

## Establecimiento *in vitro* de dos cultivares liberados de frutillas: fresa y frambuesa

Teresita Ruíz Anchondo<sup>1,2§</sup>  
Julio Adriano Martínez<sup>2</sup>  
Teresa Carrillo Castillo<sup>2</sup>  
Rafael Ángel Parra Quezada<sup>1</sup>  
Dámaris Leopoldina Ojeda Barrios<sup>1</sup>  
Adriana Hernández Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Hortofrutícolas, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas-Universidad Autónoma de Chihuahua. Calle Escorza núm. 900, Col. Centro, Chihuahua, CP. 31100. (aernande@uach.mx; raparra@uach.mx; dojeda@uach.mx). <sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología de Plantas-Facultad de Ciencias Agrotecnológicas-Universidad Autónoma de Chihuahua. (julio\_adriano@hotmail.com; teresadarlen@hotmail.com).

§Autor para correspondencia. truíz@uach.mx.

### Resumen

El desarrollo de protocolos para la producción de plantas sanas *in vitro* es importante para satisfacer la demanda creciente de frutillas en el norte de México como una alternativa a los frutales tradicionales como nogal y manzano. Se evaluaron técnicas de establecimiento *in vitro* de fresa y frambuesa, a partir de explantes meristematicos, ápices y entrenudos. Se utilizó un método de desinfección convencional, donde se utilizaron agentes desinfectantes como solución etanólica al 70%, luego se sumergieron en solución comercial al 3% de hipoclorito de sodio: agua (1:6), durante 15 min. Por último, en solución de timerosal<sup>®</sup> al 0.05% por 15 min. Se evaluaron ápices en el caso de fresa ápices, y de meristemos y entrenudos en el de frambuesa. Para el establecimiento se utilizaron sales Murashige y Skoog adicionados con citocinina 6-bencilaminopurina (BAP), ácido giberélico (GA) e ácido indolbutírico (AIB) en diferentes concentraciones para el caso de fresa. En frambuesa, se utilizaron sales de MS adicionadas con BAP, tiazuron (TDZ), GA y AIB. Se evaluaron en ambos, los porcentajes de establecimiento, necrosis y contaminación. La siembra de ápices en el caso de fresa y su sistema de desinfección, permitió su establecimiento *in vitro*, las variables se analizaron mediante pruebas no paramétricas mostraron que el mejor tratamiento, fue TT1 con 70% de efectividad. Para frambuesa, el caso de entrenudos fue mejor durante el establecimiento que en el caso de meristemos, y el mejor tratamiento fue el TT4, con BAP + GA sin auxinas, con 57% de efectividad.

**Palabras clave:** berries, 6-bencilaminopurina, meristemos, micropropagación, tiazuron.

Recibido: marzo de 2018

Aceptado: mayo de 2018

## Introducción

El término cultivo de tejidos se refiere al desarrollo de células vegetales bajo condiciones *in vitro*, dichas células se cultivan asépticamente en un medio de cultivo de composición química definida y se incuban bajo condiciones ambientales controladas; englobando a un heterogéneo grupo de técnicas para llevar a cabo tal fin (Roca y Mroginski, 1991; Purohit, 2012). Dentro de estas técnicas, se encuentra la micropropagación, la cual es ampliamente utilizada en la producción masiva de material genético de alta calidad para cultivos de gran escala, en mejoramiento genético, en conservación genética y en investigación (Jaakola *et al.*, 2001; Gajdošová *et al.*, 2006; Alanagh *et al.*, 2014).

Entre las bondades de la micropropagación se encuentran: un solo explante puede ser multiplicado miles de veces, los periodos de propagación son más cortos, existe homogeneidad en los cultivos propagados, permite la producción de plantas de calidad superior con capacidades de resistencia y tolerancia a factores de estrés biótico o abiótico, entre otras (Yesil *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2012). La micropropagación por vía de meristemos o brotes axilares, es muy recomendable para obtener homogeneidad genética en la producción masiva de plantas frutales, con características idénticas a la planta madre (Song y Sink, 2004; Ostrolucká *et al.*, 2007).

La propagación tradicional de la planta de fresa comercial (*Fragaria x ananassa Duch*) se llevó a cabo a través de estolones, lo cual no es siempre adecuado debido a la vulnerabilidad y susceptibilidad de éstos a agentes patológicos, tales como *Botrytis cinerea*, *Fusarium spp.* y *Penicilium* (Clavijo *et al.*, 2010). Por ello, después de la propagación y establecimiento del cultivo, se presentan grandes pérdidas, hasta 50%) de la producción, ocasionado por las afectaciones causadas por microorganismos (Guédez *et al.*, 2009; Ying *et al.*, 2009). En 1974, Boxus describió un método para la micropropagación masiva de plantas de fresa por medio de la técnica de brotes axilares, desde entonces la producción de fresa cultivada *in vitro* ha evolucionado, llevándose a cabo actualmente en muchos países del mundo.

Dichas plantas micropropagadas se utilizan para establecer plantaciones, y se ha encontrado que muestran mayor cantidad de flores, mayor rendimiento de frutos por hectárea, más estolones por planta y mayor vigor, en comparación con las plantas propagadas convencionalmente (Tan *et al.*, 2003). Además, este método ha resultado exitoso en la prevención de enfermedades transmitidas en suelo y plantas (Moradi *et al.*, 2011).

