



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA "PRESIDENTE JUAREZ"

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRIA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA: FISIOLÓGÍA Y GENÉTICA  
VEGETAL



**EFFECTO DEL GENOTIPO, MEDIO DE CULTIVO  
Y REGULADORES DEL CRECIMIENTO EN LA  
ANDRÓGENESIS *IN VITRO* DE ANTERAS DE  
FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L).**

## TESIS

Que como requisito para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA

León Hernando Gómez Vargas

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados

Uruapan, Michoacán, México. Noviembre de 2021.



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA "PRESIDENTE JUAREZ"

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRIA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA: FISIOLÓGÍA Y GENÉTICA  
VEGETAL



**EFFECTO DEL GENOTIPO, MEDIO DE CULTIVO  
Y REGULADORES DEL CRECIMIENTO EN LA  
ANDROGÉNESIS *IN VITRO* DE ANTERAS DE  
FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L).**

## TESIS

Que como requisito para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA

León Hernando Gómez Vargas

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados

Uruapan, Michoacán, México. Noviembre de 2021.

## **AGRADECIMIENTOS**

A MÉXICO, por brindarme una patria, educación y un hogar.

A LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, y muy especialmente a LA FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA “PRESIDENTE JUÁREZ”, por brindarme la oportunidad de ser un profesionista de las Ciencias Agrarias.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, por el patrocinio otorgado ya que, sin éste, la culminación del presente proyecto hubiera sido irrealizable.

AL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, por brindarme el espacio y herramientas para continuar mi formación profesional.

A la Dra. MARÍA DEL CARMEN ROCHA GRANADOS, por su liderazgo, respaldo, dirección y conducción académica y técnica en la elaboración de la presente investigación. También le agradezco por su confianza, paciencia y optimismo hacia mi persona, que siempre me apremiaron a continuar aún a pesar de las dificultades técnicas y burocráticas.

A los doctores: JEANNETE SOFÍA BAYUELO JIMÉNEZ, GEREMÍAS RODRIGUEZ BAUTISTA, MARÍA DEL SOCORRO SANTOS DÍAZ y NEFTALÍ OCHOA ALEJO por otorgarme su orientación, asistencia y consejos en cuestiones técnicas especializadas de difícil ejecución.

A mis asesores, los doctores: PATRICIA DELGADO VALERIO, SERGIO DAMIÁN SEGURA LEDESMA, ANA TZTZQUI CHÁVEZ BÁRCENAS y HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE, por su atención y guía en la realización de esta tesis.

A mis padres HERNÁN GÓMEZ MÉNDEZ y MARGARITA VARGAS VILLANUEVA (+) porque con su infinito amor, incondicional apoyo moral y sabiduría, plasmaron en mi un modelo de vida y constituyeron la persona que soy hoy día.

A mis hermanos DANEY MAGALI, VASCO FERNÁN y HERNAN de apellidos GÓMEZ VARGAS por su solidaridad, lealtad y compromiso de unión fraterna.

A mis abuelos JOSÉ VARGAS CHÁVEZ (+), MA. CONCEPCIÓN VILLANUEVA VARGAS (+), AGUSTÍN GÓMEZ RAMÍREZ, ESTHER CONSUELO MÉNDEZ LÓPEZ (+) y EULALIA FERMÍN NATIVIDAD, por incansablemente pugnar que hubiera agrónomos en la familia.

A mis suegros CIRILO RENDÓN FERMÍN y MA. SALUD ALCÁNTAR BARTOLO, por adoptarme cálida, afectuosa y sinceramente como un hijo más y estimular con su cariño el desarrollo de su nieto León.

A mi cuñado y su esposa: IDELFONSO EUGENIO RENDÓN ALCÁNTAR y PAOLA GABRIELA CARDOSO HUERTA por mantener, clara y abiertamente, la disposición y gentileza de ofrecer sus cortesías cuando son requeridas.

A mi cuñada ALEJANDRA GONZALEZ BASTIDA y sus hijas BRITANY y ALEXA por su afabilidad, mesura, prudencia y pronta adaptación al núcleo familiar en extenso.

A mis sobrinos VALESKA HISPANIA GÓMEZ BENÍTEZ, LUCIANA GÓMEZ, LEÓN HERNÁN GÓMEZ VARGAS, JOEL ALEXANDER RENDÓN CARDOSO y FIORELLA GÓMEZ GONZÁLEZ porque con su nobleza, curiosidad y entusiasmo, contagian de vitalidad e ímpetu renovado a todos los que nos encontramos a su alrededor.

A mi tío MARCO VINICIO VARGAS VILLANUEVA y a mi prima XITLALI YUNUEN VARGAS RAMOS, por mostrarme que las recompensas recibidas son proporcionales a los esfuerzos empleados.

A mis compañeros de estudio MC. BLANCA ROSAS ROJAS, ING. MONSERRAT ABIGAIL ROSAS ROJAS, TEC. EN LAB. CITLALI BALVINA VELÁZQUEZ MERAZ, ING. JUAN JESÚS CHURAPE MENDOZA, ING. CLAUDIA ISABEL LÓPEZ CORNEJO y BIOL. RUBÍ CONTRERAS BAILÓN por su amistad, auxilio y acompañamiento durante el tránsito por éste proceso académico.

De manera muy especial a mi esposa ERIKA IVETH RENDÓN ALCÁNTAR y a mi hijo LEÓN BASTIÁN GÓMEZ RENDÓN, por dar sentido, dirección y rumbo a mi vida; por su pasión, entrega y devoción a la familia que hemos formado; por su amor, paciencia, comprensión y alegría; por su aplomo y sinceridad; por convertirse en el pilar y motivación que me alienta a esforzarme continuamente para ser un mejor padre, esposo, y, en general, una mejor persona; por enseñarme otra visión de la existencia; por su generosa ayuda y bondadosa compañía, por significar lo máximo y hacer que cualquier esmero valga la pena; por lograr que mis días sean mejores; por eso y más ¡infinitas gracias!.

A DIOS, por darme salud y permitirme el regalo de la vida.

## DEDICATORIA

*A MARGARITA (+)*  
*Con cariño y admiración*

## INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE CUADROS.....	x
INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE.....	xii
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Producción de frambuesa.....	5
2.2. Características generales de la frambuesa.....	6
2.2.1. Botánica.....	7
2.2.2. Morfología de la flor de frambuesa.....	9
2.2.2.1. Anteras.....	9
2.3. Variedades y sus características.....	10
2.3.1. Variedades Remontantes.....	10
2.3.2. Variedades no remontantes.....	12
2.4. Mejoramiento genético.....	15
2.4.1. Métodos convencionales de mejoramiento.....	16
2.4.2. Métodos no convencionales de mejoramiento: Técnicas de cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	17
2.5. Androgénesis y cultivo de anteras.....	19
2.6. Protocolo general del cultivo de anteras.....	22
2.7. Ventajas de la inducción de androgénesis.....	24
2.8. Factores limitantes asociados a la androgénesis por cultivo de anteras.....	24
2.8.1. Estado fisiológico y condiciones de crecimiento de la planta donante....	24
2.8.2. Genotipo.....	25
2.8.3. Estado de desarrollo del polen.....	26
2.8.4. Pretratamiento.....	27
2.8.5. Esterilización y escisión de antera.....	29
2.8.6. Composición del medio.....	30

2.8.7.	Reguladores del crecimiento vegetal.....	31
2.8.8.	Condiciones del cultivo.....	33
2.8.9.	Tejido caloso.....	33
2.8.9.1.	Usos del tejido caloso.....	34
2.8.9.2.	Mantenimiento del tejido caloso.....	35
2.9.	Viabilidad celular.....	35
2.10.	Cultivo de anteras en diferentes especies.....	36
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
3.1.	Hipótesis.....	37
3.2.	Objetivos.....	37
3.2.1.	General.....	37
3.2.2.	Específicos.....	37
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4.1.	Localización del experimento.....	38
4.2.	Material genético.....	38
4.3.	Inducción de androgénesis en anteras de frambuesa.....	38
4.3.1.	Selección de la planta donante e identificación del estado de división celular propicio para inducir androgénesis.....	38
4.3.2.	Pretratamiento de inducción de estrés a bajas temperaturas.....	41
4.3.3.	Desinfección del material vegetativo.....	41
4.3.4.	Disección y establecimiento <i>in vitro</i> de anteras.....	41
4.4.	Medios de cultivo para la inducción de androgénesis y evaluación de genotipos de frambuesa.....	42
4.5.	Uso de reguladores del crecimiento para la obtención de callo.....	42
4.6.	Viabilidad celular.....	43
4.7.	Diseño experimental y análisis de datos.....	44
V.	RESULTADOS.....	47
5.1.	Identificación del estado de división celular propicio para la inducción de androgénesis en anteras de frambuesa y pretratamiento de inducción de estrés... 47	47
5.2.	Cultivo de anteras: Inducción de androgénesis.....	48



5.2.1.	Efecto del genotipo y medio de cultivo en la oxidación y supervivencia de anteras.....	48
5.2.2.	Efecto de las auxinas en la callogénesis de anteras.....	58
5.3.	Viabilidad celular.....	64
VI.	DISCUSIÓN.....	66
6.1.	Identificación del estado de división celular propicio para la inducción de androgénesis en anteras de frambuesa y pretratamiento de inducción de estrés...	66
6.2.	Efecto del genotipo y medio de cultivo en la oxidación y supervivencia de anteras.....	67
6.3.	Efecto de las auxinas en la callogénesis de anteras.....	70
6.4.	Viabilidad celular.....	73
VII.	CONCLUSIONES.....	76
VIII.	LITERATURA CITADA.....	77
IX.	APENDICE.....	92

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estados florales de frambuesa previos a la antesis.	38
2.	Estados de desarrollo del polen en frambuesa. a) microespora media (2 mm); b) microespora vacuolada (3 mm); c) microespora uninucleada (4 mm); d) polen medio (7 mm); e) polen maduro (8 mm).	47
3.	Sobrevivencia de anteras de frambuesa: AD-1 (A), Joan J (B), UMC-702 (C), V-74 (D).	49
4.	Anteras necróticas de frambuesa: genotipo AD-1 (izquierda); genotipo UMC-702 (derecha).	49
5.	Efecto de los medios de cultivo Gamborg (A) y Nitsch & Nitsch (B) en la sobrevivencia de anteras de frambuesa, genotipo AD-1.	53
6.	Efecto de los medios de cultivo Gamborg (A) y Nitsch & Nitsch (B) en la sobrevivencia de anteras de frambuesa, genotipo Joan J.	54
7.	Efecto de los medios de cultivo Gamborg (A) y Nitsch & Nitsch (B) en la sobrevivencia de anteras de frambuesa, genotipo UMC-702.	56
8.	Efecto de los medios de cultivo Gamborg (A) y Nitsch & Nitsch (B) en la sobrevivencia de anteras de frambuesa, genotipo V-74.	58
9.	Formación de callo en genotipo V-74. Izquierda, medio B5; derecha NN.	60
10.	Formación de callo en genotipo Joan J: izquierda medio B5; derecha medio NN.	60
11.	Efecto de los medios de cultivo Gamborg (A) y Nitsch & Nitsch (B) en la callogénesis de anteras. Genotipo Joan J.	62

12. Efecto de los medios de cultivo Gamborg (A) y Nitsch & Nitsch (B) en la calogénesis de anteras, genotipo V-74. 64
13. Viabilidad celular de anteras de frambuesa genotipo Joan J (A) y genotipo V-74 (B). 65

## INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Principales municipios productores de frambuesa en Michoacán.	6
2.	Variedades comerciales de frambuesa primocaña, según Weber 2013.	11
3.	Variedades comerciales de frambuesa floricaña, según Weber 2013.	13
4.	Estrategias de cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales en el mejoramiento de planta.	18
5.	Diferencias entre los tres tipos de rutas androgénicas.	21
6.	Protocolo general del cultivo de anteras.	23
7.	Tratamientos empleados en los medios de inducción de androgénesis.	43
8.	Efecto del medio de cultivo B5 en la sobrevivencia de anteras de frambuesa, genotipos AD-1, Joan J, UMC 702 y V-74.	50
9.	Efecto del medio de cultivo NN en la sobrevivencia de anteras de frambuesa, genotipos AD-1, Joan J, UMC 702 y V-74.	50
10.	Efecto del medio de cultivo NN en la oxidación de anteras de frambuesa, genotipos AD-1, Joan J, UMC 702 y V-74.	51
11.	Efecto del medio de cultivo B5 en la oxidación de anteras de frambuesa, genotipos AD-1, Joan J, UMC 702 y V-74.	51
12.	Respuesta a la inducción de callo en genotipos de frambuesa AD-1, Joan J, UMC-702 y V-74 y comparación de medias por prueba Duncan. Medio Gamborg.	59
13.	Respuesta a la inducción de callo en genotipos de frambuesa AD-1, Joan J, UMC-702 y V-74 y comparación de medias por prueba Duncan. Medio Nitsch & Nitsch.	59

- |     |   |    |
|-----|---|----|
| 14. | Efecto de reguladores del crecimiento y significancia de tratamientos en la callogénesis de anteras, medio de cultivo B5. | 61 |
| 15. | Efecto de reguladores del crecimiento y significancia de tratamientos en la callogénesis de anteras, medio de cultivo NN. | 61 |

## INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1A.	Descripción morfológica del genotipo de frambuesa V-74.	92
2A.	Composición de los medios de cultivo para la inducción de androgénesis.	97
3A.	Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo AD-1, cultivado <i>in vitro</i> en medio B5.	98
4A.	Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo AD-1, cultivado <i>in vitro</i> en medio B5.	98
5A.	Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo AD-1, cultivado <i>in vitro</i> en medio NN.	98
6A.	Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo AD-1, cultivado <i>in vitro</i> en medio NN.	99
7A.	Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo Joan J, cultivado <i>in vitro</i> en medio B5.	99
8A.	Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo Joan J, cultivado <i>in vitro</i> en medio B5.	99
9A.	Análisis de Varianza para la variable inducción de callo, genotipo Joan J, cultivado <i>in vitro</i> en medio B5.	100
10A.	Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo Joan J, cultivado <i>in vitro</i> en medio NN.	100
11A.	Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo Joan J, cultivado <i>in vitro</i> en medio NN.	100
12A.	Análisis de Varianza para la variable inducción de callo, genotipo Joan J, cultivado <i>in vitro</i> en medio NN.	101
13A.	Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo UMC-702, cultivado <i>in vitro</i> en medio B5.	101
14A.	Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo UMC-702, cultivado <i>in vitro</i> en medio B5.	101

15A.	Análisis de Varianza para la variable supervivencia, genotipo UMC-702, cultivado <i>in vitro</i> en medio NN.	102
16A.	Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo UMC-702, cultivado <i>in vitro</i> en medio NN.	102
17A.	Análisis de Varianza para la variable supervivencia, genotipo V-74, cultivado <i>in vitro</i> en medio B5.	102
18A.	Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo V-74, cultivado <i>in vitro</i> en medio B5.	103
19A.	Análisis de Varianza para la variable inducción de callo, genotipo V-74, cultivado <i>in vitro</i> en medio B5.	103
20A.	Análisis de Varianza para la variable supervivencia, genotipo V-74, cultivado <i>in vitro</i> en medio NN.	103
21A.	Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo V-74, cultivado <i>in vitro</i> en medio NN.	104
22A.	Análisis de Varianza para la variable inducción de callo, genotipo V-74, cultivado <i>in vitro</i> en medio NN.	104

## RESUMEN

La frambuesa (*Rubus idaeus* L.) es una frutilla ampliamente distribuida y apreciada alrededor del mundo. Recientemente, su consumo ha ido en aumento debido a los beneficios que a la salud humana atrae por su alto contenido en compuestos bioactivos. Sin embargo, la producción en México, ha significado un reto ya que se cuenta con pocos cultivares propios adaptados a las condiciones climáticas locales. Por tal razón, el cultivo de anteras se ha propuesto como una alternativa en la obtención de variedades nacionales, ya que permite desarrollar plantas homocigóticas en poco tiempo. Para ello, anteras de frambuesa de dos genotipos comerciales (AD-1 y Joan J) y dos genotipos obtenidos en la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" (UMC-702 y V-74), pretratadas en frío (4 °C) durante una semana, fueron sembradas *in vitro* en dos medios de cultivo (Gamborg y NN), suplementados con reguladores del crecimiento vegetal (2,4-D y ANA) para inducir androgénesis y mantenidos en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente y fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Los resultados muestran que la sobrevivencia, oxidación y formación de callo fueron influenciados por el medio de cultivo y el genotipo. En el medio de cultivo Gamborg se observó un índice de sobrevivencia de hasta un 85 %, mientras que en el medio Nitsch & Nitsch un índice de solo un 8.05 %. Respecto a la formación de callo, sólo los genotipos Joan J y V-74 mostraron inducción androgénica, con una tasa de eficiencia de 3.3 % y 2.7 % respectivamente. La dosis de reguladores requeridos para conseguir la formación de callo se logró al combinar 0.4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 0.4 mg L<sup>-1</sup> de ANA, en el medio Gamborg. Además, mediante tinción celular con Azul de Evan, se demostró que los callos obtenidos de anteras de frambuesa son viables. En el genotipo Joan J se observó viabilidad de callo en un 90 % mientras que en el genotipo V-74 en un 95 %.

**Palabras clave:** microesporas, auxinas, callogénesis, viabilidad.



## SUMMARY

Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) is a widespread berry round world, appreciated for its flavour and their benefits to human health by their high contents in bioactive compounds. Nevertheless, in Mexico, raspberry production means a major challenge, because of the scarce of local varieties, adapted to typical climate conditions. Therefore, anther culture is a strategy proposed to achieve such an objective: to develop a Mexico's cultivar. Anther culture is widely used worldwide as one of the most advantageous techniques to reach homozygous plants in relatively short term, because abbreviation of breeding cycles is possible. For this purpose, anthers extracted from raspberry floral buds, were cold pre-treated (4 °C for 7 days) and then placed on two different induction culture media (Gamborg and Nitsch & Nitsch), supplemented with plant growth regulators (2,4-D and NAA) at several doses. After 8 weeks of cultivation, in completely dark conditions at 24 °C and 16 h of photoperiod, the effect of culture media and genotype was evaluated. It is shown in experiments that survival, oxidation and callus formation rates, varied from medium to medium and from genotype to genotype. Callus induction was observed only in two genotypes: Joan J and V-74, respectively 3.3 % and 2.7 % of callogenesis rates; but Gamborg induction medium had better performance than Nitsch & Nitsch medium: Gamborg reach a percentage of 89% of survival rate while Nitsch & Nitsch a percentage of 8.50 %. The best PGR combination, was achieved when Gamborg induction medium was supplemented with 0.4 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D and 0.4 mg L<sup>-1</sup> of NAA. Therefore, apparently genotype seems to be the most important factor affecting raspberry anther culture. In order to determine cell viability in raspberry calli, Evan's Blue assay was performed. Genotype Joan J reached a 90 % of viability while genotype V-74 reached a 95 % of viability.

## I. INTRODUCCIÓN

La frambuesa es un cultivo que recientemente ha incrementado en producción y consumo a nivel mundial (Anders-Stavang *et al.*, 2015) generando gran interés para empresas comerciales e institutos como objeto de investigación (Dosset y Kempler, 2012). Mazur *et al.* (2014), señalan que este incremento, se ha visto asociado a los posibles beneficios que su consumo atrae a la salud humana debido al alto contenido en compuestos bioactivos (antocianinas, compuestos fenólicos y elagitanas), y nutrientes (minerales, vitaminas, carotenoides y ácidos orgánicos). El alto contenido en estas propiedades contribuye a una alta actividad antioxidante, previniendo enfermedades crónicas y distintas formas de cáncer, además es un fruto muy apreciado por el aromático sabor (Krüger *et al.*, 2011). Estos atributos han permitido que el consumo de la frutilla, se haya ampliado a una variedad de productos tales como gelatinas, yogures, jaleas o mermeladas, dulces y agua (Yazdanpour *et al.*, 2018).

En México, el consumo y producción de esta frutilla también ha ido en aumento, principalmente para su exportación (Hernández-Bautista *et al.*, 2017). Según fuentes oficiales, tan sólo en 2016 la industria de frutillas generó un ingreso aproximado por 25,422 millones de pesos (SIAP 2016). Así, para la economía nacional, éste sector se convirtió en una división altamente productiva y competitiva en el panorama del comercio internacional, y hacia 2017, se posicionó mundialmente como segundo país exportador (SAGARPA, 2017). Sin embargo, las condiciones del cultivo de frambuesa dentro del territorio, no son las más favorables ya que 1) hay carencia de variedades propias; 2) existe un deficiente manejo de las plantas desde origen hasta su establecimiento, y 3) las plantas son sometidas a diferentes estreses abióticos, en consecuencia, se demerita la calidad de las mismas repercutiendo en la obtención de bajos rendimientos y corta vida de anaquel.

Debido a las razones expuestas, se han explorado nuevas estrategias en los programas de mejoramiento, centrándose en la selección de variedades mejor adaptadas a las condiciones climáticas locales (Piotr *et al.*, 2014).

Una herramienta que están implementando los genetistas, es el cultivo de tejidos vegetales porque permite a los investigadores estudiar procesos morfogénéticos bajo condiciones controladas y acelerar los procesos de fitomejoramiento. Dentro de las distintas técnicas, se encuentra el cultivo de anteras y polen. Ésta técnica ha cobrado importancia porque permite desarrollar líneas homocigóticas para la producción de híbridos en especies, en un periodo relativamente corto de tiempo (Pérez *et al.*, 1995). Desde su descubrimiento hasta nuestros días, la generación de haploides se ha hecho de manera exitosa en muchas especies como trigo, triticale, maíz, arroz, cítricos, ornamentales, entre otros, sin embargo, al momento no hay un protocolo probado y validado en especies del género *Rubus*.

De esta manera, el cultivo de anteras se propone como una opción para la obtención de un protocolo eficiente que permita la generación de callos organogénicos viables para la generación de haploides en frambuesa. Tal herramienta complementará los programas de mejoramiento, impulsando el desarrollo de nuevos materiales que confieran características agronómicas deseables en los genotipos de interés para la producción nacional.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Producción de frambuesa

La frambuesa se produce en alrededor de 39 países en el mundo y existen aproximadamente 127,578 ha sembradas con una producción que asciende a las 822,493 t. Con un total de 398,844.46 t, Europa aporta la mayor cantidad de hectáreas cosechadas, seguido de América (131,044.81 ha), Asia (1.7 ha), Oceanía (0.2 ha) y África (0.1 ha) (FAOSTAT, 2019).

Más de la mitad de la frambuesa roja proviene de países como Rusia, Ucrania, Alemania, Francia, Hungría, Reino Unido y España, sin embargo, también ha habido un creciente interés en la frambuesa negra, púrpura o ártica mismas que son cultivadas en Oregon, Sur Korea y Escandinavia. México cuenta con una superficie de 7,000 ha sembradas de frambuesa por las cuales obtuvo una cosecha de 129,000 t (SIAP, 2020) y aunque como productor el país ocupa el ranking número 6, por debajo de Rusia, Serbia, Polonia, EUA y Serbia y Montenegro (FAOSTAT, 2019), con 18.3 t ha (SIAP, 2020) es la nación que obtiene los mayores rendimientos (SIAP, 2017).

Los principales estados productores de frambuesa son Jalisco, Michoacán, Baja California, Guanajuato, Puebla, México, Colima y Ciudad de México (SIAP, 2019; SIAP, 2020). En Michoacán, los municipios dedicados al negocio de la frambuesa son Zamora, Tangancícuaro, Jacona, Peribán, Los Reyes, Tangamandapio, Ixtlán, Salvador Escalante e Irimbo (Cuadro 1). Juntos suman una superficie total en el estado de 1,222 ha sembradas, con un rendimiento promedio de 14 t ha (SIAP, 2021).

Cuadro 1. Principales municipios productores de frambuesa en Michoacán

Rank	Municipio	Superficie Sembrada (ha)	Superficie Cosechada (ha)	Superficie Siniestrada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)
1	Zamora	543.00	543.00	0.00	14,118.00	26.00
2	Tangancicuaro	188.00	188.00	0.00	5,076.00	27.00
3	Jacona	161.00	161.00	0.00	4,186.00	26.00
4	Los Reyes	134.00	134.00	0.00	3,028.40	22.60
5	Peribán	53.00	53.00	0.00	1,166.00	22.00
6	Tangamandapio	40.15	40.15	0.00	441.00	11.00
7	Ixtlán	41.00	41.00	0.00	1,066.00	26.00
8	Salvador E.	12.00	12.00	0.00	234.00	19.50
9	Irimbo	2.00	2.00	0.00	21.00	10.50
	Total	1174.15	1174.15	0.00	29,336	18.66

## 2.2. Características generales de la frambuesa

Se cree que el cultivo de la frambuesa tiene su centro de diversidad en China (Graham y Brennan, 2018), sin embargo, Foster *et al.* (2019), señalan que el frambueso es originario del Monte de Ida, en la Isla de Creta, de donde Linneo tomó el nombre para identificar a la especie. Existe, también, evidencia por excavaciones arqueológicas, que la frambuesa fue distribuida a Europa por los romanos quienes la llevaron desde Turquía (Kempner y Hall, 2013).

Aunque algunos señalan que la historia del cultivo de frambueso tiene una antigüedad aproximada de unos 8,000 años A.C. (Jennings, 2018), una domesticación como tal es atribuible a un pasado más reciente. Para la mitad del siglo XVI aparecieron formas cultivadas de la frambuesa, aunque no fue sino hasta finales del siglo XVIII que se reportaron algunas variedades. El cultivo controlado de la frambuesa comenzó hacia los años 1920's y se incrementó hasta alcanzar un acervo de aproximadamente 100 nuevos cultivares liberados entre 1981 y 2001 (Graham y Brennan, 2018).

Las frambuesas son frutillas convexas, rugosas; su forma se parece a la de la piña y destacan fácilmente por su color; el más común es el rojo y el amarillo. Cada fruto tiene adherido un pelo de color amarillo oro. Su crecimiento es en forma de arbusto de tallo

subterráneo, corto, que genera cada año ramas aéreas (vástagos) de dos años de duración. Estos se desarrollan durante el primer año y en el segundo florecen y fructifican para morir inmediatamente siendo reemplazados por otros nuevos (SIAP, 2016).

Es una planta que se reproduce por medio de la generación de nuevos brotes a partir de las yemas, raíces y estolones; es decir, la propagación es a través de hijuelos con raíces o con trozos de estas. Por división de mata, consiste en arrancar rebrotes del año con raíces y trasplantarlos directamente al terreno definitivo; para ello, se eligen los tallos medios. Estos brotes se pueden obtener de la misma plantación eligiendo los tallos que se apartan de los pies o los que están en exceso (SIAP, 2017).

