

## Regeneración de explantes de hojas de cinco genotipos de frambuesa

---

Montserrat Abigail Rosas-Rojas<sup>1</sup>

Neftalí Ochoa-Alejo<sup>2</sup>

Ma. del Carmen Rocha-Granados<sup>1,§</sup>

1 Facultad de Agrobiología 'Presidente Juárez'-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán, México.

2 Departamento de Ingeniería Genética-Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-Unidad Irapuato-Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato, México.

Autora para correspondencia: [carmen.rocha@umich.mx](mailto:carmen.rocha@umich.mx).

---

### Resumen

La eficiencia en la regeneración de frambuesa, a partir de explantes de hojas, se ve limitada debido a diversos factores, entre que los que destacan la edad del explante y el genotipo. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de los reguladores de crecimiento sobre la oxidación y la regeneración *in vitro* a partir de explantes de hojas de cinco genotipos de frambuesa, el año del estudio fue en 2021. Se probaron dosis y combinaciones de auxinas y citocininas para inducir organogénesis directa en explantes foliares de los genotipos de frambuesa; 'C-6', 'Joan J.', 'A-1', 'UM-702' y 'Heritage'. Los resultados mostraron que el regulador bencilaminopurina (BAP) disminuyó la oxidación en los genotipos 'C-6', 'Joan J.', 'A-1' y 'Heritage' en 36, 48, 60 y 68% respectivamente, los que se suplementaron con cinetina tuvieron una reducción de la oxidación en el genotipo 'C-6' (56%), cuando se adicionó tidiazuron (TDZ) la oxidación disminuyó en los genotipos evaluados en 72, 64, 72, 84 y 68% respectivamente. La mayor regeneración (número de brotes/explante) fue con BAP (0.5 mg L<sup>-1</sup>) y TDZ (0.2 mg L<sup>-1</sup>) + ácidoindolbutírico (AIB) (0.1 mg L<sup>-1</sup>) para el genotipo 'C-6', y TDZ (0.2 mg L<sup>-1</sup>) + AIB (0.1 mg L<sup>-1</sup>) para 'Joan J.' y 'Heritage'. En 'A-1' y 'UMC-702' se sugiere el uso de TDZ (0.2 mg L<sup>-1</sup>) solo. Se concluye que el uso de reguladores de crecimiento, solos o combinados, disminuyen la oxidación en los explantes de hojas, y aumentan la sobrevivencia y regeneración de brotes en todos los genotipos evaluados.

### Palabras clave:

*Rubus idaeus* L., hormonas vegetales, organogénesis.

---



## Introducción

México es el quinto país productor de frambuesa (*Rubus idaeus* L.), en el año 2019 se produjeron 128 848 t, con un valor de 5 154 millones de dólares (FAOSTAT, 2022), de las cuales Michoacán aportó 25 988 t (SIAP, 2020). Dentro de las variedades con más éxito en esta región están la 'Heritage', 'Maling', 'Exploid', 'Adelita', 'Autum Bliss', 'Primavera' y 'Blazer' (Bascopé, 2013), las cuales se generaron mediante las técnicas tradicionales de cruzamiento y selección; sin embargo, debido a la naturaleza perene y su baja diversidad genética los programas de mejoramiento y generación de nuevos cultivares de frambuesa son litimados (Hall *et al.*, 2009).

La biotecnología aporta herramientas para lograr el mejoramiento genético de manera rápida y dirigida (Gutiérrez *et al.*, 2003), a partir de la multiplicación clonal de especies vegetales con rasgos agronómicos deseables (Allccaco, 2016) además del cultivo de órganos y tejidos vegetales que garantiza la calidad y seguridad del material vegetal (Jadán *et al.*, 2015). Los métodos de propagación *in vitro* para frambuesa se han empleado desde los años 80's; sin embargo, esta es altamente recalcitrante por lo que los explantes suelen presentar una gran cantidad de compuestos fenólicos que repercuten en la formación de brotes adventicios, aunado a que cada cultivar presenta sus propios requerimientos para la multiplicación *in vitro* (Wu *et al.*, 2009).

Las plantas obtenidas por regeneración vía organogénesis se distinguen por presentar caracteres sobresalientes como mayor número y longitud de cañas, y frutos en plantas de frambuesa (Debnath, 2014). La organogénesis es fundamental en la regeneración y multiplicación *in vitro* de frambuesa e incluye el uso de reguladores de crecimiento. Varias investigaciones han estudiado el efecto de estos, entre los que destacan las auxinas y citocininas (González *et al.*, 2009; Hunková *et al.*, 2016), su concentración depende principalmente de la especie, el tejido u órgano, y del objetivo principal del experimento (Adobkar *et al.*, 2012).

La regeneración de frambuesa se ha obtenido a partir de segmentos de hoja y peciolo (Kim y Dai, 2020), yemas axilares y meristemos nodales (Allccaco, 2016) y segmentos apicales (Jadán *et al.*, 2015) con el uso de ácido indolbutírico (AIB), bencil amino purina (BAP), giberelinas (AGs) y thidiazuron (TDZ) (Jadán *et al.*, 2015; Allccaco, 2016; Kim y Dai, 2020). Durante este proceso se presenta oxidación en las células debido al estrés provocado por el corte de los tejidos (Phineas y Kuman, 2013).