Por otro lado, la propagación de frambuesa (*Rubus idaeus sp.*) se realiza por medio del estaquillado de raíz, con el que se consigue un alto porcentaje de propagación y una buena calidad de plantas. Sin embargo, es imprescindible que se vigile la calidad y edad de las plantas madre, puesto que a partir de dos o tres años el porcentaje de enraizado disminuye considerablemente, a la vez que se aumenta el riesgo de enfermedades y contaminación por virus; por tanto, este método no asegura la producción de plantas libres de enfermedades. Además, en ocasiones el método de estaquillado tiene tasas de multiplicación muy bajas que no satisfacen las necesidades de la industria viverista (González *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2009; García *et al.*, 2014). Anteriormente se ha logrado micropropagar material vegetativo de frambuesa con buenos resultados, utilizando como explantes segmentos nodales o tejido meristemático y obteniendo así plantas libres de enfermedades (Reed, 1990; Minas y Neocleous, 2007; Arencibia *et al.*, 2013).

El objetivo de este estudio, fue desarrollar metodologías y protocolos, para el establecimiento *in vitro* de berries comerciales de fresa *cv* Aromas y frambuesa *cv* Heritage, utilizando diferentes tipos de explantes en distintos medios de cultivo formulados con hormonas vegetales.

## Materiales y métodos

El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología con materiales del invernadero experimental de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, de donde se tomaron fresa, *cv* Aromas, y de frambuesa *cv* Heritage, de las cuales se recolectó el material vegetativo utilizado en la presente investigación para ser establecidos *in vitro*, en el año 2015.

### Para la desinfección del material vegetativo en fresa (*Fragaria x annanasa* Duch. *cv* Aromas)

En este caso, para la desinfección de plantas de fresa se seleccionaron brotes apicales que no presentaran síntomas de enfermedad. Se cortaron y almacenaron en agua destilada estéril con  $150 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido ascórbico previo a su manejo. Después de 1 h, los brotes se sumergieron en solución acuosa de jabón alcalino al 5% con 2 gotas de Tween-80 durante 15 min, en constante agitación. Después, se enjuagaron bajo el grifo de agua por 20 min. Bajo condiciones de asepsia en campana de flujo laminar se sumergió el material vegetativo en etanol al 70% por 30 s, enjuagando posteriormente en tres ocasiones con agua destilada estéril.

En seguida se sumergieron los explantes en una solución de hipoclorito de sodio comercial y agua destilada en relación 1:6 por 10 min, agitando suavemente, para luego enjuagar nuevamente en tres ocasiones con agua destilada estéril. A continuación, se sumergieron los entrenudos en solución de sales de mercurio, Thimerosal (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, CAS 54-64-8) al 0.05% por 10 min, enjuagando posteriormente con agua destilada estéril en tres ocasiones.

### Para el establecimiento *in vitro* a partir de brotes apicales de fresa (*Fragaria x annanasa* Duch. *cv* Aromas)

Los brotes apicales ya desinfectados fueron sembrados en cuatro diferentes formulaciones de medios de cultivo, tres de ellos con micro y macro elementos, adicionados con orgánicos según la formulación MS modificado (Cuadro 1) (Murashige y Skoog, 1962), suplementados con  $1.11 \mu\text{M}$  de bencil-aminopurina (BAP),  $0.87 \mu\text{M}$  ácido giberélico (GA) y  $2.95 \mu\text{M}$  de ácido indolbutírico (IBA) para el primer tratamiento testigo (TT0); el primer tratamiento (TT1), fue suplementado con  $4.44 \mu\text{M}$  de BAP,  $0.29 \mu\text{M}$  GA y  $4.92 \mu\text{M}$  de IBA; asimismo, el segundo tratamiento (TT2), con  $2.22 \mu\text{M}$  BAP,  $0.29 \mu\text{M}$  GA y  $0.49 \mu\text{M}$  de IBA. Finalmente, otro medio de cultivo formulado con sales y vitaminas MS al 50%, suplementado con  $0.44 \mu\text{M}$  BAP,  $0.29 \mu\text{M}$  GA y  $4.92 \mu\text{M}$  de IBA se identificó como el tercer tratamiento (TT3), utilizando los reguladores de crecimiento sugeridos por diversos autores quienes han reportado éxito en sus formulaciones (Boxus, 1974; de López, 2001; Beltrán, 2002; Caboniet *et al.*, 2008) (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Formulación de medios de cultivo para fresa *cv* Aromas, suplementados con citocinina (bencilaminopurina BAP), auxinas (ácido indolbutírico AIB) y giberelinas (GA), según reportes de propagación previos. TT1 de Caboniet *et al.*, 2008; TT2 Beltrán, 2002; de López, 2001, TT3 y TT4 Boxus, 1974.**

Tratamiento	Formulación (sales MS)	BAP ( $\mu\text{M}$ )	GA ( $\mu\text{M}$ )	IBA ( $\mu\text{M}$ )
TT1	100%	1.11	0.87	2.95
TT2	100%	4.44	0.29	4.92
TT3	100%	2.22	0.29	0.49
TT4	50%	0.44	0.29	4.92

Además, se agregaron a todos los tratamientos 1 g L<sup>-1</sup> de carbón activado, 5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma®) y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa marca Sigma® CAS 71010-52-1. El pH se ajustó a 5.8 en todos los casos para posteriormente esterilizarse a 1.5 kg cm<sup>2</sup> de presión a 120 °C por 15 min. Después de sembrar los explantes, éstos se incubaron a una temperatura de 24 ±2°C, con una luminosidad de 86  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  suministrada por lámparas LED modelo T8 TecnoLite® y un fotoperiodo de 16/8 h durante 15 días. Después de ese tiempo, los explantes que mostraron crecimiento fueron transferidos en la misma formulación, por dos semanas más. Después de este lapso de tiempo, las variables evaluadas fueron porcentaje de contaminación, plantas necrosadas y explantes establecidos.