### **2.2.1. botánica**

Las frambuesas pertenecen al género *Rubus* dentro de la familia Rosaceae. Ésta es una familia que sobresale debido a que cuenta con más de 130 géneros; entre ellos se cuenta a *Cydonia*, *Eriobotrya*, *Fragaria*, *Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Rosa* y *Rubus*. Entre éstos se reparten alrededor de 2,000 a 2,500 especies aceptadas. Dichas especies se encuentran en todo el mundo, aunque son originarias principalmente de regiones templadas y subtropicales e incluye géneros con características muy heterogéneas, sin embargo, la característica más importante es la presencia de un tálamo o receptáculo floral muy desarrollado (SAGARPA, 2017).

El género *Rubus* comprende una amplia y diversa serie de aproximadamente 700 especies con número de cromosoma  $n = 7$  y niveles de ploidia que van desde diploide hasta dodecaploide. Las especies domesticadas de frutillas comercialmente importantes, están divididas en dos subgéneros: *Idaeobatus* y *Eubatus*. *Idaeobatus* incluye a la frambuesa roja Europea *R. idaeus* L. subsp. *Idaeus*, a la frambuesa roja Norteamericana *R. idaeus* subsp. *strigosus* Michx. y a la frambuesa negra *R. occidentalis* L. Éstas especies están principalmente distribuidas en el norte de Asia, pero también se encuentran en Sur África, Europa, Australia y Norteamérica. Una

característica que sobresale de éste subgénero es la propiedad de poder desprenderse del receptáculo, una vez que han sido cortadas, además, casi todas las frambuesas son especies diploides, y, solo en algunos casos, hay variación en el número cromosómico – triploides o tetraploides. (Graham y Brennan, 2018)

El género *Eubatus*, en contraste, contiene una genética considerablemente más compleja, pues contiene niveles de ploidía más diverso. Distribuido principalmente en Sur América, Europa y Norte América, engloba a las especies conocidas de zarzamora (Graham y Brennan, 2018).

Botánicamente, frambuesas y zarzamoras son separadas unas de otras dependiendo si el receptáculo permanece o no adherido a la flor, una vez que han sido desprendidos de la misma. En el caso de la frambuesa el receptáculo es el que se desprende (Jennings, 2018).

De acuerdo a Lechowics *et al.* (2020) su clasificación taxonómica es la siguiente:

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Rosales
<b>Familia:</b>	Rosaceae
<b>Subfamilia:</b>	Rosoidae
<b>Tribu:</b>	Rubeae
<b>Género:</b>	<i>Rubus</i>
<b>Subgénero</b>	<i>R.</i> <i>subg.</i> <i>Idaeobatus</i>
<b>Especie</b>	<i>Rubus idaeus</i> L.

Otras especies cultivadas según Hammer y Hall (2013) son:

- *R. strigosus* (Frambueso silvestre);
- *R. occidentalis* (Frambueso negro);
- *R. neglectus* (Frambueso morado o púrpura).

### **2.2.2. Morfología de la flor de frambuesa**

La flor de la frambuesa tiene corola compuesta por 5 sépalos, 5 pétalos de color blanco, caducos y poco vistosos, y está provista de un grueso cáliz de color verdoso, en forma de estrella que permanece soldado al receptáculo floral. El androceo está formado por una cincuentena de estambres y el gineceo por numerosos pistilos (60-100), con estilo de color verde, dispuesto sobre un receptáculo de forma cónica (Paglietta, 1986). Muchos ovarios se desarrollan dentro de una drupela y el agregado de frutos se compone de drupelas individuales unidas por pelos casi invisibles, lo cual da forma a una mora (Graham y Brennan, 2018).

#### **2.2.2.1. Anteras**

Las anteras son las partes especiales del estambre donde se lleva a cabo la producción de microesporas o polen. Generalmente, las anteras constan de dos lóbulos longitudinales, unidos por una banda de tejido. Cada lóbulo tiene dos sacos polínicos dentro de los cuales se producen los granos de polen. Cada microespora contiene un núcleo haploide, el cual pronto se divide en núcleo generativo y núcleo del tubo. Mientras esto sucede, se forma alrededor de la microespora una pared gruesa ornamentada y forman los granos de polen maduros. Antes de la distribución del polen, se rompe el tejido que separa a los dos sacos polínicos en cada lóbulo de la antera por medio de una ranura en la pared de cada lóbulo. Se separan las orillas de la ranura y el polen escapa a través de la abertura formada (Robbins *et al.*, 1979; Nabors, 2006).



## 2.3. Variedades y sus características

Entre las especies del género *Rubus* se han realizado hibridaciones, encontrándose en el mercado mundial más de 100 variedades comerciales aptas para cultivos destinados a la exportación en fresco y procesado (ASAGRIN, 2007).

### 2.3.1. Variedades Remontantes

También conocidas como primocaña o re-florecentes. Estas variedades se caracterizan por tener dos floraciones en el mismo año agrícola (Cuadro 2). En primavera emiten flores en las ramas laterales de la caña del segundo año que fructifican en marzo-abril, y en octubre-noviembre desarrollan nuevas flores sobre las ramas terminales o en las laterales de los retoños o tallos de primer año, fructificando a fines de diciembre (Bascopé, 2013). Ésta fructificación puede ser de mayor o menor importancia que la de verano, según sean las condiciones del clima y la variedad; es muy escalonada y dura dos o más meses (Morales-Alcayaga, 2009).

Algunos representantes de estas variedades son:

**Heritage:** Planta vigorosa con gran número de espinas y productiva, con tallos erectos que le permiten incluso cultivarse sin tutores para una sola cosecha al año. Los frutos, de forma cónica, son de tamaño medio con peso promedio de 2.2 g de color rojo brillante, firmes y de excelente calidad para mesa, de buena consistencia y dulzor, registrando 12.8° Brix de sólidos solubles y 2.2 % de acidez. La fruta de la primera cosecha (noviembre-diciembre), es decir, de la producción en primocaña, es de inferior calidad que la proveniente del hijuelo, ésta última es altamente atractiva para producción de fruta en los hijuelos dirigida al mercado fresco (San-Martín, 2013).

**Autumn Bliss:** planta vigorosa con espinas color púrpura, altamente productiva que madura 14 días antes que Heritage. Su fruto tiene muy baja firmeza, y presenta un peso promedio de 2.7 g, de forma cónica, color rojo intenso y brillante con drupelos

grandes, de mejor sabor que Heritage. El fruto se encuentra fuertemente adherido al receptáculo, lo cual dificulta la cosecha (Bascopé, 2013).

**Ruby:** Planta vigorosa con altos niveles de productividad, con cañas sin espinas, con abundante producción de hijuelos. Su fruta es de forma cónica alargada, con alta firmeza, peso promedio de 3.2 g. de color rojo brillante de consistencia mediana y de buen sabor. La maduración del fruto es irregular, y, además, presenta una alta adhesión al receptáculo, lo que al momento de la cosecha afecta fuertemente la calidad (Morales-Alcayaga, 2009).

Cuadro 2. Variedades comerciales de frambuesa primocaña, según Weber 2013.

Nombre de la variedad	Origen	Año de lanzamiento	Patente / Derecho varietal por planta	Uso primario	Fortalezas	Debilidades
Amira	Berryplant, Verona, Italy	2009	PVR	Fresco	Firme y buena vida de anaquel	Bajo rendimiento
Autumn Bliss	EMR UK	1984	PP # 6597, expirada	Fresco / proceso	Alto vigor, fruta larga	Fruta suave y oscura
Caroline	Universidad de Arizona, EUA	1999	PP #10412	Fresco / proceso	Alta calidad, resistencia a enfermedades	Excesivamente vigorosa
Chinook	USDA-ARS, Oregon, EUA	2002	Ninguna	Fresco	Producción temprana, fruta grande	Tolerancia al frío cuestionable
Elegance	Plant Science Inc., California, EUA	2009	PP# 21685	Fresco	Fruta firme y brillante, excelente sabor	No disponible públicamente

Erika	Centro Di Ricerca per la Frutticoltura, Roma, Italia	2008	PP# 20841 PVR	Fresco	Fruta grande y firme, buen sabor y color	No disponible públicamente
Grandeur	Plant Sciences Inc., California, EUA	2008	PP# 20459	Fresco	Fruta firme y brillante, excelente sabor	No públicamente disponible
Heritage	Cornell University, Nueva York, EUA	1969	Ninguna	Fresco y proceso	Muy adaptable, cañas erectas	Tamaño pequeño, sabor regular
Joan J	Medway fruits, UK	2002	PVR	Fresco	Muy productiva, sin espinas	Rojo oscuro, firmeza excesiva
Josephine	Universidad de Maryland, EUA	2001	PP# 12173	Fresco	Producción tardía, sabor excelente	Fruta rojo oscuro
Pacific Delux	Pacific Berry Breeding, California, EUA	2008	PP# 21074 propietario	Fresco	Color brillante, excelente vida de anaquel, resistente a pudrición de raíz	No públicamente disponible

PVR: Plant Variety Rights, para su uso en Canadá, Europa y Sudáfrica en forma similar a las patentes vegetales en EUA.

### 2.3.2. Variedades no remontantes

Conocidas a su vez como floricañas o florecientes. Se desarrollan vegetativamente durante el primer año, constituyendo el llamado retoño (Cuadro 3). Los racimos florales se forman solamente al comienzo de la época de producción sobre las ramas laterales de las ramas lignificadas de dos años, la que muere después de fructificar. La fructificación es escalonada y puede durar entre 15 y 45 días, según la variedad y

condiciones climáticas. Un periodo húmedo y caluroso acelera la maduración de los frutos y obliga a cosechas diarias. En condiciones más frías y secas, la cosecha puede realizarse cada dos días (Dosset y Kempler, 2016).

Algunos representantes de estas variedades son:

**Meeker:** Destinadas a proceso, especialmente congelado; más tardía que otras y con un largo periodo de cosecha, que abarca prácticamente todo el mes de diciembre y casi por completo enero, con producciones mayores a las 12 toneladas por hectárea (San-Martín, 2013).

**Tulameen:** al igual que la anterior, destinada al consumo fresco y procesado, de buenas características organolépticas y firmeza de la fruta; la producción se concentra en el mes de diciembre y un poco más productiva que la anterior, con una media de 7,7 toneladas por hectárea. Otras variedades nuevas de este grupo son Coho, Glen Lyon y Glen Ample, entre otras (Morales-Alcayaga, 2009).

Cuadro 3. Variedades comerciales de frambuesa floricaña, según Weber 2013.

Nombre de la variedad	Origen	Año de lanzamiento	Patente / Derecho varietal por planta	Uso primario	Fortalezas	Debilidades
Adele o Adelita	Instituto de plantas y alimentos de Nueva Zelanda	2006	PP # 20773	Fresco	Fruta grande, de color rojo brillante	Necesita de mayor firmeza
Boyne	Granja experimental moderna de	1960	Ninguna	Fresco	Producción temprana, tolerancia al frío	Fruta pequeña y suave. Susceptible

Canby	Manitoba, Canadá USDA-ARS Oregon, EUA	1953	Ninguna	Fresco	Excelente calidad de consumo, funcionalmente sin espinas	al fuego bacteriano Susceptible al frío, phytophthora y mildiú polvoriento
Cascade néctar	Universidad Estatad de Washington, EUA	2003	Ninguna	Proceso	De excelente sabor, apta para vinos	Fruto oscuro y suave; susceptible al RBVD y áfidos
Glen Ample	SCRI, UK	1994	PVR / PP # 11418	Fresco	Fruto grande y firme	Color pálido, susceptible a phytophthora y al frío
Killarney	Granja experimental moderna de Manitoba, Canadá	1961	Ninguna	Fresco	Producción temprana, tolerante a frío y color rojo y brillante	Fruto pequeño y suave
Latham	Universidad de Minnesota	1912	Ninguna	Fresco	Resistente a la pudrición de raíz por phytophthora	Fruto pequeño y suave
Meeker	Universidad Estatad de Washington, EUA	1967	Ninguna	Proceso	Mucho color, cosecha a máquina	Susceptible a pudrición de raíz por phytophthora y RBVD
Tulameen	PARC, Agriculture Agri-food Canada, British Columbia	1989	Ninguna	Fresco	Producción tardía, producto de gran calidad	Poco vigor vegetal, susceptible a frío y a phytophthora

Willamette	USDA-ARS Oregon, EUA	1943	Ninguna	Proceso	Resistente a RBDV, cosecha a máquina	Rendimiento promedio
------------	----------------------------	------	---------	---------	---	-------------------------

---

PVR: Plant Variety Rights, para su uso en Canadá, Europa y Sudáfrica en forma similar a las patentes vegetales en EUA.

En México, una de las variedades más usadas es Heritage. Sin embargo, el uso de variedades por parte de productores depende de las empresas con que se efectúen relaciones comerciales puesto que son ellos, en muchos casos, quienes proveen de las plantas y aseguran contratos de exclusividad (Bascopé, 2013).

Otras variedades usadas son Summit, Joe's Baby, Mailling, Exploid, Anita, Autumn Bliss y Blazer (Kempler y Hall, 2013).

#### **2.4. Mejoramiento genético**

La manipulación por el hombre para mejorar ciertos aspectos de las plantas en el desempeño de nuevas funciones o la optimización de las existentes, es lo que se conoce como "fitomejoramiento o mejoramiento vegetal" (Acquaah, 2012). El mismo, tuvo sus inicios cuando el humano, basándose en la selección, descubrió que podía cultivar plantas para beneficio propio, hace aproximadamente 13,000 años. Actualmente, se estima que unas 2500 especies, comprendidas en poco más o menos 160 familias, han sido domesticadas (Bradshaw, 2017).

El fitomejoramiento usualmente se asemeja al proceso evolutivo, sin embargo, la diferencia clave, entre uno y otro, radica en que el primero es exclusivamente logrado a través de la intervención del hombre (proceso artificial) y es relativamente rápido, mientras que el segundo es un proceso natural, extremadamente largo en el que la meta es incrementar la adaptabilidad de las especies. El fitomejoramiento, sólo pretende lograr propósitos, específicos, previamente concebidos (Acquaah, 2015).

Usualmente, el principal objetivo de los programas de fitomejoramiento es desarrollar variedades que estén especialmente adaptadas a una región característica con climas diversos, en tal sentido, los híbridos deben tener características superiores que puedan resolver desventajas ecológicas y defectos en cualquier área cultivable (Uz-Zaman *et al.*, 2018). Por ello el mejoramiento de plantas se ha enfocado ampliamente en mejorar rendimiento, calidad, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a estrés biótico y abiótico, eficiencia en el uso de nutrientes y eficiencia en el uso del agua (Gosal y Wani, 2018).

Hoy en día los procedimientos van desde los métodos simples de selección hasta la selección indirecta de caracteres a través de marcadores moleculares. No obstante, éstos métodos, además de diferir en costo y eficiencia genética, dependen de las condiciones locales y también del conocimiento detallado de las fuentes más útiles silvestres y cultivadas con mayor diversidad genética para ser usadas en estudios genéticos y genómicos (Mezzetti, 2013). Por lo tanto, alguien que se adentre en la mejora de especies vegetales, debe tener en mente un objetivo claro a conseguir (Bos y Caligari, 2008).

#### **2.4.1. Métodos convencionales de mejoramiento**

El desarrollo de nuevos cultivares usando técnicas tradicionales de manipulación del genoma vegetal y procesos naturales, es lo que se define como mejoramiento convencional. En este tipo de fitomejoramiento, los genetistas, a través de la selección artificial, tratan de trasladar características deseables de una planta a otra, cercanamente relacionadas, usando técnicas de cruzamientos. (Acquaah, 2015).

Para lograr tal fin, los genetistas siguen métodos estándar para crear variabilidad y discriminar entre la variabilidad (Acquaah, 2012); sin embargo, tienden a enfocarse en características de naturaleza diploide o comportamiento diploide por su simplicidad genética, en lugar de elegir cultivos poliploides; por ello se prefiere el uso de cultivos de ciclo reproductivo corto, que permitan la producción de varias generaciones en un

solo año dando lugar a la rápida producción del genotipo deseado a diferencia de cultivos anuales o perenes que pueden reproducirse sólo una vez al año o unas cuantas veces cada ciertos años (Ahmar *et al.*, 2020).

Los métodos de mejoramiento genético, aunque generalmente se basan en la selección, dependen de la naturaleza reproductiva de la planta: autopolinización, polinización cruzada y clonación (Acquaah, 2012).

#### **2.4.2. Métodos no convencionales de mejoramiento: Técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales**

La biotecnología es indispensable para el mejoramiento genético de los cultivos vegetales. Gracias a ella la agricultura ha sido revolucionada, pues se han introducido, en menor tiempo que en el mejoramiento clásico, organismos genéticamente modificados que proveen mayores rendimientos, incrementos nutritivos y resistencias a diversos factores bióticos y abióticos, lo cual, a la vez, reduce el costo medioambiental que el uso de plaguicidas y herbicidas acarrea a los ecosistemas (Klug *et al.*, 2006). Es importante mencionar que el uso de métodos biotecnológicos, asiste y no sustituye, al proceso de mejora genética convencional de plantas, con herramientas prácticas que incorporan genes para aumentar la variabilidad genética (Finn, *et al.*, 2008).

Las técnicas biotecnológicas comúnmente empleadas en la actualidad son biobalística, cultivo de tejidos vegetales y marcadores moleculares (Uz-Zaman *et al.*, 2018).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, basado en el concepto de la totipotencia, es un compendio de técnicas para desarrollar células, órganos y tejidos vegetales a partir de la siembra de distintos tipos de explantes (raíces, hipocotilos, cotiledones, hojas, segmentos nodales, ápices, inflorescencias, anteras, polen, embriones) en medios de cultivo sintéticos bajo condiciones asépticas controladas. Tal manipulación ha



permitido lograr la rápida multiplicación de plantas y el cruce a nivel somático, superando así las habilidades limitadas de entrecruzamiento entre especies y la regeneración de plántulas después de la modificación genética, ofreciendo así un rico panorama para la creación, conservación y utilización de la variabilidad genética en vegetales propagados sexual o asexualmente (Gosal y Wani, 2018).

Las estrategias usualmente empleadas en el cultivo de tejidos vegetales son: micropropagación, cultivo de meristemos, microinjertos, embriogénesis somática, variación somaclonal, producción *in vitro* de haploides, cultivo de embriones, óvulos y ovarios, cultivo de protoplastos, producción *in vitro* de metabolitos secundarios, criopreservación y almacenamiento *in vitro* de germoplasma y la transformación genética (Cuadro 4) (Uz-Zaman *et al.*, 2018).

Cuadro 4. Estrategias de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en el mejoramiento de plantas.

Estrategia	Aplicación
1. Micropropagación	Rápida multiplicación en masa de plantas
2. Cultivo de meristemos	Producción de material vegetativo libre de enfermedades
3. Microinjertos	Producción de injertos hortícolas libres de enfermedades
4. Embriogénesis somática	Clonación en masa de plantas y producción de semillas sintéticas
5. Variación somaclonal	Inducción de variación genética para selección de nuevos clones y variedades
6. Producción <i>in vitro</i> de haploides	Producción de haploides y doble haploides para un rápido mejoramiento genético

7. Cultivo de embriones/óvulos/Ovarios	Producción de híbridos distantes/transferencia de genes extraños en variedades cultivadas y producción de haploides
8. Cultivo de protoplastos	Producción de híbridos somáticos, cíbridos y plantas transgénicas
9. Transformación genética	Producción de cultivos transgénicos, variedades e híbridos.

---

## 2.5. Androgénesis y cultivo de anteras

La androgénesis es definida como el desarrollo de embriones e individuos haploides o doble haploides cuyo genoma es formado a partir de un gametofito o núcleo enteramente masculino (Seguí-Simarro y Nuez, 2008; Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2012).

El primer haploide observado naturalmente fue *Datura stramonium* L. en 1921, por Bergner y reportado al año siguiente por Blakeslee y colaboradores (1922), Desde entonces, se vislumbró el empleo de haploides en el mejoramiento genético, pero no fue sino hasta la década de los sesentas que pudo darse una aplicación práctica a tal hallazgo, debido a que, de manera espontánea, los haploides ocurren a muy baja frecuencia como para ser usados en programas de mejoramiento genético (Germana, 2011).

Guha y Maheshwari (1964) advirtieron que podían obtenerse plántulas con número haploide a partir de técnicas de cultivo *in vitro*. Tales investigadores sembraron anteras inmaduras de *Datura inoxia* en medios de cultivo y con ello fue posible cambiar el desarrollo normal gametofítico a uno esporofítico (Tripathy, 2019).

El desarrollo de haploides y dobles haploides, está basado en el conocimiento de que las plantas, tienen la capacidad de expresar fielmente cualquier parte de su código genético. Esta sobresaliente característica, denominada totipotencia, permite a cualquier célula diferenciada, desdiferenciarse y reprogramarse en un patrón de crecimiento proliferativo (Seguí-Simarro, 2010).

Haploides y doble haploides, indistintamente, pueden obtenerse a través de vías distintas que implican a gametofitos de ambos tipos: femeninos y masculinos. Cuando el proceso se desarrolla a través de gametofitos masculinos (anteras y polen), se denomina “androgénesis”; cuando los gametofitos son femeninos (óvulos) se denomina “ginogénesis” (Roca y Mroginsky, 1993).

Seguí-Simarro (2010), señala que el proceso androgénico puede ser logrado a través de tres rutas distintas (Cuadro 5):

- 1) ***In vivo* por embriogénesis en el saco embrionario:** vía extremadamente rara en la naturaleza, ligada a la fertilización, en la que un embrión haploide o doble haploide surge de manera espontánea a partir de una célula huevo fecundada para luego inactivar o eliminar el material genético de origen femenino.
- 2) ***In vitro* por embriogénesis de microesporas (polen):** microesporas en estado vacuolado, son desviadas de su ruta original de desarrollo hacia la embriogénesis. Usualmente, la antera completa es el material vegetal empleado para lograr la embriogénesis de microesporas, no obstante, otras investigaciones señalan que es posible aislar directamente el polen para inocularlo en un medio líquido y así lograr el mismo objetivo.
- 3) ***In vitro* por callogénesis derivada de meiocitos:** ésta es una ruta menos frecuente y rara, en la cual haploides y dobles haploides pueden obtenerse por post-recombinación de meiocitos. Bajo condiciones específicas *in vitro*, se puede inducir callo en los meiocitos para posteriormente seguir una de dos vías: embriogénesis u organogénesis.

Cuadro 5. Diferencias entre los tres tipos de rutas androgénicas.

	<b>Ruta 1: haploidía, maculino- proveniente, por embriogénesis de un huevo fertilizado</b>	<b>Ruta 2: embriogénesis de microespora (cultivo de anteras o cultivo de microespora aislada)</b>	<b>Ruta 3: callogénesis meiocito- proveniente</b>
<b>Programa desviado</b>	Embriogénesis cigótica	Microesporogénesis	
<b>Programa disparado</b>	Embriogénesis haploide	Embriogénesis haploide/Callogénesis	Callogénesis
<b>Ocurrencia</b>	Natural	Microespora vacuolada – polen joven	Meiocito de la metafase I a la telofase II
<b>Dependencia genotípica</b>	Alta	Alta	Alta
<b>Inducción de estrés</b>	No necesaria	Esencial	Relativa
<b>Necesidad de hormonas</b>	No necesaria	Relativa	Esencial
<b>Aplicación práctica</b>	Nula	Alta	Baja
<b>Casos documentados</b>	Pocos	Muchos	Pocos

La androgénesis, mediante el cultivo de anteras, es una técnica, *in vitro*, suplementaria para el mejoramiento en numerosas especies (Texeira Da Silva, 2015), que, por su facilidad de empleo y posibilidad de cultivar grandes cantidades de anteras por aislamiento, resulta una estrategia ventajosa a utilizar (Parra-Vega *et al.*, 2013; Parra-Vega *et al.*, 2016).

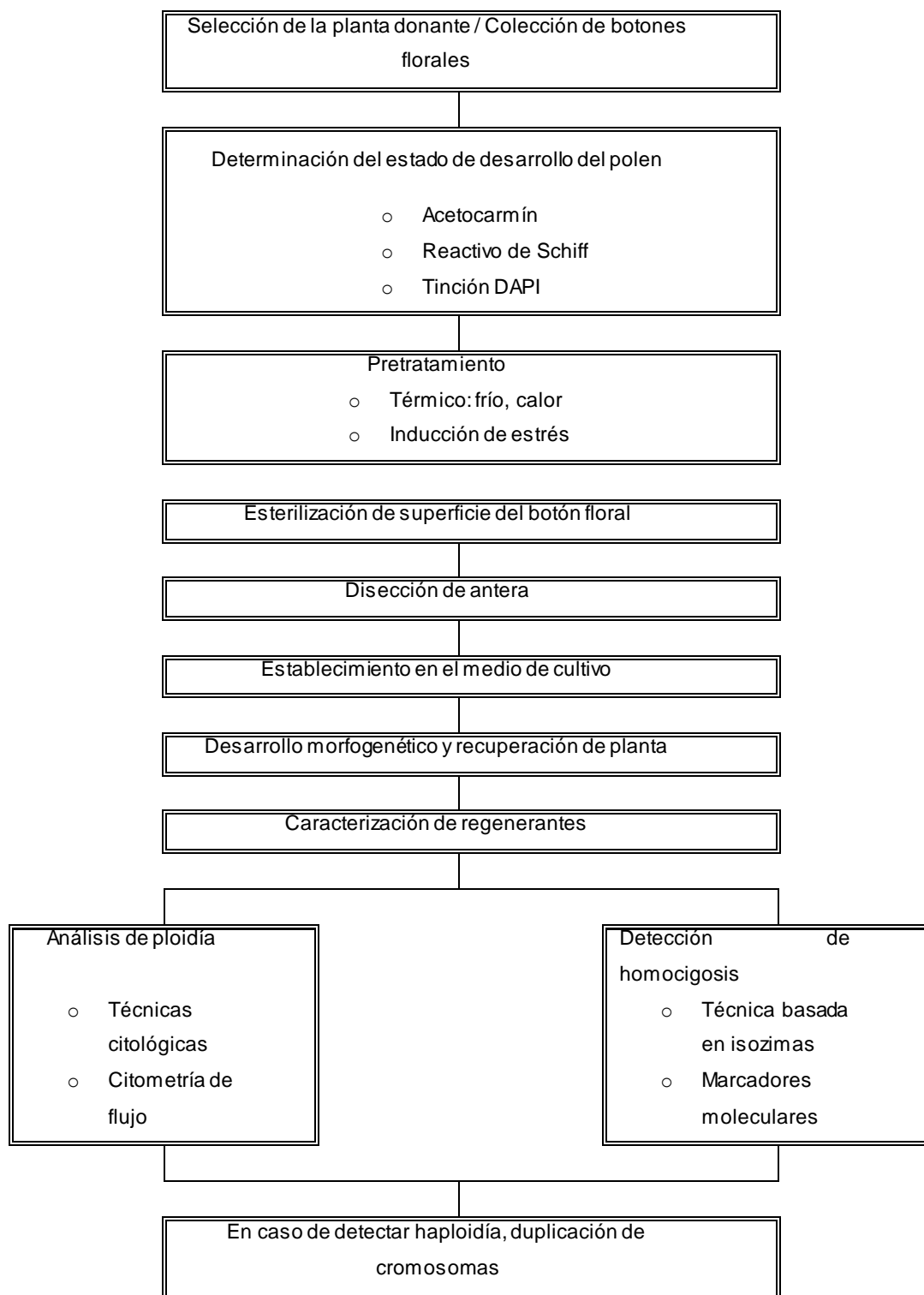
La técnica consiste en colocarlas en medios de inducción donde el polen inmaduro se divide para formar embriones que en la mayoría de los casos producen plantas haploides estériles, pero en algunas especies ocurre una duplicación espontánea de

los cromosomas en las etapas de desarrollo del callo y de regeneración de planta (Lentini *et al.*, 1997), no obstante, la homocigosis también puede ser alcanzada, de una sola vez a través de los haploides, por diploidización con colchicina (Hong *et al.*, 2016).