La oxidación de los explantes se debe a la acción de las enzimas oxidasas y tirosinasas que se liberan al herirse los tejidos (Jacinto, 2018). Para contrarrestar esto, se recomienda, adicionar al medio de cultivo antioxidantes como ácido ascórbico, ácido cítrico y adsorbentes como el carbón activado, realizar cambios de medio de cultivo cuando se observe fenolización o con una frecuencia regular, mantener el tejido en oscuridad en la cámara de crecimiento alrededor de 15 días (Restrepo *et al.*, 2018), así como choques térmicos (Méndez-Álvarez y Abdelnour-Esquivel, 2014).

La regeneración *in vitro*, vía organogénesis directa, es una fase requerida en los protocolos de desarrollo de variedades mexicanas de frambuesa a través de herramientas biotecnológicas, como la diploidización mediante agentes químicos, o bien para la transformación genética. El objetivo de este trabajo fue obtener información básica sobre el efecto de los reguladores de crecimiento, auxinas y citocininas, sobre la oxidación y regeneración *in vitro* de segmentos de hojas frambuesa (*Rubus idaeus* L.) en los genotipos 'C-6', 'Joan J.', 'A-1', 'UMC-702' y 'Heritage'.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

En este trabajo experimental se utilizaron cinco genotipos de frambuesa roja (*Rubus idaeus* L.): 'Joan J.', 'Heritage', 'A-1', 'UM-702' y 'C-6', los dos primeros son materiales comerciales y los

tres últimos se generaron en el programa de mejoramiento genético de frutillas de la Facultad de Agrobiología 'Presidente Juárez' de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### Establecimiento *in vitro* del material vegetativo

Brotos axilares y apicales provenientes del banco de germosplasma de frambuesa del invernadero de frutillas, fueron desinfectados utilizando la metodología descrita por Granados-Rubio (2017), y establecidos *in vitro* en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con las sales minerales en concentración al 100%, vitaminas y sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>. Para la proliferación de los brotes el medio fue adicionado con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Minas y Neocleous, 2007), se ajustó el pH a 5.7 ±1, el medio de cultivo se gelificó con 8 g L<sup>-1</sup> de agar y se vertieron 20 ml de medio en frascos de 100 ml de capacidad. Se esterizaron en autoclave a 15 psi de presión durante 15 min.

Los explantes fueron colocados en un cuarto de crecimiento a 16/8 h luz/oscuridad y una temperatura de 24 ±1 °C. Transcurridas tres semanas los brotes que no presentaron contaminación se colocaron en el mismo medio de proliferación, con la finalidad de contar con suficiente explantes para establecer los experimentos del efecto de los reguladores de crecimiento sobre la oxidación y regeneración de frambuesa a partir de segmentos de hojas.

### Oxidación y regeneración de segmentos de hojas

Para determinar el efecto de los reguladores de crecimiento sobre la oxidación y regeneración de frambuesa segmentos de hoja de cada genotipo (establecidos *in vitro*) fueron colocadas en un medio de cultivo MS básico adicionado con citocininas [cinetina (Kin), BAP y TDZ] y auxina (AIB) a concentraciones de 1 1.5, 2, 2.5 y 3 mg L<sup>-1</sup> para Kin y BAP y 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg L<sup>-1</sup> para TDZ, solas o combinadas con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB. A partir de las plántulas propagadas *in vitro* se realizó la siembra de los explantes bajo el siguiente procedimiento: dentro de la campana de flujo laminar con la luz apagada, se colocó agua destilada estéril con ácido ascórbico (50 mg L<sup>-1</sup>) en cajas Petri para prevenir la oxidación de los explantes; enseguida, se disectaron hojas en secciones de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y se colocaron dentro de cada frasco con medio de cultivo, los cuales se mantuvieron en el cuarto de crecimiento bajo condiciones de oscuridad durante ocho días; transcurrido ese periodo de tiempo, se colocaron en un fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad y 24 ±1 °C. Después de tres semanas se subcultivaron en un medio de cultivo fresco con las mismas condiciones que contenía el medio anterior.

### Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 34 tratamientos y un control con 5 repeticiones, cada unidad experimental constó de 5 explantes por frasco. Con los datos obtenidos se hizo un análisis de varianza univariado y, las variables que mostraron diferencias significativas se sometieron a la prueba de Duncan ( $p \leq 0.05$ ) (Duncan, 1995) para comparación de medias entre tratamientos con el programa estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2002).

Las variables evaluadas fueron: 1) oxidación de explantes; se determinó mediante la siguiente fórmula: oxidación (%) = número de explantes oxidados x 100/ número total de explantes establecidos; 2) explantes regenerados: se determinó el porcentaje de regeneración mediante la siguiente fórmula: regeneración (%) = número de explantes con brotes x 100/ número total de explantes establecidos; y 3) el coeficiente de multiplicación: se determinó mediante la siguiente fórmula: coeficiente de multiplicación = número de plántulas finales/número de explantes establecidos.

