



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

**FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA “PRESIDENTE
JUÁREZ”**

Programa *Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas*

Área Temática: Fisiología y Genética Vegetal

T E S I S

INDUCCIÓN *in vitro* DE VARIACIÓN SOMACLONAL EN SELECCIONES DE ZARZAMORA (*Rubus* SUBGÉNERO *Eubatus*) PRODUCTORAS EN PRIMOCAÑAS

Que como requisito para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

María Susana Vega Hernández

Tutor: Doctor en Ciencias Hortícolas

Dr. José López Medina

Cotutora: Doctora en Biotecnología de Plantas

Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados

Uruapan, Michoacán, México. Marzo 2016



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fisiología Vegetal y el invernadero de Frutillas de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por darme la oportunidad de formarme como profesionista.

Al CONACYT, por el apoyo brindado para desarrollarnos y motivarnos para crecer como investigadores y tener mejores capacidades.

A mi tutor Dr. José López Medina, por creer en mis capacidades y apoyarme para iniciar con este sueño que hoy culmina y cumplir con uno de mis proyectos de vida.

A la Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados, a quién tengo gran admiración y respeto por siempre brindarme su apoyo incondicional y motivarme a ser mejor persona tanto en el área profesional como personal.

A cada miembro de mi mesa de sinodales, el Dr. Alejandro Martínez Palacios por cada una de sus valiosas aportaciones para el enriquecimiento de mi proyecto. A la Dra. Patricia Delgado Valerio y Sergio Segura Ledesma por sus aportaciones brindadas.

A mi esposo Alonso, por estar a mi lado apoyándome en cada paso que doy y motivarme a ser mejor persona cada día.

A mis padres, por darme la vida y gracias a su apoyo incondicional soy la persona que he logrado ser hasta el día de hoy.

A mi hermana, por estar conmigo en cada etapa de mi vida.

A mis amigos Elva y Memo, por compartir esta hermosa etapa conmigo y por ese gran equipo que formamos, mil gracias.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por ese compañerismo que nos caracteriza y por ese hermoso ambiente de trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme estar aquí ante todo y por su amor infinito hacia mi persona y las personas que me rodean.

A mi esposo (Alonso), por su apoyo incondicional. Este es el inicio de una nueva etapa en nuestras vidas, hoy termina un ciclo, pero vendrán nuevos, los cuales quiero compartir a tu lado.

A mis padres (Enrique y Consuelo), por ser los mejores padres que pude tener y gracias a ustedes estoy con vida, y por su gran motivación para hacer de mí una mejor persona.

A Vero, por apoyarme en cada decisión que he tomado y por siempre estar a mi lado.

A mi familia, por el gran cariño que he recibido de cada uno de ustedes y por esos grandes momentos que hemos vivido (Chavito, Pella, Mamá María, Papá Toño †, Cristian).

A Lalo, por su apoyo incondicional. Aunque no nos vemos con frecuencia, pero siempre estás en mis pensamientos y en mi corazón amigo.

A mis amigos, por estar a mi lado en las buenas y en las malas sin importar tiempos y distancias, en verdad los llevo en el corazón.

CONTENIDO

	Pag.
CONTENIDO.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ABSTARCT.....	vi
RESUMEN.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Aspectos generales de la zarzamora.....	4
2.1.1. Importancia del cultivo	6
2.2. Usos.....	7
2.3. Zarzamoras productoras en primocañas.....	7
2.4. Mejoramiento genético.....	9
2.4.1. Tradicional.....	9
2.4.2. Biotecnológico.....	10
2.5. Cultivo de tejidos vegetales.....	10
2.5.1. Micropropagación.....	12
2.5.2. Organogénesis <i>in vitro</i>	13
2.5.3. Embriogénesis somática.....	14
2.6. Reguladores de crecimiento vegetal.....	15
2.6.1. Auxinas.....	16
2.6.2. Citocininas.....	16
2.6.3. Ácido giberélico y ácido abscísico.....	17
2.7. Variación somaclonal.....	18
2.7.1. Causas de la variación somaclonal.....	19
2.8. Poliploidía.....	21
2.8.1. Aneuploidía.....	21
2.8.2. Inserciones y deleciones.....	22
2.8.3. Translocaciones.....	22
2.9. Nivel de ploidia.....	22
2.10. Detección de variantes genéticas.....	23

III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Ubicación del área experimental.....	24
3.2. Obtención del material vegetal y manejo del mismo.....	24
3.2.1. Asepsia del material vegetal y establecimiento <i>in vitro</i> ...	25
3.2.2. Micropropagación del material.....	27
3.3. Organogénesis indirecta.....	27
3.4. Organogénesis directa.....	30
3.5. Aclimatación.....	30
3.6. Determinación de variantes somaclonales.....	31
3.7. Análisis de datos.....	32
IV. RESULTADOS	33
4.1. Organogénesis indirecta.....	33
4.2. Efecto del 2,4-D en el crecimiento del callo.....	33
4.2.1. Regeneración del callo.....	37
4.3. Organogénesis directa.....	38
4.4. Aclimatación.....	40
4.5. Determinación de variantes somaclonales.....	41
4.5.1. Evaluación de caracteres cualitativos.....	43
4.5.2. Evaluación de caracteres cuantitativos.....	46
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIONES	49
VII. LITERATURA CITADA	51

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PAG.
1	Taxonomía del género <i>Rubus</i> .	5
2	Tratamientos a los que fueron expuestos los callos en cada subcultivo.	29
3	Barrido hormonal con las combinaciones de BAP e IBA para inducir la regeneración de los explantes.	29
4	Tratamientos para la inducción de organogénesis directa en las selecciones UM01 y UM02 de zarzamoras productoras en primocañas.	30
5	Número de brotes obtenidos en cada uno de los tratamientos utilizados para la inducción de brotes mediante organogénesis directa en UM01.	39
6	Número de brotes obtenidos en cada uno de los tratamientos utilizados para la inducción de brotes mediante organogénesis directa en UM02.	39
7	Análisis cualitativos utilizando los descriptores recomendados por la UPO (UPOV, 2006) de cada uno de los somaclones	44
8	Análisis cuantitativo de los cinco somaclones obtenidos de la selección UM01.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAG.
1	Principios básicos del cultivo de tejidos y comportamiento de los explantes cultivados ante el estímulo aplicado	15
2	Respuestas generadas en los cultivos vegetales por la influencia de la adición de auxinas y citocininas.	17
3	Selecciones de zarzamora productoras en primocañas utilizadas como fuente de explantes.	24
4	Establecimiento <i>in vitro</i> de las selecciones de zarzamora	26
5	Explantes de tallo utilizados para el establecimiento <i>in vitro</i> de UM01 y UM02.	26
6	Micropropagación de las selecciones UM01 y UM02	27
7	Material vegetal fuente de explantes para la organogénesis indirecta.	28
8	Callos originados mediante organogénesis indirecta	33
9	Efecto del 2,4-D en el crecimiento del callo de la selección UM01, la cual se incubó durante los primeros tres días en oscuridad y posteriormente se pasó a condiciones de luz.	34
10	Efecto del 2,4-D en el crecimiento del callo de la selección UM01 únicamente en condiciones de luz.	35
11	Dinámica de crecimiento del callo utilizando 2, 4-D para determinar si es necesario incubar durante períodos largos para aumentar la cantidad de callo en UM01.	36

- 12** Gráficas del efecto del 2,4-D en el crecimiento del callo de la selección UM02, la cual se incubó durante los primeros tres días en oscuridad y posteriormente se pasó a condiciones de luz. **37**
- 13** Cambios generados sobre los callos con los tratamientos para regenerar plantas a base de BA, IBA y TDZ. **38**
- 14** Explantes mostrando respuesta al estímulo de los reguladores de crecimiento utilizados para la inducción de organogénesis directa. **39**
- 15** Etapas por las que pasaron los somaclones obtenidos vía organogénesis directa desde su inducción hasta su aclimatación en invernadero y finalmente a campo abierto. **40**
- 16** Selección UM01 planta madre y somaclones 1, 2, 3, 4 y 5 con sus respectivas repeticiones establecidas en condiciones de campo. **42**
- 17** Características fenotípicas del área foliar de los somaclones obtenidos de UM01. **43**

ABSTRACT

Recently blackberry crop is having a high demand worldwide; this has enhanced conventional breeding programs to focus on developing cultivars for specific environmental conditions; however, this process takes up to 10 years to get a new cultivar. Somaclonal variation can be an option to considerably reduce time to generate new cultivars. The objective of the present work was to detect somaclonal variation in two primocane-fruiting advanced strawberry selections, UM01 and UM02, through either direct and/or indirect regeneration by using *in vitro* culture. In order to induce development of adventitious shoots, plant growth regulators were used, with indolbutyric acid (IBA) (0.1 mg L^{-1}), either alone or combined with both bencil adenine (BA) and thidiazuron (TDZ) (1, 2, 3, 4, and 5 mg L^{-1} each one), among these. To induce callus formation, 2,4-D was used at five different concentrations: 1, 2, 3, 4, and 5 mg L^{-1} . In order to determine optimum time required to obtaining highest amount of callus formation, a growth dynamic was implemented. Increased callus formations was accomplished 15 and 60 later in UM01 and UM02, respectively; however, callus regeneration was not accomplished; this might have been due to the ploidy level (4X) presented on these genotypes. Direct plant regeneration was accomplished with 2 and 3 mg L^{-1} BA and 1 mg L^{-1} TDZ, but this happened only on the UM01 selection. From this selection, five somaclones were generated, with phenotypic somaclonal variation in somaclones 1, 3, 4, and 5, all of them showing spines on the talus. Somaclone 1 showed variability on plant port, being this from semierect, to crawling and differing from the other semi-erect somaclones. Somaclonal variation was achieved with the following treatments: 2 and 3 mg L^{-1} BA; 1 mg L^{-1} TDZ + 0.1 mg L^{-1} IBA; 1 mg L^{-1} BA + 0.1 mg L^{-1} IBA; and mg L^{-1} BA + 0.1 mg L^{-1} IBA. Somaclones are currently being evaluated under both greenhouse and field conditions; it is expected that at least one of them can be proposed as a commercial cultivar in a short-medium term.

Key Words: indirect organogenesis, direct organogenesis, growth regulators, somaclonal variation.

RESUMEN

Actualmente la zarzamora se encuentra con una elevada demanda en el mercado mundial, por lo que se han generado programas de mejoramiento genético convencional tendientes a desarrollar materiales específicos para determinadas condiciones ambientales; sin embargo, este proceso requiere de un periodo hasta de diez años para obtener un nuevo cultivar. La variación somaclonal puede ser una opción para reducir de manera considerable el tiempo del mejoramiento. El objetivo del presente trabajo fue detectar variación somaclonal en dos selecciones avanzadas de zarzamoras productoras en primocañas, UM01 y UM02, utilizando la técnica de cultivo *in vitro* a través de la regeneración vía organogénesis directa y/o indirecta. Para la inducción de brotes adventicios se utilizaron reguladores de crecimiento vegetal, entre éstos ácido indolbutírico (IBA) (0.1 mg L^{-1}), solo y en combinación con bencil adenina (BA) ($1, 2 \text{ y } 3 \text{ mg L}^{-1}$) y thidiazuron (TDZ) ($1, 2 \text{ y } 3 \text{ mg L}^{-1}$). Para la inducción de callo se utilizó 2,4-D a concentraciones de $1, 2, 3, 4 \text{ y } 5 \text{ mg L}^{-1}$, y se realizó una dinámica de crecimiento a fin de determinar el tiempo óptimo para obtener la mayor cantidad de callo. La multiplicación de callo se logró a los 15 y 60 días en UM01 y UM02, respectivamente; sin embargo, los callos no se lograron regenerar, probablemente debido a los niveles de ploidía (tetraploide) de los materiales. Para la regeneración directa, los mejores tratamientos fueron las concentraciones de $2 \text{ y } 3 \text{ mg L}^{-1}$ de BA y 1 mg L^{-1} de TDZ, pero ello se logró únicamente en UM01. Se obtuvieron cinco somaclones originados de la selección UM01, registrándose variación somaclonal fenotípicamente en los somaclones 1, 3, 4 y 5, los cuales presentaron el carácter de presencia de espinas en el tallo. El somaclón 1 mostró variabilidad en cuanto al porte de la planta, ya que se observó un porte semierecto a rastrero difiriendo de los demás que se mostraron semierectos. La variación somaclonal se logró obtener con los tratamientos a base de $2 \text{ y } 3 \text{ mg L}^{-1}$ BA, 1 mg L^{-1} de TDZ más la adición de 0.1 mg L^{-1} de IBA, 1 mg L^{-1} de BA más la adición de 0.1 mg L^{-1} de IBA y 2 mg L^{-1} de BA con 0.1 mg L^{-1} de IBA. Los somaclones están siendo evaluados en condiciones de invernadero y campo; se espera que al menos uno de ellos pueda ser propuesto como cultivar comercial en el corto-mediano plazo.

Palabras Clave: Organogénesis indirecta, organogénesis directa, reguladores de crecimiento, variación somaclonal, cultivo *in vitro*.

I. INTRODUCCIÓN

Entre las diversas aplicaciones del cultivo *in vitro* en el mejoramiento de plantas, la variación somaclonal, que se define como la variación entre plantas surgidas del cultivo *in vitro* (Larkin y Scowcroft, 1988; Skirvin *et al.*, 1993), es una de las herramientas que representa una fuente rápida de variabilidad genética (Karp, 1995). Tal variabilidad puede ocurrir de manera espontánea, como es el caso de los cambios temporales que resultan de efectos epigenéticos (expresión de genes normalmente suprimidos) o fisiológicos, no heredables y reversibles (Kaepler *et al.*, 2000); pero también pueden darse cambios permanentes (heredables) y que son el resultado de variación surgida *de novo* (Larkin y Scowcroft, 1988; Skirvin *et al.*, 1994). Entre las causas que dan origen a la variación somaclonal están: cambios en el número cromosómico, ya sea poliploidía o aneuploidía (Peschke y Phillips, 1992); daños en los cromosomas tales como inserciones, deleciones y translocaciones entre otros (Phillips *et al.*, 1994), y cambios en la metilación de cromatinas (Kaepler y Phillips, 1993).

Entre algunos ejemplos en los que la variación somaclonal ha sido decisiva para el mejoramiento de plantas se encuentra la resistencia a enfermedades en trigo (Mehtha y Angra, 2000), papa (Pérez *et al.*, 2007), arroz (Araújo *et al.*, 2001), caña de azúcar (Singh *et al.*, 2008), plátano (Asif *et al.*, 2005; Vidal & De García, 2000), manzana (Chevreau *et al.*, 1998), durazno (Hammerschlag y Ognianov, 1990) y fresa (Battistini y Rosati, 1991) entre otros. La calidad y producción de frutos también se han favorecido a través de la variación somaclonal en olivo (Leva *et al.*, 2012), plátano (Unai *et al.*, 2004), fresa (Biswas *et al.*, 2009; Kauskal *et al.*, 2004) y otros frutales (Predieri, 2001). En arándano, la variación somaclonal permitió obtener selecciones resistentes a niveles altos de pH en el suelo (Hruskoci y Paul-E, 1993).