## **2.6. Protocolo general del cultivo de anteras**

Aunque no hay condiciones estándar que permitan inducir la formación de plantas derivadas del polen debido a que muchas especies y variedades muestran diferentes requerimientos y respuestas al cultivo de anteras, hoy día existe un método aplicable de manera general en la producción de haploides y dobles haploides por ésta vía (Cuadro 6). El mismo, se describe a continuación:

Cuadro 6. Protocolo general del cultivo de anteras.



(Germana, 2011)

## **2.7. Ventajas de la inducción de androgénesis**

El principal objetivo de la obtención de haploides mediante androgénesis es el desarrollo de dobles haploides. Los dobles haploides han sido ampliamente reconocidos como una útil herramienta en el proceso de fitomejoramiento ya que, por una parte, los ciclos de mejora para estabilizar genotipos híbridos, se ven reducidos de siete u ocho a uno sólo y por la otra pueden ser necesarios para la cartografía de caracteres complejos como producción y calidad (Seguí-Simarro, 2010). Son útiles también para estudios básicos filogenéticos y estimación de fracciones recombinatorias. Asimismo, son una herramienta útil para selección genética y la detección de mutantes recesivos (Dunwell, 2010). Otra reciente ventaja es su empleo en las tecnologías de edición genómica (Jacquier *et al.*, 2020).

## **2.8. Factores limitantes asociados a la androgénesis por cultivo de anteras**

La inducción de haploides está asociada a un número considerable de limitantes. Bajo condiciones *in vitro*, muchas anteras pueden interrumpir su crecimiento y, por tanto, reprimir la formación de callo. Así, previo al establecimiento de las anteras a un medio nutritivo *in vitro*, es necesario considerar numerosos agentes causales endógenos y exógenos que pueden afectar el éxito del cultivo (Germana, 2011; Tripathy, *et al.*, 2019; Irikova *et al.*, 2011). Los factores más comúnmente descritos son los que a continuación se enumeran.

### **2.8.1. Estado fisiológico y condiciones de crecimiento de la planta donante**

Las condiciones fisiológicas de la planta donante determinan el éxito de la técnica. Esto es principalmente debido a que la fisiología afecta el número de granos de polen viables y saludables dentro de las anteras, los niveles endógenos de las hormonas que regulan las rutas metabólicas y el estado nutricional de los tejidos de las anteras (Ruwani *et al.*, 2018). También se ha observado que la procedencia de la planta donante (invernadero o campo) tiene un valor significativo en la respuesta al

tratamiento. Aquellas provenientes del campo, tienen mejor respuesta al cultivo (Germana, 2006).

De igual manera, el fotoperiodo, intensidad luminosa y temperatura juegan un papel importante en el rendimiento de plántulas y microesporas embriogénicas (Mishra y Rao, 2016). Otros elementos a considerar son las afecciones por plagas y enfermedades, la nutrición con N y la estación del año y edad (madurez) de la planta cultivada (Humprherys y Knox, 2015; El-Maghawary *et al.*, 2012). El primer flujo de botones florales, regularmente es más sensible a la inducción de androgénesis que aquellos que han nacido después (Bhojwani, 2013). Con todo, hay aún incertidumbre en la configuración de una recomendación general sobre las condiciones óptimas de crecimiento de las plantas donantes, varía entre especies y cultivares (Dunwell, 2010).

### **2.8.2. Genotipo**

De entre los factores endógenos, el genotipo es un componente clave en el control de la respuesta embriogénica en las microesporas (Seguí-Simarro, 2010). Las variaciones intra e interespecíficas son a menudo tan grandes que mientras unas líneas de algunas especies son altamente sensibles a la inducción embriogénica, otras se desempeñan pobremente o carecen de respuesta (Bhojwani, 2013). Lo anterior se ha demostrado ampliamente por diversos investigadores, al señalar que diferentes variedades de una misma especie tienen respuestas diferentes al cultivo de anteras (Mishra y Rao, 2016). Ejemplos de tal condición pueden citarse en número considerable, pero sólo algunos de esos casos son el trigo, arroz y distintas especies del género *Citrus*. En trigo (*Triticum aestivum*), solamente en diez cultivares pudieron obtenerse plantas haploides; en arroz, fue más factible obtener resultados en la especie japónica que en indica; en cítricos solamente en una variedad fue posible obtener respuesta al cultivo de anteras (Germana, 2006). Por ello, aunque la técnica de cultivo *in vitro* ha sido usada para producir plantas haploides en una amplia gama de especies, el éxito de ésta técnica no puede ser probado en todos y cada uno de los genotipos posibles de cada especie (Ruwani *et al.*, 2018).



Todo indica que la formación de microsporas competentes para llevar a cabo la embriogénesis es controlada por la interacción entre genes citoplásmicos y nucleares. Otros estudios mostraron que la habilidad para conducir a la embriogénesis es una característica recesiva controlada por más de un gen y esos genes también son recesivos (Germana, 2011; Solís-González, 2012; Uno *et al.*, 2016).

### **2.8.3. Estado de desarrollo del polen**

Éste es un factor crítico y complejo que fuertemente afecta el éxito del cultivo de anteras. La obtención de callo no se logra simplemente con la siembra de los botones florales en cualquier estadio de desarrollo, sino que está restringida a específicos estados de maduración del polen (Ruwani *et al.*, 2018). La ventana de desarrollo de competencia embriogénica difiere dependiendo de la especie a probar, pero el periodo de mayor sensibilidad para inducir el tratamiento, generalmente es alrededor de la primera división mitótica del polen, esto es, entre la microspora vacuolada y la temprana-media del polen bicelular (Bhojwani, 2013), probablemente debido al estado transcripcional que en ese momento es todavía de proliferación y no completamente diferenciado. Después que los granos de polen comienzan a acumular almacenes de reservas, normalmente pierden su capacidad embriogénica y siguen la vía gametofítica de desarrollo (Germana, 2006; Uno *et al.*, 2016).

Aunque esto es cierto, investigadores como Binarova *et al.* (1997), fueron capaces de obtener división a partir de células vegetativas ya formadas, al someter las anteras a un tratamiento adicional de estrés térmico corto y severo (41 °C). Para el caso de tabaco, los granos de polen en el estadio bicelular son los que mejor responden, cuando les es aplicado estrés por inanición como pretratamiento (Germana, 2011).

En arroz, el estado más sensible a la inducción androgénica oscila entre el temprano o medio al tardío uninucleado (Ruwani, 2018; Mishra y Rao, 2016), lo cual es similar al caso de la cebada y trigo (Broughton *et al.*, 2014; Humphreys y Knox, 2015). El polen

de *Atropa belladonna* y *Brassica napus* responde más en el estado binucleado temprano (Bhojwani, 2013; Germana, 2006), mientras que en *Capisscum annum* el polen temprano, apenas dividido, tiene una alta tasa de eficiencia a la inducción de androgénesis (Seguí-Simarro, 2010).

Otra característica interesante a señalar es que el estado del polen en el cultivo puede afectar el nivel de ploídía que tendrán los granos de polen en la planta: en *Datura innoxia* y *Petunia*, el estado unicelular produce principalmente plantas haploides, mientras que el estado bicelular produce plantas con mayores niveles de ploídía (Bhojwani, 2013).

No obstante, aunque no existe un consenso universal acerca del punto exacto que debe utilizarse como principio y fin en la reprogramación de las microesporas hacia una vía esporofítica, puesto que tal condición varía en las especies, todo parece indicar que la microespora vacuolada y el polen bicelular joven son las etapas apropiadas para realizar la inducción (Seguí-Simarro, 2010; Dunwell, 2010).

#### **2.8.4. Pretratamiento**

Se ha reportado en diversos estudios que si se expone a las anteras a distintos tipos de estrés (frío, calor, estrés osmótico, deficiencia de azúcar o nitrógeno, radiación gamma o tratamientos químicos, estrés hídrico, entre otros) previos al establecimiento *in vitro*, se inducirá de modo efectivo la androgénesis por actuar como detonantes para inducir la vía esporofítica (Tripathy *et al.*, 2019). Algunas veces la combinación de pretratamientos puede ser usada para obtener un mayor efecto, sin embargo, el tipo de pretratamiento y la duración del mismo, dependen de la especie y variedad a probar (Tripathy *et al.*, 2019, Mishra y Rao, 2016), así como del tamaño específico del recipiente a utilizar para el almacenamiento (Dunwell, 2010).

- **Pretratamiento frío:** un estrés por bajas temperaturas (4 °C por 2 o 3 semanas) induce y asegura la continuación de la vía esporofítica de las microesporas e incrementa la frecuencia en el desarrollo espontáneo de

dobles haploides (Tripathy *et al.*, 2019). Se sabe que el pretratamiento frío mejora el potencial de la androgénesis por disminución de la degeneración de microesporas y la pared celular de la antera. Además, el almacenamiento frío tiene la doble función de retrasar el envejecimiento y evitar el estrés de las microesporas antes del cultivo (Chiancone y Germana, 2016). En arroz, fue detectado que un pretratamiento frío de 10 °C de 10 a 30 días fue necesario para inducir las divisiones esporofíticas en microesporas de la especie japónica (Ruwani *et al.*, 2018). En Chile, cuando un pretratamiento frío de 4 °C fue aplicado por 48 h a botones florales la embriogénesis fue mejorada de 1 a 3 plantas por 100 anteras obtenidas. Irikova *et al.* (2011), estimularon la respuesta a androgénesis con pretratamiento frío, aplicado de 24 a 100 h.

- **Estrés por altas temperaturas:** Altas temperaturas aplicadas a las anteras, interrumpen el desarrollo normal del tejido somático, induciendo embriogénesis por intervención en el citoesqueleto de las microesporas en la fase inicial (Mishra y Rao, 2016). En calabacín fue empleado un pretratamiento a 35 °C por una semana en oscuridad (El-Maghawary *et al.*, 2012). En la mayoría de las especies de *Brassica* un pretatamiento de calor por 2 h a 4 días a 35 °C, mejora la inducción de embriogénesis (Bhojwani, 2013).
- **Estrés osmótico:** este tipo de estrés puede sustituirse o combinarse con el tratamiento frío para la inducción de la androgénesis (Ruwani *et al.*, 2018). La pérdida de agua en el contenido celular, interrumpe conexiones plasmodesmales entre células pre-embriogénicas, asilando a las células fisiológicamente y permitiendo que una mayor cantidad de células se diferencien (Mishra y Rao, 2016). Incrementa la absorción de azúcares y por tanto incrementa los niveles de glucosa en anteras, lo cual permite el aislamiento fisiológico de las anteras para dar paso a la formación de embriones (Tripathy *et al.*, 2019). Se ha reportado que una solución del 0.4 M de manitol de 4 a 7 días, es efectiva en la inducción de androgénesis en el cultivo de arroz (Bhojwani, 2013). La regeneración de callos también

puede ser mejorada por el tratamiento osmótico ya que se supone actúa en la regulación de niveles endógenos de auxina interactuando con el ácido abscísico, afectando el metabolismo de carbohidratos y disparando así una respuesta en la iniciación de callos y en la regeneración de brotes (Ruwani *et al.*, 2018).

- **Deficiencia de azúcar:** se ha probado que la deficiencia de azúcar es efectiva en la inducción de embriogénesis, pues induce la promoción de alta frecuencia en embriogénesis y la regeneración de plantas, sin embargo, el pretratamiento frío, resulta superior a este tratamiento (Tripathy *et al.*, 2019).
- **Radiación gamma:** la baja radiación puede ayudar también, a la embriogénesis en el cultivo de anteras (Tripathy *et al.*, 2019). Por ejemplo, Miruya *et al.*, (2005) consiguieron la producción de dobles haploides y la regeneración de plántulas verdes después de aplicar irradiación gama a una línea de arroz denominada TM7 – 5. En tomate una combinación de rayos gamma a 4 Gy a 10 °C por 9 días resultó efectiva en la inducción de androgénesis (El-Maghawary *et al.*, 2012). Es importante señalar que la penetración de la irradiación, depende de la morfología del polen y el grosor de la pared del polen (Ruwani *et al.*, 2018).
- **Tratamiento químico:** al aplicar liberadores de etileno (Ethrel o Ethephon) poco antes del proceso meiótico, se promueve el desarrollo de polen multinucleado con unos cuantos granos de almidón. Investigadores como Wang *et al.*, 1979, reportaron una mejor respuesta en el cultivo de anteras de arroz cuando se aplicó una dosis de 4000 ppm de ethrel a 10° C por 48 h (Tripathy *et al.*, 2019).

### 2.8.5. Esterilización y escisión de antera

Antes del corte de anteras es necesario remover los contaminantes de la superficie del botón floral a través de la esterilización. Después del pretratamiento la superficie de los botones florales es esterilizada por inmersión en alcohol etílico al 70 % (v/v) por

unos cuantos minutos, seguida de una inmersión en hipoclorito de sodio (alrededor de 1.5% de cloro activo en agua), con unas cuantas gotas de Tween 20 por 10-15 min y posteriormente enjuagar con agua destilada estéril de 3-5 min. Finalmente, las anteras asépticas son separadas del filamento y se colocan en el medio de cultivo. Debe evitarse en lo posible los daños a las anteras durante el corte, pues esto previene la producción de callo somático (Chiancone y Germana, 2016).

### **2.8.6. Composición del medio**

El medio de cultivo juega un papel central en la inducción de embriogénesis de microsporas, pues provee de nutrientes y decide el destino de las mismas (Chiancone y Germana, 2016; Mishra y Rao, 2016). La composición del medio basal afecta fuertemente el crecimiento y desarrollo de las distintas partes vegetales y por tanto determina el éxito del cultivo vegetal (Texeira da Silva *et al.*, 2015), por ésta razón, la mejor respuesta a los requerimientos nutrimentales debe ser considerada y seleccionada como un primer paso para la optimización de resultados en el cultivo de anteras (Ruwani *et al.*, 2018).

Aunque hay muchos medios de cultivo utilizados para la inducción de callos en el cultivo de anteras, normalmente, los medios comúnmente más usados son MS, N6 o Nitsch y Nitsch y B5 o Gamborg (Irikova *et al.*, 2011; Germana, 2011).

Se ha reportado que, en arroz, los medios de cultivo Heh-2, Heh-5, SK – 3, SK – 8, Szchuan, Medio V y Chaleffs R – 2, han sido utilizados (Mishra y Rao 2016), aunque en general para cereales, el medio más usado es el N6 (Germana *et al.*, 2006). En pepino, El-Maghawary *et al.*, (2012), probaron los medios MS y B5. Los mismos autores, probaron los medios MS y B5 con concentraciones modificadas de reguladores de crecimiento, y azúcares, en melón, sandía, pepino armeniano y calabacín. En trigo, se probó el medio N6 (El-Hennawy *et al.*, 2011). En el cultivo de anturio Wintarto *et al.*, (2011), también señalan que el medio N6 es usado, sin

embargo, mencionan que el medio MS y MS modificado también ha sido usado, tal como en el caso de tabaco.

Sin embargo, las respuestas embriogénicas y morfogenéticas dependen tanto de la suplementación del medio de cultivo con reguladores de crecimiento en concentraciones óptimas como del estado del medio de cultivo y el mantenimiento de las condiciones de cultivo, requerimientos que, como se mencionó anteriormente, también son dependientes de la especie a tratar y/o ser probada (Ruwani *et al.*, 2018).

Cuando se observa la inducción de callo y los callos tienen aproximadamente una longitud de 1.5 – 2.0 mm se debe trasladar el tejido desdiferenciado a un medio de regeneración (Humphreys y Knox, 2015). En ocasiones, el medio de cultivo que mejor responde a la inducción de callos no es favorable para la regeneración de plantas, por tanto, la transferencia del callo a un medio apropiado de regeneración debe ser realizada en el momento propicio (Ruwani *et al.*, 2018). Generalmente, el medio más usado para regeneración de plantas es el medio MS.

### **2.8.7. Reguladores del crecimiento vegetal**

La presencia de reguladores del crecimiento vegetal es crucial para la producción de embriones derivados de microesporas para la mayoría de las especies, particularmente en el caso de las recalcitrantes, pues el tipo y concentración de fitohormonas determina la vía de desarrollo de la microespora. Las fitohormonas comúnmente usadas en cultivo de anteras son auxinas y citoquininas o combinación de ambas (Germana, 2011).

- **Auxinas**

El descubrimiento de las auxinas se remonta a la época de De Candolle, en 1832, quien realizó las primeras observaciones sobre el fototropismo, no obstante, un pasado más reciente muestra que el término “auxina” no fue propuesto sino hasta casi cien años después (1934) por Kögl y Haagen-Smit al detectar una sustancia similar cristalizada

en la orina humana. Ellos propusieron nombrar a las auxinas encontradas en los vegetales “auxina a y auxina b” y a la encontrada en los humanos “heteroauxina” (Bhatla *et al.*, 2018).

- **AIA ó IAA, auxinas naturales**

La primer auxina aislada y descubierta fue el ácido indolil-3-acético, por Haagen-Smit en 1942. La misma fue separada de un compuesto alcalino hidrolizado del maíz y posteriormente encontrada, por otros investigadores, en avena, pino y ricino. Éste es el compuesto natural que se acepta como auxina y está ampliamente distribuido por todo el reino vegetal. Otros compuestos que se aceptan como auxinas naturales son el ácido fenil acético, algunos-cloro índoles y el ácido indolbutírico (Acosta-Echeverria *et al.*, 2008). Para que un compuesto sea considerado auxina debe poseer una estructura con carga negativa en el carboxilo separado por una distancia de 5.5 Å de otra carga residual positiva que puede o no estar unida a un anillo indólico o aromático (Bhatla *et al.*, 2018).

La fitohormona auxina juega un papel central en el crecimiento y desarrollo de las plantas porque afecta a la división, crecimiento y diferenciación de las células (Acosta-Echeverria, *et al.*, 2008), regulando así numerosos procesos como (1) embriogénesis, (2) foto y gravitropismo, (3) filotaxis y (4) enraizamiento (Marcos y Berleth, 2009), asimismo, en cultivo *in vitro* de anteras el tipo y concentración de auxina parece determinar el destino de desarrollo de la microespora (Germana, 2011); es una hormona única entre las plantas y es activamente transportada célula a célula de manera polar (Bhatla *et al.*, 2018).

- **Auxinas sintéticas**

Las auxinas sintéticas son de composición química muy variada: ácidos naftalenacéticos, clorofenoxiácidos y derivados de los ácidos benzoico y picolínico. Tienen, además, interés las llamadas antiauxinas (como el ácido p-clorofenoxi-

isobutírico) que, por su analogía estructural y carencia de efecto fisiológico puede inhibir la acción de las auxinas. (Olatunji y Kelly 2021). En cultivo *in vitro* de anteras la aplicación de ácido naftalenacético promueve la embriogénesis directa y la aplicación de ácido 2,4 diclorofenoxiacético induce la formación de callo (Chiancone y Germana, 2016).

#### **2.8.8. Condiciones del cultivo**

Los cultivos de anteras usualmente son incubados a una temperatura de entre 24 °C y 27 °C y expuestos a una intensidad lumínica de aproximadamente 2000 lux por 14 h. Algunos autores han reportado que la alternancia entre periodos de luz y oscuridad pueden ser beneficiosos para la inducción de callos, y que los entornos de incubación suelen ser aún más específicos en la fase de regeneración, sin embargo, las condiciones óptimas tienen que ser determinadas para cada sistema individual (Germana 2006; Ruwani *et al.*, 2018).

Otros aspectos a considerar son la atmósfera en el frasco de incubación, la densidad del cultivo y la manera en que es colocada la antera, es decir, su orientación (Ruwani *et al.*, 2018; Asadi *et al.*, 2018).

#### **2.8.9. Tejido calloso**

El callo es un tejido amorfo desdiferenciado que se desarrolla a partir de tejido dañado y/o proliferación desorganizada de células (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015). En las plantas silvestres, el tejido calloso se forma en respuesta a daños mecánicos sufridos por influencia del medio ambiente o por invasión de tejidos por ciertos microorganismos; en cultivos *in vitro*, el tejido calloso se induce mediante la influencia de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal o fitohormonas adicionadas al medio de cultivo (Tempé y Schell, 1985; Crozier *et al.*, 2000).

El éxito en la inducción y establecimiento de cultivos de callos y regeneración de plantas está en función de la calidad del explante usado, que a su vez depende de la



planta madre o del tejido del que se inició el cultivo (Doerner, 2000). Por lo tanto, es preferible utilizar plantas jóvenes o en desarrollo con tejidos meristemáticos y crecimiento vegetativo vigoroso ya que éstas son la mejor fuente de explantes (Seabrook, 1980). Diversos fragmentos vegetales de una planta pueden ser potencialmente utilizados como explante para su proliferación *in vitro*, no obstante, frecuentemente se ha reportado que los callos son más fáciles de obtener en unos órganos que en otros. En cereales, por ejemplo, el crecimiento de callo solamente se obtiene de embriones cigóticos, semillas en germinación, endospermo de semilla o mesocótilo inicial y hojas muy jóvenes o vainas foliares, pero nunca de hojas maduras (George *et al.*, 2008).

Para inducir tejido calloso se requiere un medio de cultivo rico en nutrientes; las altas concentraciones de auxinas favorecen la friabilidad, mientras que las citocininas tienden a endurecer el tejido. En ciertas especies se puede lograr tejido calloso agregando solamente auxinas; entre las más utilizadas están el 2,4-D, el AIA y el ANA; entre las citocininas a veces utilizadas están la cinetina y la benciladenina (BA) (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). El tejido calloso conlleva hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo; esta masa puede subcultivarse para su mantenimiento y propagación (Calva-Calva y Pérez-Vargas, 2005).

#### **2.8.9.1. Usos del tejido calloso**

El tejido calloso puede ser usado como intermediario para la regeneración de plantas. En el explante original se induce la aparición de tejido calloso organogénico a partir del cual se da la formación de brotes adventicios (organogénesis indirecta). O también, a partir del explante se induce la aparición de tejido calloso embriogénico; sin embargo, no todo el tejido calloso tiene potencial organogénico o embriogénico, por lo que la regeneración de plantas no siempre es posible. Debido a las variaciones genéticas y epigenéticas que aparecen en las células del tejido calloso, es posible regenerar plantas fenotípicamente diferentes a la planta original (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). El callo también es usado para estudios básicos de fisiología celular y

bioquímica y en la producción de metabolitos secundarios y puede potencialmente ser usado como fuente de nueva variación genética (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015).

#### **2.8.9.2. Mantenimiento del tejido calloso**

Para el mantenimiento del tejido calloso se requieren subcultivos de porciones de callo cada 3-8 semanas, dependiendo de la especie en un medio de la misma composición. Para el subcultivo deben tomarse solo aquellos fragmentos de aspecto sano que no muestren señales de deshidratación, obscurecimiento o necrosis; puede reducirse la concentración de auxinas; y en cuanto a las citocininas, hay algunos tejidos que las requieren para su proliferación (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015).

#### **2.9. Viabilidad celular**

Una célula se considera viable si tiene la capacidad de crecer y desarrollarse, por ello la muerte celular se considera una característica importante a monitorear en los cultivos *in vitro* y debe ser estimada con precisión para valorar apropiadamente el tipo de respuesta celular (Escobedo y Miranda-Ham, 2003).

Los ensayos de viabilidad están basados en dos características principales de las células: sus propiedades físicas o su actividad metabólica. Los primeros evalúan la integridad de la membrana y fluido citoplásmico y los segundos la capacidad de reducir sales de tetrazolio o hidrolizar substratos fluorogénicos (Castro-Concha, *et al.*, 2012).

Para evaluar la integridad de la membrana los colorantes usualmente utilizados son: Azul de Evan, Azul de Metileno, Azul Tripano, Rojo Neutral y Fenosafranina. Estos compuestos entran por las membranas rotas y tiñen las células muertas (Castro-Concha *et al.*, 2006).

La actividad enzimática se mide como reductasas y estererasas. En el caso de reductasas MTT (3-[4,5- dimetilthiazol-2yl]-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) y TTC

(2,3,5- trifenil cloruro de tetrazolio) son los más utilizados y éstos funcionan aceptando electrones desde la cadena de transporte de la mitocondria; como resultado las moléculas se convierten en formazan dentro de las células viables con completa actividad mitocondrial (Louis y Siegel, 2011).

Por otra parte, las esterasas intracelulares hidrolizan el substrato fluorogénico que puede pasar a través de la membrana tras lo cual se adhieren al grupo diacetato produciendo fluoresceína. La fluoresceína se acumulará en las células que poseen membranas intactas adquiriendo un color verde, por ello el verde fluorescente puede ser utilizado como un marcador de viabilidad celular (Castro-Concha, *et al.*, 2012).

## **2.10. Cultivo de anteras en diferentes especies**

Actualmente, la inducción de haploides se ha realizado con éxito en distintas especies, particularmente en gramíneas (arroz, trigo, maíz, triticale) (Tripathy, 2019; Kondic-spika, 2010), brásicas (mostaza) (Binarova *et al.*, 1997), solanáceas (tabaco, chile manzano) (Irikova *et al.*, 2011), entre otras, y, aunque el cultivo de anteras permite la obtención de individuos homocigóticos en relativamente corto tiempo y con ello la aceleración de programas de mejoramiento (Germana, 2011; Bobkov, 2010), el éxito de ésta técnica no se extiende a todas las especies: solamente cuatro especies son consideradas como sistemas modelo (mostaza, tabaco, cebada y trigo) y muchas plantas leñosas o económicamente importantes son recalcitrantes a este tipo de morfogénesis *in vitro*, puesto que las limitaciones técnicas, como la renuencia a la regeneración de plantas (girasol, anturio, frijol, guisante, etc) y los bajos rendimientos de las plantas haploides, inciden directamente en el genotipo, ocasionando el lento desarrollo del mejoramiento genético mediante el empleo de tal técnica. En consecuencia, las condiciones que llevan a la haploidía en las plantas cultivadas importantes necesitan ser afinadas incluso caso por caso (Hurtado y Merino, 1988; Seguí-Simarro y Nuez, 2008; Soriano *et al.*, 2013).

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1. Hipótesis

La inducción de androgénesis en anteras de frambuesa está determinada por el genotipo, el medio de cultivo y los reguladores del crecimiento

#### 3.2. Objetivos

##### 3.2.1. General

Estudiar el efecto del genotipo, medio de cultivo y los reguladores de crecimiento sobre la inducción de androgénesis *in vitro* de cuatro genotipos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) y su viabilidad.