#### **Para la desinfección del material vegetativo a partir de explantes nodales de frambuesa (*Rubus idaeus* L. *cv* Heritage)**

Para la desinfección de frambuesa se seleccionaron plantas madre sanas. Se seccionaron segmentos de tallo de 30 cm de longitud que contaran con yemas axilares vegetativas. Dichos segmentos se resguardaron y colocaron en bolsas de plástico humedecidas previo a su desinfección. Se seccionaron los explantes dejando una yema vegetativa por sección, y se sumergieron en solución de jabón alcalino al 5% con dos gotas de Tween-80 durante 15 min. Luego, se enjuagaron bajo el grifo de agua por 30 min.

Después se trasladaron a condiciones de asepsia en campana de flujo laminar sumergiendo los explantes en etanol 70% durante 30 s, enjuagando posteriormente en tres ocasiones con agua destilada estéril. A continuación se sumergieron en solución de sales de mercurio, Thymerosal (Sigma Aldrich®) al 0.05% por 15 min, para luego enjuagar tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente se sumergieron los explantes en una solución de hipoclorito de sodio comercial con agua destilada estéril en relación (1:6) por 10 min, agitando suavemente, para inmediatamente enjuagar en tres ocasiones. Finalmente, se sumergieron los explantes en solución de ácido ascórbico (150 mg L<sup>-1</sup>) y se almacenaron por 24 h a 4 °C.

#### **Para el establecimiento *in vitro* del material vegetativo en frambuesa (*Rubus idaeus* *cv* Heritage)**

Se utilizaron dos técnicas de micropropagación para introducir a condiciones *in vitro* el material vegetativo de frambuesa, la de segmentos nodales (entrenudos) y la de meristemos axilares.

En el caso de los entrenudos, después de 24 h éstos fueron seccionados en explantes de 2-3 cm y sembrados en cuatro diferentes medios de cultivo. El primer tratamiento (TT1) constó de un medio MS modificado, adicionado con 19.75  $\mu\text{M}$  BAP y 0.04  $\mu\text{M}$  de IBA, de acuerdo a Minas y Neocleus (2007). El segundo (TT2) se formuló igual al anterior, pero con la diferencia de que se agregaron 20.2  $\mu\text{M}$  de Tiazuron (TDZ) en lugar de BAP, ya que esta citocinina ha sido usada ampliamente en la propagación de tejido vegetativo de frambuesa (Gajdošová *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2006; Cappelletti *et al.*, 2006). El tercero (TT3) se formuló con sales MS y vitaminas LS (Linsmaier y Skoog, 1965), además de 4.4  $\mu\text{M}$  de BAP, 0.29  $\mu\text{M}$  de GA y 0.49  $\mu\text{M}$  de IBA (Poothong y Reed, 2015). Finalmente, el cuarto medio de cultivo (TT4) se formuló de acuerdo a Sigarroa y García (2011), el cual constó de un medio MS con vitaminas modificadas más 4.44  $\mu\text{M}$  de BAP y 1.44  $\mu\text{M}$  de GA, como se muestra en el Cuadro 2. En el caso de los meristemos, éstos fueron extraídos con ayuda de pinzas y bisturí estériles y utilizando un microscopio óptico del tipo estereoscopio marca VANGUARD® a 2x su aumento.

**Cuadro 2. Formulación de medios de cultivo suplementados con citocininas, auxinas y giberelinas.** Según reportes de propagación previos para frambuesa *cv* Heritage. TT1 Minas y Eoclus, 2007; TT2 Gadjosova *et al.*, 2006; TT3 sales por Linsmaier y Skoog, 1965; hormonas por Poothong y Reed, 2015; TT4 Sigarroa, 2011.

Tratamiento	Formulación (Sales MS)	Vitaminas	BAP/TDZ ( $\mu\text{M}$ )	GA ( $\mu\text{M}$ )	IBA ( $\mu\text{M}$ )
TT1	100%	MS modificadas	19.75 BAP	-	0.04
TT2	100%	MS modificadas	20.2 TDZ	-	0.04
TT3	100%	LS	4.4 BAP	0.29	0.49
TT4	100%	MS modificadas	4.44 BAP	1.44	-
TT1M	100%	MS modificadas	4.44 BAP	1.44	-

Se retiraron las brácteas de las yemas axilares y se sembró el tejido meristemático en medio de cultivo MS modificado adicionado con 4.44  $\mu\text{M}$  de BAP y 1.44  $\mu\text{M}$  GA (TT1M), de acuerdo a Sigarroa y García (2011). Se agregaron en todos los casos 1 g L<sup>-1</sup> de carbón activado, 5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma® CAS (71010-52-1) como agente gelificante y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, marca SIGMA® (CAS 57-50-1). El pH del cultivo se ajustó a 5.7 en el caso de los entrenudos y seis para los meristemos (Sigarroa y García, 2011; Poothong y Reed, 2015) para posteriormente esterilizarse a 1.5 kg cm<sup>2</sup> de presión a 120 °C por 15 min.

Después de sembrado, se transfirió el material vegetativo a una cámara de transferencia con condiciones controladas de temperatura de 24  $\pm$ 2 °C en condiciones de total oscuridad. Transcurridos siete días, fueron transferidos a condiciones de luminosidad de 86  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  suministrada por lámparas LED modelo T8 TecnoLite® y un fotoperiodo de 16/8 h. Luego de 21 días, se evaluaron los porcentajes de contaminación, plantas necrosadas y explantes establecidos.

### Análisis estadístico

En el caso de la micropropagación de fresa, las variables cualitativas evaluadas fueron el porcentaje de contaminación, que evalúa el éxito del tratamiento de desinfección, el porcentaje de plantas necrosadas, el cual evalúa la formulación del medio de establecimiento y el porcentaje de explantes

establecidos (Marulanda *et al.*, 2000; Sigarroa y García, 2011), las repeticiones fueron 10 unidades para cada uno de los cuatro tratamientos, y éstos se analizaron utilizando un diseño experimental completamente al azar en condiciones homogéneas.