La variación que se pueda esperar del cultivo *in vitro* dependerá del tipo y edad del material vegetativo a utilizar como clon, el uso de agentes mutagénicos y la presión de selección que se aplique a las células individuales para inducir condiciones de estrés, tales como los niveles de sales, metabolitos específicos,

fitorreguladores específicos como herbicidas y auxinas entre otros (Skirvin *et al.*, 1993). En el caso de la fresa, entre los factores más importantes para inducir variación somaclonal están la concentración de auxinas en el medio de cultivo y el número de subcultivos (Gaafar y Saker, 2006). Al respecto, el uso de bencil amino purina (BAP) en el medio de cultivo, así como el cultivo de meristemos, fueron los factores decisivos para seleccionar varios somaclones prometedores de este cultivo (Biswaset *et al.*, 2009).

En zarzamora se tiene registrado solamente un caso exitoso de variación somaclonal. A partir de meristemos tomados de 'Evergreen', una variedad rastrera con espinas, se obtuvo un clon sin espinas que se convirtió en la variedad Thornless Evergreen (McPheeters y Skirvin, 1989) y que ha sido un material de mucha trascendencia en varias regiones del mundo. 'Thornless Evergreen' (TE) es una zarzamora (*Rubus laciniatus* Willd.) quimera periclinal, en la cual, la epidermis ha mutado a carecer de espinas, mientras que las partes internas de la planta permanecen espinosas genéticamente. Más de 300 plantas *ex vitro* (a partir del cultivo de puntas apicales de TE) se establecieron en campo y se observaron más de dos estaciones fructíferas para rasgos vegetativos y de fructificación. Las plantas fueron evaluadas por hábito de crecimiento, vigor de la floración y los rasgos de la fructificación (McPheeters y Skirvin, 1989).

Dada la gran importancia que la zarzamora tiene en México, pero donde solo se dispone de 'Tupy', una variedad con espinas y productora en floricañas desarrollada en Brasil, la Facultad de Agrobiología tiene implementado un programa de mejoramiento genético en este cultivo, cuyo objetivo principal es desarrollar variedades sin espinas y productoras en primocañas. A pesar de contar con materiales sobresalientes desarrollados por hibridación convencional, se cree que la variación somaclonal puede ser una herramienta útil en el desarrollo de materiales con características sobresalientes en un tiempo relativamente rápido, como puede ser el fortalecimiento de la producción en primocañas, carácter incorporado recientemente (Clark *et al.*, 2005).

Actualmente las frutillas, entre ellas la zarzamora, se encuentran con una elevada demanda en el mercado debido a sus propiedades que aportan grandes beneficios para la salud. El período que normalmente transcurre para que un cultivo recién establecido de esta frutilla llegue a la etapa de producción es de 12 a 15 meses, ya que la etapa vegetativa es de cinco a siete meses, después de lo cual las plantas inician la diferenciación de yemas florales, seguido de un periodo de latencia, para proseguir con la brotación floral y culminar con la etapa productiva (Calderón 2006). A estos materiales, que son los que predominan en el mundo, se les conoce como “productores en floricañas”. Bajo condiciones subtropicales, se tienen implementan prácticas de producción forzada que implican el uso (indiscriminado) de sustancias químicas para inducir desde la defoliación hasta la brotación floral y la cosecha; con ello, el tiempo de establecimiento de las plantas hasta la cosecha de frutos se reduce a 10 o 12 meses. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos materiales que sean mucho más rápidos para dar inicio con la producción. Una excelente alternativa es el uso de variedades “productoras en primocañas”, ya que en éstas el periodo vegetativo se reduce, de manera natural, a sólo tres meses, y si las condiciones de crecimiento son favorables, la cosecha ocurre dos a tres meses más tarde. El cultivo *in vitro* es una de las herramientas de la biotecnología vegetal más sobresalientes; donde la variación somaclonal es una de sus diversas aplicaciones que puede ser útil para el mejoramiento genético, ya que ésta representa una fuente rápida de variabilidad genética (Robert *et al.*, 1994; Skirvin, 1989).

Hipótesis

A través del cultivo *in vitro* es posible observar variación somaclonal en zarzamoras productoras en primocañas, mediante las técnicas de organogénesis indirecta y directa.

Objetivo general

Detectar variación somaclonal en selecciones de zarzamora productoras en primocañas e identificar fenotipos con características agronómicas sobresalientes.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar las técnicas de organogénesis indirecta y directa, mediante las cuales se pueda identificar variación somaclonal en dos selecciones avanzadas de zarzamoras productoras en primocañas.
- 2) Determinar los parámetros morfológicos que mejor identifiquen a los materiales generados mediante variación somaclonal.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales de la Zarzamora

Las zarzamoras pertenecen al género *Rubus* (Cuadro 1), dentro del cual se encuentran descritas alrededor de 700 especies. Este género se encuentra distribuido principalmente en regiones de clima templado frío del hemisferio Norte y en zonas montañosas intertropicales. Los frutos de las zarzamoras son comestibles y son cultivadas para explotar su producción. Las especies de éste género se caracterizan por poseer una amplia variabilidad genética como resultado de su frecuente hibridación y reproducción. La distribución de esta frutilla en el estado de Michoacán se ubica en las zonas boscosas del Norte, principalmente se encuentra como vegetación secundaria derivada de bosque húmedos de coníferas y de encino, de las cuales, sus frutos son colectados durante los meses de marzo a noviembre (Rzedowski y Calderón, 2005; Sánchez, 2008).

Generalmente existen tres tipos de zarzamoras; erectas, semierectas y rastreras. Mundialmente, las regiones con la producción más elevada se encuentran en México, Europa y USA (Strik y Finn, 2012).

En México las variedades que se cultivan son las de caña de tipo erecto, dentro de las cuales predominan ‘Tupy’ y ‘Brazos’. Anteriormente, durante un largo período ‘Brazos’ fue la variedad erecta más común en todo el mundo hasta el año 2005; actualmente en México esta variedad ha sido reemplazada por ‘Tupy’, la cual, es un híbrido que resultó de la cruce entre una zarzamora silvestre de crecimiento rastrero de Uruguay con la variedad ‘Comanche’ de crecimiento erecto de Arkanzas, siendo creada en Brasil por EMBRAPA en 1982; las características de la planta es que sus cañas presentan crecimiento erecto, son vigorosas, con espinas, los frutos son de gran tamaño, firmes, alargados, balanceados en el contenido de azúcares y ácidos, de semillas pequeñas. Los sistemas de producción de la zarzamora se modifican para ampliar el rango de la temporada de producción, iniciando en octubre para concluir en junio (Finn, 2002; Strik *et al.*, 2007).

Actualmente los sistemas de producción forzada utilizan una gran variedad de químicos defoliantes, aplicación de reguladores de crecimiento y el empleo de podas para lograr extender la temporada de producción, para ‘Tupy’ principalmente (Strik y Finn, 2012).

Cuadro 1. Taxonomía del género *Rubus* (USDA, 2013; Cruz, 1997)

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Phylum	Pterophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Subfamilia	Rosoidae
Género	<i>Rubus</i> L.
Especie	spp.

2.1.1. Importancia del cultivo

La zarzamora pertenece al grupo de las frutillas, las cuales, actualmente constituyen aproximadamente el 2 % de la producción mundial de frutas. En México, el estado de Michoacán encabeza la producción del cultivo con un 96 % de la superficie cultivada, seguido de los estados de Jalisco con el 1.6 % y Colima con el 0.7 %. El país que posee el principal mercado para la exportación de la zarzamora procedente de México es Estados Unidos, seguido de Reino Unido y Bélgica (Flores, 2010).

En el estado de Michoacán la variedad predominante es 'Tupy'; los municipios en los cuales se cultiva esta frutilla son los Reyes, Ziracuaretiro, Ario de Rosales y Tacámbaro. Dado el incremento de la exportación de este fruto durante los últimos años, se han generado importantes divisas para los productores; la fruta de excelente calidad, con el adecuado manejo fitosanitario y fuera de temporada, ha logrado que el estado se consolide en los mercados internacionales. Las frutillas mexicanas se exportan en el período de octubre a abril, y hasta el mes de mayo en algunos casos, lo cual representa una ventaja competitiva para el país (Calderón, 2006; López, 2006).

2.1.2. Manejo del cultivo

En México, se han tenido que implementar sistemas de producción para ampliar la temporada de producción del cultivar 'Tupy'. Una vez que las plantaciones son podadas y quemadas durante el invierno, el crecimiento de las primocañas se estimula mediante el riego y la fertilización. Para llevar a cabo la estimulación floral, se utilizan métodos culturales y aplicaciones de ácido fosfórico y ethrel (precursor de etileno). Posteriormente, a los 5-7 meses de la emergencia, el crecimiento de las primocañas se disminuye con el uso de aplicaciones de sulfato de cobre, urea y aceite mineral, después son defoliadas con una combinación de sulfato de amonio, sulfato de cobre y aceite mineral. Para promover la brotación floral se utiliza ácido giberélico y citoquininas. El período de cosecha inicia a partir de los 90 a 100 días posteriores a la defoliación. Al término de la primera cosecha, se realiza una poda para eliminar la parte

de las cañas que fructificaron y estimular los brotes para la segunda cosecha; lo anterior puede repetirse para una tercera cosecha, lo cual, reduce el rendimiento sucesivamente para cada cultivo. Con los métodos anteriores, la temporada de fructificación en México ha logrado extenderse desde mediados de octubre hasta principios de mayo para exportación, y de mayo a junio para los mercados locales (Strik y Finn, 2012).

2.2. Usos

Las zarzamoras y frutillas en general han adquirido gran importancia por sus elevados contenidos de antocianinas, elagitaninos y su capacidad antioxidante, además de su contenido en vitaminas y minerales esenciales. Actualmente se encuentran dentro de las frutas más demandadas por los consumidores debido a los beneficios que traen a la salud y por sus innumerables usos (Choet *et al.*, 2004).

Estudios recientes han demostrado que los alimentos con alto contenido de antioxidantes, como lo son las zarzamoras, ayudan a disminuir riesgos para prevenir cáncer y enfermedades cardiovasculares, y de esta forma mejorar la calidad de vida, estas propiedades que poseen las frutillas son determinadas por la composición química de los frutos, en este caso de zarzamora, e influyen diversos factores como es el tipo de variedad, el estado fenológico en que se encuentre la planta de la que proviene, la etapa de maduración o cosecha, el clima en el que se encuentre ubicada la planta y su almacenamiento (Ding *et al.*, 2006; Talcott, 2007).

2.3. Zarzamoras productoras en primocañas

Las zarzamoras tienen dos tipos de caña; las primocañas o cañas del primer año, las cuales, suelen ser vegetativas, y las floricañas, que son las mismas cañas y producen frutos durante la próxima temporada del cultivo. Las zarzamoras productoras en primocañas emergen durante la primavera y se desarrollan rápidamente bajo las temperaturas adecuadas para su

crecimiento. Los brotes florales se producen durante días de fotoperiodo corto y con bajas temperaturas. Los niveles de rendimiento logran alcanzar de 8 a 12 ton ha⁻¹, lo cual, puede variar debido al tipo de cultivar, región y el manejo del mismo (Clark, 2008; Strik y Finn, 2012).

En 2003, Drake y Clark demostraron que el doble cultivo (floricañas + primocañas) en zarzamora no lograba reducir el rendimiento de la cosecha en primocañas en Arkansas. Por lo tanto, sugirieron que éstas moras serían ideales para extender la temporada de producción.

En la zarzamora, la fructificación en floricañas ha sido la base de toda la producción de este cultivo, ya que no existían cultivares comerciales con fructificación en primocañas antes del lanzamiento de 'Prime Jim'® y 'Prime Jan'® (*Rubus* L. subgénero *Rubus*) los primeros cultivares comerciales por la Universidad de Arkansas, en septiembre de 1997 por J. López-Medina, J. N. Moore y J. R. Clark, y liberadas en 2004. El reto para esas nuevas selecciones implica mejorar el tamaño del fruto y la calidad en comparación con los de zarzamora mejorada de tipo erecto con producciones en floricañas. Sin embargo, hay mucho por hacer para mejorar las zarzadoras productoras en primocañas. Este tipo de zarzadoras presentan fructificación en las cañas durante la primera temporada (primocañas) y en cañas durante la segunda temporada (floricañas), mientras que los otros tipos de moras únicamente producen en floricañas. La fructificación en primocañas presenta una serie de ventajas, dentro de las cuales destacan: el potencial de dos cultivos en una planta durante el mismo año (floricañas y primocañas), la posibilidad de programar la producción basada en las primocañas, evitar lesiones de invierno, evitar el potencial de roseta [enfermedad de la flor doble, causada por *Cercospora rubi* (G. Wint) Plakidas] (Drake y Clark, 2003; Clark *et al.*, 2005; Clark, 2008).

El valor de la producción en primocañas depende principalmente de la comercialización de la fruta. Un ejemplo de un momento clave en la disponibilidad de la fruta de zarzamora en Estados Unidos es que se encuentra limitada durante los meses de septiembre a noviembre, lo que abre una importante ventana en el mercado para que inicien importaciones

sustanciales de México. Las lesiones de invierno en éstas moras son una de las principales preocupaciones en el Oeste y Norte de Estados Unidos, ya que impide una fructificación fiable (Clark, 2008; Clark et. al., 2005).

Debido a que las cañas de primocañas no tienen que pasar el invierno, existe la oportunidad de cultivar zarzamoras en áreas donde, por lo general, son de reposo invernal (período de inactividad) esto podría ser particularmente valioso en México donde se requieren manipulaciones químicas en los cultivares productores en floricañas (Clark, 2008).

2.4. Mejoramiento genético

El surgimiento de las técnicas de ingeniería genética de plantas abrió una amplia gama de posibilidades para el mejoramiento genético de las especies cultivadas por el hombre; el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante posibilita el aislar, manipular y transferir genes. Por otro lado, el cultivo de tejidos vegetales nos brinda la posibilidad de controlar hasta cierto punto los procesos morfogénicos *in vitro* y generar plantas completas a partir de una sola célula (Pérez et al., 1999; Rodríguez et al., 2006).

2.4.1. Mejoramiento genético tradicional

El mejoramiento genético tradicional o también llamado convencional, ha sido una de las prácticas más antiguas que ha realizado el ser humano desde el momento en que comenzó a domesticar las plantas, cultivándolas bajo condiciones controladas y seleccionando aquellos tipos que proveían una fuente segura de alimentación. Sin embargo, por ser un proceso lento y fortuito, se consideraba más como un arte que como una ciencia, hasta que al inicio del siglo pasado se redescubrieron las Leyes de Mendel y comenzaron a ser aplicadas en el mejoramiento genético (Rodríguez et al., 2006).

2.4.2. Mejoramiento genético biotecnológico

Es un proceso que se lleva a cabo para la obtención de plantas transgénicas mediante dos fases: durante la primera, se introduce la información genética a una o varias células a través de diferentes técnicas y, posteriormente, durante la segunda fase se genera una planta completa a partir de la célula que ha sido transformada, cuyo objetivo es la introducción de una nueva información genética haciéndola más productiva. Todo esto se realiza bajo sistemas *in vitro* (Pérez *et al.*, 1999).