##### 3.2.2. Específicos

- Identificar el estado de división celular propicio para inducir androgénesis en anteras de frambuesa.
- Evaluar el efecto del genotipo (genotipos AD-1, Joan J, UMC-702 y V-74) y dos medios de cultivo (Gamborg y Nitsch y Nitsch) en la sobrevivencia de anteras de frambuesa.
- Analizar el efecto de auxinas (2,4-D y ANA) en la callogénesis de anteras de frambuesa.
- Determinar viabilidad de callo obtenido de anteras de frambuesa.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Localización del experimento

La presente investigación tuvo lugar en el laboratorio de Fisiología y Genética Vegetal y en el invernadero de frutillas de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en la ciudad de Uruapan, Michoacán ubicada a 19.39556133 ° -102.05741818 ° latitud norte y longitud oeste, a una altura de 1599 msnm.

### 4.2. Material genético

Plantas de frambuesa de los genotipos AD-1, Joan J, UMC-702 y V-74 (Cuadro 1A) fueron desarrolladas y mantenidas en condiciones de invernadero. Cuando el estado fenológico de floración se presentó, los botones florales fueron cortados (Figura 1), medidos y pesados. Además, se extrajeron las anteras para cultivarlas en condiciones *in vitro*.



Figura 1. Estados florales de frambuesa previos a la antesis.

### 4.3. Inducción de androgénesis en anteras de frambuesa

#### 4.3.1. Selección de la planta donante e identificación del estado de división celular propicio para inducir androgénesis

Para identificar la etapa de división celular más adecuada para inducir androgénesis, se extrajo el polen de anteras en varias fases de desarrollo de botón floral (Figura 1)

y, posteriormente, fue examinado microscópicamente. Uno *et al.* (2016) señalan que el estado más adecuado para la obtención de haploides es el uninucleado.

Para lograr el éxito en la técnica de cultivo *in vitro* de anteras, la planta donante debe encontrarse en óptimas condiciones de crecimiento, así, se tuvo especial cuidado en la selección de plantas sanas y vigorosas de los genotipos sometidos a evaluación, evitando el efecto por envejecimiento (cortando flores abiertas o frutos pequeños) y previniendo el ataque por plagas y enfermedades (Rotino, 2016).

Siguiendo los protocolos descritos por García-Velázquez (1990), Parra-Vega *et al.* (2013) y Chiancone y Germana (2016), la identificación del estado uninucleado se desarrolló como a continuación se describe:

1. **Elección y corte de botones florales.** La colecta de los botones florales se realizó a las 8:00 h y a las 16:00 h. Se tomaron los botones de distintas etapas de desarrollo, color verde y sanos. Los mismos se cortaron con tijeras, se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas y se transportaron al laboratorio en un recipiente con hielo en cubos (Chiancone y Germana 2016).
2. **Medición de botones florales.** Los botones se ordenaron en forma ascendente respecto a su tamaño y se enumeraron. Se determinaron los parámetros longitud, longitud de cáliz y diámetro con ayuda de Vernier. El peso de los mismos se registró con balanza analítica digital marca Hanchen, modelo BSM-220.4 (Parra-Vega *et al.*, 2013).
3. **Pretratamiento.** Consistió en colocar los botones florales en frascos sellados de vidrio de 100 mL con agua fría, a 4 °C durante 24 h. Los frascos se guardaron en una hielera plástica, en la cual se dispusieron cubos de hielo y un termómetro para observar un control de la temperatura (Rodríguez-Bautista *et al.* 2019).

4. **Fijación.** Los botones florales se cubrieron con solución Farmer (alcohol etílico absoluto : ácido acético glacial, 3:1 v/v), durante 48 h más a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo de fijación, los botones se drenaron y transfirieron a un frasco con etanol al 70% (García-Velázquez,1990).
5. **Extracción de anteras.** Cada botón fue sustraído, con el auxilio de pinzas, desde la solución Farmer y luego fueron colocados en cajas Petri de 90 x 15mm. La caja Petri con cada botón fue observada bajo la lente de un microscopio estereoscópico marca AM Scope, modelo SM-3B. Con ayuda de pinzas y bisturí, se cortó longitudinalmente el botón para dejar las anteras desubiertas y extraerlas con agujas de disección (Rotino, 2016).
6. **Aplastado o “Squash”.** Las anteras fueron dispuestas, en juegos de tres, sobre portaobjetos. Se depositó una gota de acetocarmín (1 % de acetocarmín en 45 % de ácido acético) y se presionó ligeramente con el bisturí Posteriormente, se colocó el cubreobjetos, se eliminó el exceso de acetocarmín con papel filtro y se ejerció presión con ayuda de un lápiz o el dedo pulgar para comprimir las anteras y exponer el contenido de las mismas. Con ello, los granos de polen fueron liberados del interior y fue posible observarlos al microscopio óptico (García-Velázquez, 1990).
7. **Observación en microscopio.** Las anteras preparadas por “Squash” fueron observadas bajo microscopio óptico marca Velab modelo VE-B4 y se llevaron a cabo las observaciones pertinentes. Se buscó la etapa de primera división mitótica, cuando hay microesporas vacuoladas, uninucleadas tardías o polen bicelular temprano (García-Velázquez, 1990; Parra-Vega *et al.*, 2013).
8. **Determinación del desarrollo del estado floral.** Se determinó el estado de maduración floral propicio para realizar la inducción de androgénesis siguiendo la categorización de estados de botón floral acorde a Parra-Vega *et al.*, 2013.

#### **4.3.2. Pretratamiento de inducción de estrés a baja temperatura**

Los botones florales fueron guardados en bolsas de polietileno con toallas de papel húmedas y se almacenaron en refrigerador a 4 °C por un espacio de tiempo de 6-8 días, (Kikkert *et al.*, 2005; Shrivastava, *et al.*, 2020; Cardoso *et al.*, 2016; Madan *et al.*, 2019).

#### **4.3.3. Desinfección del material vegetativo**

Los botones florales se desinfectaron de acuerdo al siguiente protocolo:

- a) Lavado con agua corriente y jabón en polvo durante algunos segundos.
- b) Enjuague con agua destilada hasta eliminar restos de jabón y transferencia a caja “Petri” previamente esterilizada.
- c) Inmersión de los botones florales en etanol al 70 % por 45 segundos. Transcurrido el tiempo pasar a una solución con hipoclorito de sodio (Cloro comercial) al 5 % por 10 min.
- d) Enjuague con agua destilada estéril, durante 5, 10 y 15 minutos. Se recomienda utilizar tubos falcón.
- e) Refrigerar durante 24 h a 4 °C.

(Ochoa-Alejo, 2012; Chen *et al.* 2005)

#### **4.3.4. Disección y establecimiento *in vitro* de anteras**

Las anteras desinfectadas se extrajeron siguiendo un proceso similar al descrito en párrafos anteriores (4.3.1.) y se cortaron los filamentos con el objeto de prevenir la formación de callos de origen distinto al de las anteras, más tarde se realizó la siembra en cajas “Petri” de 60 x 15 mm con un contenido de 10 mL de medio de cultivo y se sellaron con cinta Parafilm (Hoogvorst *et al.*, 2018).



Las cajas Petri se envolvieron en papel aluminio y se conservaron en oscuridad, por un período de ocho semanas, a  $24 \pm 1$  °C (Fu *et al.*, 2008). Al término de ese lapso de tiempo las cajas Petri fueron transferidas a condiciones de luminosidad (por 16 h de luz/8 h de oscuridad) bajo una intensidad de 2000 lux a  $24 \pm 1$  °C y se realizaron subcultivos a medios frescos cada 3 o 4 semanas (Warchol, *et al.*, 2019).

#### **4.4. Medios de cultivo para la inducción de androgénesis y evaluación de genotipos de frambuesa**

Se utilizaron los medios de inducción NN (Nitsch y Nitsch, 1969) y B5 (Gamborg y Ojima, 1968) con el objeto de evaluar la respuesta del genotipo y medio de cultivo en la inducción de androgénesis (Cuadro 2A). La fuente de carbón empleada para cada medio fue sacarosa a razón de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  y se agregaron  $8 \text{ g L}^{-1}$  de agar-agar, como agente solidificante. Asimismo, para evitar oxidación, se agregaron  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  de carbón activado. El pH fue ajustado 5.8 y la esterilización fue llevada a cabo con autoclave a 120 °C de temperatura y 15 bar de presión por 20 minutos, (Chiancone y Germana, 2016).

#### **4.5. Uso de reguladores del crecimiento para la obtención de callo**

Con el fin de promover la generación de callo por medio de auxinas sintéticas, cada medio de cultivo fue suplementado con 2,4 – D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y ANA (ácido naftalenacético), en dosis de 0 a  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Cabe resaltar que el 2,4-D estuvo siempre contenido en el medio y fue enriquecido por ANA en cinco diferentes concentraciones (Cuadro 7) (Kikkert *et al.*, 2005, Madan *et al.*, 2019).

Cuadro 7. Tratamientos empleados en los medios de inducción de androgénesis. Los dos genotipos probados (Joan J y V-74) fueron omitidos del cuadro por razones de espacio y los medios (B5 y NN) así como los niveles de auxinas fueron probados en cada genotipo.

Medio básico	Tratamiento	RCV combinación y concentración (mg L <sup>-1</sup> de i. a.)	
		24-D	ANA
<b>Gamborg (B5)</b>	GM0	----	----
	GM1	0.2	----
	GM2	0.4	----
	GM3	0.6	----
	GM4	0.8	----
	GM5	1.0	----
	GM6	0.2	0.2
	GM7	0.4	0.4
	GM8	0.6	0.6
	GM9	0.8	0.8
	GM10	1.0	1.0
<b>Nitsch &amp; Nitsch (NN)</b>	NN0	----	----
	NN1	<b>0.2</b>	----
	NN2	<b>0.4</b>	----
	NN3	<b>0.6</b>	----
	NN4	<b>0.8</b>	----
	NN5	<b>1.0</b>	----
	NN6	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>
	NN7	<b>0.4</b>	<b>0.4</b>
	NN8	<b>0.6</b>	<b>0.6</b>
	NN9	<b>0.8</b>	<b>0.8</b>
	NN10	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>

#### 4.6. Viabilidad celular

El callo obtenido de anteras de frambuesa fue transferido a 50 mL de medio de cultivo líquido (similar al medio de inducción antes descrito, sin agar) e incubado en oscuridad a 24±1 °C. Los callos en suspensión fueron subcultivados cada 7 días para su conservación y mantenimiento en fresco. Para obtener la suspensión celular y

cuantificar la viabilidad de las células se siguió el protocolo de Castro-Concha (2012) acorde a los siguientes pasos:

- a) Macerado de callo en agua destilada estéril.
- b) Colección de células con micropipeta y adición de colorante “Azul de Evan” (1 mL) a la muestra celular.
- c) Incubación de la muestra durante 15 min a temperatura ambiente y, posteriormente, centrifugado 2000 g por 5 min.
- d) Retiro de sobrenadante y lavado con agua destilada estéril.
- e) Solubilización del colorante adherido a células muertas en 50 % (v/v) de metanol con 1 % (w/v) de SDS a 60 °C por 30 min. Repetir 2 veces y retirar sobrenadante.
- f) Centrifugar a 2000 g por 15 min diluir el sobrenadante a volumen final de 7 mL, llevar al microscopio y realizar el conteo de células.

#### **4.7. Diseño experimental y análisis de datos**

El ensayo fue montado en dos etapas: inicialmente se probaron 4 genotipos, no obstante, dos de ellos fueron descartados por la oxidación de sus anteras. Enseguida, se probaron los genotipos restantes (Joan J y V-74) en los medios de inducción (B5 y NN) con cinco niveles de auxina 2,4-D y se agregó, además, la auxina ANA al medio en cinco niveles. Se utilizó un diseño completamente al azar con 11 tratamientos y 3 repeticiones, donde la unidad experimental constó de una caja Petri con 10 explantes. Los datos obtenidos se analizaron a los 60 días después de la inoculación en los medios de cultivo mediante análisis de varianza y a las variables que mostraron diferencias estadísticas se les aplicó la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ), además, todas las pruebas estadísticas se implementaron con la ayuda del paquete estadístico SAS versión 9.0 (Statistical Analysis System, 2002) (Asadi *et al.*, 2018).

Las variables respuesta analizadas fueron:

## Inducción de androgénesis:

- a) Porcentaje (%) de sobrevivencia de anteras: se realizó contando las anteras que sobrevivieron después de su siembra en los medios de cultivo y estos datos fueron transformados a porcentaje usando la siguiente fórmula:

Porcentaje de sobrevivencia

$$= \frac{\text{Número de anteras vivas}}{\text{Número total de anteras sembradas en el medio de cultivo}} \times 100$$

- b) Porcentaje (%) de anteras que formaron callo: se contó el número de callos inducidos en los medios de cultivo por anteras sembrada en relación al total de anteras introducidas al medio de cultivo, a través de la fórmula siguiente:

Porcentaje de inducción de callo

$$= \frac{\text{Número de callos formados}}{\text{Número total de anteras sembradas en el medio de cultivo}} \times 100$$

Al realizar los análisis estadísticos se determinó la mejor respuesta de los medios de cultivo y dosis óptima de reguladores del crecimiento a utilizar en el cultivo *in vitro* de anteras de frambuesa.

## Viabilidad celular:

El conteo de células se llevó a cabo por medio de hemocitómetro y se emplearon las siguientes fórmulas:

- Total, de células:

*Número de células (viables y no viables)*

$$= \frac{(A + B + C + D)}{4} \times 10^4 \times 2 \times \text{dilución de muestra}$$

- Porcentaje de células viables:

$$\% \text{ Células Viables} = \frac{\text{Número de células viables}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

## V. RESULTADOS

El propósito del presente estudio fue determinar si la androgénesis puede ser inducida en genotipos de frambuesa a través del cultivo de anteras. En tal sentido, se estudiaron los efectos del genotipo, medio de cultivo y reguladores de crecimiento de tipo auxínico. La respuesta de las anteras al cultivo *in vitro* se presenta en términos de sobrevivencia y formación de callo y, también, se evaluó la viabilidad de las masas desdiferenciadas formadas.

### 5.1. Identificación del estado de división celular propicio para la inducción de androgénesis en anteras de frambuesa y pretratamiento de inducción de estrés

La observación microscópica del polen en anteras de frambuesa de los genotipos estudiados, reveló que el estado uninucleado se encuentra cuando los botones florales alcanzan una longitud de 4 mm (Figura 2-C). Botones de menor longitud muestran estados de división celular temprana (Figura 2-A y B); botones de mayor longitud muestran granos de polen maduro (Figura 2-D y E).

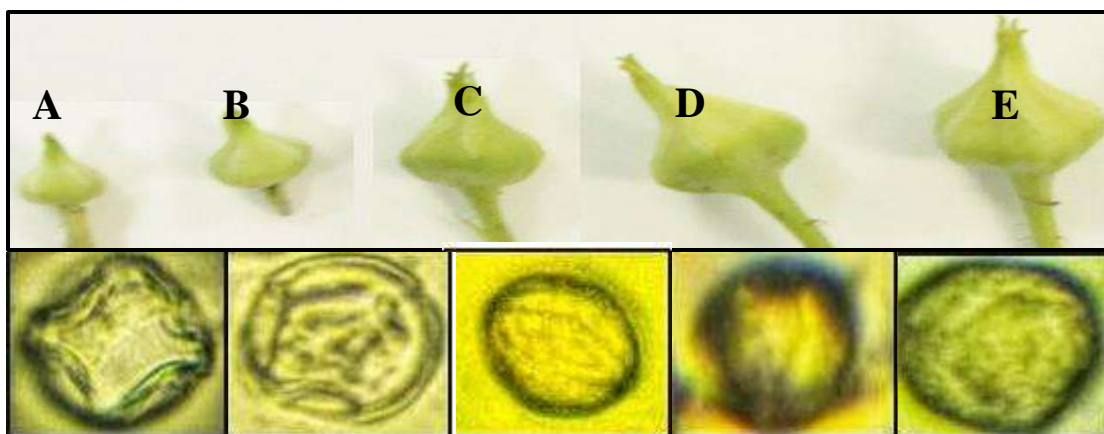


Figura 2. Estados de desarrollo del polen en frambuesa. a) microespora media (2 mm); b) microespora vacuolada (3 mm); c) microespora uninucleada (4 mm); d) polen medio (7 mm); e) polen maduro (8 mm).

Lo anterior demuestra que microesporas, anteras y botones, crecen paralelamente mientras su desarrollo avanza hacia la madurez y apertura floral.

En el estado descrito, los botones florales permanecen todavía cerrados pero la apertura floral comienza a hacerse visible, evidenciado la separación de los pétalos a través de la muestra de un ligero color blanco en los ejes longitudinales del botón.

Asimismo, el pretratamiento frío (4 °C por 6-8 días) aplicado a los botones florales preservó y evitó el daño por envejecimiento y sometió a estrés a las microesporas, antes del cultivo en los medios de inducción.

## **5.2. Cultivo de anteras: Inducción de androgénesis**

### **5.2.1. Efecto del genotipo y medio de cultivo en la sobrevivencia de anteras**

Tal como fue señalado, la inducción de androgénesis *in vitro* se obtuvo de anteras en estado uninucleado de desarrollo (Figura 2-C); los datos presentados fueron analizados 60 días posteriores a la siembra de anteras en los medios de cultivo.

Transcurrido ese período de tiempo, las anteras sobrevivientes de los distintos genotipos objeto de estudio, comenzaron a hincharse y presentaron un color pardo (Figura 3); sin embargo, cuatro semanas más tarde dos de los cuatro genotipos estudiados, AD-1 y UMC-702, necrosaron y los cultivos colapsaron al no alcanzar etapas posteriores de desarrollo (Figura 4).

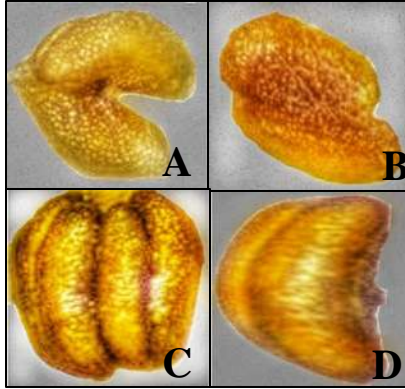


Figura 3. Sobrevivencia de anteras de frambuesa: AD-1 (A), Joan J (B), UMC-702 (C), V-74 (Izquierda a derecha).

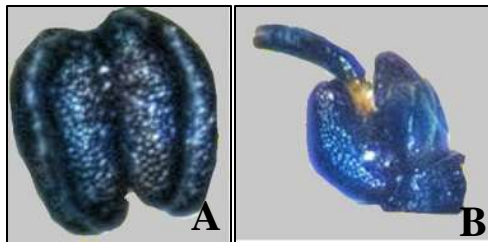


Figura 4. Anteras necróticas de frambuesa: genotipo AD-1 (A); genotipo UMC-702 (B).

De los medios de inducción probados, el mayor porcentaje de sobrevivencia fue observado cuando las anteras de los genotipos experimentales se sembraron en el medio de cultivo B5 (Cuadro 8). Al comparar medias, se observa que el máximo porcentaje de sobrevivencia fue observado en la variedad AD-1 con un 89.69 % de sobrevivencia de anteras y el menor porcentaje fue observado en la selección UMC-702 con un 33.33 % de sobrevivencia (Cuadro 8). En el medio NN el porcentaje máximo y mínimo de sobrevivencia se observó en la variedad AD-1 y en la selección UMC-702, con un 60 % y 8.50 % respectivamente (Cuadro 9).



Cuadro 8. Efecto del medio de cultivo B5 en la sobrevivencia de anteras de frambuesa, genotipos AD-1, Joan J, UMC 702 y V-74.

Variable	Variedad	Media	Cuadrado de la media		CV	R <sup>2</sup>
			Tratamiento	Error		
Sobrevivencia (B5)	AD-1	89.69	4563.63 <sup>NS</sup>	5733.33	17.99	0.44
	Joan J	83.63	15296.96**	9666.66	25.06	0.61
	UMC-702	33.33	30133.33**	10400	65.22	0.74
	V-74	42.42	22606.06 <sup>NS</sup>	32000	89.89	0.41

Altamente significativo \*\*: Significativo \*: No significativo NS

Cuadro 9. Efecto del medio de cultivo NN en la sobrevivencia de anteras de frambuesa, genotipos AD-1, Joan J, UMC 702 y V-74.

Variable	Variedad	Media	Cuadrado de la media		CV	R <sup>2</sup>
			Tratamiento	Error		
Sobrevivencia (N N)	AD-1	60	15000 <sup>NS</sup>	19200	49.23	0.43
	Joan J	39.39	30654.54**	13733.33	63.42	0.69
	UMC-702	8.48	2424.24 <sup>NS</sup>	7200	213.21	0.25
	V-74	56.9	3630.30 <sup>NS</sup>	15666	46.84	0.18

Altamente significativo \*\*: Significativo \*: No significativo NS

Caso contrario ocurre para la variable oxidación: el mayor porcentaje de oxidación se observa cuando las anteras de los distintos genotipos fueron expuestas al medio de cultivo NN mientras que el menor porcentaje se observa cuando las anteras fueron sembradas en el medio B5. Las anteras del genotipo UMC-702 sembradas en el medio de cultivo NN con 91.51 % de oxidación, fueron las anteras que mayor grado oxidación presentaron (Cuadro 10), mientras que las anteras del genotipo AD-1, sembradas en el medio de cultivo B5, presentaron menor grado de oxidación (Cuadro 11).

Cuadro 10. Efecto del medio de cultivo NN en la oxidación de anteras de frambuesa, genotipos AD-1, Joan J, UMC 702 y V-74.

Variable	Variedad	Media	Cuadrado de la media		CV	R <sup>2</sup>
			Tratamiento	Error		
Oxidación (N N)	AD-1	40	15000 <sup>NS</sup>	19200	73.85	0.43
	Joan J	60.60	30654.54 <sup>**</sup>	13733	41.22	0.69
	UMC-702	91.51	2424.24 <sup>NS</sup>	7200	19.76	0.25
	V-74	43.03	3630.30 <sup>NS</sup>	15666	62.01	0.18

Altamente significativo \*\*; Significativo \*; No significativo NS

Cuadro 11. Efecto del medio de cultivo B5 en la oxidación de anteras de frambuesa, genotipos AD-1, Joan J, UMC 702 y V-74.

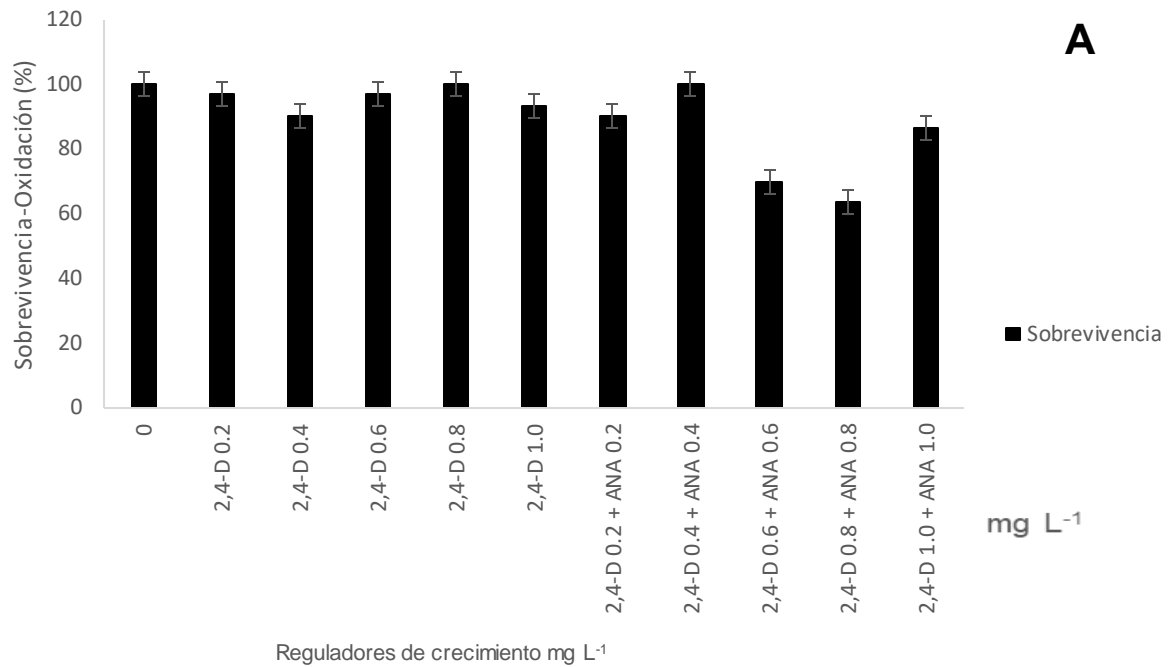
Variable	Variedad	Media	Cuadrado de la media		CV	R <sup>2</sup>
			Tratamiento	Error		
Oxidación (B5)	AD-1	9.69	3896.96 <sup>NS</sup>	6400	175.89	0.39
	Joan J	16.36	14296.96 <sup>**</sup>	1529.69	128.09	0.61
	UMC-702	66.66	30133.33 <sup>**</sup>	10400	32.61	0.74
	V-74	57.57	22606.06 <sup>NS</sup>	32000	66.24	0.41

Altamente significativo \*\*; Significativo \*; No significativo NS

La sobrevivencia de anteras también se ve afectada por la aplicación de reguladores del crecimiento en los medios de cultivo.

En el caso del genotipo AD-1, independientemente del medio empleado, el uso de 2,4-D solo o en combinación con ANA no tuvo efectos estadísticamente significativos (Cuadro 3A y 5A). Anteras en el medio B5 (Figura 5A), expuestas a 2,4-D (0.8 mg L<sup>-1</sup>) y 2,4-D + ANA (0.4 +0.4 mg L<sup>-1</sup>) alcanzaron porcentajes de sobrevivencia del 100 %, mientras que anteras sembradas en el medio de cultivo NN, expuestas a 2,4-D (0.2,

0.6 y 0.8 mg L<sup>-1</sup> respectivamente), solo alcanzaron un máximo de 80 % de sobrevivencia, sin superar al testigo (93 %). De igual manera, en el caso de las anteras cultivadas en el medio NN se observa que concentraciones elevadas de 2,4-D (1.0 mg L<sup>-1</sup>) y 2,4-D (0.6 mg L<sup>-1</sup>) + ANA (0.6 mg L<sup>-1</sup>), disminuyen los porcentajes de sobrevivencia hasta en 70 % (Figura 5B).