Estas variables se analizaron mediante las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis debido al pequeño número de repeticiones por tratamiento con el cual no es válida de  $\chi^2$  para prueba de proporciones, se aplicó la prueba de Dunn, para la separación de medias Neave y Worthington (1988), utilizando el paquete estadístico Minitab® versión 17.1.0.

En el caso de la frambuesa, se evaluaron el número de plantas necrosadas, y los explantes establecidos, tanto de los entrenudos. Las repeticiones fueron 65 unidades por tratamiento. Los datos fueron analizados mediante el modelo de regresión logística, utilizando como variable independiente los tratamientos y la respuesta al necrosamiento y establecimiento. Todos los datos se procesaron en el software IBM SPSS Statistics 20.

## Resultados y discusión

### Necrosis

La mayoría de las plantas producen compuestos fenólicos después de pasar por etapas de estrés, tales como la que produce el contacto con agentes desinfectantes, por lo cual, se debe tener cautela en la concentración de los mismos a la hora de aplicarlos en tejidos vegetales, este procedimiento es imprescindible para poder establecer material vegetativo bajo condiciones *in vitro* (Rostami y Reza, 2012). Estos compuestos afectan el crecimiento y sobrevivencia de los explantes, oxidando los tejidos y llevando a la necrosis y muerte del mismo.

Para evitar esto, lo recomendable es agregar antioxidantes en el medio, así como aumentar la frecuencia de los subcultivos (Swartz y Lindstrom, 1986). Otras opciones para evitar los procesos de oxidación que conllevan al oscurecimiento de los tejidos y su posterior muerte son el uso de un medio de cultivo líquido, cambio del agente gelificante, uso de carbón activado, adición de ácido ascórbico y de polivinil polipirrolidona; sin embargo, ya que el problema es complejo, se requiere una solución integral que involucre a un mayor número de variables (Azofeifa, 2009; García *et al.*, 2010).

En la presente investigación se buscó contrarrestar la oxidación de los tejidos mediante la aplicación de carbón activado al medio de cultivo y la colocación de los explantes en condiciones de oscuridad por un lapso de tiempo. El carbón activado se distingue del carbón elemental por su ausencia de impurezas y forma casi gráfica, una fina red de poros, una extraordinariamente grande área superficial y un volumen que le confiere una capacidad de absorción única, ayudando así a disminuir los efectos de la oxidación tisular. De la misma forma, disminuir la intensidad luminosa evita la oxidación y necrosamiento de los tejidos (Swartz y Lindstrom, 1986; Thomas, 2008). En este ensayo, en el caso de fresa, los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de oxidación y posterior necrosis fueron el TT3, con 40% y TT4, 70%; por otro lado, los TT1 y el TT2 solo presentaron 10%; es decir, un porcentaje bajo de tejido necrosado. En el ensayo para frambuesa,

el porcentaje de necrosis en general fue alto, con un promedio de 78.1%, a pesar de la adición del carbón activado al medio de cultivo y de haber colocado los explantes bajo condiciones de oscuridad por 7 días.

El tratamiento con el porcentaje de necrosis más bajo fue el TT1, con 27.69% y de acuerdo a la prueba de Mann-Wittney, el TT1 de meristemos mostró una diferencia estadística significativa respecto a los otros tratamientos, con un porcentaje de necrosis alto (Cuadro 3). En esta técnica se cultivan porciones milimétricas de tejidos provenientes de yemas axilares o apicales, cada porción consiste en un fragmento de la región meristemática con o sin primordios foliares, por lo tanto, estos diminutos fragmentos de tejido son más sensibles a la oxidación (García *et al.*, 2011; George *et al.*, 2008).

**Cuadro 3. Frecuencias calculadas para la respuesta del explante a establecimiento (0); desinfección (1) y necrosamiento (2); donde se aprecia que el TT1, proporciona el mejor tratamiento para las tres respuestas (SPSS® IBM v20).**

Tratamiento			Frequency	Percent	Valid percent	Cumulative percent
TT1	Valid	0	7	70	70	70
		1	2	20	20	90
		2	1	10	10	100
		Total	10	100	100	
TT2	Valid	0	6	60	60	60
		1	3	30	30	90
		2	1	10	10	100
		Total	10	100	100	
TT3	Valid	0	5	50	50	50
		1	1	10	10	60
		2	4	40	40	100
		Total	10	100	100	
TT4	Valid	0	2	20	20	20
		1	1	10	10	30
		2	7	70	70	100
		Total	10	100	100	

### Contaminación

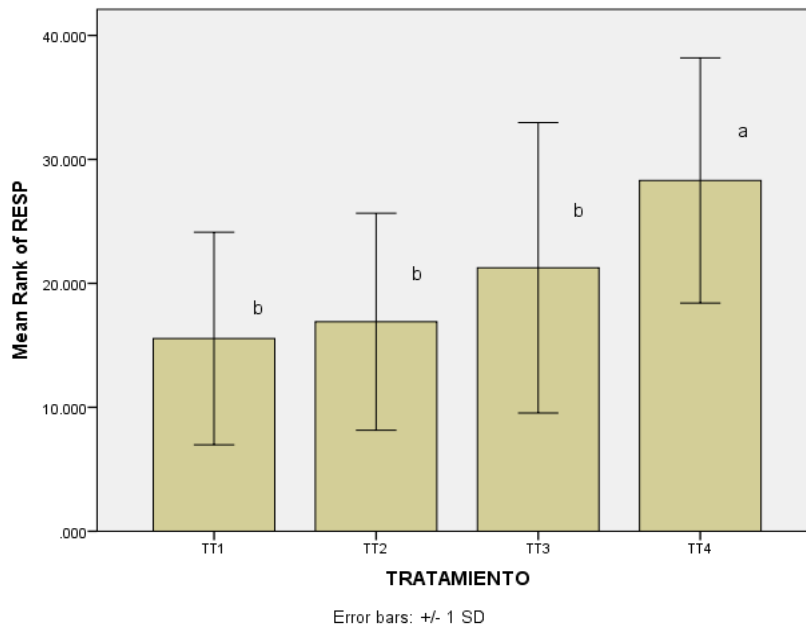
El proceso más importante previo al establecimiento del cultivo es la formulación idónea en la aplicación de agentes desinfectantes y antioxidantes, así como los tiempos en los que se someten los explantes en el proceso de desinfección. Ya que en condiciones *in vitro* algunos microorganismos como bacterias y hongos encuentran un ambiente óptimo para desarrollarse, una desinfección no exitosa obstaculiza el progreso de la propagación, por ello la aplicación de