2.5. Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es la ciencia que se encarga del cultivo de plantas, células, tejidos u órganos aislados de la planta madre y que consiste en un conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, desarrollo y mantenimiento de una planta, de la cual, se puede utilizar desde una célula u órgano hasta un organismo completo, denominado explante, en un ambiente artificial *in vitro* controlado (George *et al.*, 2008) de luz, temperatura y humedad, junto con las condiciones fisicoquímicas y nutricionales propicias, así libre de microorganismos; se basa en la totipotencia; capacidad de cualquier célula vegetal de regenerar una planta completa, debido a que contiene una copia exacta del material genético de la planta de la cual se originó. El proceso en el cual una célula se transforma en una planta u órgano se conoce como organogénesis o embriogénesis; las condiciones controladas conducen al explante a la formación de una masa celular amorfa, denominada callo, o en otro caso a la formación de tejido diferenciado que producirá órganos o embriones (Figura 1) (George *et al.*, 2008; Calva y Pérez, 2005; Ferl y Paul, 2000).

Actualmente, el cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en una herramienta fundamental para la investigación en plantas. Principalmente se utiliza en la producción, conservación y mejoramiento de los recursos vegetales. La variación somaclonal en las poblaciones derivadas del cultivo

de tejidos es una fuente de nuevos clones con variantes que pueden ser deseables con mejores características agronómicas (Michael *et al.*, 2011).

- **Problemas asociados al cultivo de tejidos vegetales**

Durante el establecimiento del cultivo de tejidos vegetales se presenta una serie de dificultades que pueden llegar a causar demora en obtener resultados, e inclusive, si no se tienen los cuidados precautorios, no se alcanzará la meta que se pretende. A continuación se describen algunas dificultades que con frecuencia se presentan en el cultivo *in vitro* (Pérez *et al.*, 1999).

a) Contaminación

Una de las condiciones primordiales para el establecimiento del cultivo de tejidos vegetales es la asepsia, que se refiere a la ausencia de cualquier microorganismo patógeno que pueda afectar los resultados, o incluso acabar con el tejido. Desafortunadamente, es muy común que en la etapa del establecimiento se contamine el material, esto se debe en gran parte a que el medio de cultivo es muy rico en nutrientes y ayuda a la proliferación de los microorganismos. Los contaminantes que pueden estar presentes en los cultivos vegetales pueden ser hongos, bacterias, virus, viroides o micoplasmas. Los hongos que suelen aparecer con más frecuencia pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Candida*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Alternaria* y *Fusarium*; en cuanto a bacterias, se pueden encontrar Gram positivas como *Actinomyces*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Streptomyces*, y Gram negativas de los géneros *Acitenobacter*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Cassells, 1997; Leifer *et al.*, 1994; Cassells, 1991).

b) Oxidación

En el cultivo de tejidos, al momento de obtener los explantes, es necesario realizar heridas en el tejido para llevar a cabo su establecimiento, por lo que dicho tejido suele excretar una cantidad de compuestos, en su mayoría fenólicos, que intervienen posteriormente en el proceso de cicatrización y de defensa contra patógenos. Estos compuestos tienden a oxidarse una

vez que entran en contacto con la atmósfera, provocando escurrimientos del tejido, lo que conlleva a una generación de radicales como las quinonas que son altamente tóxicas para los tejidos vegetales. Principalmente en plantas leñosas, estos escurrimientos llegan a causar la necrosis completa del explante, y como consecuencia, la pérdida del cultivo (Pérez *et al.*, 1999).

c) Vitrificación

Frecuentemente los tejidos cultivados presentan un aspecto vítreo y deformaciones evidentes. Esto se debe a una serie de desórdenes morfológicos, fisiológicos y anatómicos causados por las condiciones en que se realiza el cultivo. Las condiciones que favorecen este proceso son el exceso de nutrientes y carbohidratos, altos niveles de reguladores de crecimiento, el tipo de regulador, baja intensidad luminosa, y principalmente, la alta humedad relativa y la alta disponibilidad de agua en el medio. Las características de un tejido vitrificado son: hiperhidratación, paredes celulares delgadas y poco lignificadas, deformaciones en la cutícula, grandes espacios intercelulares llenos de agua e inclusive la atrofia de los estomas (Ziv, 1991; Pérez *et al.*, 1999).

2.5.1. Micropropagación

Es la reproducción asexual utilizando la técnica del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Tratándose de un sistema de propagación clonal de forma masiva, en un tiempo relativamente corto y en espacios pequeños, cuyos materiales mantienen las mismas características genotípicas que el explante madre, el cual, cuenta con características, en este caso, agronómicas sobresalientes. Las plantas que se logran obtener mediante este proceso están libres de virus, hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos (George *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 1999).

El proceso de micropropagación normalmente se utiliza para obtener organismos idénticos a los progenitores. Por lo anterior, el cultivo de tejidos vegetales se utiliza comúnmente para la propagación. Sin embargo, ocurre

una inestabilidad clonal, ya que, se ha reportado variabilidad utilizando cultivo de tejidos en muchas especies. La variación genética es muy importante para los procesos de selección y mejoramiento genético de las plantas, principalmente se expresa en plantas propagadas asexualmente a un ritmo más lento que en las plantas que son un producto de recombinación sexual. Algunas zarzamoras sin espinas son quimeras, ya que consisten en varios tipos de células genéticamente distintas. Para mantener estas quimeras, deben ser propagadas asexualmente, para lo cual, es recomendable utilizar el cultivo de tejidos (McPheeters y Skirvin, 1989).

Skirvin (1993), afirma que para la variación somaclonal, el cultivo *in vitro* tiene un valor importante para la propagación asexual. Scowcroft y Larkin informaron de 22 especies en las que se observó variación somaclonal (Scowcroft *et al.*, 1983; McPheeters y Skirvin, 1989).

2.5.2. Organogénesis *in vitro*

La organogénesis se refiere a la formación de *novo* de órganos en los explantes cultivados *in vitro*, basándose fundamentalmente en la totipotencialidad celular de las plantas, es decir, cada célula contiene una copia íntegra del material genético de la planta sin importar su función o posición en ella necesaria para formar una planta completa, o bien, desempeñar la función de cualquier órgano o tejido (Calva y Pérez, 2005; Ferl y Paul, 2000).

La organogénesis puede generarse directamente cuando a partir del explante inicial se forma un órgano, o por el contrario, indirectamente en donde sobre el tejido inicial primeramente se origina la formación de tejido calloso y posteriormente con estímulo con reguladores de crecimiento vegetal se induce la formación de órganos vegetales (George *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 1999).

Generalmente, el callo se asocia con la variación somaclonal, a tal grado, que algunas variantes provenientes de estos callos han sido llamados

“calliclones” para hacer referencia a su origen. Existe una relación tan estrecha entre el callo y la variación somaclonal, que los laboratorios comerciales tratan de evitar el desarrollo de callo durante cualquier etapa de la propagación. La iniciación del callo *in vitro* se produce más fácilmente en el corte o superficies expuestas que estén en mayor contacto con el medio de cultivo (Skirvin y Janick, 1976; McClintock, 1984).

2.5.3. Embriogénesis somática

Es un proceso asexual, ya que la planta nueva que se origina será exactamente igual a la donadora de la célula inicial. Éste proceso no sólo sucede en plantas establecidas *in vitro*, sino también, suele suceder en algunas familias de plantas, lo cual, se conoce con el nombre de apomixis. Existen dos tipos de embriogénesis somática (Figura 1): la directa, en la que los embriones se forman directamente sobre el explante original a través de células meristemáticas existentes, y la indirecta, que consiste en primeramente obtener tejido calloso (acumulación de células indiferenciadas), o bien, una suspensión celular embriogénica, a partir de la cual se efectúa la diferenciación de los embriones en un segundo paso (George *et al.*, 2008; Kiran y Thorpe, 1995).

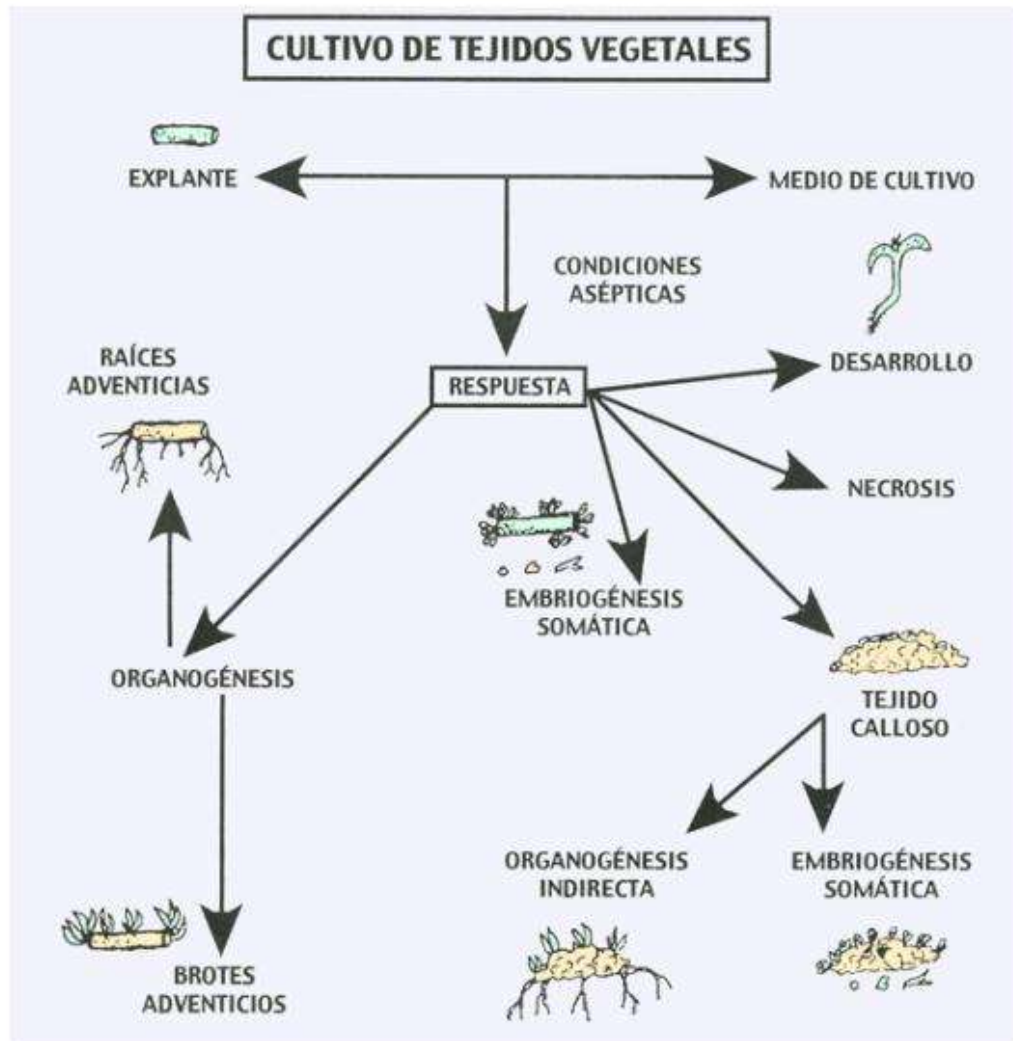


Figura 1. Principios básicos del cultivo de tejidos y comportamiento de los explantes cultivados ante el estímulo aplicado (Pérez *et al.*, 1999).

2.6. Reguladores de crecimiento vegetal

También conocidos como fitoreguladores del crecimiento, son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta con influencia fisiológica en el desarrollo de los diferentes tejidos vegetales con tan solo una mínima cantidad. Se clasifican en cinco grupos básicos: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno; esto depende de su efecto fisiológico y de su estructura química. Los más utilizados dentro del cultivo de tejidos vegetales son los que pertenecen al grupo de las auxinas y citocininas, ya que son las responsables de regular los procesos de crecimiento y desarrollo organizado de los tejidos. Las que se encuentran dentro del

grupo de las giberelinas y ácido abscísico son utilizadas con menor frecuencia (George *et al.*, 2008; Davies, 1995; Pérez *et al.*, 1999).

2.6.1. Auxinas

Son un grupo de compuestos generalmente derivados del triptófano que se sintetizan de forma natural en los ápices de las plantas. Estas fitohormonas están relacionadas directamente con el crecimiento y diferenciación celular; participan en la regulación del crecimiento celular, en el inicio de la división celular, en la formación de tejidos no diferenciados (tejido calloso), en la diferenciación del tejido vascular y en la formación de órganos (raíces); dentro de las plantas completas su función tiene que ver con la dominancia apical, afectan la senescencia, abscisión de las hojas y la mediación de los tropismos. La auxina más común de forma natural son el ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB) junto con la anterior son las más utilizadas. Ejemplo de las auxinas artificiales son 2,4 -D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y ANA (ácido naftalenacético (George *et al.*, 2008; Friml, 2003).

2.6.2. Citocininas

Las citocininas son un grupo de compuestos derivados de la adenina y se sintetizan en los tejidos jóvenes y raíces. Su función dentro del cultivo de tejidos vegetales es la estimulación de la división celular, y rompen la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar. Dentro de las plantas completas se encargan de promover la brotación de las yemas axilares, estimulan la expansión de las hojas y retardan la senescencia. En conjunto las auxinas y citocininas son las responsables de realizar los procesos de regulación de la división celular, por tanto, el balance de estas dos fitohormonas (Figura 2) es determinante para el patrón de desarrollo que siga el tejido. Las citocininas más comunes sintetizadas de forma natural por las plantas son la zeatina, la isopentiladenina (2iP) y el ribósido de zeatina (Stirk *et al.*, 2003; Pérez *et al.* 1999).

2.6.3. Ácido giberélico y ácido abscísico

Son reguladores del crecimiento vegetal que intervienen en algunos procesos fisiológicos en los tejidos. El ácido giberélico se utiliza para inducir y acelerar la aparición y la elongación de estructuras como brotes; suele tener efectos contrastantes con las auxinas. El AG₃ ha demostrado ser necesario para el cultivo de ápices o meristemos caulinares de varias especies vegetales como *Phaseolus vulgaris*, *Solanum tuberosum*, *Fragaria x ananassa* y *Manihot esculenta*, entre otras. El ácido abscísico, por su parte, inhibe la germinación de embriones somáticos y además, es empleado para acelerar su proceso de maduración (Pérez *et al.*, 1999).