## Resultados

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

El Cuadro 1 incluye los resultados del efecto de los reguladores sobre la oxidación de los explantes de los cinco genotipos analizados. El genotipo 'C-6' tratado con TDZ (0.2 a 1 mg L<sup>-1</sup>) mostró porcentajes de oxidación de 8 a 16%, cuando se utilizó 0.2 mg L<sup>-1</sup> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB no se presentó oxidación (0%), mientras que en el testigo se observó (72%). Los explantes de 'Joan J.' que se establecieron con TDZ presentaron oxidación de 0 a 28%, esto se redujo cuando se combinó TDZ con AIB donde la oxidación fue de 0 a 12% y en el tratamiento testigo fue de (64%). La oxidación aumentó radicalmente con 3 mg L<sup>-1</sup> de cinetina (84%).

**Cuadro 1. Porcentaje de oxidación de explantes de hoja de frambuesa de los genotipos 'C-6', 'Joan J.', 'A-1', 'UMC-702' y 'Heritage' cultivados *in vitro* y tratados con reguladores de crecimiento (BAP, cinetina y TDZ) solos o en interacción con ácido indolbutírico (AIB).**

Regulador de (mg L <sup>-1</sup> ) crecimiento		'C-6'	'JOAN J'	'A-1'	'UMC-702'	'HER'
Coeficiente de variación		63.15	61.64	37.63	27.56	28.71
Bencilaminopurina	0.5	44 cdefgh	40 cdefghi	48 defg	72 ab	36 ef
	1	84 a	44 bcdefgh	92 abc	84 ab	88 ab
	1.5	52 abcdef	56 abcde	16 ghi	64 bc	76 abc
	2	48 abcdefg	56 abcde	96 ab	72 ab	20 fgh
	2.5	64 abcd	68 abc	88 abc	64 bc	88 ab
	3	80 ab	72 abc	100 a	84 ab	100 a
Bencilaminopurina + ácido indolbutírico	0.5+0.1	60 abcde	16 fghij	100 a	40 c	44 de
	1+0.1	60 abcde	44 bcdefgh	84 abc	64 bc	0 h
	1.5+0.1	60 abcde	20 efghij	60 bcdef	88 ab	76 abc
	2+0.1	44 bcdefgh	28 defghij	68abcde	68 bc	44 de
Cinetina	0.5	48 abcdefg	68 abc	88 abc	100 a	96 a
	1	36 cdefghi	72 abc	80 abcd	100 a	100 a
	1.5	40 cdefgh	64 abcd	100 a	100 a	96 a
	2	72 abc	40 bcdefghi	92 abc	100 a	100 a
	2.5	16 fghi	76 ab	84 abc	100 a	96 a
Cinetina + ácido indolbutírico	0.5+0.1	60 abcde	48 abcdefg	40 efgh	100 a	96 a
	1+0.1	32 defghi	52 abcdef	68 abcde	100 a	100 a
	1.5+0.1	44 bcdefgh	36 cdefghij	100 a	80 ab	100 a
	2+0.1	40 cdefgh	64 abcd	76 abcd	88 ab	100 a
	2.5+0.1	56 abcde	48 abcdefg	100 a	100 a	100 a
Thidiazuron	0.2	12 ghi	4 ij	4 i	84 ab	16 fgh
	0.4	8 hi	24 efghij	16 ghi	72 ab	16 fgh
	0.6	12 ghi	0 j	32 fghi	76 ab	12 fgh
	0.8	16 fghi	28 defghij	20 ghi	64 bc	8 gh
	1	16 fghi	12 ghij	60 bcdef	68 bc	24 efgh
Thidiazuron + ácido indolbutírico	0.2+0.1	0 i	4 ij	8 hi	4 d	12 fgh
	0.4+0.1	16 fghi	12 ghij	36 efghi	0 d	8 gh
	0.6+0.1	8 hi	0 j	28 fghi	0 d	12 fgh

Regulador de ( $\text{mg L}^{-1}$ ) crecimiento	'C-6'	'JOAN J'	'A-1'	'UMC-702'	'HER'
0.8+0.1	8 hi	8 hij	36 efghi	0 d	16 fgh
1 +0.1	24 efghi	4 ij	4 i	0 d	0 h
Testigo	0	64 abcd	76 abcd	84 ab	68 bc

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 0.05.

El genotipo 'A-1' presentó menor oxidación con TDZ a concentraciones de 0.2  $\text{mg L}^{-1}$  y 1  $\text{mg L}^{-1}$  más 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  de AIB (4%). Mientras que, las dosis de 3  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP, 0.5  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP más 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  de AIB o 1.5, 2.5 y 3  $\text{mg L}^{-1}$  de cinetina combinada con 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  de AIB mostraron 100% de oxidación (Cuadro 1). El genotipo 'UMC-702' mostró 0% de oxidación en los explantes expuestos a 0.4 - 1  $\text{mg L}^{-1}$  de TDZ + 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  de AIB, los explantes expuestos a cinetina solo o combinado con AIB presentaron 100% de oxidación (Cuadro 1). El TDZ disminuyó la oxidación en el genotipo 'Heritage'. Donde concentraciones de 0.2 a 1  $\text{mg L}^{-1}$  de TDZ + 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  de AIB mostraron porcentajes de oxidación de 0 a 16%, mientras que la cinetina (0.5 a 3  $\text{mg L}^{-1}$ ) + 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  de AIB indujo la oxidación de 96 a 100%, valores superiores al tetigo (68%).