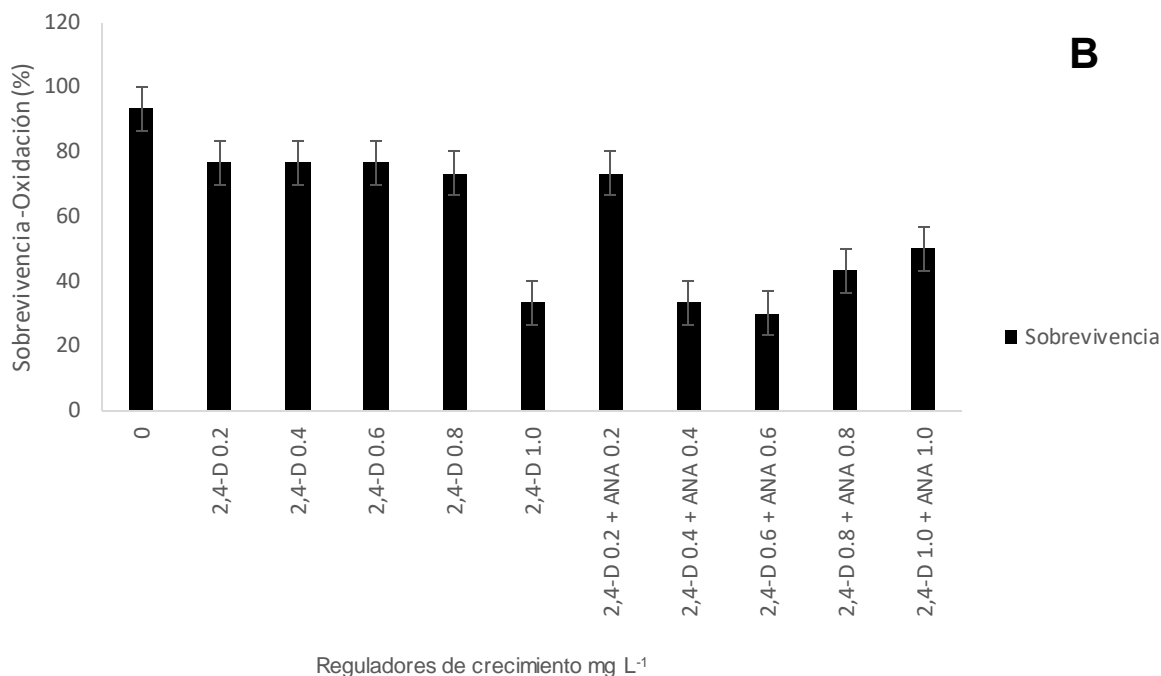


Figura 5. Efecto de los medios de cultivo Gamborg (A) y Nitsch & Nitsch (B) en la sobrevivencia de anteras de frambuesa, genotipo AD-1.

Al probar los reguladores del crecimiento en el genotipo Joan J, se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Cuadro 7A y 10A).

Cuando se usó la auxina 2,4-D separada del ANA, en el medio de cultivo B5 (Figura 6A), se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia de hasta un 97 % (0.2 mg L<sup>-1</sup>), mientras que al aplicarla combinada (0.4 + 0.4, 0.6 + 0.6 y 1.0 + 1.0 mg L<sup>-1</sup>) se lograron porcentajes de hasta un 100% de sobrevivencia, reduciendo en su totalidad la oxidación de explantes. Las anteras en el medio NN (Figura 6B) expuestas a 2,4-D (0.8 mg L<sup>-1</sup>) sobreviven en un 87% mientras que la sobrevivencia se reduce a 0 % cuando las anteras están en contacto con 2,4-D y ANA (0.8 + 0.8 mg L<sup>-1</sup>).

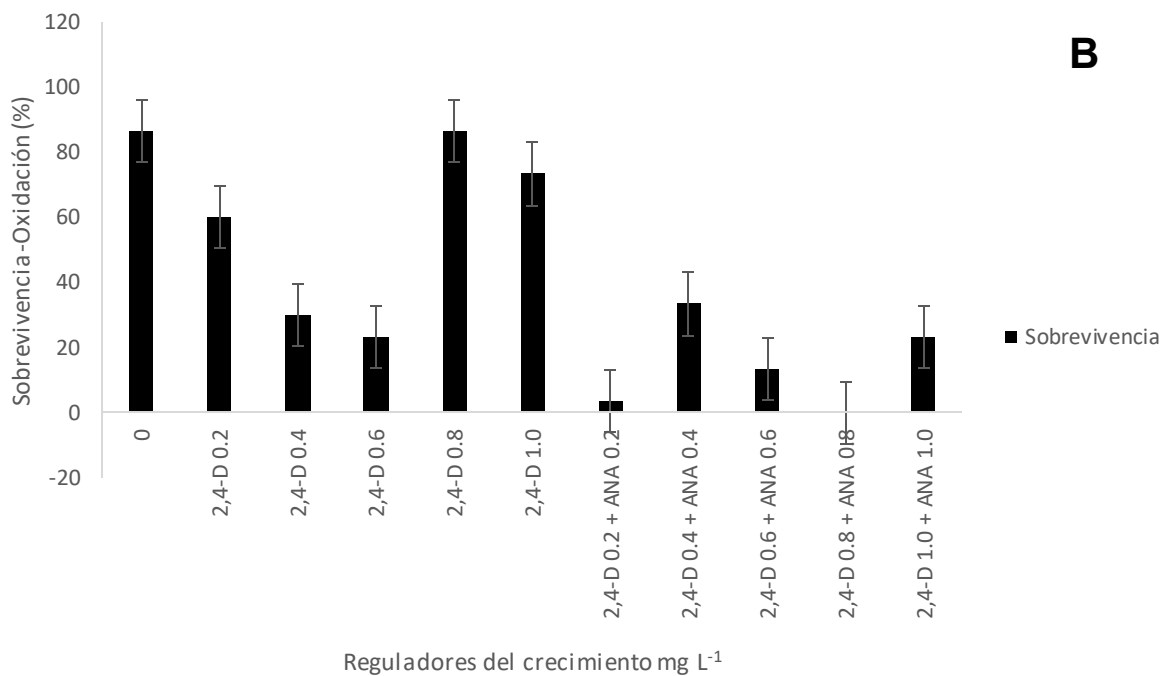
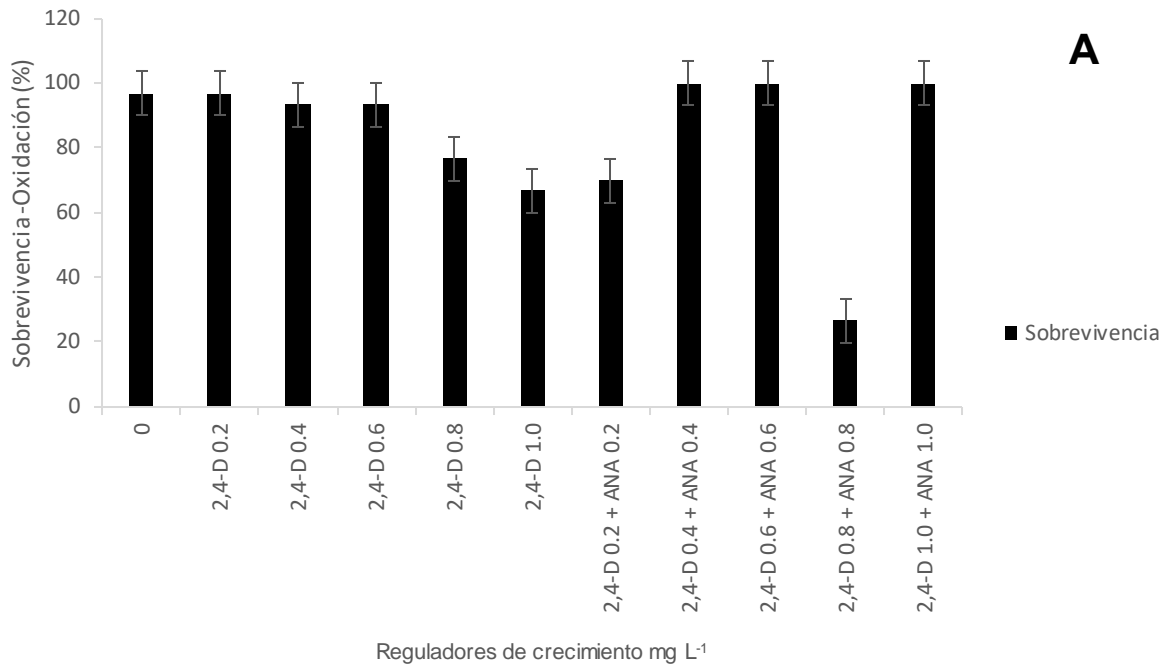


Figura 6. Efecto de los medios de cultivo Gamborg (A) y Nitsch & Nitsch (B) en la sobrevivencia de anteras de frambuesa, genotipo Joan J.

Al igual que para el caso anterior, el análisis estadístico muestra diferencias significativas entre tratamientos cuando las anteras del genotipo UMC-702 fueron

sembradas en el medio B5; sin embargo, cuando son sembradas en el medio NN, no se observan variaciones significativas entre tratamientos (Cuadro 13A y 15A).

Dosis de 0.8 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y dosis de 0.8 + 0.8 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + ANA, en el medio de cultivo B5 (Figura 7A), logran porcentajes de sobrevivencia de anteras de 73 % y 80 %, respectivamente, lo que representa, en relación al testigo, una reducción de la oxidación en 60 % y 67 %. En el medio NN, el uso de 2,4-D (0.2 mg L<sup>-1</sup>), logra un porcentaje de sobrevivencia del 30 % mientras que en combinación con ANA (0.8 + 0.8 mg L<sup>-1</sup>), alcanza una sobrevivencia del 10%. Aunque lo anterior representa una disminución del porcentaje de oxidación en 20 %, para el primer caso, comparado con el testigo, en la mayoría de los tratamientos el grado de oxidación es elevado (Figura 7B).

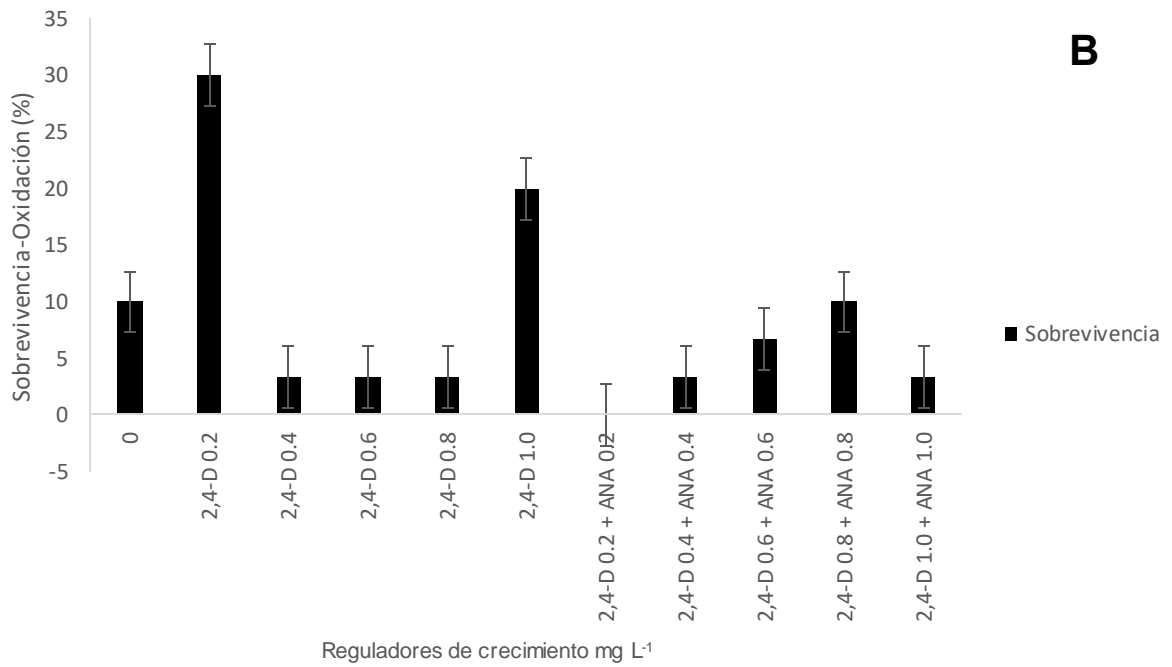
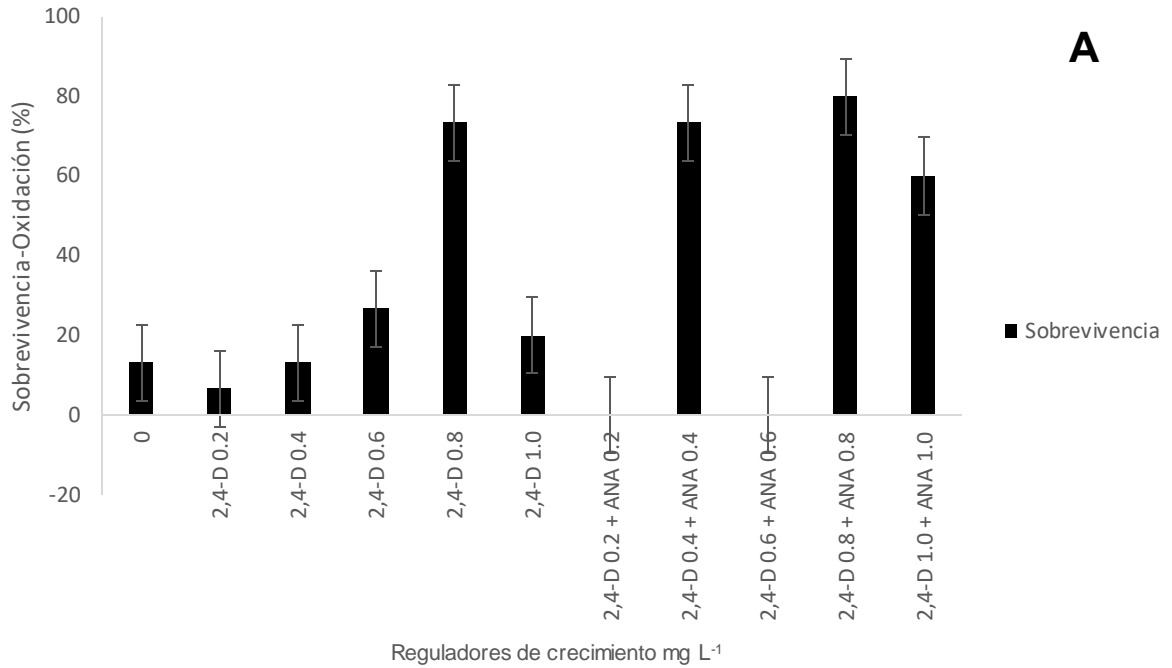
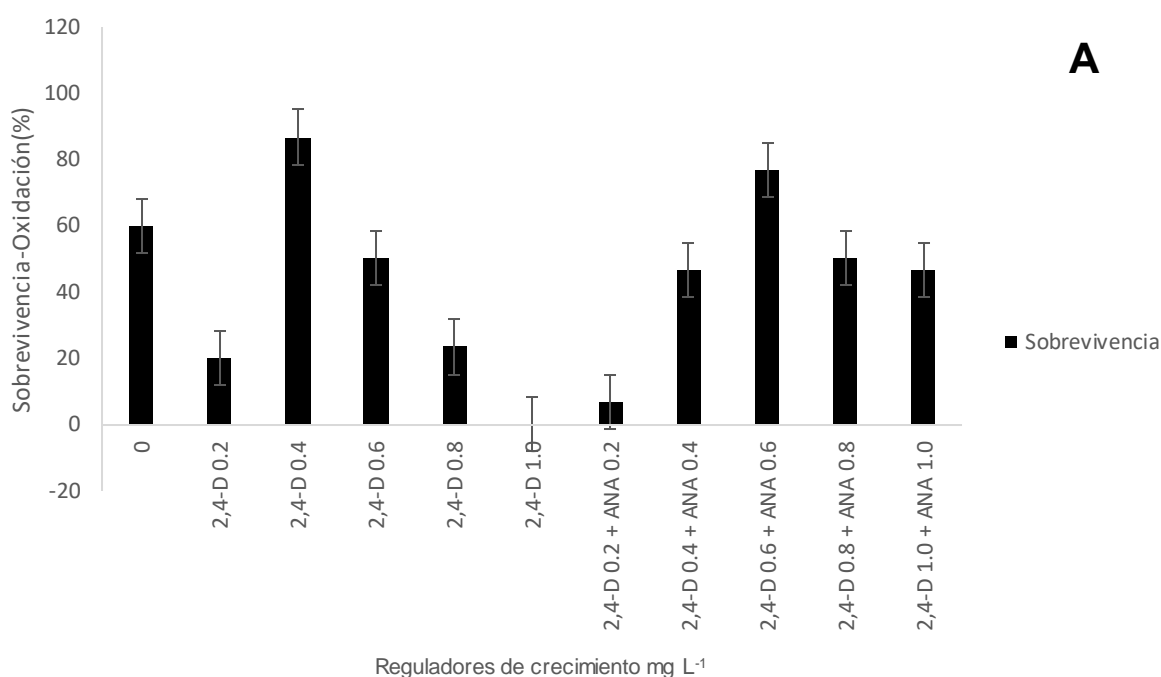


Figura 7. Efecto de los medios de cultivo Gamborg (A) y Nitsch & Nitsch (B) en la sobrevivencia de anteras de frambuesa, genotipo UMC-702

Estadísticamente y de manera independiente al medio de cultivo empleado, el efecto entre los tratamientos no es significativo, para el caso del genotipo V-74 (Cuadro 17A y 20A); sin embargo, se advierte que, opuesto a los genotipos anteriores, el genotipo V-74 parece tener mayor afinidad por el medio de cultivo NN ya que para la mayoría de las dosis empleadas las tasas de sobrevivencia son altas, no obstante, el porcentaje de sobrevivencia más alto se observa cuando las anteras están en contacto con la combinación de auxinas del tratamiento 8 (2,4-D 0.6 mg L<sup>-1</sup> + ANA 0.6 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 8B). En el caso de los explantes cultivados en el medio de cultivo B5, la dosis de 0.2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D logró una sobrevivencia del 87 % y la combinación de 2,4-D + ANA a dosis de 0.6 + 0.6 mg L<sup>-1</sup> consiguió una tasa de sobrevivencia del 77 %, disminuyendo así, en relación al testigo, la oxidación en 27 % y 17% respectivamente (Figura 8A).





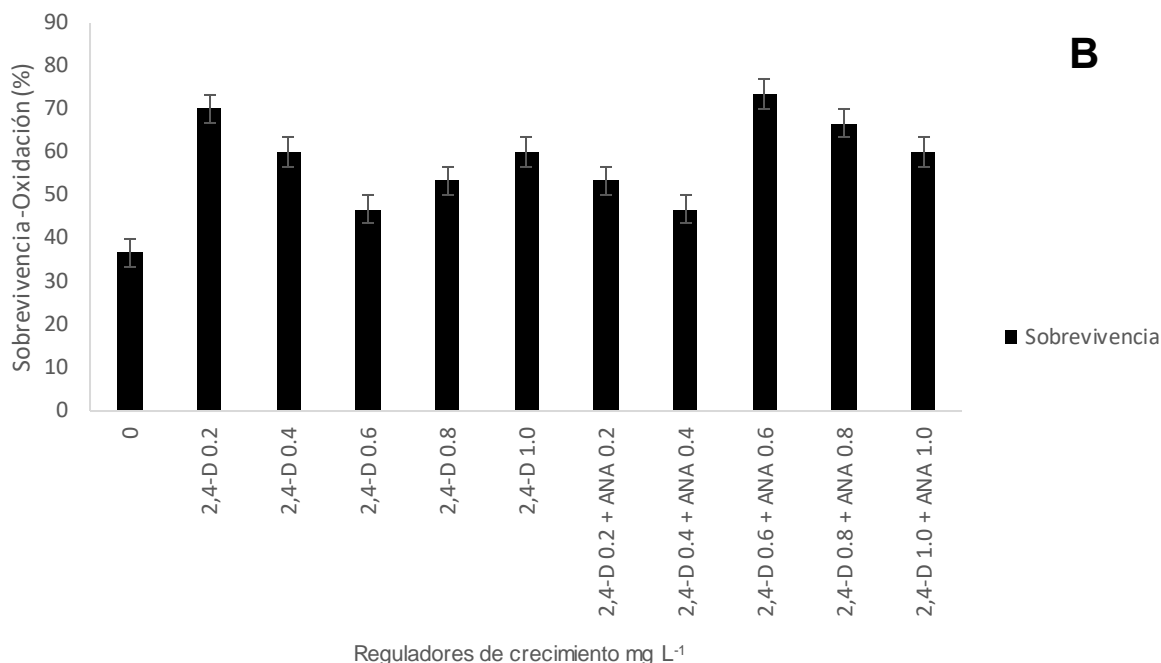


Figura 8. Efecto de los medios de cultivo Gamborg (A) y Nitsch & Nitsch (B) en la sobrevivencia de anteras de frambuesa, genotipo V-74

### 5.2.2. Efecto de las auxinas en la callogénesis de anteras

La formación de callo se observó a las 15 semanas de cultivo en los medios de inducción y la respuesta al cultivo de anteras por genotipo se expone en porcentaje de callo formado por cada 100 anteras sembradas. Los resultados del presente estudio revelan que la producción de masas desdiferenciadas se encuentra restringida a sólo dos de los cuatro genotipos probados, contrastando así con los parámetros anteriormente analizados y en el análisis de comparación de medias se observa que hubo diferencias estadísticas en cuanto al uso de reguladores del crecimiento, a diferentes dosis y combinaciones, en los genotipos estudiados (Cuadro 12 y 13).

Cuadro 12. Efecto de reguladores del crecimiento en la inducción de callo en genotipos de frambuesa AD-1, Joan J, UMC-702 y V-74 y comparación de medias por prueba Duncan. Medio Gamborg.

Anteras por tratamiento	Tratamiento (mg L <sup>-1</sup> )	Genotipos			
		AD-1	Joan J	UMC-702	V-74
30	-----	0.0	0 c	0.0	3.33 b
30	0.2 + 0.0	0.0	0 c	0.0	3.33 b
30	0.4 + 0.0	0.0	0 c	0.0	0 b
30	0.6 + 0.0	0.0	0 c	0.0	16.67 a
30	0.8 + 0.0	0.0	0 c	0.0	3.33 b
30	1.0 + 0.0	0.0	0 c	0.0	0 b
30	0.2 + 0.2	0.0	0 c	0.0	0 b
30	0.4 + 0.4	0.0	36.66 a	0.0	3.33 b
30	0.6 + 0.6	0.0	16.66 b	0.0	3.33 b
30	0.8 + 0.8	0.0	0 c	0.0	3.33 b
30	1.0 + 1.0	0.0	16.66 b	0.0	0 b
	Media Total	0.0	6.36	0.0	3.33

Letras diferentes junto a las medias, indican diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de Duncan  $P \leq 0.05$

Cuadro 13. Efecto de reguladores de crecimiento en la inducción de callo en genotipos de frambuesa AD-1, Joan J, UMC-702 y V-74 y comparación de medias por prueba Duncan. Medio Nitsch & Nitsch

Anteras por tratamiento	Tratamiento (mg L <sup>-1</sup> )	Genotipos			
		AD-1	Joan J	UMC-702	V-74
30	-----	0.0	0.33 a	0.0	0 c
30	0.2 + 0.0	0.0	0 a	0.0	3.33 ab
30	0.4 + 0.0	0.0	0 a	0.0	6.66 ab
30	0.6 + 0.0	0.0	0 a	0.0	0 c
30	0.8 + 0.0	0.0	0 a	0.0	0 c
30	1.0 + 0.0	0.0	0 a	0.0	30 a
30	0.2 + 0.2	0.0	0 a	0.0	13.33 ab
30	0.4 + 0.4	0.0	0 a	0.0	3.33 ab
30	0.6 + 0.6	0.0	0 a	0.0	6.66 bc
30	0.8 + 0.8	0.0	0 a	0.0	3.33 bc
30	1.0 + 1.0	0.0	0 a	0.0	0 c
	Media Total	0.0	0.03	0.0	6.05

Letras diferentes junto a las medias, indican diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de Duncan  $P \leq 0.05$

El callo formado que emergió de diferentes partes de la antera, se hizo visible a simple vista y, en primera instancia se tornó de color blanco, posteriormente incrementó en

tamaño y se mostró color amarillo (Figura 9). En el caso del genotipo Joan J, algunas partes se mostraron color verde. Cabe mencionar que en ninguno de los casos fue evidente la formación de estructuras embriogénicas y, por tanto, no hubo regeneración de plántulas (Figura 10).

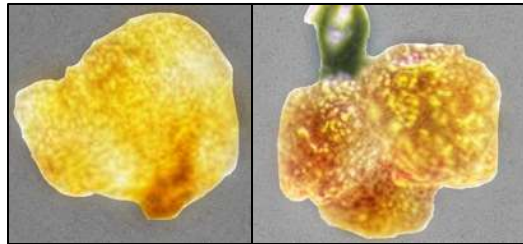


Figura 9. Formación de callo en genotipo V-74. Izquierda, medio B5; derecha NN.

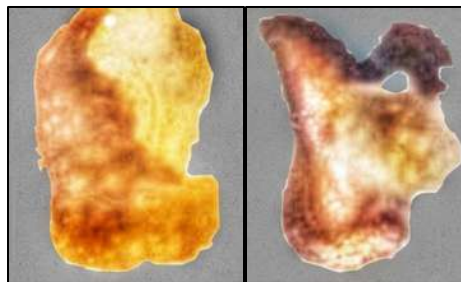


Figura 10. Formación de callo en genotipo Joan J: izquierda medio B5; derecha medio NN.

El análisis estadístico muestra que existen diferencias significativas cuando las anteras de los dos genotipos que formaron callo son sembradas en el medio de cultivo B5 mientras que cuando son sembradas en el medio de cultivo NN sólo existen diferencias significativas en el genotipo V-74 (Cuadro 12A y 19A). En el genotipo Joan J, el mayor índice de inducción androgénica (6.36 %), se logró al colocar las anteras en el medio de cultivo Gamborg (Cuadro 14), y en oposición a lo anterior, en el genotipo V-74 (6.06 %) se consiguió cuando las anteras se dispusieron en el medio Nitsch & Nitsch (Cuadro 15).

Cuadro 14. Respuesta a la inducción de callo en anteras de frambuesa genotipos AD-1, Joan J, UMC-702 y V-74 y significancia de tratamientos, medio de cultivo B5.

Variable	Variedad	Media	Cuadrado de la media		CV	R <sup>2</sup>
			Tratamiento	Error		
Callo (B5)	AD-1	-----	-----	-----	-----	-----
	Joan J	6.36	4363.63**	1400	125.35	0.75
	UMC-702	-----	-----	-----	-----	-----
	V-74	3.3	666.66*	666.66	165.14	0.50

Altamente significativo \*\*; Significativo \*; No significativo NS

Cuadro 15. Respuesta a la inducción de callo en anteras de frambuesa genotipos AD-1, Joan J, UMC-702 y V-74 y significancia de tratamientos, medio de cultivo NN.