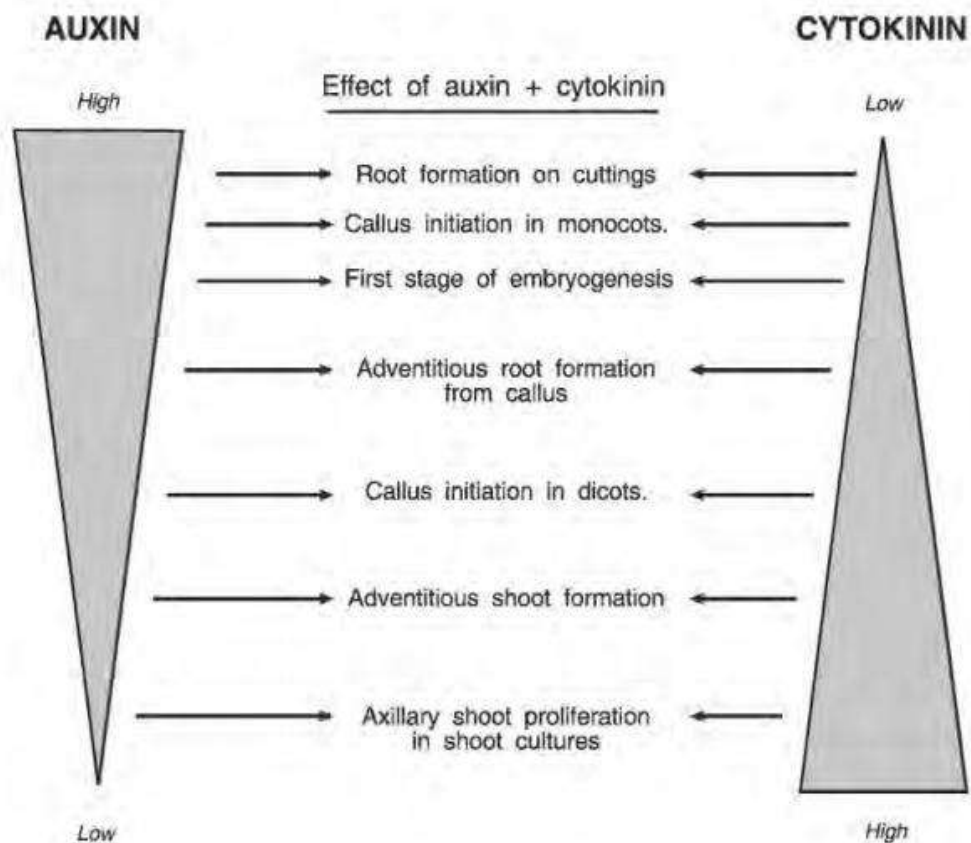


Figura 2. Respuestas generadas en los cultivos de tejidos vegetales por la influencia de la adición de auxinas y citocininas (George *et al.*, 2008).

2.7. Variación somaclonal

En la naturaleza, la diversidad y variabilidad genética se generan a causa de una serie de eventos de recombinación en una población. Tal variabilidad, puede ser influenciada por diversos factores como la selección natural, mutaciones, migración y por el propio tamaño de la población (Leva *et al.*, 2012).

En 1958, Steward reportó la primera fuente de variabilidad genética en células de plantas superiores cultivadas *in vitro*, las cuales mostraron una inestabilidad genética, características que también poseían las células regeneradas. Posteriormente Larkin y Scowcroft (1981), propusieron dos términos para hacer referencia a los resultados de los cultivos *in vitro* de vegetales. El término “somaclon” para referirse a las plantas derivadas de cualquier forma de cultivo de células, y “variación somaclonal” para referirse a la variación genética entre tales plantas (Larkin y Scowcroft, 1981; Steward, 1958).

La variación somaclonal es la variación entre plantas generadas producto del cultivo de tejidos vegetales de cualquier tipo, la cual puede surgir de una variación preexistente o inducida (Robert *et al.*, 1994).

El crecimiento de las células vegetales *in vitro* y su posterior regeneración en plantas completas es un proceso asexual que únicamente implica la división mitótica de las células, por lo que cabe mencionar la probabilidad de una variación espontánea incontrolada y aleatoria bajo estas condiciones de cultivo, pudiendo ser plantas mutagénicas regeneradas de cultivos procedentes de callos, protoplastos y embriones somáticos que muestran variación fenotípica y genotípica. Algunos de los somaclones o inclusive, todos, pueden ser físicamente diferentes a las plantas madre donadoras. De forma general, la variabilidad se produce espontáneamente y puede ser el resultado de cambios genéticos temporales o permanentes durante la etapa del cultivo *in vitro*. Los cambios temporales, son el resultado de efectos epigenéticos o fisiológicos no hereditarios y reversibles. Por otra parte, los cambios permanentes son heredables, representando la expresión de la variación preexistente en las plantas de origen o siendo el resultado de la

variación de *novo*. El alcance de la variación somaclonal puede variar desde rasgos específicos hasta todo el genoma de la planta. Además, de que proporciona una valiosa fuente de variación genética para el mejoramiento de los cultivos a través de la selección de nuevas variantes, que puedan mostrar resistencia a enfermedades, mejora de la calidad o mayor rendimiento (Michael *et al.*, 2011; LarkinyScowcroft, 1981).

2.7.1. Causas de la variación somaclonal

Una serie de factores son los que contribuyen para que se lleve a cabo éste fenómeno de variación, tales, como el sistema por que se induce la regeneración, el tipo de tejido, la fuente de explante, los componentes del medio de cultivo y la duración del ciclo de cultivo *in vitro*. La cantidad de variación que se puede esperar *in vitro* varía con el tipo y edad del clon, el uso de agentes mutagénicos y el uso de la presión de selección aplicada a las células individuales para condiciones de estrés como el nivel de salinidad, herbicidas, microorganismos o subproductos, y metabolitos específicos (Skirvin *et al.*, 1993; Leva *et al.*, 2012).

La formación de callo durante el cultivo *in vitro* genera una pérdida del control celular, dando lugar a un crecimiento desorganizado, lo cual es una característica para inducir la variación somaclonal (Karp, 1994). Este tipo de variación puede involucrar cualquier tipo de genes y puede deberse a alteraciones en las bases de ADN, genes, cromosomas o conjuntos completos de cromosomas (Leva *et al.*, 2012).

• Fuente del explante

La conservación de la información genética depende en gran medida de la fuente del explante, ya que el tejido que se elija puede influir o afectar en la frecuencia de la variación somaclonal (Krikorian *et al.*, 1993). El uso de tejidos meristemáticos como el periciclo, procambium y cambium, como materiales de fuente de explante reducen la posibilidad de variación. Por otro lado, los tejidos altamente diferenciados como las raíces, hojas y tallos, generan más variantes, esto probablemente se atribuye a que pasan

por la fase de callo. Aunado, que la preparación de varios explantes de una misma planta donadora incrementa la posibilidad de variación durante los cultivos. Lo anterior resalta la importancia de la planta donadora de explantes con respecto a su composición genética, con esta información se tiene que la variación somaclonal puede surgir de mutaciones somáticas ya existentes en los tejidos de la planta madre (Karp, 1994; Leva *et al.*, 2012).

- **Medio de cultivo**

Los componentes hormonales del medio de cultivo son importantes agentes de variación. Por lo tanto, el efecto del tipo y concentración de los reguladores de crecimiento vegetal sobre la incidencia de la variación somaclonal en diferentes especies vegetales sigue siendo un tema en discusión. Concentraciones balanceadas de auxinas y citocininas pueden inducir poliploidía, por el contrario, en bajas concentraciones o ausencia total de reguladores de crecimiento, las células muestran ploidía normal. Además, un acelerado crecimiento desorganizado de las células más la adición de auxinas aumenta la variación genética mediante el aumento de la metilación del ADN. En cultivos de callo en fresa, la presencia de la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético se asocia con anomalías genéticas como la poliploidía y la estimulación de la síntesis de ADN, lo que puede terminar en una endorreducción. Otro ejemplo se tiene en cultivos de banano ‘Nanjanagudurasabale’ y ‘Cavendish’, en donde altos niveles de citocininas no afectan directamente la tasa de variación somaclonal, con lo cual se puede deducir que el genotipo presenta un efecto elevado en la variación somaclonal (Loschiavo *et al.*, 1989; Bouman y DeKlerk, 2001; Leva *et al.*, 2012).

- **Número y duración de los subcultivos**

A medida que aumentan los subcultivos y su duración aumenta la frecuencia de variación somaclonal, siendo más probable en cultivos de callo y células en suspensión. Por otra parte, la rápida multiplicación y el hecho de que las plantas están bajo condiciones *in vitro* pueden afectar la estabilidad genética de los cultivos (Bairuet *et al.*, 2006).

- **Efecto del genotipo**

Las condiciones del cultivo *in vitro* son muy estresantes para las células vegetales, ya que pueden desencadenar procesos altamente mutagénicos. Sin embargo, cada tipo de genoma responde de manera diferente a la variación inducida por el estrés, esto se atribuye a que las diferencias en la estabilidad genética están relacionadas con la composición del genoma de la planta, ya que éste puede ser inestable durante el proceso de cultivo (Sahijram *et al.*, 2003; Marti *et al.*, 2006).

2.8. Poliploidía

Se le denomina poliploidía a la duplicación de los juegos de cromosomas completos por encima del nivel diploide del genoma. Es un proceso evolutivo recurrente en las especies vegetales, ya que a menudo confiere un aislamiento reproductivo instantáneo, por lo que puede conllevar dicho proceso a una especiación. La falta de una reducción meiótica durante la gametogénesis es ampliamente reconocida como un modo de formación de poliploidía. El nivel de ploidía de un individuo determina completamente su estructura gamética. Los organismos diploides producen mayormente gametos reducidos y una cierta parte de la proporción de gametos no reducidos; los triploides producen pares de gametos reducidos (x y $2x$), y una cierta proporción de gametos no reducidos; los gametos aneuploides, su progenie no sobreviven (Jan y Tomás, 2013).

2.8.1. Aneuploidía

Las células aneuploides se caracterizan por poseer juegos de cromosomas incompletos. El equilibrio entre los tipos de cromosomas y los genes que codifican resultan en la expresión alterada de varios genes, incluyendo a genes con efectos dosis-sensibles en fenotipos. En bastantes especies

vegetales las poblaciones de individuos aneuploides se pueden obtener fácilmente a partir de individuos triploides. (Henry *et al.*, 2010).

Los mecanismos implicados en la inducción de la Aneuploidía en las plantas son eventos que tienen lugar durante la segregación celular, tales como funciones de la respiración, husillo y fragmoplasma y la duplicación de los cromosomas, los cuales son estresados por los productos agrícolas, e industriales, dando lugar a la aneuploidía durante la mitosis y meiosis celular (Sharma, 1990).

2.8.2. Inserciones y deleciones

Una inserción es cuando dentro de una secuencia de ADN se introduce un nucleótido. Por otra parte, una deleción se reconoce cuando a una secuencia de ADN le hace falta un segmento (Rainey, 1999).

2.8.3. Translocaciones

Las translocaciones afectan la estructura de los cromosomas, ya que se lleva a cabo cuando dos cromosomas no homólogos intercambian segmentos cromosómicos (Rainey, 1999).

2.9. Nivel de ploidía

Poehlman y Allen (2003), mencionan que el nivel de ploidía es una limitante para los procesos de mejoramiento genético, ya que al realizar cruza con progenitores con diferentes niveles de ploidía pueden originar progenies estériles o genéticamente inestables.

En el género *Rubus*, el número básico encontrado universalmente es 7, actualmente los niveles de ploidía que se conocen oscilan desde 2x hasta 14x. Con los primeros estudios realizados en éste género se ha logrado

demostrar que la polipliodía ha sido de suma importancia en su evolución (Delgado *et al.*, 2010).

2.10. Detección de variantes genéticas

Los marcadores morfológicos generalmente se utilizan para identificar a familias, géneros y especies en colecciones de germoplasma. Las variantes somaclonales pueden ser detectadas fácilmente por características morfológicas como la altura de la planta, forma de las hojas y pigmentación, tamaño y forma del fruto, etc (Eastman *et al.*, 1991).

La alteración cromosómica y ploidía se detectan mediante análisis citogenéticos, incluyendo conteo de cromosomas y/o citometría de flujo. El análisis de proteínas e isoenzimas se han utilizados ampliamente como marcadores para identificar cultivares y la caracterización de la variación somaclonal para evaluar la fidelidad genética en plantas regeneradas a través de organogénesis y embriogénesis somática. Actualmente las técnicas de análisis moleculares se utilizan para señalar la variación somaclonal en las plantas regeneradas a través del cultivo de tejidos mediante la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), las repeticiones de secuencias simples (SSR) y el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Hashmi *et al.*, 1997; Eastman *et al.*, 1991; Leal *et al.*, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del área experimental

El presente trabajo fue desarrollando tanto en el laboratorio de fisiología vegetal como en el invernadero de frutillas de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Uruapan, Michoacán (19° 23' 38.8" LN, 101° 05' 54.6" LO).

3.2. Obtención del material vegetal y manejo del mismo

Para iniciar con nuestro estudio y establecer *in vitro* los materiales de interés se utilizaron segmentos de tallo con yemas vegetativas tomados de dos selecciones de zarzamora; UM01y UM02 (Figura 3) localizadas en el invernadero de frutillas de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”.

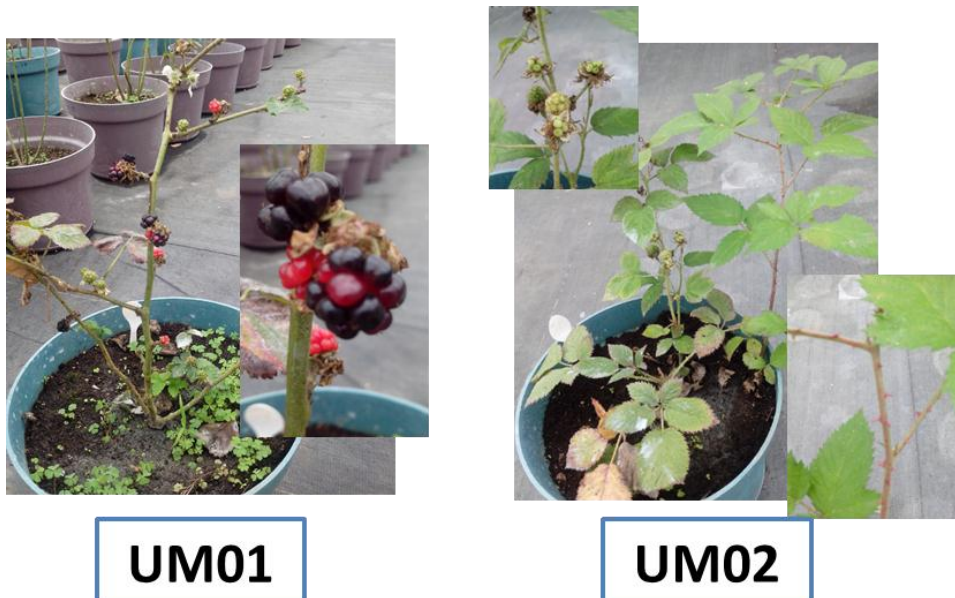


Figura 3. Selecciones de zarzamora productoras en primocañas utilizadas como fuente de explantes.

3.2.1. Asepsia del material vegetal y establecimiento *in vitro*

Previo al establecimiento *in vitro* se procedió a realizar un tratamiento de asepsia para reducir la carga microbiana que pudiera contaminar el cultivo. El método de asepsia consistió en los siguientes pasos (Figura 4):

1. Se colectó y etiquetó el material de las dos selecciones de zarzamora (tallos que contenían de 3 a 5 yemas).
2. El material fue lavado con agua y jabón.
3. Se cortaron los explantes (segmentos de tallo con una sola yema) y fueron colocados en una solución con agua adicionando jabón roma en polvo 2 g L⁻¹, manzate 200 (mancozeb) 1 g L⁻¹ y streptops (estreptomycin) 1 g L⁻¹. Los explantes se colocaron en agitación durante 45 min; posteriormente se enjuagaron con agua corriente.
4. Dentro de la campana de flujo laminar, los explantes (Figura 5) fueron puestos en etanol al 70 % durante 45 segundos; se eliminó el etanol y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 15 min, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril 3 veces.
5. Finalmente, se llevó a cabo la siembra en el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) colocando 3 explantes por frasco.