## Efecto de auxinas y citocininas sobre la regeneración de brotes adventicios en explantes de hojas

Los reguladores de crecimiento tuvieron efecto sobre el número de explantes que formaron brotes en los genotipos estudiados. Los explantes del genotipo 'C-6' presentaron su mayor tasa de formación de brotes con TDZ (0.2  $\text{mg L}^{-1}$ ) con 1.4 brotes por explante; al aumentar la dosis y combinar con AIB disminuyó la inducción de brotes. También se pudo observar que la cinetina, sola o combinada con AIB, no indujo la regeneración (Cuadro 2, Figura 1A). Los explantes del genotipo 'Joan J.' mostraron una mayor formación de brotes con 0.6  $\text{mg L}^{-1}$  de TDZ y 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  de AIB, donde se obtuvieron 1.6 brotes por explante (Cuadro 2, Figura 1B).

En el genotipo 'A-1' el TDZ (0.2  $\text{mg L}^{-1}$ ) indujo la regeneración (0.92 brotes por explante, esto representó 36% más que el tratamiento control (Cuadro 2, Figura 1C). Para el caso de 'UM-702' se observó que dosis bajas de TDZ (0.2  $\text{mg L}^{-1}$ ) + AIB (0.1  $\text{mg L}^{-1}$ ) indujeron la regeneración de brotes (1.12 brotes por explante) (Cuadro 2, Figura 1D). En el genotipo 'Heritage' se obtuvo regeneración de los con el TDZ a dosis de 0.2  $\text{mg L}^{-1}$ , solo o en combinación con 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  de AIB (40%), mientras que en el tratamiento control no se obtuvo regeneración (Cuadro 2, Figura 1C).

**Cuadro 2. Comparación del coeficiente de multiplicación y de los resultados de la prueba de Duncan para brotes obtenidos a partir de explantes de hoja de frambuesa de los genotipos 'C-6', 'Joan J.', 'A-1', 'UMC-702' y 'Her' cultivados *in vitro* y tratados con reguladores de crecimiento (BAP, CIN y TDZ) solos o en interacción con AIB.**

Regulador de ( $\text{mg L}^{-1}$ ) crecimiento		'C-6'	'JOAN J'	'A-1'	'UMC-702'	'HER'
Coefficiente de variación		239.1	117.48	175.69	139.1	176.81
Bencilaminopurina	0.5	0.12 bc	0.12 d	0 d	0.04 fg	0.04 e
	1	0 c	0.24 cd	0 d	0.18 defg	0 e
	1.5	0.16 bc	0.08 d	0.16 bcd	0.04 fg	0.44 bcde
	2	0.16 bc	0.08 d	0.04 d	0.2 defg	0.08 e
	2.5	0.08 c	0.04 d	0.08 cd	0.6 b	0.04 e
	3	0 c	0.04 d	0 d	0.04 fg	0 e

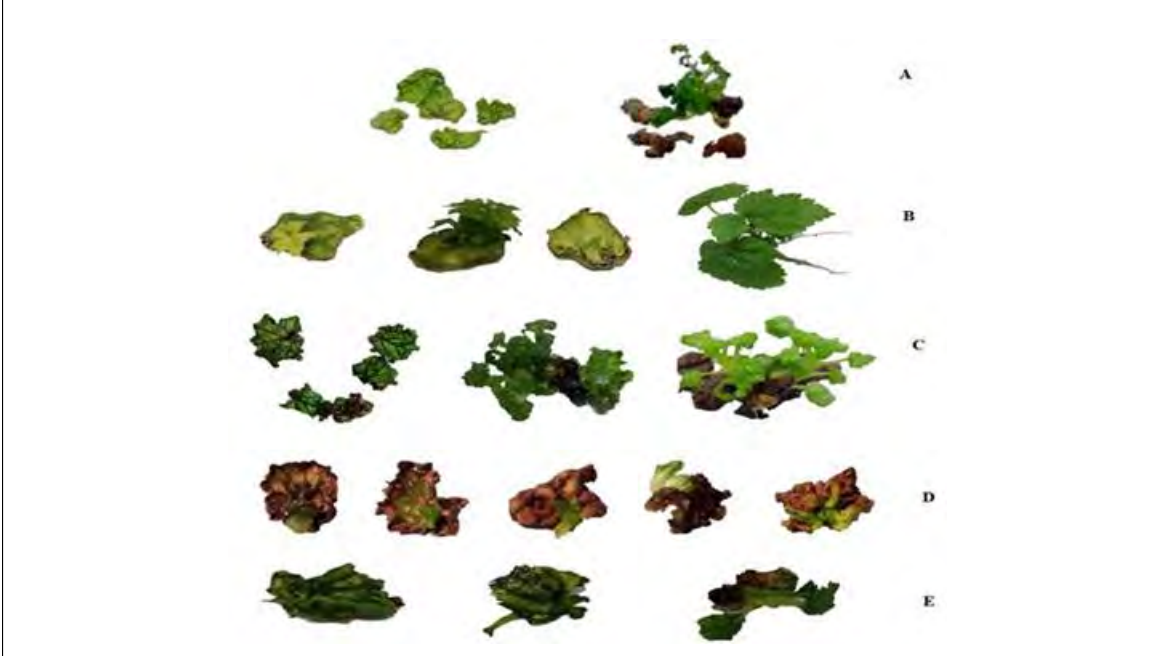
Regulador de crecimiento	(mg L <sup>-1</sup> )	'C-6'	'JOAN J'	'A-1'	'UMC-702'	'HER'
<i>Bencilaminopurina</i>	0.5+0.1	0.08 c	0.36 cd	0 d	0.24 cdefg	0 e
+ ácido	1+0.1	0.16 bc	0 d	0 d	0.2 defg	0.16 e
<i>indolbutírico</i>	1.5+0.1	0.12 bc	0.08 d	0.08 cd	0.04 fg	0.08 e
	2+0.1	0.2 bc	0 d	0.08 cd	0.04 fg	0 e
	2.5+0.1	0.04 c	0 d	0 d	0 g	0.12 e
	3+0.1	0.24 bc	0 d	0.36 b	0.04 fg	0.2 e
<i>Cinetina</i>	0.5	0.08 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	1	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	1.5	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	2	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	2.5	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	3	0.04 c	0 d	0.08 cd	0 g	0 e
<i>Cinetina + ácido</i>	0.5+0.1	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
<i>indolbutírico</i>	1+0.1	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	1.5+0.1	0.04 c	0 d	0 d	0.04 fg	0 e
	2+0.1	0 c	0.04 d	0 d	0 g	0 e
	2.5+0.1	0 c	0 d	0 d	0 g	0 e
	3+0.1	0 c	0 d	0 d	0.04 fg	0 e
<i>Thidiazuron</i>	0.2	1.4 a	1.12 a	0.92 a	0.37 bcde	0.84 ab
	0.4	1 a	1 ab	0.24 bcd	0.04 fg	0.32 de
	0.6	1 a	0.88 ab	0.36 b	0.36 cdef	0.8 abc
	0.8	0.2 bc	0.08 d	0 d	0.08 efg	0.68 abcd
	1	0.2 bc	0.4 cd	0.16 bcd	0.2 defg	0.28 de
<i>Thidiazuron</i>	0.2+0.1	0.8 ab	1.24 a	0.32 bc	1.12 a	0.96 a
+ ácido	0.4+0.1	0.2 bc	1.2 a	0.12 bcd	0.4 bcd	0.68 abcd
<i>indolbutírico</i>	0.6+0.1	0.2 bc	1.6 a	0.12 bcd	0.16 defg	0.36 cde
	0.8+0.1	0 c	0.32 cd	0.2 bcd	0.44 bcd	0 e
	1+0.1	0.2 bc	0.6 bc	0.08 cd	0.52 bc	0.24 de
<i>Testigo</i>	0	0 c	0.04 d	0.08 cd	0 g	0 e