Variable	Variedad	Media	Cuadrado de la media		CV	R <sup>2</sup>
			Tratamiento	Error		
Callo (N N)	AD-1	-----	-----	-----	-----	-----
	Joan J	0.03	0.30 <sup>NS</sup>	0.66	574.45	0.31
	UMC-702	-----	-----	-----	-----	-----
	V-74	6.06	1387.87*	100	111.24	0.58

Altamente significativo \*\*; Significativo \*; No significativo NS

La Figura 11A indica que, en el caso del genotipo Joan J, no hay formación de callo cuando la aplicación de auxinas al medio de cultivo B5 se realiza de manera aislada (2,4-D); cuando se suministran en combinación (2,4-D + ANA) los callos se hacen presentes y el mayor porcentaje de formación de los mismos (37 %) se obtiene al aumentar la dosis hasta 0.4 + 0.4 mg L<sup>-1</sup>. En lo referente al medio de cultivo NN (Figura 11B), la aplicación de reguladores del crecimiento no tuvo un efecto significativo, ya

que la formación de callo solo tiene lugar, aunque incipientemente, en el tratamiento testigo (0.33 %).

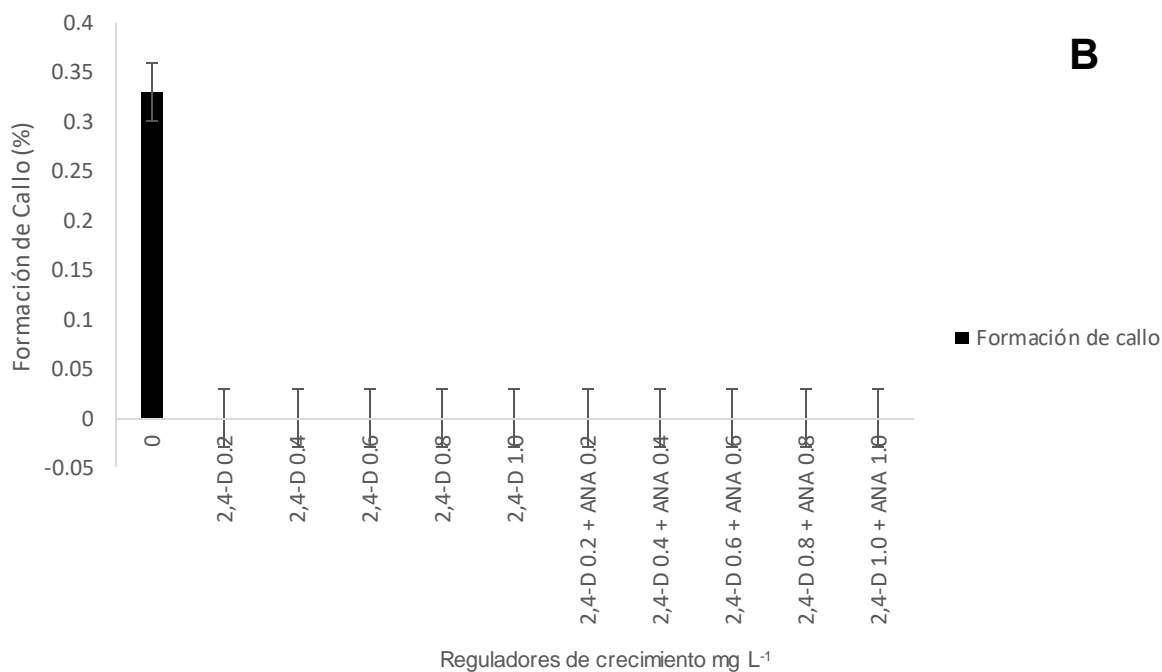
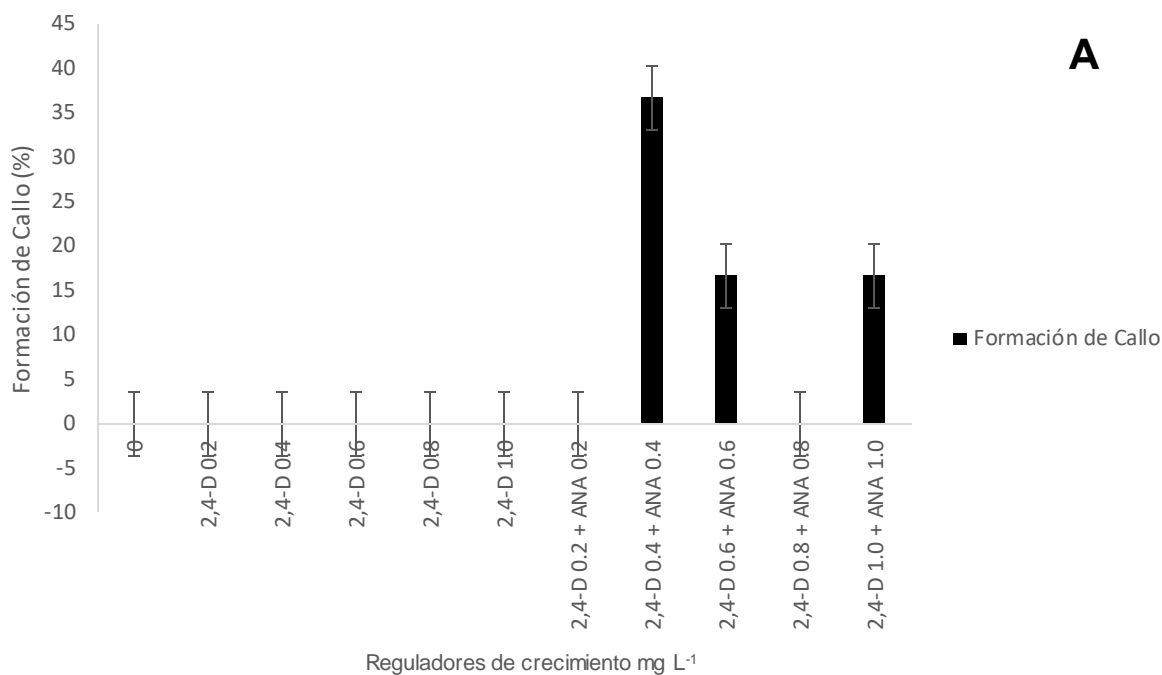
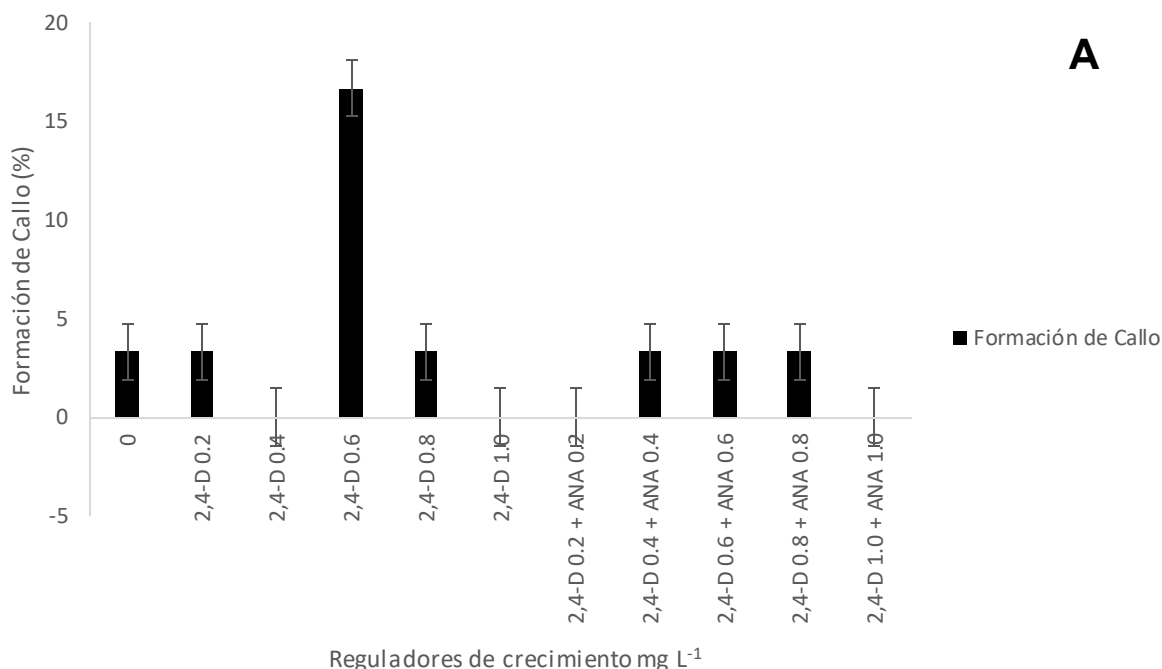


Figura 11. Efecto de los medios de cultivo Gamborg (A) y Nitsch & Nitsch (B) en la callogénesis de anteras. Genotipo Joan J.

El uso de reguladores del crecimiento tuvo efectos significativos cuando fueron probados en anteras del genotipo V-74, (Cuadro 19A y 22A) indistintamente del medio de cultivo empleado. De manera opuesta al genotipo Joan J, la Figura 12 señala que empleo de auxinas en forma independiente surte un mayor efecto que al usarlas en combinación.

En referencia al medio de cultivo B5 (Figura 12A), el uso de 2,4-D a dosis de 0.6 mg L<sup>-1</sup> estimuló la formación de callo en un 17 %, mientras que su aplicación en combinación con ANA ejerció mínima influencia: la dosis media de 0.6 + 0.6 mg L<sup>-1</sup> redujo el callo en un 14 % y la dosis alta de 1.0 + 1.0 mg L<sup>-1</sup> incluso lo inhibió.

En el caso del medio de cultivo NN (Figura 12B), se promovió un mayor porcentaje de formación de callo (30 %) cuando una dosis alta (1.0 mg L<sup>-1</sup>) de 2,4-D fue introducida y, de manera similar a lo anteriormente referido, el suministro de 2,4-D y ANA en altas dosis (1.0 y 1.0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente), inhibió la aparición de callo.



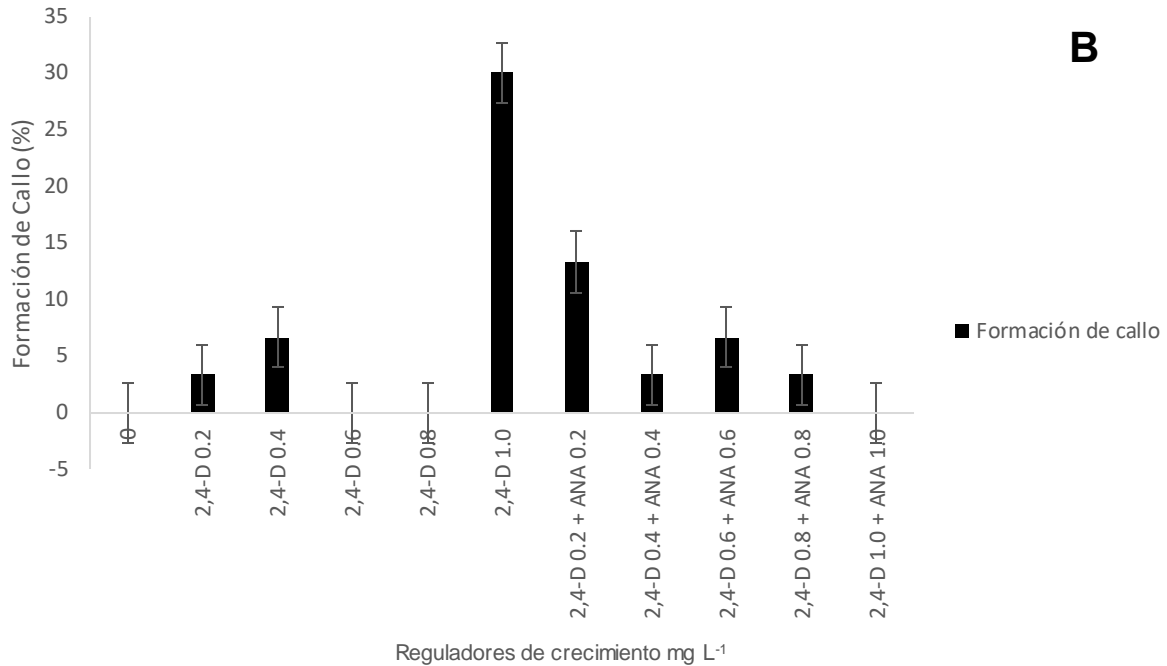


Figura 12. Efecto de los medios de cultivo Gamborg (A) y Nitsch & Nitsch (B) en la callogénesis de anteras, genotipo V-74.

### 5.3. Viabilidad celular

El ensayo por tinción celular con “Azul de Evan” fue hecho con el propósito de constatar la integridad física de las células mediante la filtración del colorante al interior de las mismas y así comprobar la viabilidad de los callos originados a partir de anteras de frambuesa; en otras palabras, era necesario comprobar la existencia de células rotas que cesaran sus actividades metabólicas. Bajo la lente de un microscopio, el indicativo de ruptura celular era determinado por la presencia en las células de coloración azul; si no se teñían se infería continuaban con sus funciones vitales. De esta manera, al realizar las pruebas, pudo constatar que hubo un mayor porcentaje de células no teñidas que de células teñidas, en los genotipos que originaron callos, lo cual demuestra la viabilidad celular del tejido desdiferenciado. En el genotipo Joan J se observó un porcentaje de viabilidad de 90 % mientras que en el genotipo V-74 se observó un porcentaje de viabilidad de 95 % (Figura 13).

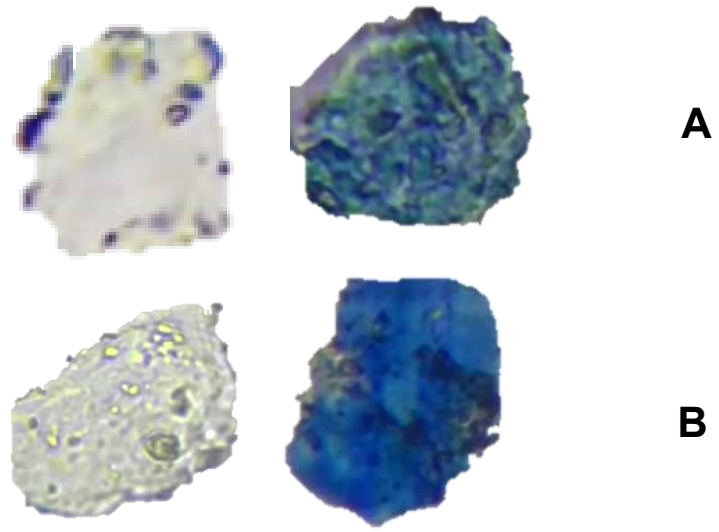


Figura 13. Viabilidad celular de anteras de frambuesa genotipo Joan J (A) y genotipo V-74 (B).



## VI. DISCUSIÓN

### 6.1. Identificación del estado de división celular propicio para la inducción de androgénesis en anteras de frambuesa y pretratamiento de inducción de estrés

El grado de división celular o desarrollo de la microespora, es un factor endógeno que tiene importante relevancia en el éxito de la técnica de cultivo de anteras (Seguí-Simarro y Nuez, 2008), pues parece existir una relación entre la polaridad de la división celular del polen y la habilidad para reprogramar su desarrollo (Solís-González, 2012). Según Tripathy (2019), Warchol et al. (2018) y Ślusarkiewicz-Jarzina (2017), en la mayoría de los casos el estado uninucleado tardío o el estado binucleado temprano es el propicio para la extracción y siembra en los medios de cultivo, asimismo señalan que el estado uninucleado puede ser morfológicamente correlacionado de acuerdo a la longitud del botón floral. El estado uninucleado difiere entre especies, sin embargo, en cultivos como arroz, trigo y triticale fue determinado entre los 3–5 mm, lo cual coincide con lo observado en frambuesa. En papaya y pepino, una longitud que varía de los 10 a 15 mm resulta óptima para la siembra (Chong-Pérez *et al.*, 2018; Asadi *et al.*, 2018), mientras que para el lino Mikelsone *et al.* (2013) señalan que el rango óptimo de botón floral esta entre los 5-7 mm.

En el estado uninucleado, hay un cambio en el desarrollo normal del polen y puede ocurrir uno de los siguientes escenarios: el desarrollo de la microespora frena y/o muere inmediatamente, la microespora forma una estructura tipo polen maduro antes de frenar su desarrollo y morir lo cual ocurre típicamente al cuarto o quinto día después de la siembra, y algunas otras microesporas pueden ser inducidas efectivamente y, dependiendo del genotipo, después de repetidas divisiones mitóticas puede formarse callo (Seguí-Simarro y Nuez, 2008). Esto se debe, probablemente, a su estado proliferativo, cuando la microespora se ha alargado y está lista para dividirse reorientando el plano de división de uno asimétrico a uno simétrico y hay estructuras desdiferenciadas (Malik *et al.* 2007), a diferencia a como ocurre en el polen maduro,

donde un programa específico para su maduración es activado según El-Hennawy *et al.* (2011) y Seguí-Simarro (2010).

En este sentido, la aplicación del tratamiento de estrés es clave para la reprogramación de la microespora hacia una de las rutas referidas, pues es el inductor de la respuesta a embriogénesis o a formación de callo del explante y, como consecuencia, de ello una serie de cambios a nivel celular y génico ocurren (Solís-González, 2012). Los cambios que suceden a nivel celular son: reposición nuclear, modificación del citoesqueleto y ruptura de la vacuola central. Por su parte, los cambios que a nivel génico sobrevienen, pueden a su vez pueden ser clasificados en 3 categorías: respuesta celular al estrés, supresión del programa gametofítico y expresión del programa de embriogénesis o formación de callo (Pauls *et al.* 2006). En la respuesta celular al estrés existen, primero, señales extracelulares reguladas por proteínas homólogas de kinasas que actúan como intermediarios entre el pretratamiento (frío) y la activación del programa de expresión génica y luego, cambios en la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP), mismas que tienen un papel crioprotector en tolerancia al estrés. La supresión del programa gametofítico incluye la cancelación síntesis de almidón y eliminación de reservas de almidón a través de la inhibición de genes involucrados en la biosíntesis y acumulación de almidón y, paralelamente, se activa un programa de dediferenciación celular (Seguí simarro y Nuez 2008; Solís-González, 2012)

## **6.2. Efecto del genotipo y medio de cultivo en la sobrevivencia de anteras**

El medio de cultivo es un factor que ejerce una influencia vital en el proceso de producción de haploides, pues limita o promueve el desarrollo de anteras. En el presente caso, se mostró un claro efecto de los medios de cultivo siendo más efectivo el desarrollo de tejido caloso en las anteras cultivadas en el medio B5. El-Maghawary *et al.* (2012), descubrieron que el medio B5 funcionó para cultivar anteras de calabacita, pero no para anteras de sandía. Savel'ev *et al.* (2010) al probar en

variedades rusas de frambuesa roja remontante los medios de cultivo N6 y MS, identificaron una mayor respuesta de las anteras en el medio N6.

Los resultados del presente estudio, difieren con lo señalado por Fu *et al.* (2008), quienes mencionan que tanto el medio B5 como NN tuvieron escasa respuesta a la inducción de androgénesis en clavel; sin embargo, guardan similitud con aquellos expuestos por Koleva-Gudeva *et al.* (2007) y Górecka *et al.* (2009). Los primeros señalan un mayor rendimiento en la inducción de haploides en anteras de chile expuestas al medio NN; los segundos atribuyen mayor eficiencia al medio B5 en zanahoria. Otros autores sostienen que el mejor medio para la inducción de haploides es el MS (Lee *et al.* 2013; Uno *et al.* 2016; Chong-Pérez *et al.* 2018; Madan *et al.* 2019).

En este sentido, Irikova *et al.* (2011) mencionan que tanto medio B5 como NN, en chile manzano, solamente originan formación de callo, sin llegar a la regeneración de planta, demostrando así ser un cultivo recalcitrante a este proceso.

A pesar de la importancia del medio basal, una respuesta positiva a la androgénesis se puede atribuir más al genotipo (Sánchez *et al.* 2020), pues esta causa una respuesta diferencial tanto en la inducción de callo como en la regeneración de plántulas (Hooghvorst *et al.* 2018). Del mismo modo, la competencia androgénica varía de genotipo en genotipo pues en diversas especies e incluso en distintas variedades dentro de las especies o individuos, se pueden mostrar respuestas muy heterogéneas a la inducción de androgénesis y la misma puede ser heredada por los descendientes (Seguí-Simarro y Nuez, 2008).

Kikkert *et al.* (2005), en un estudio realizado en uva, reportan que, después de 30 semanas de cultivo, 3 de 9 genotipos probados no mostraron respuesta alguna; los genotipos restantes formaron callo, pero fueron difíciles de mantener por un período más largo de tiempo, y, posteriormente, algunos de ellos no conservaron su capacidad embriogénica y la formación de plántulas no fue lograda.

Al probar distintos genotipos de trigo (líneas parentales e híbridos) El-Hennawy *et al.* (2011) obtuvieron bajos porcentajes de inducción de callo. Las líneas parentales mostraron un rango de callo formado entre 0.67 % - 7.67 % y los híbridos un rango entre 4-18 %.

En piñón, después de 4 semanas de cultivo, anteras de 4 de 7 genotipos probados en medio MS suplementado con KIN ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) y ANA ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) se mostraron necróticas y no desarrollaron la siguiente etapa (Madan *et al.* 2019). En mostaza, al probar el efecto del medio Gamborg (B5) suplementado con 2,4-D ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) y ANA ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), en la inducción de haploides, Kumari *et al.* (2015), encontraron que después de 4 semanas de cultivo, 4 de 6 genotipos mostraron nula respuesta a la androgénesis.

Ismaili y Mohammadi, (2016), advirtieron que sólo 10 de 46 genotipos probados en maíz, independientemente el medio de cultivo en el cual fueron colocados (IMSS, N6 y YPM), respondían al cultivo de anteras. En piñón, de 7 genotipos probados, 2 mostraron una pobre respuesta a la inducción de callo (Madan *et al.*, 2019), y en calabacita el genotipo “Yellow Bik F1” produjo mayor porcentaje de callos embriogénicos (38.7 %) que el genotipo “Arlika F1” (Dong *et al.*, 2016).

En cuanto a la necrosis de anteras, se han reportado efectos similares a este estudio. Asadi *et al.*, (2018), al probar dos variedades de pepino (Beta Alpha y Esfahani), en dos protocolos distintos de cultivo de anteras demostraron que después de dos semanas las anteras se hincharon, pero ninguna se desarrolló hasta la formación de callo y seis semanas más tarde murieron.

Aunado a lo anterior, un factor que puede tener particular influencia en la sobrevivencia-oxidación de anteras es la transferencia de oscuridad a luz. Ésta parece tener un efecto negativo en la respuesta de las anteras a continuar su desarrollo porque la formación de callo se impide por una alta producción de inhibidores del crecimiento cuando las anteras son expuestas a la luz (Azofeifa, 2009). La producción de compuestos fenólicos endógenos es estimulada por la luz y mientras la exposición

a la misma sea mayor, mayores cantidades se acumularán ocasionando el típico color marrón de la oxidación o el negro de la necrosis del explante (George, *et al.* 2008). Además, la variación de color está relacionada con la activación de la enzima polifenol-oxidasa que oxida a los fenoles y produce compuestos tóxicos e insolubles denominados quinonas (Hernández-Amasifuen y Díaz-Pillasca, 2019). Por tanto, el mantenimiento de los explantes en ausencia de luz puede reducir el porcentaje de oxidación y por consiguiente un número mayor de explantes vivos puede ser logrado (Pelizza *et al.* 2016). En ese orden, numerosos investigadores, para prevenir la “fenolización” en cultivo *in vitro*, han propuesto la adición de antioxidantes al medio de cultivo tales como carbón activado (usado en el presente estudio), ácido cítrico y ácido ascórbico o absorbentes poliméricos como la polivinilpirrolidona (Shrivastava, *et al.*, 2020).

### **6.3. Efecto de las auxinas en la callogenesis de anteras**

Los reguladores de crecimiento, y su combinación, mostraron un efecto prominente sobre la formación de callos de anteras de frambuesa, observándose un mejor desarrollo de callos en los medios que contenían una combinación de 2,4-D y ANA. En un trabajo realizado en anturio por Texeira Da Silva *et al.* (2015), observaron que la formación de callo se logró tras 3.5 meses de cultivo, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio.

El uso de reguladores del crecimiento en los medios de cultivo para promover la división celular inicial es crucial en cultivo de anteras y determinante en el logro de resultados (Asadi *et al.*, 2018). Numerosos reguladores (BA, 2,4-D, KIN, ZT, IBA, ANA, AIA) han sido empleados en cultivo *in vitro* para fines diversos, solos o en combinación, aunque las auxinas son un factor clave porque participan fuertemente en regulaciones cíclicas de la fisiología de las plantas y división celular (Sabooni y Shekafandeh, 2017). Las auxinas comúnmente más utilizadas son el ácido 2,4-diclorofenoxiacético y el ácido naftalenacético (Hooghvorst *et al.*, 2018). Chong-Pérez *et al.* (2018), señalan que la combinación de reguladores de crecimiento aporta un mayor efecto en la

inducción de androgénesis que el simple uso por separado. Puntualizan que una combinación de 2,4-D y ANA, es más efectiva en la inducción de callo para la generación de haploides, en *Vasconcelia pubscens*.

En el presente estudio se determinó una respuesta similar al inducir callo en anteras de la variedad Joan J. En el medio B5 con la combinación de 2,4-D y ANA en dosis de 0.4 mg L<sup>-1</sup> y 0.4 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, se advirtió un mayor porcentaje (37 %) de calogénesis (Figura 9). Para el caso de la selección V-74, el mayor porcentaje (30%) se obtuvo cuando se adicionó 1.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D al medio de cultivo NN (Figura 11).

Al probar dosis superiores a 1.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y ANA respectivamente, en arroz malayo de especie indica, Rahman *et al.* (2020), encontraron que la formación de callo es reducida a 0 %, lo cual coincide a lo expuesto en este trabajo (Figura 12A). La formación de callo ocurre cuando las células vegetales se multiplican en forma desorganizada. Bajo el estímulo de los reguladores de crecimiento adicionados al medio, el metabolismo de las células cambia de un estado quiescente a uno de división celular activa (George *et al.*, 2008) en el que la diferenciación y especialización celular es revertida y el explante genera nuevos tejidos provistos de meristema y células no especializadas. Por ello, se requiere la aplicación de auxinas, para la inducción de callo en los explantes, debido a su habilidad para alterar la fisiología programada en un vegetal y programar la dediferenciación y división en las células (Schmidt-Durán *et al.*, 2016).

Un callo tiene tres fases de desarrollo: inducción de división celular, un periodo de activa división celular durante el cual las células pierden cualquier tipo de especialización y, finalmente un periodo en el cual la división celular es reducida y se incrementa la diferenciación celular en el callo (González *et al.*, 2011). De manera particular, la combinación de 2,4-D y ANA, aumenta la eficiencia androgénica debido a que el efecto del 2,4-D está relacionado a la formación de callo por promoción de una rápida división y proliferación celular y el efecto del ANA está relacionado a la inducción directa de embriogénesis (Hooghvorst *et al.*, 2018).