Los frascos con los explantes fueron incubados en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 24 ± 1 °C, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 2500 lux durante un mes para iniciar su micropropagación.

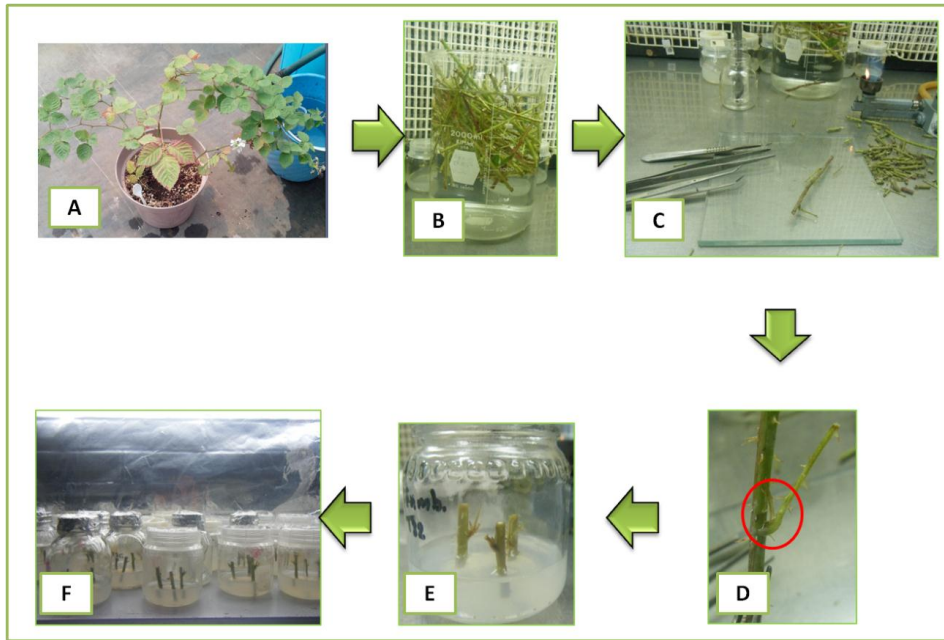


Figura 4. Establecimiento *in vitro* de las selecciones de zarzamora. **A)** Planta en el sitio de colecta. **B)** Asepsia en campana de flujo laminar. **C)** Material para realizar los cortes de las microestacas. **D)** Tallo con una yema axilar. **E)** Siembra de las microestacas en el medio de cultivo. **F)** Tratamientos en incubación.



Figura 5. Explantes de tallo utilizados para el establecimiento *in vitro* de UM01, y UM02.

3.2.2. Micropropagación del material

Al pasar el tiempo requerido para que el material vegetal de las dos selecciones haya tenido el desarrollo adecuado de los brotes, se procedió a colocarlos en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con benciladenina (BA) 2 mg L⁻¹, para llevar a cabo la proliferación de éstos y poder tener la cantidad suficiente de material vegetal para realizar los posteriores estudios (Figura 6).



Figura 6. Micropropagación de las selecciones UM01 y UM02 de zarzadoras productoras en primocañas.

3.3. Organogénesis indirecta

Para llevar a cabo la inducción de la formación de tejido calloso, se utilizaron hojas *in vitro* de los materiales antes mencionados como explantes y fueron cortadas por los extremos (para que estuvieran con mayor contacto al medio de cultivo) y colocadas en medio MS (Figura 7) complementado con 2,4-D a concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg L⁻¹ con cinco repeticiones cada tratamiento; para su incubación se probaron tanto condiciones de luz como oscuridad. Después de realizar los cortes en los explantes se sumergieron en una solución de Tween 20 con ácido cítrico 100 mg L⁻¹ para prevenir la oxidación del tejido. Se colocó un experimento con todos los tratamientos del 2,4-D incubándose 3 días en oscuridad y el resto del tiempo de incubación en luz, y otro experimento se incubó únicamente en luz, ambos en las dos selecciones (UM01 y UM02). Una vez formado el callo, fue subcultivado durante tres meses por espacios de 4 semanas para realizar una dinámica de crecimiento del tejido calloso, la cual consistió en pesar 0.5 g de callo y

subcultivarlo en cada uno de los tratamientos de 2,4-D con sus respectivas repeticiones y tomar registro en cada subcultivo.

Se realizó un nuevo experimento para observar el efecto del 2,4-D en el crecimiento del callo para determinar cuál es el tiempo indicado para multiplicar al máximo el tejido calloso; el cual consistió en pesar 0.5 g de callo inicial y pesarlo cada 15 días durante 3 meses sin cambiarlo de medio de cultivo, únicamente se pesaron y colocaron en los mismos frascos.

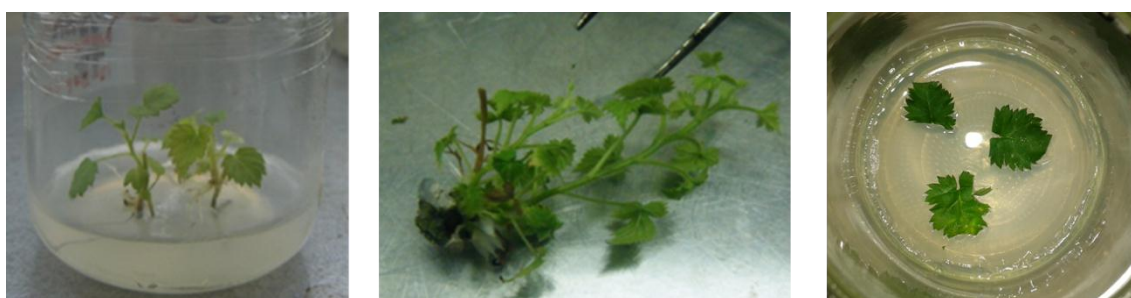


Figura 7. Material vegetal fuente de explantes para la organogénesis indirecta.

Se realizó un total de 10 tratamientos y un control incluyendo las dos condiciones del fotoperiodo para las dos selecciones, generando un total de 20 tratamientos y sus respectivos controles, en donde cada repetición constó de tres explantes, se utilizó un diseño completamente al azar.

- **Regeneración del tejido calloso**

Para llevar a cabo la regeneración del tejido calloso en ambas selecciones, se probaron una serie de tratamientos en cada subcultivo (Cuadro 2) los cuales constan de cinco repeticiones.

Cuadro 2. Tratamientos a los que fueron expuestos los callos en cada subcultivo. **A)** Tratamientos utilizados en el primer subcultivo. **B)** Tratamientos utilizados durante el segundo subcultivo. **C)** Tratamientos utilizados durante el tercer subcultivo.

A	IBA (mg L⁻¹)	BAP (mg L⁻¹)
	0	0
	0.1	1
	0.1	1.5
	0.1	2
B	IBA (mg L⁻¹)	BAP (mg L⁻¹)
	0	1
	0	1.5
	0	2
	1	1
	1	1.5
	1	2
C	TDZ (mg L⁻¹)	IBA (mg L⁻¹)
	1	0.1
	1	0
	2	0
	3	0

Se realizaron una serie de nuevos tratamientos para probar nuevas combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento para inducir la regeneración del tejido (Cuadro 3).

Cuadro 3. Barrido hormonal con las combinaciones de BAP e IBA para inducir la regeneración de los explantes.

BAP mg L⁻¹	IBA mg L⁻¹	BAP mg L⁻¹	IBA mg L⁻¹
-	-	1.5	-
-	0.2	1.5	0.2
-	0.4	1.5	0.4
-	0.6	1.5	0.6
-	0.8	1.5	0.8
-	1.0	1.5	1.0
1	-	2.0	-
1	0.2	2.0	0.2
1	0.4	2.0	0.4
1	0.6	2.0	0.6
1	0.8	2.0	0.8
1	1.0	2.0	1.0

3.4. Organogénesis directa

Para llevar a cabo esta técnica de igual forma se utilizaron hojas como explantes, se realizaron 10 tratamientos y un control con cinco repeticiones cada uno utilizando los reguladores de crecimiento BA, IBA y TDZ utilizando un diseño completamente al azar (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos para la inducción de organogénesis directa en las selecciones UM01 y UM02 de zarzamora productoras en primocañas.

BA (mg L ⁻¹)	IBA (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
1	0.1	-
2	0.1	-
3	0.1	-
-	-	1
-	-	2
-	-	3
-	0.1	1

3.5. Aclimatación

Las plantas que se lograron obtener de cada uno de los tratamientos de la organogénesis directa fueron pasadas a charolas una vez que tuvieron el tamaño adecuado para su aclimatación. Lo cual consistió en los siguientes pasos:

1. Una vez regeneradas las plantas nuevas por organogénesis directa fueron subcultivadas en medio MS durante un período de 3 meses.
2. Cuando mostraron el tamaño necesario para su aclimatación fueron colocadas en charolas con sustrato peat moss y se les aplicó un enraizador (Radix 1500) para asegurar su sobrevivencia y permanecieron durante 1 mes en esas condiciones.
3. Al término del mes fueron trasplantadas a macetas para colocarlas en el invernadero, en donde se mantuvieron por un período de 2 meses. Se fertilizaron cada 3 semanas con 1 g/planta de MAP (12-61-00).
4. Posteriormente, fueron establecidas en campo abierto, para evaluarlas y determinar las variantes somaclonales.

Una vez establecidas las plantas en campo, se aplicó semanalmente PLUS MAX, PREVENTIF-K, y PERMETRINA 500 CE cuando hubo daños por gusanos y enfermedades.

- **Descripción de los productos utilizados**

- **PLUS MAX.** Promueve la división celular, floración, uniformidad, movilización de nutrientes e incrementa el amarre y llenado de frutos en la planta. Se recomienda aplicar después de una granizada, helada o en condiciones de stress por calor. No causa desbalances nutricionales en las plantas. Se recomienda aplicar en berries en condiciones de estrés y producción intensiva para una mayor floración y llenado de frutos (1 L Ha⁻¹)
- **PREVENTIF-K.** Al usar este nutriente, no aparecen hongos resistentes, ya que los fosfitos aumentan la resistencia de las plantas a las enfermedades, estimula el crecimiento de la planta. Este producto se recomienda aplicar en los primeros tres meses de desarrollo a dosis de 1-2 L Ha⁻¹.
- **PERMETRINA 500 CE.** Es un insecticida agrícola piretroide, concentrado emulsionable. Se recomienda su aplicación para controlar gusanos como *Trichoplusia virescens*, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Liriomyza munda* (275-400 cc/Ha).

3.6. Determinación de variantes somaclonales en campo

Se evaluaron variables cualitativas y cuantitativas. Para evaluar las variables cualitativas se utilizaron algunos de los descriptores recomendados por la UPO para caracterizar materiales de *Rubus* (UPOV, 2006).

- *Caracteres cualitativos:* Se evaluaron características como el porte de la planta; rama latente: espinas; espina: postura del ápice en relación con la rama; pigmentación antociánica del brote joven; intensidad del color verde del brote joven; densidad de la pilosidad glandular del brote joven;

foliolo superior: lobulado; tipo de incisión del margen del foliolo; número predominante de foliolos; tipo de hoja.

- *Caracteres cuantitativos:* Se evaluó el número de brotes laterales; número de nudos; longitud y ancho de la hoja; número de foliolos por hoja; número de espinas en caso de poseerlas.

Para llevar a cabo las mediciones cuantitativas se procedió inicialmente a podar las plantas cuando alcanzaron 1 m de longitud, para que al momento de medirlas, todos los materiales fueran lo más homogéneos posibles, para cada variable se tomaron tres muestras por planta y cinco plantas por somaclón. Para medir el número de espinas se contaron las espinas de entrenudo a entrenudo tomando tres segmentos al azar por planta.

3.7. Análisis de datos

Se corrió un análisis de varianza mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$) y de separación de medias para cada una de las variables cuantitativas en los tratamientos utilizados para la inducción de callo y el número de brotes en la organogénesis directa. Todos los análisis se hicieron con la ayuda del paquete estadístico SAS (2000).

IV. RESULTADOS

4.1. Organogénesis indirecta

Como resultados se logró observar que la exposición a luz u oscuridad no afecta la respuesta de los explantes, ya que en ambos casos presentaron resultados similares, logrando obtener callos friables (Figura 8) un mes después de establecido el experimento. Cabe destacar que no hubo problemas de oxidación.



Figura 8. Callos originados mediante organogénesis indirecta. **A)** Callo de un explante de la selección UM01; presentó un color verde-cremoso con consistencia friable. **B)** Callo obtenido de un explante de la selección UM02; presentó un color púrpura y de consistencia friable.

4.2. Efecto del 2,4-D en el crecimiento del callo

El análisis estadístico mostró que hubo diferencia significativa en el crecimiento de los callos en la selección UM01, la cual, bajo condiciones de oscuridad, subcultivar en medio nuevo aumenta mínimamente la tasa de crecimiento del callo con las concentraciones de 1, 2, 3 y 4 mg L⁻¹ de 2, 4-D (Figura 9). Mientras que en condiciones de luz estadísticamente todos los tratamientos se comportaron igual, sin embargo, la concentración de 4 mg L⁻¹ mostró un mejor comportamiento durante el tercer subcultivo duplicando el peso del callo a 1 g.

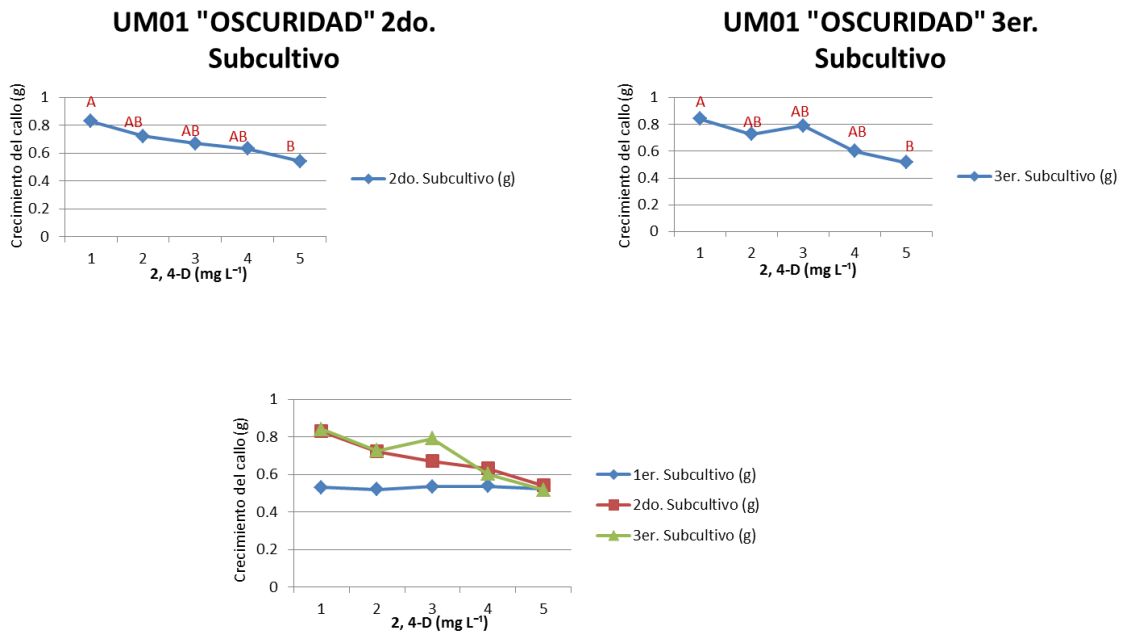


Figura 9. Efecto del 2,4-D en el crecimiento del callo de la selección UM01, la cual se incubó durante los primeros tres días en oscuridad y posteriormente se pasó a condiciones de luz.