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas al 0.5.





**Figura 1.** Diferentes números de explantes que muestran el grado de oxidación y de regeneración *in vitro* de secciones de hojas de frambuesa genotipos 'C-6'(A), 'Joan J' (B), 'A-1' (C), 'UM-702' (D) y 'Heritage' (E), todos creciendo en un medio MS básico adicionado con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB.



Los datos más reevevantes de este estudio, englobados en el párrafo anterior, muestran que existe una correlación entre la oxidación y regeneración de los brotes obtenidos a partir de secciones de hojas en todos los genotipos de frambuesa utilizados en esta investigación, a menor oxidación aumenta la regeneración de los explantes.

## Discusión

### Oxidación de los explantes

Los resultados muestran que los reguladores de crecimiento pueden influir en la oxidación, y sobrevivencia de los explantes. El cultivo *in vitro* de plantas leñosas se ve limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales, éstos se relacionan con el estrés oxidativo (Turrens, 2003) que se origina a partir de los cortes del explante, la composición del medio, volumen y capacidad del frasco de cultivo, entre otros (Abdelwahd *et al.*, 2008). En la mayoría de los protocolos se provoca un estrés en los explantes, esto induce la producción de compuestos fenólicos y varias especies reactivas de oxígeno (Phineas y Kuman, 2013). El estrés oxidativo puede ser atribuido al uso de reguladores del crecimiento; la citocinina BAP es uno de los reguladores con más reportes de este efecto (Azofeifa *et al.*, 2009).

En nuestra investigación observamos que la oxidación de lo explantes de frambuesa se ve influida por el genotipo y por el tipo de regulador de crecimiento utilizado. Esto coincide con otras investigaciones donde se indica que la regeneración en plantas es dependiente del genotipo, ya que la regeneración se ha obtenido para algunos genotipos, pues la recalcitrancia de los tejidos de *Rubus* es una limitante (Palomo-Ríos *et al.*, 2018). Zawadzka y Orlikowska (2006) observaron genotipos de frambuesa *in vitro* que mostraron hojas cloróticas y recalcitrantes a la regeneración.

La clorosis en plantas de frambuesa y la oxidación de los explantes se incrementa de manera sustancial cuando los tejidos son expuestos a largos periodos de luz fluorescente en medios de cultivo adicionados con citocininas del tipo 6-bencil adenina (BA) o isopentenil adenina (2iP), ya que estas interfieren en el correcto funcionamiento de calcio intracelular e incrementan la

concentración de algunas proteínas involucradas en el correcto funcionamiento del fotosistema II (Murvanidze *et al.*, 2022).