sustancias y el empleo de técnicas desinfectantes se centran en eliminar a dichos microorganismos no deseados, entre ellos las sales de mercurio en porcentajes del 0.05-0.15%. (Mikropavai-Rošana *et al.*, 2009; Yildiz, 2012).

Respecto a la evaluación de la variable de contaminación en fresa, *cv* Aromas, se encontró que el TT2 mostró mayor porcentaje de explantes con presencia de microorganismos (30%), mientras que los TT3 y TT4 solo presentaron 10% de explantes contaminados. En general el protocolo de desinfección presentó valores aceptables en los tratamientos TT3 y TT4, como se aprecia en el Cuadro 3.

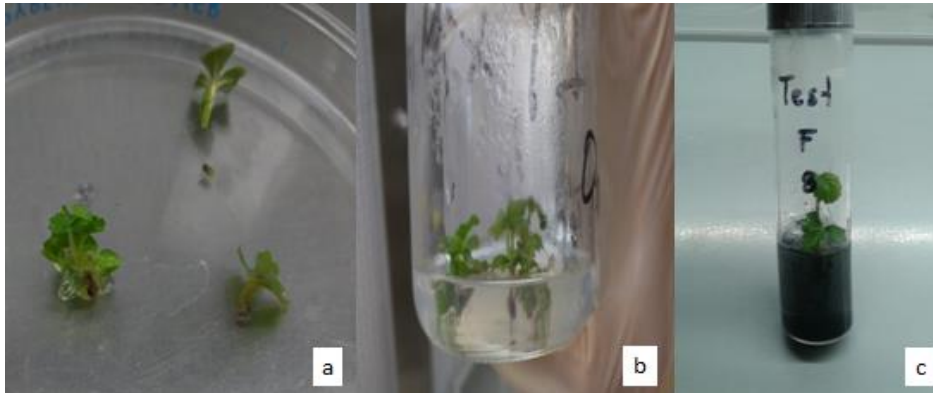
### Establecimiento

En el caso de fresa, *cv* Aromas, los cuatro tratamientos fueron estadísticamente diferentes al ser analizados mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn, mediante la comparación de las diferencias entre los tratamientos. El tratamiento que mejor se comportó fue el TT4, con mayor número de explantes establecidos con éxito (70%). En la Figura 1 y Figura 2, se ilustra, que efectivamente el tratamiento formulado según Caboni *et al.* (2008), al utilizar la combinación de BAP+GA+IBA, se potencializa de una manera mas eficiente la actividad hormonal obteniéndose una respuesta vegetativa mas eficiente que en los otros casos, con un porcentaje de 70% de explantes establecidos.



**Figura 1. Comparativo de la respuesta en establecimiento, contaminación y necrosamiento a las diferentes formulaciones o tratamientos evaluados en fresa, *cv* Aromas.** Se aprecia que en el tratamiento TT4, la diferencia es menor. Se utilizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para la separación de medias y la prueba de Dunn de comparaciones múltiples, del paquete estadístico SPSS® versión 20.

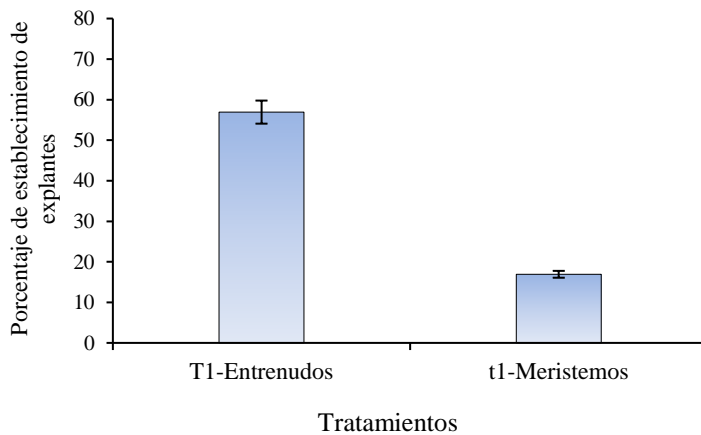




**Figura 2. Material vegetativo de fresa *cv* Aromas; a) explantes de brotes apicales de fresa; b) explantes establecidos en medio de cultivo; c) explante en medio de cultivo con carbón activado.**

### Frambuesa

En el caso de frambuesa, *cv* Heritage, las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn (referencia), para analizar las diferencias estadísticas en la utilización de meristemos contra entrenudos, se encontró que fue mejor el tejido internodal para establecerse, no así en el caso de los meristemos, siendo que, en ese tejido, aun cuando fue el que presentó el menor porcentaje de contaminación (1.54%), tuvo un porcentaje muy bajo de establecimiento con respecto al tejido intermodal. En la Figura 3 se aprecia la marcada diferencia entre tratamientos utilizando esquejes contra células meristemales.