El efecto del 2, 4-D en la selección UM02 en condiciones de oscuridad favoreció el aumento del peso de los callos, ya que se duplicó durante el segundo subcultivo con cada una de las concentraciones de ésta auxina, lo cual indica que estadísticamente todos los tratamientos son iguales y que no es necesario subcultivar más de dos veces bajo estas condiciones. En UM02 bajo condiciones de luz, la concentración de 3 mg L⁻¹ durante el segundo subcultivo resultó ser la más eficiente estadísticamente mostrando alta significancia, ya que se logró obtener 1.2 g de callo, el cual se mantuvo durante el tercer subcultivo (Figura 10).

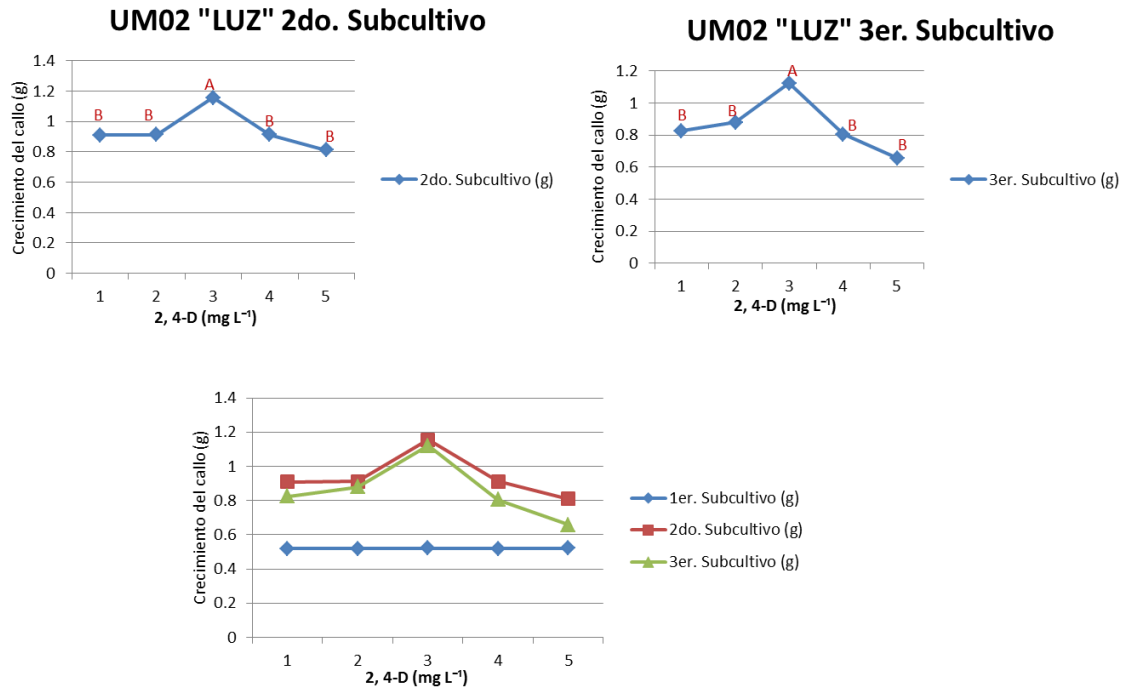


Figura 10. Efecto del 2,4-D en el crecimiento del callo en la selección UM02, la cual se incubó únicamente en condiciones de luz.

El análisis estadístico nos permitió determinar el tiempo ideal para obtener la mayor cantidad de tejido calloso con cada una de las concentraciones utilizadas con el regulador de crecimiento 2, 4-D, con el que pudimos observar que en UM01 hubo diferencia significativa, mostrándose el tratamiento de 5 mg L⁻¹ mejor a los demás a los 60 y 75 días (Figura 11). Mientras en la selección UM02 estadísticamente los mejores resultados se obtuvieron con 1 mg L⁻¹ de 2, 4-D siendo altamente significativo desde el día 30 hasta el día 75 (Figura 12).

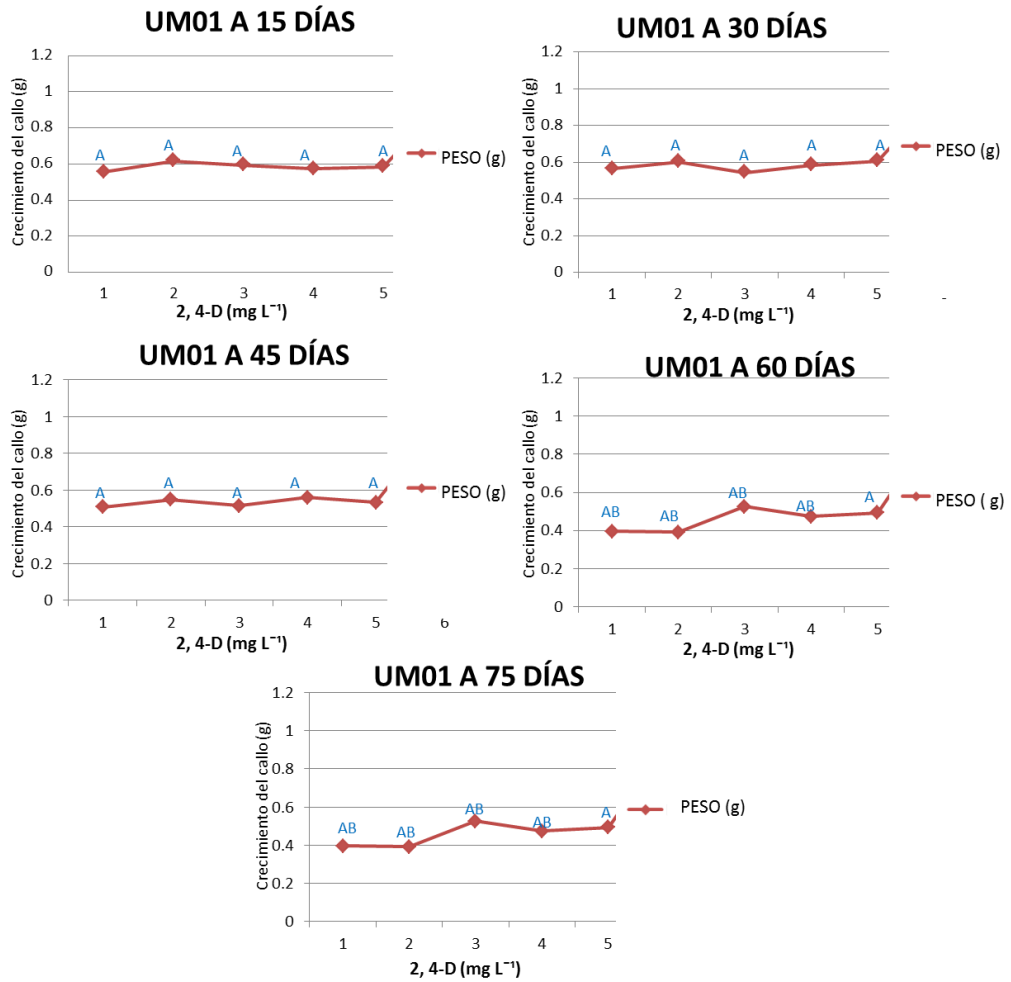


Figura 11. Dinámica de crecimiento del callo utilizando 2,4-D (1, 2, 3, 4, y 5 mg.L⁻¹) para determinar si es necesario incubar durante períodos largos para aumentar la cantidad de callo en UM01.

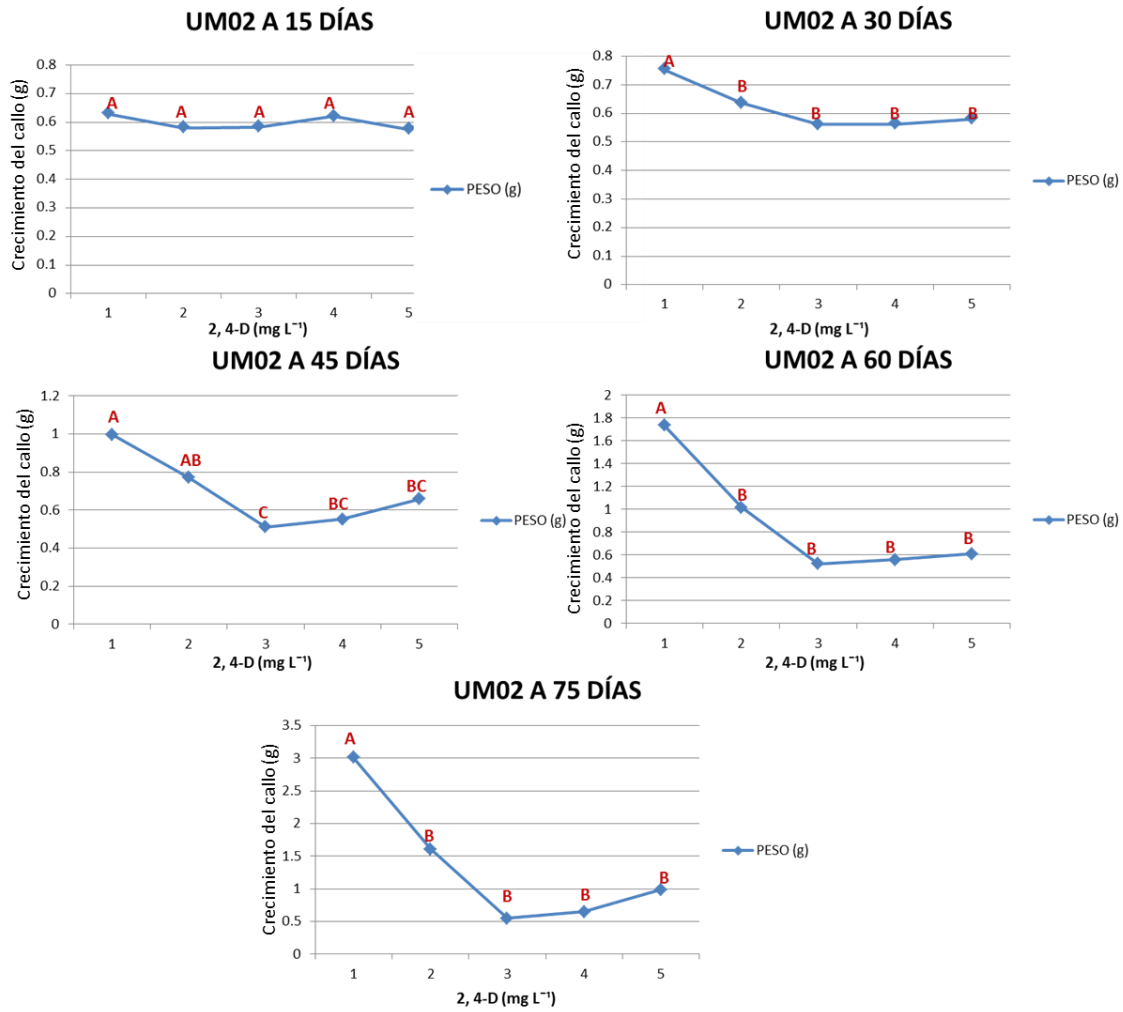


Figura 12. Dinámica de crecimiento del callo utilizando 2,4-D para determinar si es necesario incubar durante períodos largos para aumentar la cantidad de callo en UM02.

4.2.1. Regeneración de callo

No se logró regenerar el tejido calloso con ninguno de los tratamientos probados, por lo que, se recomienda para trabajos posteriores con estos genotipos realizar un estudio de cariotipo para determinar los niveles de ploidía de las selecciones que estamos utilizando, para averiguar si hay un inconveniente a este nivel. Todos los tratamientos únicamente mostraron tener un efecto sobre los callos al cambiar su tonalidad a verde y su consistencia (Figura 13).

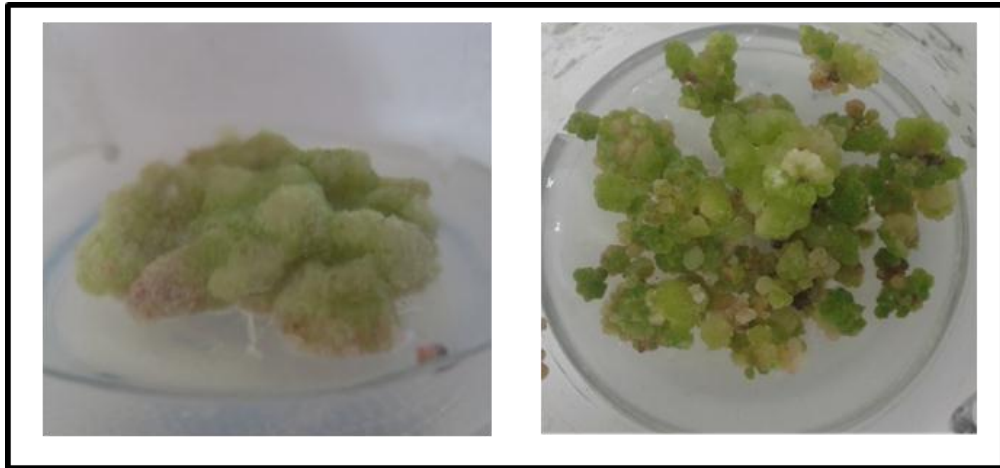


Figura 13. Cambios generados sobre lo callos con los tratamientos para regenerar plantas a base de BA, IBA y TDZ.

4.3. Organogénesis directa

Estadísticamente se comportaron igual todos los tratamientos para la regeneración de nuevas plantas. En total se lograron obtener treinta plantas vía organogénesis directa de UM01, las cuales se denominaron como somaclones 1, 2, 3, hasta el 30, cabe mencionar, que la mayor parte de ellos se perdieron debido a que algunos se oxidaron y otros se contaminaron. De las seis plantas que se lograron obtener de la UM02, todas se oxidaron después de separarlas del explante madre.

Se inició con la evaluación de los brotes generados (Cuadro 5 y 6) con los tratamientos utilizados a partir de un mes posterior al establecimiento. Todos los tratamientos fueron transferidos a nuevo medio de cultivo cada mes. Las plantas que se lograron obtener (Figura 14) fueron pasadas a un medio MS sin reguladores de crecimiento, manteniéndose hasta lograr obtener el tamaño adecuado para su posterior aclimatación.