## Regeneración y multiplicación de brotes adventicios

Los protocolos de regeneración en 'berries' deben contener las dosis y combinaciones de reguladores de crecimiento correctos (auxinas y citocininas) en el medio de cultivo (Cappelletti *et al.*, 2016). La morfogénesis *in vitro* es afectada por factores como: genotipo, edad, posición y orientación del explante en el medio de cultivo (Kumar y Reddy, 2011). En esta investigación se observó que los reguladores de crecimiento influyeron sobre la regeneración; sin embargo, cada genotipo tuvo una capacidad de respuesta distinta; el uso de BAP ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), solo o combinado con AIB ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ), indujo la regeneración de brotes adventicios en el genotipo 'C-6', el resto de los genotipos mostraron una mayor regeneración con TDZ ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Estos resultados concuerdan con Meng *et al.* (2004) donde el uso de BAP ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y AIB ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) en frambuesa cv. 'Marion' indujeron la regeneración 70%, mientras que en el cultivar 'Sunberry' se observó 46%. Kim y Dai (2020) obtuvieron en el genotipo 'Joan J.' una regeneración de 70% con  $2.5 \mu\text{M}$  ( $0.56 \text{ mg L}^{-1}$ ) de BAP +  $1 \mu\text{M}$  ( $0.216 \text{ mg L}^{-1}$ ) de TDZ. La combinación de BAP con TDZ fomenta la proliferación celular a medida que se acelera la multiplicación de brotes nuevos (Bairú *et al.*, 2007). El efecto de las citocininas en la regeneración se puede atribuir a que éstas actúan como un activador positivo de la división celular, la BAP pertenece a este grupo, que son las hormonas clave para la inducción de brotes en diversos tejidos y órganos (Bustillo-Avendaño *et al.*, 2018; Howell *et al.*, 2003).

Algunos estudios han mostrado que los procesos morfogenéticos se regulan en primera instancia por las citocininas, las cuales actúan sobre la zona central de los explantes y posteriormente intervienen las auxinas en el proceso sobre las células periféricas del explante (Schaller *et al.*, 2015). El BAP se utiliza para el cultivo *in vitro* de especies leñosas para inducir multiplicación porque estas plantas poseen una mayor carga hormonal endógena en comparación con plantas herbáceas (Bairú *et al.*, 2007) y cuando se utiliza en tejidos jóvenes el potencial morfogénico para la diferenciación se incrementa (Mazumdar *et al.*, 2020).

En esta investigación se observó que la cinetina, no indujo la regeneración en ninguno los genotipos evaluados. Sin embargo, Zawdzka y Orlikowska (2006) reportaron el efecto de la combinación de BAP + cinetina sobre la regeneración de cinco cultivares de frambuesa, ya que las citocininas estimulan la división celular y la propagación vegetativa (Taiz y Zeiger, 2010).

En esta investigación, la adición de TDZ al medio de cultivo estimuló la regeneración de brotes en los genotipos 'Joan J.' y 'A-1', lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Fiola *et al.* (1990) donde el TDZ tuvo mayor efecto que el BAP para inducir organogénesis en cotiledones y hojas de *Rubus fruticosus*, la dosis óptima en explantes de hoja fue de  $5\text{-}20 \mu\text{M}$  ( $1.13\text{-}4.5 \text{ mg}$ ), esto ocurrió de manera similar en la formación de brotes a partir de yemas axilares y brotes apicales en zarzamora, donde concentraciones de  $0.25$ ,  $0.5$ ,  $0.75$  y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  indujeron porcentajes de regeneración de 60, 70, 100, 80 y 75%, respectivamente (Jadán *et al.*, 2015).

En los cultivares 'Autumn Bliss', 'Canby', 'Summit' y 'Sentry' de frambuesa se observó que el TDZ fue significativamente más efectivo que BAP, el medio adicionado con  $1 \mu\text{M}$  ( $0.23 \text{ mg}$ ) de TDZ indujo la regeneración en hojas (Turk, 1994). Debnath *et al.* (2014) reportaron 70% de regeneración con  $4.5 \mu\text{M}$  ( $1.01 \text{ mg}$ ) de TDZ con 4.2 brotes por explante y un coeficiente de multiplicación de 1.7 en un sistema de biorreactores y al aumentar la dosis a  $5 \mu\text{M}$  se obtuvo un porcentaje de regeneración de 96% en el cv. 'MD-ETC E-1'.

Ruíz-Anchondo *et al.* (2018) observan que la micropropagación *in vitro* de frambuesa cv Heritage, a partir de meristemos y entrenudos, se ve favorecida cuando se utiliza BAP ( $4.44 \mu\text{M}$ ) y GA ( $1.44 \mu\text{M}$ ) en el medio de cultivo, mientras que Georgieva *et al.* (2020) encuentran que la capacidad de proliferación es mayor en el cv Magdalena (3.9 brotes/explante) en relación con el cv Willamette (2.6 brotes/explante) en un medio adicionado con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP y  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, concentraciones de reguladores menores a las utilizadas en nuestro estudio.



El TDZ ha demostrado ser eficaz en la regeneración de muchas especies recalcitrantes (Liu *et al.*, 2003). A diferencia de otras citocininas, el TDZ es resistente a la citocinina oxidasa, por lo cual es bastante estable en los tejidos de las plantas (Dewir *et al.*, 2018). La necesidad de citocininas es extremadamente variable y depende del contenido endógeno de la especie y del genotipo, ya que éste tiene un efecto marcado sobre la capacidad de regeneración en condiciones *in vitro* (Hunková *et al.*, 2016).