Lo anterior significa que el tipo y concentración de auxina determinan la ruta de desarrollo que seguirá la microespora. La ruta indirecta (formación de callo) involucra un número irregular de divisiones asincrónicas que resultan en callos que experimentan organogénesis y la subsecuente formación de embriones haploides. La ruta directa es similar a la embriogénesis cigótica donde los embriones se desarrollan directamente y proceden a los estados globular, corazón, torpedo y cotiledonario (Dong *et al.*, 2016).

El efecto positivo que las auxinas aportan, se debe a un efecto sinérgico entre la interacción de hormonas exógenas y endógenas presentes, lo que permite un estado de equilibrio que da lugar a la formación de callo (Grossmann, 2003; Nic-Can y Loyola-Vargas, 2016). El efecto negativo está más relacionado a la acción del 2,4-D como herbicida. Éste regulador induce la acumulación de etileno y, como consecuencia, los niveles de ABA se elevan, inhibiéndose así la expansión y división celular lo cual regularmente resulta en tejidos dañados y posteriormente necróticos, por tanto, si el 2,4-D es aplicado a altas concentraciones, persiste por mayor tiempo ocasionando efectos negativos al cultivo *in vitro* (Rahman *et al.*, 2020).

En este estudio se reporta la aparición de masas desdiferenciadas a partir de anteras, pero en el callo formado no se hacen visibles estructuras embriogénicas, lo cual concuerda con Salas *et al.*, (2011) quienes al probar el cultivo de anteras en berenjena encontraron solo formación de callo en la mayoría de los genotipos probados. Teóricamente, la adición de reguladores del crecimiento y la inducción de estrés en los explantes provocarían la embriogénesis a partir de los callos formados, sin embargo, Sabooni y Shekanfandeh (2017), al inducir callos en dos genotipos de zarzamora, reportan que la formación de callo embriogénico solamente tuvo lugar cuando el medio de cultivo fue enriquecido con glicerol y maltosa, además de ANA y BA, y mencionan que en uno de los genotipos probados incluso provocó la organogénesis en callos iniciados de partes dérmicas. Los autores manifiestan que tal respuesta se debe a que la maltosa es lentamente metabolizada y no hay acumulación de etanol en las células

como ocurre con la sacarosa, el oxígeno intracelular presente permite a las células sobrevivir y por ende continuar su desarrollo. En cítricos se ha visto que el glicerol es una fuente útil de morfogénesis y embriogénesis (Belletre *et al.*, 1999).

De este modo, es importante destacar que, la elección concentración y/o combinación de reguladores más apropiada, depende, al igual que otros factores, tanto del genotipo como de la etapa de cultivo en que se encuentre: inducción, diferenciación, regeneración, enraizamiento y otros procesos organogénicos; y por ende debe ser determinada de manera experimental e independiente, sin generalizar (Texeira Da Silva *et al.*, 2015).

#### **6.4. Viabilidad celular**

Los métodos de exclusión por tinción son los tradicionalmente destinados para evaluar la viabilidad celular. Entre ellos, el ensayo con “Azul de Evan” ha sido ampliamente usado en múltiples estudios, por su efectividad en la rápida y reproducible determinación de células muertas (Jacyn-Baker y Mock, 1994). Las células viables tienen membranas intactas y por tanto no absorben el colorante; las células no viables no tienen membranas intactas y por ello toman el colorante filtrándolo hacia el interior, esto resulta en una rápida distinción entre células viables y no viables, pues las primeras permanecen sin teñir mientras que las segundas se hinchan y tiñen con un característico color azul (Louis y Siegel, 2011).

Resultados similares a los obtenidos en esta tesis, fueron conseguidos por Fernández-Da Silva y Menéndez-Yuffá (2006), cuando realizaron la prueba de viabilidad con “Azul de Evan” en cultivo de células de café (*Coffea arabica*) cv. Catimor las células no viables se tiñeron de un color azul intenso y las células viables no tomaron el colorante; además, observaron que la determinación de células muertas a través de este método fue rápida (10 min).



Intiaz *et al.* (2018), observaron que la muerte celular es determinada mediante la tinción con “Azul de Evan”, en cultivos celulares de garbanzo. De la misma manera que para el caso anterior, las células muertas se tiñen de color azul, pero añaden, además, que la intensidad en la absorción de la tinción, depende de la cantidad de elementos tóxicos dentro de la célula, es decir, a mayor dosis de toxinas (para este caso el Vanadio) mayor será el nivel de colorante absorbido.

La pérdida de viabilidad es un fenómeno que aún continúa en investigación, pues los descubrimientos en torno al mecanismo de la muerte celular han ocasionado discrepancias en si la disminución de funciones vitales es consecuencia de la apoptosis o la necrosis (Stoddart, 2011). La apoptosis es una secuencia programada de eventos que son responsables de la remoción de células indeseables durante el desarrollo normal y también puede ocurrir cuando una célula ha sido dañada más allá del punto de reparación, infectada con un virus o si se somete a estrés (Pérez-Delgado *et al.*, 2007). Sirve para mantener la homeostasis tisular y regula numerosos procesos fisiológicos tales como la germinación, diferenciación, formación de embriones, crecimiento, reproducción, degeneración del tapetum de anteras, desarrollo de semillas y eliminación del polen en procesos de autoincompatibilidad (Solís-González, 2012). La necrosis es un mecanismo alternativo de muerte celular que generalmente es más traumático y es ocasionado por infecciones o toxinas y no depende de un control genético específico, ni de la actividad celular (Schmid *et al.*, 1992).

Durante la ruta apoptótica, las caspasas son activadas y se adhieren a proteínas celulares y ocurren cambios en la integridad de la membrana. Las primeras células apoptóticas poseen una membrana celular intacta y segregan fosfatidilserinas, mientras que las células próximas a cesar funciones tienen una membrana rota y liberan lactato deshidrogenasa (Kurokawa y Kornbluth, 2009). La muerte celular en callos originados a partir de anteras, sucede con el objetivo de disparar el mecanismo de cambio de ruta de desarrollo y desatar el proceso de embriogénesis, redireccionando la vía gametofítica a una embriogénica con la subsecuente formación de estructuras embriogénicas tempranas (Seguí-Simaro y Nuez, 2008). En este

sentido es importante resaltar que la muerte celular programada es crucial sobre todo en las primeras etapas, pues es necesaria la muerte del tejido de las anteras para la liberación de las microesporas (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2012).

Es importante tener claro que numerosos factores deben ser considerados para adquirir un ensayo de viabilidad celular exitoso. Algunos de ellos son: la agregación de la suspensión celular, especie a trabajar, condiciones de incubación con los diferentes colorantes, cambios en la regulación enzimática, pH y variaciones en el ciclo celular y por ende algunas dificultades pueden surgir al utilizar estas pruebas (Escobedo y Miranda-Ham, 2003).

En este estudio un factor que contribuyó en la obtención de resultados positivos, fue la agregación de la suspensión celular de células desdiferenciadas. Al ser ésta renovada de manera constante (cada 7 d), permitió un crecimiento adecuado del cultivo celular y que las células en el medio líquido pudieran dispersarse, lo cual dio lugar a que el colorante tiñera las células y las observaciones pudieran realizarse (Cimini, *et al.*, 2017).

El tiempo de incubación y el colorante fueron otros factores que actuaron en favor de la prueba. Fernández-Da Silva y Menéndez-Yuffá (2006) observaron un porcentaje de viabilidad de hasta un 9.6% en cultivo celular de café, cuando la suspensión fue incubada a temperatura ambiente por 15 min de con MTT, mientras que en las mismas condiciones con Azul de Evan consiguieron un porcentaje de viabilidad de 53%. El porcentaje de viabilidad con MTT aumentó hasta 39% cuando la temperatura se elevó hasta los 37 °C y el tiempo de exposición fue aumentado hasta los 120 min.

## VII. CONCLUSIONES

En el ensayo de inducción de androgénesis mediante cultivo *in vitro* de anteras de frambuesa que se realizó, se obtuvieron las conclusiones que a continuación se enlistan:

1. La longitud del botón floral es un factor morfológico que permite identificar rápidamente el estado uninuclear de las microesporas y, por ende, el momento para la siembra de anteras. Las observaciones microscópicas de los granos de polen de frambuesa, permitieron determinar que la longitud del botón floral en la cual se encuentra el estado uninucleado fue la de 4 mm, en los genotipos probados, y ésta es la mejor longitud en frambuesa para extraer anteras.
2. El medio de cultivo tiene un marcado efecto sobre la sobrevivencia y oxidación de las anteras de los diferentes genotipos. El medio Gamborg (B5) fue el más adecuado para que las anteras del genotipo AD-1 sobrevivieran y se formara mayor cantidad de masas callosas en el genotipo Joan J, mientras que el medio Nitsch & Nitsch (NN) es el menos eficiente en la formación de callos en los diferentes genotipos, lo cual sea probablemente un efecto de los componentes del medio de cultivo y del grado de antioxidantes que presenta cada genotipo.
3. Los reguladores de crecimiento, del tipo auxínico (2,4-D y ANA), y el genotipo tienen un marcado efecto sobre la inducción de callos de anteras de frambuesa. La androgénesis en los genotipos Joan J (tallos lisos sin pubescencias) y V-74 (tallo liso con pocas pubescencias) es más efectiva que los genotipos UMC-702 y AD-1 (tallos pubescentes); asimismo, la combinación y concentración de las auxinas 2,4-D y ANA aumentan la formación de callo, lo cual es muy probable que se deba a un efecto sinérgico en su acción.
4. El tejido calloso obtenido de las anteras de frambuesa es viable y puede continuar a etapas posteriores de desarrollo.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Acosta-Echeverría, M., Sánchez-Bravo, J. y Tañón-Arno, M. 2008. Auxinas. *In*: Azcón-Bieto J., M. Talón, eds. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ediciones McGraw-Hill Interamericana. 669 p.
- Acquaah, G. 2012. Principles of plant genetics and breeding. 2nd ed. Wiley-Blackwell, Oxford. 569 p.
- Acquaah, G. 2015. Conventional plant breeding principles and techniques. *In*: J.M. Al-Khayri *et al.*, eds. 2016. Advances in plant breeding strategies: Breeding, biotechnology and molecular tools. Springer International Publishing Switzerland. 1: 115-158. [https://doi.org/DOI 10.1007/978-3-319-22521-0\\_5](https://doi.org/DOI 10.1007/978-3-319-22521-0_5).
- Ahmar, S., Gill, R. A., Jung, K.-H., Faheem, A., Qasim, M. U., Mubeen, M., y Zhou, W. 2020. Conventional and Molecular Techniques from Simple Breeding to Speed Breeding in Crop Plants: Recent Advances and Future Outlook. International Journal of Molecular Sciences. 21(7): 2590. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21072590>
- Anders-Stavang, J., Freitang, S., Foito, A., Verral. S., Heide, O. M., Stewart, D. y Sonsteby, A. 2015. Raspberry fruit quality changes during ripening and storage assessed by colour, sensory evaluation and chemical analyses. Scientia Horticulturae. 195: 216–225.
- Asadi, A., Zebarjadi, A., Reza-Abdollahi, M. y Seguí-Simarro, J.M. 2018. Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Euphytica. Pp: 214-216. [https://doi.org/10.1007/s10681-018-2297-x\(0123456789\(\).,-volIV\(0123456789\(\).,-volIV](https://doi.org/10.1007/s10681-018-2297-x(0123456789().,-volIV(0123456789().,-volIV)
- ASAGRIN, Asesorías Agrícolas e Industriales. 2007. Estrategias regionales de competitividad por rubro. Berries, región del Maule Instituto de Desarrollo Agropecuario. Región de Maule, Chile. 56 p.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana 20(1): 153-175.

- Bascopé, J. A. 2013. Informe: Realidad productiva de la frambuesa EEUU y México. Ministerio de Agricultura. Chile. 42 p. <http://www.agrimundo.cl/wp-content/uploads/Informe-Frambuesa-VF22012013.pdf>
- Bellettre, A., Couillerot, J.P. y Vasseur, J. 1999. Effects of glycerol on somatic embryogenesis in *Cichorium leaves*. Plant Cell Reports. 19: 26–31. <https://doi.org/10.1007/s002990050705>
- Bhatla, S. C., Lal, A. y Manju, A. 2018. Plant Physiology, Development and Metabolism || Auxins. , 10.1007/978-981-13-2023-1 (Chapter 15). Pp. 569–601. doi:10.1007/978-981-13-2023-1\_15
- Bhojwani, S. S., y Dantu, P. K. 2013. Plant tissue culture: An introductory text. Plant Tissue Culture: An Introductory Text, (i). Pp. 1–309. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Binarova, P., Hause, G., Cenklova, V., Cordewener, J. H. G., Van Lookeren-Campagne, M. M. 1997. A short-severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. Sex Plant Reprod 10: 200–208.
- Blakeslee, A.F., Belling, J., Farnham, M.E. y Bergner, A.D. 1922. A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. Science. 55: 646–647.
- Bobkov, S. V. 2010. Isolated Pea Anther Culture. Russian Agricultural Sciences 36(6): 413–416. doi: 10.3103/S1068367410060078
- Bos, I. y Caligari, P. 2008. Population Genetic Effects of Inbreeding. Selection Methods in Plant Breeding. Pp: 33–58. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6370-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6370-1_3)
- Bradshaw, J. E. 2017. Plant breeding: past, present and future. In: Euphytica (Vol. 213). <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1815-y>
- Broughton, S., Sidhu, P. K., y Davies, P. A. 2014. *In vitro* culture for doubled haploids: Tools for molecular breeding. In: Methods in Molecular Biology. 1145: 167–189. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0446-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0446-4_14)
- Calva-Calva, G. y Pérez-Vargas, J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria UNAM 6(11): 1-16.

- Cardoso, J. C., Abdelgalel, A. M., Chiancone, B., Latado, R. R., Lain, O., Testolin, R., & Germanà, M. A. 2016. Gametic and somatic embryogenesis through *in vitro* anther culture of different *Citrus* genotypes. *In: Plant Biosystems*, 150(2), 304–312. <https://doi.org/10.1080/11263504.2014.987847>
- Castro-Concha, L. A., Escobedo, R. M. y Miranda-Ham, M. 2012. Measurement of cell viability. *In: Methods in Molecular Biology*. 877(6): 49–56. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_5)
- Cimini S. Ronci, M. B., Barizza, E., De Pinto, M.C., Locato, V., Lo Schiavo, F. y De Gara, L. 2018. Plant Cell Cultures as Model Systems to Study Programmed Cell Death. *In: L., De Gara, V., Locato, eds. Plant Programmed Cell Death. Methods in Molecular Biology*, vol 1743. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7668-3\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7668-3_16)
- Chiancone, B. y Germanà, M. A. 2016. Microspore embryogenesis through anther culture in *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *In: M. A. Germana y M. Lambardi, eds. 2016. In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in molecular Biology*. Humana Press-Springer. 1359(27): 475-487 [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_27)
- Chong-Pérez, B., Carrasco, B., Silva, H., Herrera, F., Quiroz, K. y Garcia-Gonzales, R. 2018. Regeneration of highland papaya (*Vasconcellea pubescens*) from anther culture. *Applications in Plant Sciences*. 6(9): 3–10. <https://doi.org/10.1002/aps3.1182>
- Corral-Martínez, P. y Seguí-Simarro, J. M. 2012. Efficient production of callus-derived doubled haploids through isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Euphytica*. 187(1): 47-61. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0715-z>
- Crozier, A., Y. Kamiya, G. Bishop, y T. Yokota. 2000. Biosynthesis of hormones and elicitors molecules. *In: B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones (eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists. Pp: 850-929.
- Doerner, P. 2000. Cell division regulation. *In: B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society

- of Plant Physiologists, pp. 528-567.
- Dong, Y. Q., Zhao, W. X., Li, X. H., Liu, X. C., Gao, N. N., Huang, J. H., Wang, W. Y., Xu, X. L. y Tang, Z. H. 2016. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant Cell Reports*. 35(10): 1991–2019. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7>
- Dossett, M., y Kempler, C. 2012. Biotypic diversity and resistance to the Raspberry Aphid *Amphorophora agathonica* in Pacific Northwestern North America. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 137:445–451.
- Dossett, M., y Kempler, C. 2016. Breeding raspberries for aphid resistance in British Columbia: progress and challenges. *Acta Hortic.* 1133: 115–120.
- Dunwell, J. M. 2010. Haploids in flowering plants: Origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*. 8(4): 377–424. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x>
- El-Hennawy, M. A.; Abdalla, A. F.; Shafey, I.M. y Al-Ashkar. 2011. Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. *In: Annals of Agricultural Science*. 56(2): 63–72.
- El-Maghawary, N., Mohammed, F. y Elwan, M. 2012. Studies on Anther Culture in some Cucurbits. Editorial. LAP LAMBERT Academic Publishing. 9-12  
<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Escobedo, R.M. y Miranda-Ham, M.L. 2003. Analysis of elicitor-induced cell viability changes in *Lycopersicon esculentum* Mill. suspension culture by different methods. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 39: 236–239.
- Fernández-Da Silva, R. y Menéndez-Yuffá, A. 2006. Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. *In: Electronic Journal of Biotechnology*. 9(5): 593–597. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue5-fulltext-4>
- Finn, C.E., Moore, P.P. y Kempler, C. 2008. Raspberry cultivars: What's new? What's succeeding? Where are the breeding programs headed? *Acta Horticulturae*. 777: 33-40.
- Foster, T. M., Bassil, N. V., Dossett, M., Leigh Worthington, M. y Graham, J. 2019. Genetic and genomic resources for *Rubus* breeding: a roadmap for the future. *Horticulture Research*. 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0199-2>

- Fu, X., Yang, S. y Bao, M. 2008. Factors affecting somatic embryogenesis in anther cultures of Chinese pink (*Dianthus chinensis* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 44: 194–202. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9107-4>
- Gamborg, O.L., Miller R.A. y Ojima, O. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- García-Velazquez, A. 1990. Técnicas y procedimientos de citogenética vegetal. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 144 p.
- George, E. F., Hall, M. A. y Klerk, G. J. D. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems BT - Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background (E. F. George, M. A. Hall, & G.-J. De Klerk, Eds.). [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_4)
- Germanà, M. A. 2006. Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 86(2): 131–146. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9088-0>
- Germana, M.A. 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 104: 283–300.
- Germana, M.A. 2011. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Reports.* 30: 839-857. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1061-7>
- González, O.; Hernández, M.; Silva, J. y Espinosa, A. 2011. Evaluación de la dinámica del crecimiento *in vitro* en callos de *Ipomoea batatas*. *Rev Colombiana Biotecnol* 13(1):148–155.
- Górecka, K., Krzyżanowska, D., Kiszczak, W. *et al.* 2009. Plant regeneration from carrot (*Daucus carota* L.) anther culture derived embryos. *Acta Physiol Plant.* 31: 1139–1145. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0332-1>
- Gosal, S. S. y Wani, S. H. 2018. Biotechnologies of Crop Improvement. *In: Biotechnologies of Crop Improvement (Vol. 1).* <https://doi.org/10.1007/978-3-319-78283-6>
- Graham, J. y Brennan, R. 2018. Raspberry Breeding, challenges and advances. Dundee, UK: Springer. 164 p.



- Grossmann, K. 2003. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. *J Plant Growth Regul.* 22(1): 109-122
- Guha, S. y Maheshwari, S.C. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204:497.
- Hernández-Amasifuen, A. D. y Díaz-Pillasca, H. B. 2019. Inducción *in vitro* de callo embriogénico a partir del cultivo de anteras en "papa amarilla" (*Solanum goniocalyx* Juz.) y Bukasov (*Solanaceae*). *Arnaldoa*, 26(1): 277-286. <https://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26111>
- Hernández-Bautista, A., Lobato-Ortíz, R., García-Zavala, J.J., Chávez- Serbia, J.L., Mejía-Contreras, J.A. y García-Velázquez, J. A. 2017. Breeding potential of raspberry primocane selections based on their combining abilities. *Can. J. Plant Sci.* 98: 28–37. doi: [dx.doi.org/10.1139/cjps-2016-0399](https://doi.org/10.1139/cjps-2016-0399)
- Hooghvorst, I., Ramos-Fuentes, E., López-Cristofannini, C., Ortega, M., Vidal, R., Serrat, X. y Nogués, S. 2018. Antimitotic and hormone effects on green double haploid plant production through anther culture of Mediterranean japonica rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 134(2): 205–215
- Hummer, K. y Hall, H. K. 2013. Raspberries. *In: Funt, R. C. y Hall, H. K. eds. 2013 Raspberries.* CABI, Boston. Pp: 1-19.
- Humphreys, D.G. y Knox, R.E. 2015. Double haploid breeding in cereals. *In: Al-Khayri, J.M., S. M. Jain y D. V. Johnson, eds. 2015. Advances in plant breeding strategies: Breeding, biotechnology and molecular tools.* 241-290. Springer International publishing Switzerland. DOI: 10.1007/978-3-319-22521-0\_9
- Hurtado, D y Merino, M.A. 1988. Cultivo de Tejidos Vegetales. Mexico, D. F.: Trillas.
- Imtiaz, M., Ashraf, M., Rizwan, M. S., Nawaz, M. A., Rizwan, M., Mehmood, S., Balal, Y., Yuan, Y., Ditta, A., Mumtaz, M.A., Ali, M., Mahmood, S. y Tu, S. 2018. Vanadium toxicity in chickpea (*Cicer arietinum* L.) grown in red soil: Effects on cell death, ROS and antioxidative systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158 (December 2017): 139-144. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.022>

- Irikova, T., Grozeva, S. y Rodeva, V. 2011. Anther culture in pepper (*Capsicum annum* L.) *in vitro* Acta Physiologiae Plantarum DOI 10.1007/s11738-011-0736-6
- Ismaili, A., y Mohammadi, P. P. 2016. Effect of genotype, induction medium, carbohydrate source, and polyethylene glycol on embryogenesis in maize (*Zea mays* L.) anther culture. Acta Physiologiae Plantarum. 38(3): 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2085-y>
- Jacquier, N. M. A., Gilles, L. M., Pyott, D. E., Martinant, J. P., Rogowsky, P. M., & Widiez, T. 2020. Puzzling out plant reproduction by haploid induction for innovations in plant breeding. Nature Plants. 6(6): 610–619. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0664-9>
- Jacyn-Baker, C. y Mock, N. M. 1994. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 39(1): 7–12. <https://doi.org/10.1007/BF00037585>
- Jennings, S. N. 2018. Advances in *Rubus* Breeding. *In*: J. Graham (Ed.), Raspberry. Breeding, challenges and advances. Dundee, UK: Springer. 17-20
- Kempler, C. y Hall, H. K. 2013. World raspberry production and marketing: industry changes and trends from 1960 to 2010. *In*: Funt, R. C. y Hall, H. K. eds. 2013 Raspberries. CABI, Boston. 213-233.
- Kikkert, J. R., Striem, M. J., Vidal, J. R., Wallace, P. G., Barnard, J. y Reisch, B. I. 2005. Long-term study of somatic embryogenesis from anthers and ovaries of 12 grapevine (*Vitis sp.*) genotypes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 41(3): 232–239. <https://doi.org/10.1079/IVP2004609>
- Klug, W.S., Cummings, M.R. y Spencer, C.A. 2006. Conceptos de Genética. Madrid, España: Editorial Prentice Hall. 884 p.
- Koleva-Gudeva, L.R., Spasenoski, M. y Trajkova, F. 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. Scientia Horticulturae. 111(2): 114-119. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.013>.
- Kondic-spika, A., Brbaklic, L., Trkulja, D., y Crops, V. 2010. Genetic analysis of anther culture response in wheat genotypes. (January). Contemporary Agriculture.

- 59(1-2): 49-55.
- Krüger, E., Dietrich, H., Schöppl, E., Rasim, S. y Kürbel, P. 2011. Cultivar, storage conditions and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 60: 31–37.
- Kumari, P., Singh, A. K., Sharma, M. y Ahmed, S. 2015. Comparative Response of Different Genotypes of Brassica to Anther Culture. (December). *International Journal of Research Studies in Biosciences*. 3(4): 33-44.
- Kurokawa, M., y Kornbluth, S. 2009. Caspases and kinases in a death grip. *Cell*. 138: 838–854.
- Lechowicz, K., Wrońska-Pilarek, D., Bocianowski, J. y Maliński, T. 2020. Pollen morphology of Polish species from the genus *Rubus* L. (Rosaceae) and its systematic importance. *PLoS ONE* 15(5): e0221607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221607>
- Lee, H. Y., Khorolragchaa, A., Sun, M. S., Kim, Y. J., Kim, Y. J., Kwon, W. S., y Yang, D.C. 2013. Plant Regeneration from Anther Culture of *Panax ginseng*. *Korean Journal of Plant Resources*. 26(3): 383–388. <https://doi.org/10.7732/kjpr.2013.26.3.383>
- Lentini, Z., Martínez, C. y Roca, W. 1997. Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. *Calí, Colombia. CIAT* 293: 62.
- Louis, K. S., y Siegel, A. C. 2011. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. Chapter 2. *740(1)*: 7–12. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6>
- Madan, N. S., Arockiasamy, S., Narasimham, J. V., Patil, M., Yepuri, V., y Sarkar, P. 2019. Anther culture for the production of haploid and doubled haploids in *Jatropha curcas* L. and its hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 138(1): 181–192. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01616-4>
- Malik, M. R., Wang, F., Dirpaul, J. M., Zhou, N., Polowick, P.L., Ferrie, A. M. R., Krochko, J. E. 2007. Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 144: 134–154
- Marcos, D. y Berleth, T. 2009. Visualizing Auxin Transport Routes

- in *Arabidopsis* Leaf Primordia. In: Cutler S., Bonetta D. (eds) Plant Hormones. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 495. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-477-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-477-3_2)
- Mazur, S. P., Nes, A., Wold, A. B., Remberg, S. F. y Aaby, K. 2014. Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus*L.) genotypes during three harvest seasons. Food Chemistry. 160: 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.174>
- Mezzetti, B. 2013. Breeding and biotechnology for improving the nutritional quality of strawberry. J. Berry Res. 3:127–133.
- Mikelsone, A., Grauda, D., Stramkale, V., Ornicans, R., Rashal, I. 2013. Using anther culture method for flax breeding intensification. Vide. Tehnologija. Resursi - Environment, Technology, Resources, 1 (October 2015): 149–153. <https://doi.org/10.17770/etr2013vol1.819>
- Mkuya, M. S., Si, H. M., Liu, W. Z. y Sun, Z. X. 2005. Effect of <sup>137</sup>Cs gamma rays to panicles on rice anther culture. Rice Sci. 12(4): 299–302.
- Mishra, R. y Rao, G. J. N. 2016. *In vitro* Androgenesis in Rice: Advantages, Constraints and Future Prospects. Rice Science. 23(2): 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.02.001>
- Morales-Alcayaga, C. G., Gonzáles, M. I. y Hirzel, J. 2009. Aspectos relevantes en la producción de Frambuesa (*Rubus Idaeus* L.). Villa Alegre, Chile. Boletín INIA 192: 27-34
- Nabors, M. 2006. Introducción a la botánica. 1ª Ed. Pearson-Education. Madrid, España. 744 p.
- Nic-Can, G. I. y Loyola-Vargas, V. M. 2016. The role of the auxins during somatic embryogenesis. 537 In: Somatic embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. Pp. 171-182.
- Nitsch, J.P. y Nitsch, C. 1969. Haploid plant from pollen grains. Science 163(3862): 85-87. <https://doi.org/10.1126/science.163.3862.85>
- Olatunji, D. y Kelley, D. R. 2021. Signals: auxins. In: Jez, J., eds. 2021. Enciclopedia of biological chemistry III. 3a. Ed. Elsevier. 2-17. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819460-7.00132-8>.