Cuadro 5. Número de brotes obtenidos en cada uno de los tratamientos utilizados para la inducción de brotes mediante la organogénesis directa en UM01.

TRAT.	BA (mg L ⁻¹)	IBA (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)	No. De BROTES
U	1	-	-	-
V	2	-	-	0.8
W	3	-	-	1
X	1	0.1	-	0.4
Y	2	0.1	-	1
Z	3	0.1	-	-
TDZ1	-	-	1	1.2
TDZ2	-	-	2	0.6
TDZ3	-	-	3	0.6
TDZ4	-	0.1	1	0.4

Cuadro 6. Número de brotes obtenidos con cada uno de los tratamientos utilizados para la inducción de brotes mediante la organogénesis directa en UM02.

TRAT.	BA (mg L ⁻¹)	IBA (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)	No. De BROTES
U	1	-	-	-
V	2	-	-	-
W	3	-	-	1
X	1	0.1	-	-
Y	2	0.1	-	-
Z	3	0.1	-	-
TDZ1	-	-	1	3
TDZ2	-	-	2	1
TDZ3	-	-	3	1
TDZ4	-	0.1	1	-

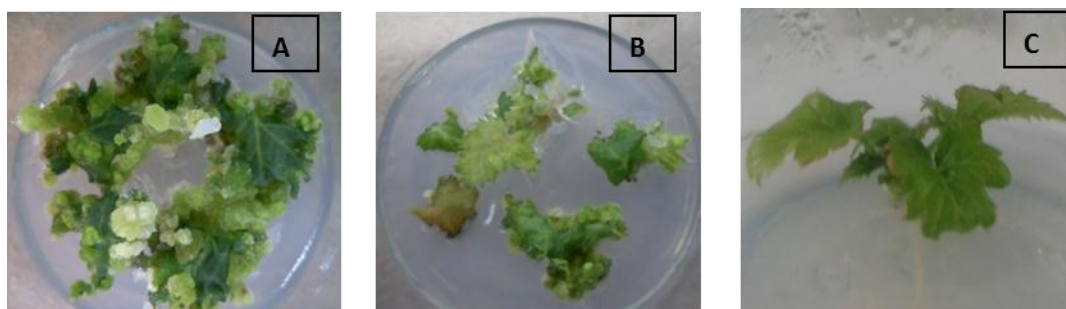


Figura 14. **A)** Explantes mostrando respuesta al estímulo de los reguladores de crecimiento utilizados para la inducción de organogénesis directa. **B)** Explantes con brotes. **C)** Nuevo brote separado del explante madre.

4.4. Aclimatación

De un total de 30 somaclones únicamente se lograron aclimatar cinco somaclones de la selección UM01, los cuales permanecieron en el invernadero de frutillas durante un periodo de dos meses, y posteriormente fueron trasladados a condiciones de campo (Figura 15) en el municipio de Ziracuaretiro, Mich.

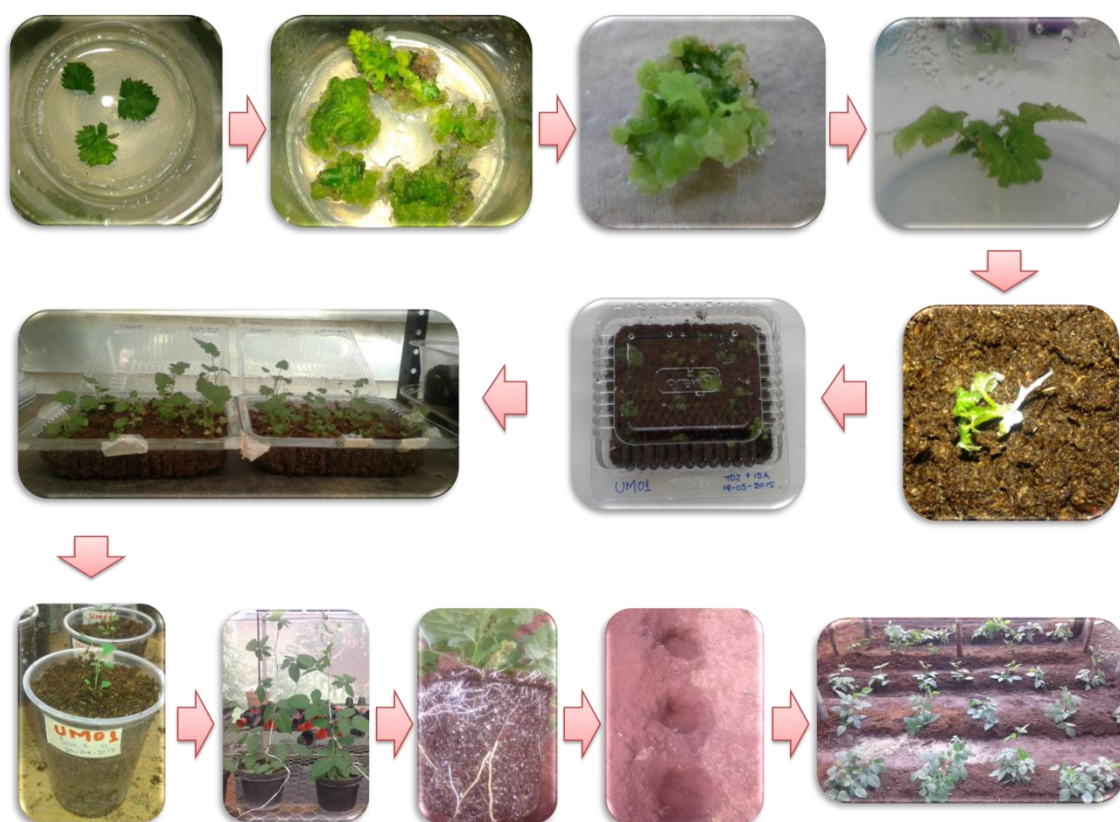


Figura 15. Etapas por las que pasaron los somaclones obtenidos vía organogénesis directa desde su inducción *in vitro* hasta su aclimatación en invernadero y finalmente a campo abierto.

Cabe resaltar la procedencia de los somaclones para tomar en cuenta de cuales tratamientos hormonales proviene cada uno de ellos. El somaclón 1; proviene del tratamiento a base de 3 mg L^{-1} de BA, el somaclón 2; de 2 mg L^{-1} de BA, el somaclón 3; de 1 mg L^{-1} de TDZ más la adición de 0.1 mg L^{-1} de IBA, el somaclón 4; de 1 mg L^{-1} de BA más la adición de 0.1 mg L^{-1} de IBA, y

finalmente el somaclón 5; deriva de la combinación de 2 mg L⁻¹ de BA con 0.1 mg L⁻¹ de IBA.

4.5. Determinación de variantes somaclonales

Únicamente los somaclones 1, 2, 3, 4 y 5 fueron trasplantados a condiciones de campo para evaluarlos lo más apegado a las condiciones reales (Figura 16 y 17), para que estuvieran expuestos a todos los factores bióticos y abióticos a los que pueda ser susceptible este cultivo.

Se logró observar que únicamente el somaclón 2 muestra características morfológicas muy similares a la planta madre donadora de explantes para llevar a cabo el proceso; ya que conservó las característica particular de la selección UM01 de carecer de espinas en el tallo y su susceptibilidad a patógenos fúngos. Por otro lado, el somaclones 1, 3, 4 y 5 reflejan de forma irrefutable que hubo variación somaclonal, ya que las características morfológicas de éstos somaclones no corresponden con las características de la planta madre; presentando espinas en el tallo y durante su estancia bajo condiciones de invernadero presentaron una cualidad de gran valor agronómico, bajo las mismas condiciones de humedad que el somaclón 2, ya que, permanecieron libres de patógenos fúngos y de pulgones, lo cual, los distingue del somaclón 2. Por lo cual, las plantas fueron tratadas con aspersiones foliares de Mancozeb (1 g L⁻¹).

Se evaluaron las variables cualitativas de los somaclones obtenidos de la selección UM01 utilizando algunos de los descriptores recomendados por la UPOV (UPOV, 2006), con los cuales se obtuvieron los datos que se muestran en el Cuadro 6, para ilustrar las características de cada somaclón. Por otro lado, se evaluaron características cuantitativas como ancho y largo de las hojas, número de brotes laterales, número de nudos y número de espinas en caso de poseerlas, dichos datos se muestran en el cuadro 7.

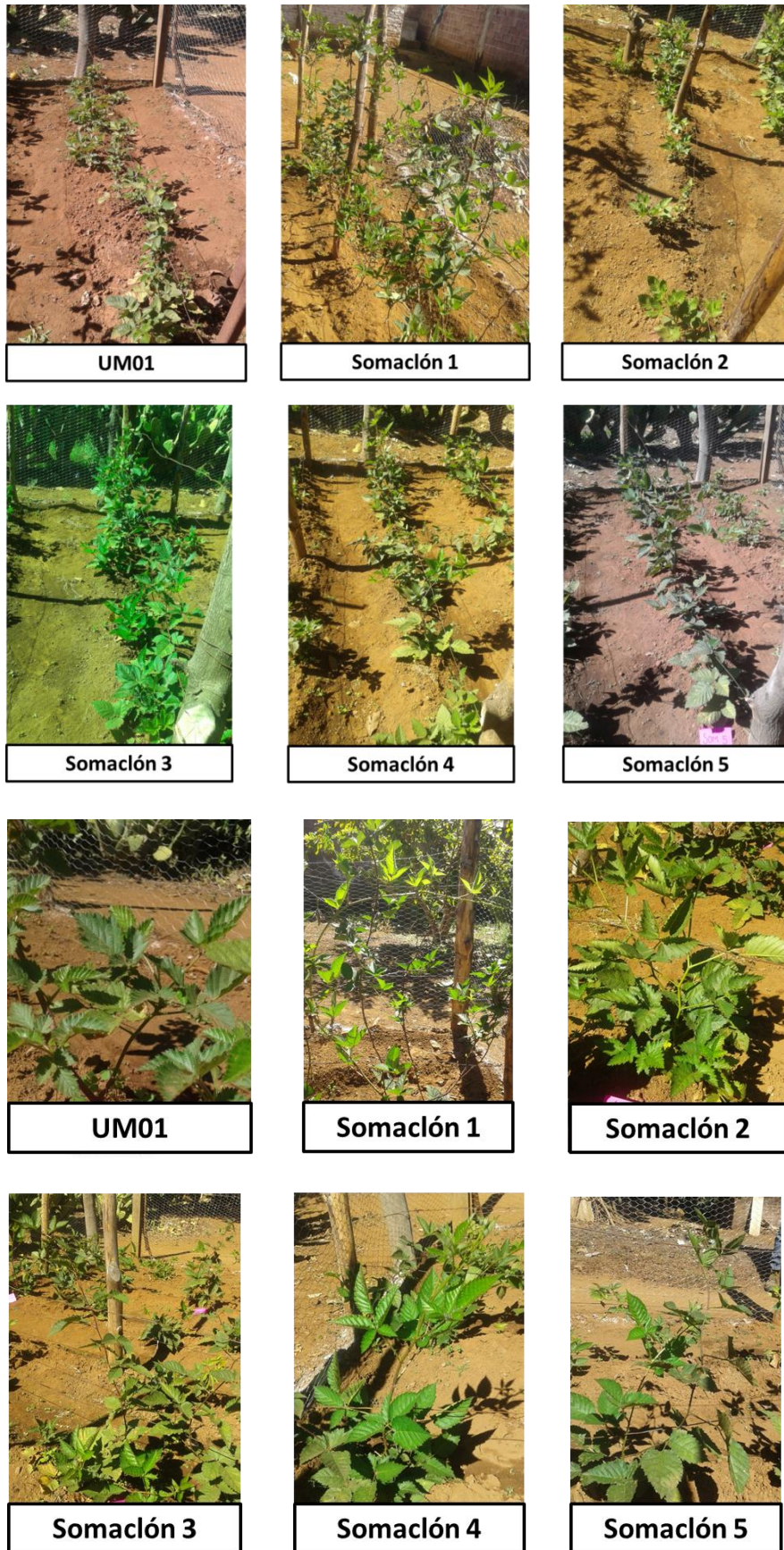


Figura 16. Planta madre de la selección UM01 y los somaclones 1, 2, 3, 4 y 5 obtenidos de la presente selección.



Figura 17. Características fenotípicas del área foliar de los somaclones obtenidos de UM01. Se logra observar que únicamente el somaclón 2 mantuvo el carácter de ausencia de espinas en el tallo.

4.5.1. Evaluación de caracteres cualitativos

Como se ha logrado observar anteriormente, un carácter cualitativo muy interesante es la presencia de espinas en los somaclones 1, 3, 4, y 5, mostrando evidencia de que ocurrió variación somaclonal, ya que el somaclón 2 se observó muy similar a la planta madre donadora de explantes. Además, de otras características como el porte de la planta y la postura de las espinas, que son las más sobresalientes (cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis cualitativos utilizando los descriptores recomendados por la UPO (UPOV, 2006) de cada uno de los somaclones.