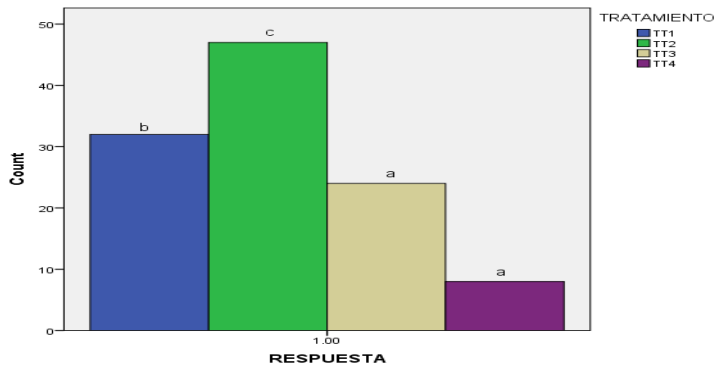


**Figura 3. Diferencia estadística en el establecimiento de entrenudos y meristemos expresado en porcentaje, frambuesa *cv* Heritage.** Utilizando pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y la prueba de Mann-Whitney de dos proporciones del paquete estadístico Minitab® versión 17.1.0

En el caso de la respuesta a los tratamientos mediante formulaciones distintas reportadas, se encontró que el análisis de regresión logística, en respuesta a los tratamientos, para el caso de la formulación del TT4 (4.44µM de BAP + 1.44µM de GA) (Anderson, 1980; Sigarroa, 2011) fue el mejor a la respuesta de establecimiento con respecto a los demás tratamientos, ya que tuvo mucho menor necrosamiento. Se ha reportado que la micropropagación por medio de meristemos permite no solo la obtención de plantas de alta calidad y mayor uniformidad, sino también la propagación

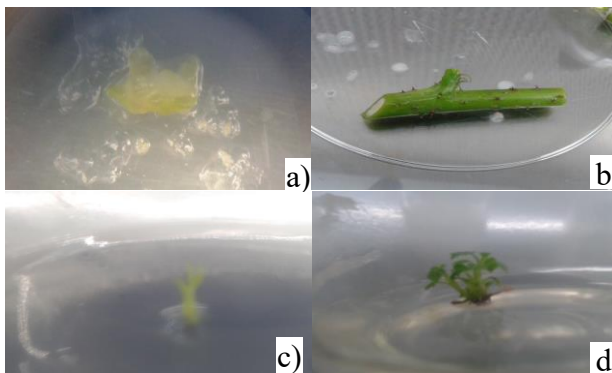
de clones específicos libres de patógenos, logrando reducir la contaminación endógena hasta un nivel mínimo sin necesidad de aplicar protocolos de desinfección más agresivos (Sigarroa y García, 2011). Pero también la respuesta vegetativa a las formulaciones nutritivas, determinan el éxito, en la pronta respuesta al medio de cultivo (Sinha *et al.*, 1987; Reed, 1990; Reed *et al.*, 2013).

Aun cuando se ha reportado que para frambuesa, el medio formulado con sales MS, expresan pobre crecimiento y problemas de desarrollo *in vitro* Greenwayet *et al.* (2012), en este caso la Figura 4 muestra los resultados estadísticos de los rangos entre las diferencias de las formulaciones o tratamientos evaluados, siendo efectivamente el TT4 que tuvo diferencia estadística significativa, al utilizarse entrenudos con material vegetativo para establecimiento y a la combinación de hormonas 4.4 µM de BAP + 1.44 de GA (Sigarroa y García, 2011).



**Figura 4. Efecto de la formulación en explantes contaminados, necrosados y establecidos de frambuesa cv Heritage por tratamientos evaluados.** Analizados mediante el modelo de regresión logística, utilizando como variables independientes el efecto de los tratamientos, al necrosamiento por establecimiento, obteniendo  $X^2$ . Realizado en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20.

En frambuesa solo en dos tratamientos se pudo observar el establecimiento de los explantes. El TT4 de entrenudos presentó el porcentaje más alto de éxito, alcanzando 56.92% de explantes establecidos (Figura 5). Con la prueba de dos proporciones, se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas entre dicho tratamiento y los explantes de la técnica de meristemos.



**Figura 5. Material vegetativo de frambuesa cv Heritage;** a) tejido meristemático observado en microscopio estereoscópico a 2x; b) entrenudo de frambuesa, desinfectado y listo para plantarse; c) explante a partir de tejido meristemático en pleno crecimiento; d) explante en crecimiento a partir de segmento nodal.

## Conclusiones

En fresa *cv* Aromas, el establecimiento *in vitro*, a partir de ápices fue exitoso en los cuatro medios de cultivo evaluados, ya que fue posible su establecimiento si bien el TT1 demostró tener la mayor viabilidad, al presentar el mayor porcentaje de tejido vegetativo establecido con 70% y el de menor porcentaje el TT4, con tan solo 20%. La combinación de hormonas en la formulación, permitió el desarrollo exitoso del tejido para su establecimiento *in vitro* de fresa (Folta, *et al.*, 2006). En todos los tratamientos, el porcentaje de contaminación no rebasó 30%, considerando, así como aceptable para un sistema de propagación *in vitro*.

Para el caso de frambuesa, *cv* Heritage, la formulación propuesta por Anderson (1980): Sigarroa y García (2011) fue el único que permitió el desarrollo de los explantes, existiendo un porcentaje mayor de establecimiento mediante la técnica donde se utilizaron esquejes internodales, no así por medio de meristemos, donde se tuvo una alta tasa de necrosamiento y muerte del tejido establecido, en los demás tratamientos. La formulación con la combinación de hormonas BAP + GA, sin la presencia de la auxina AIB, resultó mas exitosa en el establecimiento de segmentos nodales en frambuesa.

Por otro lado, cuando se extrajo células del meristemal mostró un porcentaje de contaminación mucho menor respecto de los explantes obtenidos mediante siembra de entrenudos, debido a que es más exitoso el sistema de desinfección cuando se trata de la extracción de tejido del cambium (Yildiz, 2012). Cuando se evaluaron los meristemos, se obtuvo alto porcentaje de necrosamiento en el tejido, pero muy bajo el porcentaje de contaminación. Por lo que se sugiere evaluar nuevamente esta técnica, utilizando otro tipo de agentes desinfectantes y tiempos de exposición del tejido ante ellos.