Las dosis utilizadas influyen sobre los procesos a los que da origen, por ejemplo, cuando se usan dosis bajas de TDZ, éste induce organogénesis; al utilizar dosis altas se conduce a la embriogénesis; pero, concentraciones elevadas pueden ser tóxicas para el desarrollo de los cultivos *in vitro* (Ling *et al.*, 2013).

## Conclusiones

El grado de oxidación de los explantes y la regeneración de frambuesa a partir de secciones de hojas dependen en gran medida de los reguladores de crecimiento utilizados en el medio de cultivo y del genotipo o variedad utilizada para tal fin. Las citocininas (BAP) solas o combinadas con auxinas (AIB) disminuyen la oxidación en los explantes de los genotipos 'C-6' 'Joan J.' y 'Heritage', mientras que el TDZ, solo o combinado con AIB, tiene un efecto más amplio pues disminuye la oxidación y además, promueve la regeneración de los explantes en los cinco genotipos evaluados.

## Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría otorgada para la realización de este proyecto de investigación y al Consejo de la Investigación Científica (CIC) de la UMSNH por el financiamiento del proyecto.

## Bibliografía

- 1 Abdelwahd, R.; Hakam, N.; Labhilili, M. and Udupa, S. M. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *Afr. J. Biotechnol.* 7(8):997-1002.
- 2 Adobkar, I.; Ahmed, M. S. and Elshabed, M. 2012. Plant tissue culture media. Annarita L. and MR Laura. Ed. *In: recent advances in plant in vitro culture*. IntechOpen. Doi: 10.5772/50569.
- 3 Allcaco, J. C. 2016. Estandarización para la propagación clonal *in vitro* de *Rubus idaeus* var. Heritage "frambuesa roja" de importancia comercial. Tesis Licenciada en Biología. Lima, Perú. Universidad Ricardo Palma, Facultad de Ciencias Biológicas. 123 p.
- 4 Azofeifa-Delgado, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agron. Mesoam.* 20(1):153-175.
- 5 Bairú, M. W.; Stirk, W. A.; Dolezal, K. and Staden, J-Van. 2007. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can metapolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 90(1):15-23.
- 6 Bascopé, J. A. 2013. Realidad productiva de la frambuesa EE. UU. y México. Informe de Experto. Santiago, Chile. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. 42 p.
- 7 Bustillo-Avenidaño, E.; Ibañez, S.; Sanz, O.; Sousa, B. J. A.; Gude, I.; Perianez-Rodríguez, J.; Micol, J. L.; Del Pozo, J. C.; Moreno-Risueno, M. A. and Pérez-Pérez, J. M. 2018. Regulation of hormonal control, cell reprogramming and patterning during *de novo* root organogenesis. *Plant Physiology.* 176(2):1709-1727.

- 8 Cappelletti, R.; Sabbadini, S. and Mezzetti, B. 2016. The use of TDZ for the efficient *in vitro* regeneration and organogénesis of strawberry and blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*. 207:117-124.
- 9 Debnath, S. C. 2014. Bioreactor-induced adventitious shoot regeneration affects genotype-dependent morphology but maintains clonal fidelity in red raspberry. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 50(6):777-788.
- 10 Dewir, Y. H.; Nurmansyah, H.; Naidoo, Y. and Teixeira da Silva, J. A. 2018. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. *Plant Cell Reports*. 37(11):1451-1470.
- 11 Duncan, D. B. 1995. Multiple range and multiple F test. *Biometrics*. 11(1):1-42.
- 12 FAOSTAT. 2022. Database. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- 13 Fiola, J. A.; Hassan, M. A.; Swartz, H. J.; Bors, R. H. and McNicols, R. 1990. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 20(3):223-222.
- 14 Georgieva, M.; Kondakova, V. and Yancheva, S. 2020. A comparative study on raspberry cultivars in micropropagation. *Bulgarian J. Agric. Sci.* 26(3):527-532.
- 15 González, M. V.; López, M.; Valdes, A. E. and Ordas, R. J. 2009. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-Grown plants. *Annals Appl. Biol.* 137(1):73-78.
- 16 Granados-Rubio, K. 2017. Variación somaclonal *in vitro* de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) var. Josephine. Tesis de licenciatura. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán, México. 46 p.
- 17 Gutiérrez, M. A.; Santacruz, R. F.; Cabrera, P. J. L. y Rodríguez, G. B. 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. *Revista Digital Científica y Tecnológica e- Gnosis*. 1(4):0-19.
- 18 Hall, H. K.; Hummer, K. E.; Jamieson, A. R.; Jennings, S. N. and Weber, C. A. 2009. Raspberry breeding and genetics. *Plant Breeding Review*. 32:44-62.
- 19 Howell, S. H.; Lali, S. and Che, P. 2003. Cytokinins and shoot development. *Trends in Plant Science*. 8(9):453-459.
- 20 Hunková, J.; Libiakova, G. and Gajdosova, A. 2016. Shoot proliferation ability of selected cultivars of *Rubus* spp. as influenced by genotype and cytokinin concentration. *J. Central Eur. Agric.* 17(2):379-390.
- 21 Jacinto, A. M. E. 2018. Evaluación de tres niveles de auxinas y citoquininas para la obtención de plantas madre de rosa (*Rosa* sp.) variedad Freedom en condiciones *in vitro*. *Rev. de la carrera de ingeniería Agronómica-UMSA*. 4(2):1073-1081.
- 22 Jadán, M.; Ruíz, J.; Soria, N. and Mihai, R. A. 2015. Synthetic seed production and the induction of organogenesis in blackberry (*Rubus glaucus* Benth). *Romanian Biotechnological Letters*. 20(1):10134-10142.
- 23 Kim, C. and Dai, W. 2020. Plant regeneration of redraspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars 'Joan J' y 'Polana'. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 56(3):390-397.
- 24 Kumar, N. and Reddy, M. P. 2011. *In vitro* plant propagation: a review. *J. For Environ Science*. 27(3):61-72.
- 25 Ling, A. P. K.; Tan, K. P. and Hussein, S. 2013. Comparative effects of plant growth regulators on leaf and stem explants of *Labisla pumila* var. *Alata*. *J. Zhejrang University Science B*. 14(7):621-631.
- 26 Liu, C. Z.; Murch, S. J.; Demerdash, M. E. L. and Saxeria, P. K. 2003. Regeneration of the egyptian medicinal plant *Artemesia juddaica* L. *Plant Cell Reports*. 21:525-530.