- Paglietta, R. 1986. El Frambueso. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 296 p.
- Parra-Vega, V., González-García, B., y Seguí-Simarro, J. M. 2013. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*. 35(2): 627–633. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1104-x>
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A., y Seguí-Simarro, J. M. 2013. Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 112(3): 353–360. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0242-6>
- Parra-Vega, V., y Seguí-Simarro, J. M. 2016. Anther Culture in Pepper (*Capsicum annuum* L.) *In: M. A. Germana y M. Lambardi, eds. 2016. In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in molecular Biology. Humana Press-Springer. 1359(26): 467-474. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\_26*
- Pauls, K. P.; Chan, J.; Woronuk, G.; Schulze, D. y Brazolot, J. 2006. When microspores decide to become embryos - cellular and molecular changes. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*. 84: 668-678.
- Pelizza, T. R., Silveira, F. N., Ribeiro, R. S., Machado, B. D., Rufatto, L., y Kretschmar, A. A. 2016. In vitro establishment of blackberry (*Rubus sp.*) cultivar “Xavante.” *Ciência Rural*. 46(9): 1542–1545. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140988>
- Pérez Delgado, Y., Galindo Castro, I. y Arvelo, F. 2007. La muerte celular programada en las plantas: ¿Es semejante a la "apoptosis" en animales? *Interciencia*, 32(12), 812-819. Recuperado en 22 de septiembre de 2021, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442007001200005&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007001200005&lng=es&tlng=es)
- Pérez-Molphe-Balch, E., Ramírez-Malagón, M. R., Núñez-Palienus H. G. y Ochoa-Alejo, N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 179 p.

- Pérez-Molphe-Balch, E., Santos-Díaz, M.S., Ramírez-Malagón, R. y Ochoa-Alejo, N. 2015. Tissue culture of ornamental cacti. *Sci Agric* 72: 540–556. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0012>
- Pérez, N., Ismaíl, C. y González, M. C. 1995. Mejoramiento genético mediante el cultivo *in vitro* de anteras de híbridos de arroz. *Cultivos Tropicales*. 16 (2): 54-56.
- Piotr-Mazur, S., Nes, A., Wold, A. B., Fagertun–Remberg, S. y Aaby, K. 2014. Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. *Food Chemistry*. 160: 233–240.
- Rahman, Z. A., Seman, Z. A., Othman, A. N., Ab Ghaffar, M. B., Razak, S. A., Mohd Yusof, M. F., Nasir, K. H., Ahmad, K., Chow, Y. L. y Subramaniam, S. 2020. Efficient callus induction and plant regeneration of Malaysian indica rice MR219 using anther culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 31: 101865. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101865>
- Roca, W. M. y Mroginski, L. A. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT 151: 271-294.
- Rotino, G. L. 2016. Anther culture in eggplant (*Solanum melongena*). *In*: M. A. Germana y M. Lambardi, eds. 2016. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in molecular Biology*. Humana Press-Springer. 1359(25): 453-466. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_25)
- Ruwani, D. M., Mayakaduwa, G. y Silva, T. D. 2018. Anther Culture as a Supplementary Tool for Rice Breeding. *Rice Crops: Current Developments*. Pp: 1-15. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76157>
- Sabooni, N., y Shekafandeh, A. 2017. Somatic embryogenesis and plant regeneration of blackberry using the thin cell layer technique. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 130(2): 313–321. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1225-4>.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2017. Frutas del Bosque: Arándano, Frambuesa, Zarzamora mexicanas. Planeación Agrícola Nacional 2017 – 2030. SAGARPA. México, Ciudad de México. 28.

- Salas, P., Prohens, J. y Seguí-Simarro, J. M. 2011. Evaluation of androgenic competence through anther culture in common eggplant and related species. *Euphytica*. 182(2): 261–274. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0490-2>
- San-Martín, J. 2013. Situación varietal de la frambuesa. *In: Undurraga, P. y Vargas, S. eds. 2013. Manual de la Frambuesa. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Chilán, Chile. Boletín INIA 264: 11-14.*
- Sánchez, M. A., Coronado, Y. M. y Coronado, A. C. M. 2020. Androgenic studies in the production of haploids and doubled haploids in capsicum spp. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 73(1): 9047–9056. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v73n1.76044>
- Savel'ev, N. I., Oleinikova, O. Y., Il'ina, N. S., Turovtseva, E. S., & Chivilev, V. V. 2010. *In vitro* androgenesis of fruit and berry plants. *Russian Agricultural Sciences*. 36(1): 15–17. <https://doi.org/10.3103/s1068367410010052>
- Schmid, I., Krall, W. J., Uittenbogaart, C. H., Braun J. y Giorgi J.V. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. 1992. *Cytometry*. 13: 204–208.
- Schmidt-Durán, A., Alvarado-Ulloa, C., Chacón-Cerdas, R., Alvarado-Marchena, L. F., & Flores-Mora, D. 2016. Callogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schldl.) and its microscopic analysis. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3381-0>
- Seabrook, J. E. A. 1980. Laboratory culture. *In: E. J. Staba, eds. 1980. Plant tissue culture as a source of biochemicals. C.R.C. Press, Boca Raton, Florida, U.S.A. Pp: 1-20.*
- Seguí-Simarro, Jose M. 2016. Androgenesis in *Solanaceae*. *Methods in Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_9)
- Seguí-Simarro, José M. 2010. Androgenesis Revisited. *Botanical Review*. 76(3): 377–404. <https://doi.org/10.1007/s12229-010-9056-6>
- Seguí-Simarro, José M., & Nuez, F. 2008. How microspores transform into haploid embryos: Changes associated with embryogenesis induction and microspore-

- derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*. 134(1): 1–12.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01113.x>
- Shrivastava, V., Savarimuthu, A., Patil, M., Sarkar, P., Hadole, S. y Dasgupta, S. 2020. Gametic embryogenesis and callogenesis in isolated microspore culture of *Jatropha curcas* L. a recalcitrant bioenergy crop. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 30(2). 1–9. <https://doi.org/10.007/s11240-020-01959-3>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2016. Atlas agroalimentario 2016. 1ª Ed. SIAP. Ciudad de México. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016)
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2017. Atlas agroalimentario 2017. 1ª Ed. SIAP. Ciudad de México. 236. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2017/Atlas-Agroalimentario-2017](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2017/Atlas-Agroalimentario-2017)
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018. Atlas Agroalimentario 2012-2018. 1ª Ed. Publicaciones SIAP. Ciudad de México 115. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018).
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2019. Panorama agroalimentario 2019. 1ª Ed. SIAP. Ciudad de México. 218. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019)
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. Panorama agroalimentario 2020. 1ª Ed. SIAP. Ciudad de México. 200. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020)
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2021. Anuario estadístico de la producción agrícola: Frambuesa en el estado de Michoacán, ciclo anual y perenne, modalidad riego y temporal. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Pudelska, H., Woźna, J., y Pniewski, T. 2017. Improved



- production of doubled haploids of winter and spring triticale hybrids via combination of colchicine treatments on anthers and regenerated plants. *Journal of Applied Genetics*. 58(3). <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0387-9>
- Solís-González, M. T. 2012. Reprogramación del polen a embriogénesis inducida por estrés: Identidad celular, muerte celular programada y papel de la metilación de DNA. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 422 p.
- Soriano, M., Li, H., y Boutilier, K. 2013. Microspore embryogenesis: Establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reproduction*. 26(3): 181–196. <https://doi.org/10.1007/s00497-013-0226-7>
- Statistical Analysis System. 2002. SAS Institute Inc., SAS/STAT. User's Guide, version 9.0. Carey, N.C
- Stoddart, M. J. 2011. Chapter 1 Cell Viability Assays : Introduction. *Mammalian Cell Viability*. 740: 1–6. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6>
- Tempé, J. y Schell, J. 1985. La manipulación de las plantas. *Mundo Científico* 7(71):792-801.
- Texeira da Silva, J.A., Dobránszki, J., Winarto, B. y Zeng, S. 2015. *Anthurium in vitro*: A review. *Scientia Horticulturae*. 186: 266–298
- Tripathy, S.K., Lenka, D., Prusti, A.M., Mishra, D., Swain, D. y Behera, S.K. 2019. Anther culture in rice: progress and breeding perspective. *Applied Biological Research* 21(2): 87-104. doi: 10.5958/0974-4517.2019.00012.0
- Tripathy, S.K., 2019. Anther Culture for Double Haploid Breeding in Rice-a Way forward. *Rice Genomics and Genetics*. 9(1): 1-6.
- Tripathy, S. K., Swain, D., Mohapatra, P. M., Prusti, A. M., Sahoo, B., y Panda, S. 2019. Exploring factors affecting anther culture in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 7(2): 87–92. <https://doi.org/10.7324/jabb.2019.70216>
- Uno, Y., Koda – katayama, H. y Kobayashi, H. 2016. Application of anther culture for efficient haploid production in the genus *Saintpaulia*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 125:241–248. doi: 10.1007/s11240-016-0943-3

- Uz-Zaman, A., Al-Khayri, J. M. y Islam, R. 2018. Genetic improvement of strawberry (*Fragaria × ananassa duchesne*). *In: Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits* (Vol. 3). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7_6)
- Wang, R.F., Zuo, Q.Z., Zheng, S.W. y Tiang, W.Z. 1979. Induction of plantlets from isolated pollen culture in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genetica Sinica*. 6: 7.
- Warchoł, M., Czyczyło-Mysza, I., Marcińska, I., Dziurka, K., Noga, A., Kapłoniak, K., Pilipowicz, M., & Skrzypek, E. 2019. Factors inducing regeneration response in oat (*Avena sativa* L.) anther culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 55(5), 595–604. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09987-1>
- Weber, C. 2013. Cultivar development and selection. *In: Funt, R. C. y Hall, H. K. eds. 2013 Raspberries*. CABI, Boston. Pp. 55-72
- Wintarto, B., Rachmawati, F., y Texeira da Silva, J.A. 2011. New basal media for half-anther culture of *Anthurium andreanum* Linden ex Andre ´ cv. Tropical. *Plant Growth Regul.* 65: 513–529.
- Yazdanpour, F., Khadivi, A. y Etemadi-Khah, A. 2018. Phenotypic characterization of black raspberry to select the promising genotypes. *Scientia Horticulturae* 235: 95-105.

## IX. APENDICE

Cuadro 1A. Descripción morfológica del genotipo de frambuesa V-74

### Planta de frambuesa denominada “V-74”

Nombre Latino: *Rubus idaeus* L.

Obtendor. José López Medina

Mejoradores: José López Medina,  
Yolanda Sánchez, Carmen Rocha  
Granados, Sergio Segura Ledesma

#### Resumen

Genotipo de frambuesa de nueva creación que se distingue por ser primocaña, sumamente productivo, y aunque la polidrupa es de tamaño medio y firme, posee favorable color y sabor de fruta.

Género y especie: *Rubus idaeus* L.

Denominación del genotipo: “V-74”.

#### Antecedentes del nuevo genotipo

La presente invención comprende la selección avanzada de un nuevo genotipo de frambuesa roja, botánicamente conocida como *Rubus idaeus* L., y en adelante referido como “V-74”. “V-74” se produjo por

polinización abierta del progenitor femenino Adelita (Patente de plantas de Estados Unidos N° 25245) y progenitor masculino V-77 (No registrada). El nuevo genotipo se creó en 2014 en Uruapan, Michoacán y ha probado ser reproducido fielmente de manera asexual en repetidas ocasiones a través del cultivo *in vitro* y estacas de raíz desde agosto de 2015

#### Sumario del genotipo “V-74”

Las siguientes son las más destacadas y distinguidas características del nuevo genotipo cuando se cultiva bajo condiciones de invernadero en la localidad de Uruapan, Michoacán.

- a. Frambuesa primocaña
- b. Sabor, color y olor de fruta favorables
- c. Polidrupa media y firme
- d. Alto rendimiento del cultivo.

#### Descripción de fotografías

El nuevo genotipo está acompañado por fotografías que ilustran el fruto, hojas y cañas de la planta. Los colores mostrados son tan fielmente reproducidos como fue posible obtenerlos de los procedimientos fotográficos convencionales.

Las fotografías mostradas fueron tomadas de plantas de dos años de cultivo.

Figura 1A, Color de cañas y densidad de espinas

Figura 1B, Hojas de la planta

Figura 1C, Flor de la planta

Figura 1D, Frutos

### **Descripción del nuevo genotipo.**

La siguiente descripción a detalle establece el distintivo característico del genotipo “V-74”. Los datos que definen estos caracteres se recolectaron de plantas establecidas en Uruapan, Michoacán.

El historial de planta fue tomado de frambuesas de dos años, bajo condiciones de invernadero durante la temporada de primocañas. Los colores de referencia son principalmente

tomados de la “Royal Horticultural Society of London (RHS, edición 2001).

### **Descripción botánica al detalle**

Clasificación:

Familia: *Rosaceae*.

Nombre Botánico: *Rubus idaeus* L.

Nombre común: Frambuesa.

Genealogía: Polinización abierta del progenitor femenino “Adelita” (Patente de plantas de Estados Unidos N° 25245 y progenitor masculino “V-77” (No registrada).

Planta:

Propagación. Por cultivo *in vitro* y estacas de raíz. Autofértil.

Primocañas:

Color de cañas. RHS 142A (Amarillo-verde).

Espinas. Presencia de espinas.

Longitud. 2.0 m a 2.1 m

Diámetro. 1.0 cm a 1.2 cm

Textura. Firme

Longitud del internodo. 4.0 cm a 7.0 cm.

Ramas laterales:

Número de ramas laterales fructíferas por planta. de 5 a 7.

Longitud de la rama lateral fructífera. de 20,0 cm a 30,0 cm.

Diámetro de la rama lateral fructífera. de 0,3 cm a 0,5 cm.

Textura de las ramas laterales fructíferas. Suave.

Color de la rama lateral de fructificación. RHS 142A (Verde).

#### Espinas:

Número de espinas en el brote principal. 3 a 5 por cm<sup>2</sup>.

Forma. cónica.

Longitud. muy corta

Diámetro. ancho en la base.

Color. RHS grupo gris-violáceo (cerca de 183B al 183D)

#### Hojas:

Tipo. Compuesta

Arreglo. foliolos libres.

Longitud de hoja. De 19,0 cm a 26,0 cm.

Ancho de hoja: De 16,0 cm a 19,5 cm.

Forma del foliolo principal: Convexa

Color de hojas y superficie superior: RHS 142A (Amarillo verde)

Superficie inferior: RHS 141D (verde bajo).

Longitud del peciolo: 8,0 cm a 10,0 cm.

Diámetro: 0,15 cm hasta 0,25 cm.

Color: RHS 142A (Amarillo verde).

#### Estípulas:

Cantidad por hoja: 1 a 2

Forma: erecta

Longitud: de 0,25 cm a 0,65 cm.

Diámetro: muy estrecha 0,05 cm a 0,08 cm.

Color (ambas superficies). RHS 1424A (Amarillo-verde).

#### Flores:

Altura: de 0,30 cm a 0,60 cm.

Diámetro: 0,8 cm a 1,0 cm.

Botón. forma: cónico elongada. Largo. 1,0 cm. Diámetro: 0,7 cm. RHS. 140A (verde)

Pétalos. Número por flor: 5. Forma: Cónico alargado. Longitud: 0,55 a 0,63 cm. Diámetro: 0,30 a 0,35 cm. Color: RHS 155A (blanco).

Ápice: redondeado. Base: Muy estrecha. Margen: Suave y regular. Textura: Suave. Color (ambas superficies): RHS 155C (Blanco).

Sépalos. Número de sépalos por flor: 6. Forma: Triangular. Longitud: 0,38 cm a 0,42 cm. Diámetro: Ancho en la base. Ápice: Acuminado. Base: Grande en la base formando el cáliz. Margen: Suave

y regular. Textura: Suave. Color (ambas superficies): RHS 140A (Verde).

Periodo de floración de la planta. floración (en áreas templadas): del 7 de julio al 12 de julio. Plena floración: 28 de agosto hasta el 5 de agosto.

Fruto:

Forma predominante: cónica.

Peso. 4,0 g.

Tamaño. Longitud: 1.8 cm. Ancho: 1.0 cm.

Color de la fruta madura. RHS 53A (rojo) y posteriormente convirtiéndose en RHS 59A (rojo-violeta).

Vigor. Alto.

Época de cosecha (áreas templadas). La primera cosecha se da del 28 agosto al 12 de septiembre; la última se da del 31 de octubre al 05 de noviembre.

Época de maduración. El comienzo de la madurez es el 02 de septiembre hasta el 08 de septiembre.

Pedicelo. Diámetro: 0,20 cm a 0,25 cm.

Color: Amarillo verde 142A.

Número de drupas por fruta. 70 a 90.

Uso / mercado. Los frutos son aptos para el consumo como fruta fresca de buena calidad.

Mantenimiento de calidad. El color del fruto es rojo medio, pero tiende a rojo

oscuro en caso de cosecha tardía. La vida de anaquel es buena.

### **Comparación con padres y cultivares comerciales**

"V-74" se diferencia de la variedad parental femenina "Joan J" (Patente de plantas de Estados Unidos N° 18954) en que "V-74" tiene frutos de forma cónica, de color rojo claro que pesan 4,0 g, mientras que "Joan J" tiene una forma cónica ovalada, color rojo con un peso de 4.0 a 4.5 g. Aunque "Joan J", posee un fruto de mayor tamaño, "V-74" se distingue por ser más una planta productiva.

"V-74" es similar a la variedad comercial "Lupita" (Patente de plantas de Estados Unidos 25695), sin embargo, existen varias diferencias como las descritas a continuación:

Tabla 1. Comparación de características entre "V-74" y "Lupita"

Característica	"V-74"	"Lupita"
Hábito	Erecto	Arqueado
Color de caña	Amarillo verde	Amarillo verde con tonos rojo-grisáceo
Espinas	Densidad baja	Densidad media

Forma de fruto	Cónica	Cónica alargada	Color de hoja	Amarillo verde	Verde

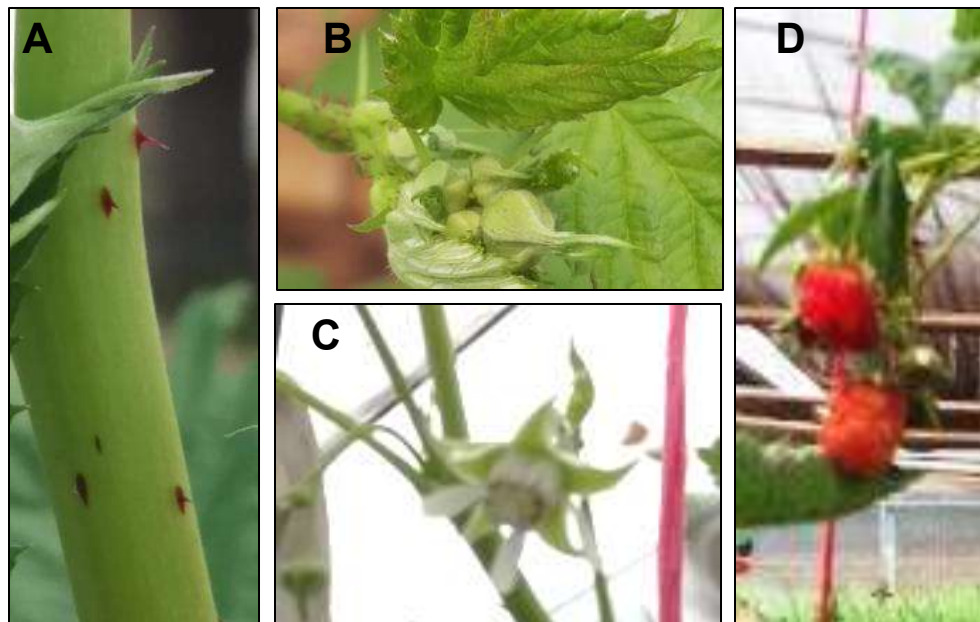


Figura 1. Caracteres distintivos del genotipo de frambuesa V-74. A) color de cañas y densidad de espinas; B) hojas de la planta; C) flor de la planta; D) fruto de la planta

Cuadro 2A. Composición de los medios de cultivo para la inducción de androgénesis.

Componentes del medio	Concentración mg L <sup>-1</sup> de i. a.	
	Gamborg (B5)	Nitsch & Nitsch (NN)
Macronutrientes		
KNO <sub>3</sub>	2500	950
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		720
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	250	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		68
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	150	
CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	150	166
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · SO <sub>4</sub>	134	
KCL		
Micronutrientes		
H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	3	10
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10	19
ZNSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2	10
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
KI	0.75	
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		
EDTA Disódico	40	100
EDTA Sal férica sódica		
Glicina		
Sacarosa	20 x 10 <sup>3</sup>	20x10 <sup>3</sup>
Vitaminas		
Tiamina hipoclórica	10	0.5
Piridoxina hipoclórica	1	0.5
Ácido nicotínico	1	5
Myo-inositol	100	100
pH	5.5	5.5

(Gamborg *et al.*, 1968 y Nitsch y Nitsch, 1969)



Cuadro 3A. Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo AD-1, cultivado *in vitro* en medio B5.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	4563.63636	456.36364	1.75	0.1313
Error	22	5733.33333	260.60606		
Total corregido	32	10296.96970			
C.V.= 17.99		R2 = 0.44			

Cuadro 4A. Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo AD-1, cultivado *in vitro* en medio B5.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	3896.96970	389.69697	1.34	0.2709
Error	22	6400.00000	290.90909		
Total corregido	32	10296.96970			
C.V.= 175.89		R2 = 0.37			

Cuadro 5A. Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo AD-1, cultivado *in vitro* en medio NN.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	15000.00000	1500.00000	1.72	0.1391
Error	22	19200.00000	872.72727		
Total corregido	32	34200.00000			
C.V.= 49.23		R2 = 0.43			

Cuadro 6A. Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo AD-1, cultivado *in vitro* en medio NN.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	15000.00000	1500.00000	1.72	0.1391
Error	22	19200.00000	872.72727		
Total corregido	32	34200.00000			

C.V.= 49.23      R2 = 0.43

Cuadro 7A. Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo Joan J, cultivado *in vitro* en medio B5.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	15296.96970	1529.69697	3.48	0.0070
Error	22	9666.66667	439.39394		
Total corregido	32	24963.63636			

C.V.= 25.06      R2 = 0.61

Cuadro 8A. Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo Joan J, cultivado *in vitro* en medio B5.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	15296.96970	1529.69697	3.48	0.0070
Error	22	9666.66667	439.39394		
Total corregido	32	24963.63636			

C.V.= 128.09      R2 = 0.61

Cuadro 9A. Análisis de Varianza para la variable inducción de callo, genotipo Joan J, cultivado *in vitro* en medio B5.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	4363.636364	436.363636	6.86	<.0001
Error	22	1400.000000	63.636364		
Total corregido	32	5763.636364			

C.V.= 125.35      R2 = 0.75

Cuadro 10A. Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo Joan J, cultivado *in vitro* en medio NN.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	30654.54545	3065.45455	4.91	0.0009
Error	22	13733.33333	624.24242		
Total corregido	32	44387.87879			

C.V.= 63.42      R2 = 0.69

Cuadro 11A. Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo Joan J, cultivado *in vitro* en medio NN.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	30654.54545	3065.45455	4.91	0.0009
Error	22	13733.33333	624.24242		
Total corregido	32	44387.87879			

C.V.= 41.22      R2 = 0.69

Cuadro 12A. Análisis de Varianza para la variable inducción de callo, genotipo Joan J, cultivado *in vitro* en medio NN.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	0.30303030	0.03030303	1.00	0.4729
Error	22	0.66666667	0.03030303		
Total corregido	32	0.96969697			

C.V.= 574.45      R2 = 0.31

Cuadro 13A. Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo UMC-702, cultivado *in vitro* en medio B5.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	30133.33333	3013.33333	6.37	0.0001
Error	22	10400.00000	472.72727		
Total corregido	32	40533.33333			

C.V.= 65.22      R2 = 0.74

Cuadro 14A. Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo UMC-702, cultivado *in vitro* en medio B5.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	30133.33333	3013.33333	6.37	0.0001
Error	22	10400.00000	472.72727		
Total corregido	32	40533.33333			

C.V.= 32.61      R2 = 0.74

Cuadro 15A. Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo UMC-702, cultivado *in vitro* en medio NN.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	2424.242424	242.424242	0.74	0.6802
Error	22	7200.000000	327.272727		
Total corregido	32	9624.242424	32		

C.V.= 213.21    R2 = 0.25

Cuadro 16A. Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo UMC-702, cultivado *in vitro* en medio NN.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	2424.242424	242.424242	0.74	0.6802
Error	22	7200.000000	22		
Total corregido	32	9624.242424			

C.V.= 19.76    R2 = 0.25

Cuadro 17A. Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo V-74, cultivado *in vitro* en medio B5.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	22606.06061	2260.60606	1.55	0.1863
Error	22	32000.00000	1454.54545		
Total corregido	32	54606.06061			

C.V.= 89.89    R2 = 0.41

Cuadro 18A. Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo V-74, cultivado *in vitro* en medio B5.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	22606.06061	2260.60606	1.55	0.1863
Error	22	32000.00000	1454.54545		
Total corregido	32	54606.06061			
C.V.= 66.24		R2 = 0.41			

Cuadro 19A. Análisis de Varianza para la variable inducción de callo, genotipo V-74, cultivado *in vitro* en medio B5.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	666.666667	66.666667	2.20	0.0592
Error	22	666.666667	30.303030		
Total corregido	32	1333.333333			
C.V.= 165.14		R2 = 0.50			

Cuadro 20A. Análisis de Varianza para la variable sobrevivencia, genotipo V-74, cultivado *in vitro* en medio NN.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	3630.30303	363.03030	0.51	0.8650
Error	22	15666.66667	712.12121		
Total corregido	32	19296.96970			
C.V.= 46.84		R2 = 0.18			

Cuadro 21A. Análisis de Varianza para la variable oxidación, genotipo V-74, cultivado *in vitro* en medio NN.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	3630.30303	363.03030	0.51	0.8650
Error	22	15666.66667	712.12121		
Total corregido	32	19296.96970			
C.V.= 62.01		R <sup>2</sup> = 0.18			

Cuadro 22A. Análisis de Varianza para la variable inducción de callo, genotipo V-74, cultivado *in vitro* en medio NN.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F - Valor	Pr > F
Tratamientos	10	1387.878788	138.787879	3.05	0.0139
Error	22	1000.000000	45.454545		
Total corregido	32	2387.878788			
C.V.= 111.24		R <sup>2</sup> = 0.58			