## Agradecimientos

Los autores(as) agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento del proyecto PRO-INNOVA 2015 con núm. 221265: innovación frutícola utilizando el cultivo de tejidos y agricultura orgánica en frutales alternativos de alto valor económico en el estado de Chihuahua.

## Literatura citada

- Abobkar, I. 2012. Plant tissue cultura media, Recent advances in plant *in vitro* culture. Leva, A. (Ed.). INTECH Open Access Publisher. <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-media>.
- Alanagh, E. N.; Garoosi, G. A.; Haddad, R.; Maleki, S.; Landín, M. and Gallego, P. P. 2014. Design of tissue culture media for efficient Prunus rootstock micropropagation using artificial intelligence models. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 117(3):349-359.
- Ali, A.; Ahmad, T.; Akhtar, N. and Ahmed, I. 2009. Effect of different media and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of olive cultivar "Moraiolo". Pak. J. Bot. 41(2):783-795.
- Anderson, W. C. 1980. Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. In: Symposium on Breeding and Machine Harvesting of Rubus. 112:13-20.

- Arencibia, A.; Vergara, C.; Quiroz, K.; Carrasco, B. and García, R. 2013. Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary immersion bioreactors (TIBs). *Scientia Hort.* 160(1):49-53.
- Ashrafuzzaman, M.; Faisal, S.; Yadav, D.; Khanam, D. and Raihan, F. 2013. Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner culture. *Bangladesh J. Agril. Res.* 38(3):467-472.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana.* 20(1):153-175.
- Balachandran, S.; Bhat, S. and Chandel, K. 1990. *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Plant Cell Reports.* 8(9):521-524.
- Biswas, M.; Hossain, M.; Ahmed, M.; Roy, U.; Karim, R.; Razvy, M.; Salahin, M. and Islam, R. 2007. Multiple shoot regeneration of strawberry under various colour illuminations. *Am. Eur. J. Sci. Res.* 2(2):133-135.
- Boxus, P. 1974. The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation. *J. Horti. Sci.* 49(3):209-210.
- Broome, O. C. and Zimmerman, R. H. 1978. *In vitro* propagation of Blackberry. *HortSci.* 13(2):151-153.
- Caboni, E.; Condello, E.; Meneghini, M.; Palombi, M. A.; Frattarelli, A. and Damiano, D. 2008. Progresses in cryopreservation of *Pyrus* spp. and evaluation of genetic stability of the recovered shoots. Cryopreservation of crop species in Europe: cryoplanet cost action 87120<sup>th</sup>- 23<sup>rd</sup> of February 2008, Oulu, Finland/Jaana Laamanen, Marjatta Uosukainen, Hely Häggman, Anna Nukari and Saija Rantala. (Eds.). 36 p.
- Cappelletti, R.; Sabbadini, S. and Mezzetti, B. 2016. The use of TDZ for the efficient *in vitro* regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars. *Sci. Hort.* 207: (1):117-124.
- Clapa, D.; Fira, A. and Pacurar, I. 2008. The *in vitro* propagation of the raspberry cultivar citria. *Bulletin of the University of Agricultura Sciences.* 65(1):99-103.
- Clavijo, R.; Beltrán, A.; Llauger, R.; Rodríguez, A.; Farrés, E.; García, M. E. y Rodríguez, M. 2010. Apuntes sobre el cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Rev. Citrifrut,* 27(2):67-71.
- Dai, W.; Magnusson, V.; Hatterman, H. and Carter, J. 2006. Micropropagation of 'Amethyst' purple raspberry (*Rubus occidentalis* L. x *R. Idaeus* L. 'Amethyst'). *J. Environ. Hort.* 4(1):35-38.
- Folta, K. M.; Dhingra, A.; Howard, L.; Stewart, P. J. and Chandler, C. K. 2006. Characterization of LF9, an octoploid strawberry genotype selected for rapid regeneration and transformation. *Planta.* 224(5):1058-1067.
- Gajdošová, A.; Ostrolucká, M.; Libiaková, G.; Ondrušková, E. and Šimala, D. 2006. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture *in vitro*. *J. Fruit Ornamental Plant Res.* 14(1):103-119.
- García, E.; Lorente, P.; Marín, J.; Arbeloa, A. y Andre, P. 2010. Micropropagación e injerto *in vitro* de pistacho. *Información Técnica Económica Agraria.* 106(4):294-302.
- García, E.; Lorente, P.; Marín, J. A.; Andreu, P. y Arbeloa, A. 2011. Factores que afectan a la necrosis apical de brotes de *Pistacia vera* L. Cultivados *in vitro*. *ITEA.* 107(4):315-323.
- García, J.; González, G. y Ciordia, M. 2014. El cultivo del frambueso. Servicio regional de investigación y desarrollo agroalimentario. España. 33 p.
- George, E.; Hall, Michael and De Klerk, Geert-Jan. 2008. Plant propagation by tissue culture. 3<sup>ra</sup> Edición. 1 p.