- 27 Mazumdar, P.; Basu, A.; Paul A.; Mahanta, C. and Sahoo, L. 2020. Age and orientation of cotyledonary leaf explants determine the efficiency of *de novo* plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Jatropha curcas* L. South African J. Bot. 76(2):337-344.
- 28 Méndez-Álvarez, D. y Abdelnour-Esquivel, A. 2014. Establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* Gmel. Excell. Rev. Forestal Mesoamericana Kurú. 11(27):07-21.
- 29 Meng, R.; Chen, T. H. H.; Fino, C. E. and Li, Y. 2004. Improving *in vitro* plant regeneration from leaf and petiole explant of 'Marion' blackberry. HortScience. 39(2):316-320.
- 30 Minas, G. J. and Neocleous, D. 2007. A protocol for rapid clonal micropropagation *in vitro* of primocane-fruiting red raspberry cultivars. Sistema Internacional de Ciencia y Tecnología Agrícolas AGRIS. 7 p.
- 31 Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15(3):473-497.
- 32 Murvanidze, N.; Ameye, M.; Geelen, D. and Werbrouck, S. P. O. 2022. A calmodulin antagonist protects *in vitro* raspberries against disturbed photosynthesis caused by constant light and cytokinin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 148(1):73-80.
- 33 Palomo-Ríos, E.; Quesada, M. A.; Matas, A. J.; Pliego-Alfaro, F. and Mercado, J. A. 2018. The history and status of genetic transformation in berry crops. *In: The Genomes of Rosaceous-Berries and Their Wild Relatives*. Springer Nature. Spain. 139-160 pp.
- 34 Phineas, J. A. A. and Kumar, S. P. 2013. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisa annua* L.: A novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. PlosOne. 8(10):e76802:1-13.
- 35 Restrepo-Osorio, C.; Gómez-Velasquez, F. A.; Gil-Correal, A.; Torres-Bonilla, J. M. and Urrea-Trujillo, A. I. 2018. *In vitro* propagation of avocado *Persea americana* Mill. cv. Hass through morfogénesis. Acta Agron. 67(1):160-167.
- 36 Ruíz-Anchondo, T.; Martínez, J. A.; Carrillo-Castillo, T.; Parra-Quezada, R. A.; Ojeda-Barrios, D. L. y Hernández-Rodríguez, A. 2018. Establecimiento *in vitro* de dos cultivares liberados de frutillas: fresa y frambuesa. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 9(4):799-812.
- 37 Schaller, G. E.; Bishopp, A. and Kieber, J. J. 2015. The Ying-Yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. The Plant Cell. 27(1):44-63.
- 38 SIAP. 2021. Sistema de información agroalimentaria y pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Atlas agroalimentario. [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).
- 39 SAS. 2002. Statistical Analysis System. Institute Inc. SAS/STAT. User's Guide, version 9.0. Carey, N.C.
- 40 Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. 5<sup>th</sup> Ed. Sinaeur Associates Inc., Massachusetts. 778 p.
- 41 Turrens, J. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 552(2):335-344.
- 42 Turk, B. A.; Swartz, H. J. and Zimmerman, R. H. 1994. Adventitious shoot regeneration from *in vitro*-cultured leaves of *Rubus* genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 38:11-17.
- 43 Wu, J. H.; Miller, S. A.; Hall, H. K. and Mooney, P. A. 2009. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoots tips of *Rubus*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 99:17-25.

- 44 Zawadzka, M. and Orlikowska, T. 2006. Factors modifying regeneration *in vitro* of adventitious shoot in five red raspberry cultivars. Journal of fruit and Ornamental. Plant Research. 14:105-115.

## Regeneración de explantes de hojas de cinco genotipos de frambuesa

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 June 2023
Date accepted: 01 August 2023
Publication date: 24 August 2023
Publication date: August 2023
Volume: 14
Issue: 6
Electronic Location Identifier: e3183
DOI: 10.29312/remexca.v14i6.3183

### Categories

Subject: Artículo

### Palabras clave:

**Palabras clave:**

*Rubus idaeus* L.  
hormonas vegetales  
organogénesis.

### Counts

Figures: 1  
Tables: 2  
Equations: 0  
References: 44  
Pages: 0