- Greenway, M. B.; Phillips, I. C.; Lloyd, M. N.; Hubstenberger, J. F. and Phillips, G. C. (2012). A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. *In Vitro Cel. Develop. Biol. Plant.* 48(4):403-410.
- Guédez, C.; Cañizález, L.; Castillo, C. y Olivari, R. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp.). *Revista Soc. Venezolana Microbiol.* 29(1):34-38.
- González, M.; López, M.; Valdés, A. and Ordas, R. 2000. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Ann. Appl. Biol.* 137(1):73-78.
- Haddadi, F.; Abd-Aziz, M.; Saleh, G.; Abd-Rashid, A. and Kamaladini, H. 2010. Micropropagation of strawberry *cv* Camarosa: prolific shoot regeneration from *in vitro* shoot tips using Thidiazuron with N6-benzylamino-purine. *Hortic. Sci.* 45(3):453-456.
- Hussain, A.; Ahmed, I.; Nazir, H. and Ullah, I. 2012. Plant tissue culture: current status and opportunities, *Recent Advances in Plant In Vitro Culture*. Leva, A. (Ed.). INTECH. <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-current-status-and-opportunities>.
- Jaakola, L.; Pirttilä, A. M.; Halonen, M. and Hohtola, A. 2001. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Mol. Biotechnol.* 19(2):201-203.
- Kessel, D. A. 2012. Mejora genética de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.), a través de métodos biotecnológicos. *Cultivos Tropicales.* 33(3):34-41.
- Linsmaier, E. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 18(1):100-127.
- Litwińczuk, W.; Okołodkiewicz, E. and Matyaszek, I. 2009. Development of *in vitro* shoot cultures of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) “Senga Sengana” and “Elsanta” under the influence of high doses of gibberellic acid. *Folia Hort.* 21(2):43-52.
- Minas, G. and Neocleous, D. 2007. A protocol for rapid clonal micropropagation *in vitro* of primocane-fruiting red raspberry cultivars. Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture, Natural Resources and the Environment. Lefkosia, Cyprus. Miscellaneous Report: 95(1):3-7 <http://news.ari.gov.cy/publications/mr95-minas.pdf>.
- Moradi, K.; Otroshy, M. and Azimi, M. 2011. Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures. *J. Agric. Technol.* 7(6):1755-1763.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15(3):473-497.
- Neave, H. R. and Worthington, P. L. 1988. *Distribution-Free Tests*. Editorial Unwin Hyman Ltd. London, UK. 430 p.
- Nitsch, J. and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science.* 163(3862):85-87.
- Ostrolucká, M.; Libiaková, G.; Ondrušková, E. and Gajdošova A. 2004. *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis.* 676(1):207-2012.
- Ostrolucká, M. G.; Gajdošová, A.; Libiaková, G.; Hrubíková, K. and Bežo, M. 2007. Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium* spp. *In: protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Springer Netherlands. 445-455 pp.
- Pérez, A.; Nápoles, L.; Concepción, O. y Trujillo, R. 2002. Multiplicación *in vitro* de brotes de guayaba (*Psidium guajava* L.) var. enana roja cubana EAA 18-40 obtenidos a partir de semillas. *Cultivos tropicales.* 23(3):57-61.
- Poothong, S. and Reed, B. 2015. Increased CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> improve the growth of micropropagated red raspberries. *In vitro Cel. Develop. Biol. Animal.* 51(6):648-658.
- Purohit, S. 2012. *Introduction to plant cell, tissue and organ culture*. PHI Learning Pvt Ltd, New Delhi. 1 p.

- Roca, W. and Mroginsky, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. (No. 151). Ciat.
- Reed, B. M. 1990. Multiplication of *Rubus* germplasm *in vitro*: a screen of 256 accessions. Fruit Var J. 44(1):141-148.
- Reed, B. M.; Wada, S.; DeNoma, J. and Niedz, R. P. 2013. Improving *in vitro* mineral nutrition for diverse pear germplasm. *In Vitro Cel. Develop. Biol. Plant.* 49(3):343-355.
- Rostami, A. A and Reza, A. 2012. *In vitro* propagation of Olive (*Olea europaea* L.) by nodal segments. *J. Biol. Environ. Sci.* 6(17):155-159.
- Singha, S.; Oberly, G. H. and Townsend, E. C. 1987. Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during *in vitro* shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 11(3):209-220.
- Sigarroa, A. y García, C. 2011. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. *Acta Agronómica,* 60(4):347-354.
- Song, G. Q. and Sink, K. C. 2005. Optimizing shoot regeneration and transient expression factors for *Agrobacterium tumefaciens* transformation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) cultivar Montmorency. *Sci. Hortic.* 106(1):60-69.
- Ostrolucká, M. G.; Gajdošová, A.; Libiaková, G.; Hrubíková, K. and Bežo, M. 2007. Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium* spp. *In: protocols for micropropagation of woody trees and fruits* Springer Netherlands. 445-455 pp.
- Swartz, H. and Lindstrom, J. 1986. Small fruit and grapes tissue culture from 1980 to 1985: Commercialization of the technique. *In: tissue culture as a plan production system for horticultural crops.* Springer Netherlands. 201-220 pp.
- Tan, D.; Takamura, T.; Watanabe, H.; Okamoto, K. and Tanaka, M. 2003. Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue Organ Culture.* 73(1)43-52.
- Thomas, T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol. Adv.* 26(6):618-631.
- Yesil, O.; Gurel, A. and Vardar, F. 2010. Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. *Transworld Research Network, Kerala.* 3 p.
- Yildiz, M. 2012. The prerequisite of the success in plant tissue culture: high frequency shoot regeneration, recent advances in plant *in vitro* Culture. Leva, A. (Ed.). INTECH. <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/the-prerequisite-of-the-success-in-plant-tissue-culture-high-frequency-shoot-regeneration>.
- Ying, C.; Al-Abdulkarim, A.; Al-Jowid, S. and Al-Baiz, A. 2009. An effective disinfection protocol for plant regeneration from shoot tip cultures of strawberry. *Afr. J. Biotechnol.* 8(11):2611-2615.
- Reed, B. 1990. Multiplication of *Rubus* germplasm *in vitro*: a screen of 256 accessions. *Fruit Varieties J.* 44(1):141-148.
- Wu, J.; Miller, S.; Hall, H. and Mooney, P. 2009. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 99(1):17-25.