UM01	Porte de planta	Rama latente: sección transversal	Rama latente: espinas	Rama latente: No. de espinas	Espina: tamaño	Espina: postura del ápice en relación con la rama	
	Erecto a semierecto	Redondeada a angular	Ausentes	Ausentes	Ausente	Ausente	
	Brote joven: pigmentación antociánica (durante el crecimiento rápido)	Brote joven: intensidad del color verde	Brote joven: densidad de la pilosidad glandular	Foliolo superior: lobulado	Foliolo: tipo de incisión del margen	Hoja: número predominante de foliolos	Hoja: tipo
	Ausente o muy débil	Medio	Ausente o baja	Ausente	Biserrada	Cinco	Palmada

Somaclón 1	Porte de planta	Rama latente: sección transversal	Rama latente: espinas	Rama latente: No. de espinas	Espina: tamaño	Espina: postura del ápice en relación con la rama	
	Semierecto	Redondeada a angular	Presentes	Medio	Pequeño	Hacia abajo	
	Brote joven: pigmentación antociánica (durante el crecimiento rápido)	Brote joven: intensidad del color verde	Brote joven: densidad de la pilosidad glandular	Foliolo superior: lobulado	Foliolo: tipo de incisión del margen	Hoja: número predominante de foliolos	Hoja: tipo
	Media	Claro	Ausente o baja	Ausente	Biserrada	Cinco	Palmada

Somaclón 2	Porte de planta	Rama latente: sección transversal	Rama latente: espinas	Rama latente: No. de espinas	Espina: tamaño	Espina: postura del ápice en relación con la rama	
	Semierecto a rastrero	Redonda	Ausentes	Ausentes	Ausente	Ausente	
	Brote joven: pigmentación antociánica (durante el crecimiento rápido)	Brote joven: intensidad del color verde	Brote joven: densidad de la pilosidad glandular	Foliolo superior: lobulado	Foliolo: tipo de incisión del margen	Hoja: número predominante de foliolos	Hoja: tipo

	Ausente	Medio	Ausente	Ausente	Biserrada	Cinco	Palmada
--	---------	-------	---------	---------	-----------	-------	---------

Somaclón 3	Porte de planta	Rama latente: sección transversal	Rama latente: espinas	Rama latente: No. de espinas	Espina: tamaño	Espina: postura del ápice en relación con la rama		
	Semierecto	Redonda	Presentes	Bajo	Pequeño	Hacia afuera		
	Brote joven: pigmentación antociánica (durante el crecimiento rápido)	Brote joven: intensidad del color verde	Brote joven: densidad de la pilosidad glandular	Foliolo superior: lobulado	Foliolo: tipo de incisión del margen	Hoja: número predominante de folíolos	Hoja: tipo	
	Fuerte	Claro	Ausente o baja	Ausente	Biserrada	Cinco	Palmada	

Somaclón 4	Porte de planta	Rama latente: sección transversal	Rama latente: espinas	Rama latente: No. de espinas	Espina: tamaño	Espina: postura del ápice en relación con la rama		
	Semierecto	Redondeada a angular	Presentes	Bajo	Pequeño	Hacia afuera		
	Brote joven: pigmentación antociánica (durante el crecimiento rápido)	Brote joven: intensidad del color verde	Brote joven: densidad de la pilosidad glandular	Foliolo superior: lobulado	Foliolo: tipo de incisión del margen	Hoja: número predominante de folíolos	Hoja: tipo	
	Media	Claro	Ausente o baja	Ausente	Biserrada	Cinco	Palmada	

Somaclón 5	Porte de planta	Rama latente: sección transversal	Rama latente: espinas	Rama latente: No. de espinas	Espina: tamaño	Espina: postura del ápice en relación con la rama		
	Semierecto	Redondeada a angular	Presentes	Bajo	Pequeño	Hacia afuera		
	Brote joven: pigmentación antociánica (durante el crecimiento rápido)	Brote joven: intensidad del color verde	Brote joven: densidad de la pilosidad glandular	Foliolo superior: lobulado	Foliolo: tipo de incisión del margen	Hoja: número predominante de folíolos	Hoja: tipo	
	Fuerte	Claro	Ausente o baja	Ausente	Biserrada	Cinco	Palmada	

4.5.2. Evaluación de caracteres cuantitativos

Aparentemente no se logró observar una diferencia muy marcada en cuanto a las características cuantitativas, pero cabe resaltar que el somaclón 3 muestra tamaño mayor de hojas (Cuadro 8), teniendo como resultado una planta más vigorosa comparándola con los otros somaclones.

Cuadro 8. Análisis cuantitativo de los cinco somaclones obtenidos de la selección UM01.

SOMACLÓN	No. DE BROTOS LATERALES	No. DE NUDOS	No. DE FOLIOLOS	LONGITUD DE LAS HOJAS (cm)	ANCHO DE LAS HOJAS (cm)	No. DE ESPINAS
1	18	18	5	16.5	15.2	5.5
2	19	19	5	15.6	16.2	0
3	21	21	5	18.1	15.3	4.8
4	20	20	5	15.9	17.0	5.0
5	19	19	5	16.5	15.9	5.0

Cada uno de los somaclones con sus correspondientes repeticiones fueron tratados de la misma forma en cuanto a los riegos semanales y a la aplicación de fertilizantes o algún producto para contrarrestar el ataque por algún patógeno.

V. DISCUSIÓN

En ambas selecciones (UM01 y UM02) no se logró regenerar el tejido caloso con ninguno de los tratamientos utilizados, lo cual, no concuerda con lo mencionado por Gill y Ozias-Akins (1999), quienes mencionan que con concentraciones de TDZ (0.1, 1, 3, 6, 9 y 12 mg L⁻¹) se lograba obtener organogénesis indirecta en yemas de *A. hypogaea*, esto en gran parte debe de atribuirse al genotipo del material con que trabajamos, ya que cada especie responde diferente a los estímulos hormonales que apliquemos.

Veilleux y Johnson (1998) mencionan que la variación en cultivo de tejidos se ha aprovechado en algunos casos para conferir características deseables a los cultivares, incluyendo rasgos morfológicos, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, y tolerancia a los ácidos y a la salinidad, con lo cual concordamos, pero también se pueden obtener características deseables que superen a la planta progenitora, sin embargo, éstos caracteres no son dirigidos y este tipo de variación es aleatoria como lo mencionan Kaeppler y Phillips (1993), dentro de las células vegetales que crecen en medios de cultivo artificiales ocurren numerosos cambios genéticos, éstas alteraciones se manifiestan como el aumento de mutaciones de un solo gen, roturas cromosómicas, activación de elementos transponibles, variación de rasgos cuantitativos y modificaciones de los patrones normales de metilación del ADN.

Chandani *et al.*, 2003, mencionan que en *P. communis* después de 30 días de incubación en oscuridad lograron obtener formación de callo y en explantes incubados en luz no observaron formación de callo, lo cual, no coincide con nuestro experimento, ya que no hubo diferencia alguna entre incubar durante unos días en oscuridad y otros en luz, con los que únicamente se incubaron en luz, pues en ambos el comportamiento fue igual.

Orlando *et al.* (2011) obtuvieron mejores resultados en *Ipomoea batatas* para la formación y dinámica de crecimiento cuantitativa y cualitativa de callo con el uso de 0.5 mg L⁻¹ de 2, 4-D y 0.25 mg L⁻¹ de 6-BAP entre los 28 y 32 días posteriores a la siembra. Mientras que nosotros logramos obtener la mayor cantidad de callo utilizando únicamente 1 mg L⁻¹ de 2,4-D durante los 60 y 75

días de establecido el experimento en la selección UM02 y en la selección UM01 estadísticamente las concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 mg L⁻¹ mostraron el mismo comportamiento estadísticamente.

Capote *et al.* (2000), mencionan que la adición de 2,4-D (2 mg L⁻¹) únicamente en combinación con una citocinina estimuló la formación de callos, ya que su utilización individual hizo deficiente el crecimiento de estos callos, coincidiendo con Santana (1982), el cual señala que con la adición independiente de 2, 4-D en *Coffea* sp para inducir la formación de callos fue nula y en combinación con 6-BAP fue posible, con lo cual, no concordamos, ya que pudimos demostrar que solo con la adición del 2, 4-D es muy factible la formación de callos en zarzamoras.

Aura *et al.* (2012), en plantas de *Z. incognita* evaluaron el efecto de diferentes combinaciones de auxinas (2,4-D y ANA) y citocininas (KIN, BAP y TDZ) sobre la formación de callo y regeneración de brotes. El callo se presentó sobre un rango amplio de 2,4-D con KIN y con BAP independientemente del medio basal, pero no resultó igual en los explantes tratados con ANA, KIN o TDZ.

Reuveni *et al.* (1993), señalan que los altos niveles de citocininas no afectan directamente la tasa de variación somaclonal en cultivares de banano 'Nanjangud Rasabale' y 'Cavendish', lo cual indica que es el genotipo el que tiene mayor influencia. Con lo cual diferimos ya que consideremos que en efecto el genotipo es fundamental para cualquier proceso en el que se involucren reguladores de crecimiento vegetal, pero también, en nuestro caso las citocininas jugaron un papel importante ya que propiciaron variabilidad genética.

Por otra parte, en cuanto a variaciones somaclonales en especies de zarzamora, únicamente podemos comparar nuestros resultados con los obtenidos a partir de meristemas tomados de 'Evergreen', cuya variedad es rastrera con espinas y de la cual se obtuvo un clon sin espinas, el cual se convirtió en la variedad Thornless Evergreen (*Rubus laciniatus* Willd) según McPheeters y Skirvin (1989), ya que nosotros logramos obtener somaclones con presencia de espinas, mostrando tal variabilidad, ya que la planta madre carece de espinas.

Gajdosová *et al.* (2006), en arándano rojo no lograron regenerar brotes adventicios después de seis semanas en un medio de cultivo suplementado con 2.19 y 4.38 mg L⁻¹ de zeatina, utilizando hojas como explantes, ya que únicamente lograron formar tejido de callo, lo cual coincide con nuestros resultados, ya que, únicamente logramos inducir tejido calloso con las concentraciones que utilizamos de 2,4-D, los cuales no logramos regenerar con las concentraciones de IBA, BA y TDZ. Por otra parte, también concordamos con estos autores, ya que logramos inducir brotes adventicios utilizando concentraciones de 1 mg L⁻¹ de BAP con 0.1 mg L⁻¹ de IBA como ellos lo mencionan con frambuesa.

VI. CONCLUSIONES

En base a los estudios anteriores podemos concluir que:

- I. No existe diferencia entre incubar los explantes de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en condiciones de luz u oscuridad para la inducción de callo, ya que en ambas condiciones su comportamiento fue similar.
- II. Tanto en la selección UM01 como en la UM02 no es necesario subcultivar más de dos veces para multiplicar la cantidad de tejido calloso.
- III. En la selección UM01 no fue necesario mantener en incubación los callos para aumentar su peso, ya que a medida que transcurre el tiempo no se multiplica el callo, sin embargo para la selección UM02 resultó ser mejor la concentración de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D durante un período de 75 días obteniendo un peso de 3 g.
- IV. Estadísticamente se comportaron igual todos los tratamientos utilizados para inducir la organogénesis directa a base de BA a concentraciones de 1, 2 y 3 mg L⁻¹ solo o en combinación con 0.1 mg L⁻¹ de IBA y con 1, 2 y 3 mg L⁻¹ de TDZ.

- V. Se obtuvieron cinco somaclones originados de la selección UM01, registrándose variación somaclonal fenotípicamente en los somaclones 1, 3, 4 y 5, los cuales presentaron el carácter de presencia de espinas en el tallo.
- VI. El somaclón 1 mostró variabilidad en cuanto al porte de la planta, ya que se observó un porte semierecto a rastrero difiriendo de los demás que se mostraron semierectos.
- VII. La variación somaclonal se logró obtener con los tratamientos a base de 2 y 3 mg L⁻¹ BA, 1mg L⁻¹ de TDZ más la adición de 0.1 mg L⁻¹ de IBA, 1 mg L⁻¹ de BA más la adición de 0.1 mg L⁻¹ de IBA y 2 mg L⁻¹ de BA con 0.1 mg L⁻¹ de IBA.

VII. LITERATURA CITADA

- A.O.A.C.** 1984. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 14th Ed. Washington, D.C. pp. 1058-1059.
- Araújo**, L.G., A.S. Prabhu, M.C. Filippi, and L.J. Chaves. 2001. RAPD analysis of blast resistant somaclones from upland rice cultivar IAC 47 for genetic divergence. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 165–172.
- Asif**, M.J. and R.Y. Othman. 2005. Characterization of fusarium wilt-resistant and fusarium wilt-susceptible somaclones of banana cultivar rastali (Musa AAB) by random amplified polymorphic DNA and retrotransposon markers. *Plant Molecular Biology Report* 23: 241–249.
- Aura** I. Urrea, Sonia Gomez, Esther J. Naranjo. 2012. Respuesta de *Zamia incognita* L. al cultivo in vitro, una alternativa para su conservación. Vol. 4(2).
- Bairu**, M.V., Fennell, C.W., and J. Van Staden. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Scientia Horticulturae* 108: 347-351.
- Battistini**, C. and P. Rosati. 1991. In vitro evaluation of somaclonal strawberry (*Fragaria x ananassa* "Brighton") variants for susceptibility to *Phytophthora cactorum*. pp. 121-123. In: A. Dale and W.W. Lubby (eds.). *The strawberry into the 21st. century*. Timber Press, Portland, OR.
- Biswas**, M.K., M. Dutt, U.K. Roy, R. Islam, and M. Hossain. 2009. Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. *Scientia Horticulturae* 122: 409-416.
- Bouman**, H. and G.J. DeKler. 2001. Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions.

Comparaison of three assays. Theoretical and Applied Genetics 102:111-117.

Calderón Z., G. 2006. Producción forzada de zarzamora en México. Memorias del III Simpósio Nacional do Morango. II Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul. pp. 67-78.

Calderón Z., G. 2006. Producción forzada de zarzamora en México. Memorias del III Simpósio Nacional do Morango. II Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul. pp. 67-78.

Calva, C. G. y Pérez, V. J. 2005. "Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro". Revista Digital Universitaria (en línea). Vol. 6. No. 11. (Consultada 15 de junio de 2013). Disponible en internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/int104a.htm>

Calva, C.G. and Pérez J. V. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria. 6(11):2-16.

Capote, A., Rodríguez Z. y Pérez O. 2000. Estudio de la variabilidad inducida en células y plántulas de cebolla (*Allium cepa* L.) cv Caribe-71 regeneradas *in vitro*. Biotecnología Aplicada. 17(4):241-246.

Cassells, A. C. 1997. Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation. Kluwer Dordrecht

Chandani, K. H., Kumara D., Narumi M., Takeshi T. y Tetsu N. 2003. An Efficient and Reproducible *in vitro* Plant Regeneration from Leaf Discs in Pear Cultivars (*Pyrus* spp.). Plant Biotechnology, 20(4):283-289.

Chevreau, E., M.N. Brisset, J.P. Paulin, and D.J. James. 1998. Fire blight resistance and genetic trueness-to-type of four somaclonal variants from the apple cultivar. Euphytica 104: 199-205.

Cho, M.J., L.R. Howard, R.L. Prior, and J.R. Clark. 2004. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Journal of the Science of Food and Agriculture 84: 1771-1782.

- Clark, J.R., J.N. Moore, J. Lopez-Medina, C. Finn, and P. Perkins-Veazie.** 2005. 'Prime-Jan' (APF-8') and 'Prime-Jim' (APF-12) primocane-fruiting blackberries. *HortScience* 40: 852-855.
- Davies, P. J.** 1995. *The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions.* Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1-11 Pp.
- Delgado, L. M., Uribe, L. D. y Marulanda, A. M. L.** 2010. Standardization of Cytogenetic Techniques "SQUASH" for Counting of Mitotic Chromosomes in *Rubus glaucus* Benth. *Scientia et Technica.* 46:74-79.
- Ding, M., R. Feng, S. Wang, L. Bowman, Y. Lu, Y. Qian, V. Castranova, B. Jiang, and X. Shi.** 2006. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *Journal of Biology and Chemistry* 281: 17359-17368.
- Drake, C. and J.R. Clark.** 2003. Effects of pruning and cropping on field grown primocane-fruiting blackberries. *HortScience* 38: 260-262.
- Eastman PAK, F.B. Webster, J.A. Pitel and D.R. Roberts.** 1991. Evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis of interior spruce (*Picea engelmannii* complex) using culture morphology and isozyme analysis. *Plant Cell Report.* 10:425-430.
- Ferl, R. and Paul A. L.** 2000. Genome organization and expression. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* USA: American Society of Plant Physiologists, 312-357.
- Finn, C.E.** 2002. Register of new fruit and nut varieties- List 41, Strawberry. *HortScience* 37: 266-268.
- Flores, D.** 2010. Recopilación del reportaje "Blackberry Situation". Gain Report Number MX0061. USDA-FAS del 10/09/2010. US Census Bureau.
- Friml, J.** 2003. Auxin transport – shaping the plant. *Curr. Opin. Plant. Biology* 6: 1-6.

- Gaafar**, R.M. and M.M. Saker. 2006. Monitoring of cultivar identity and genetic stability in strawberry varieties grown in Egypt. *World Journal of Agricultural Science* 2: 29-36.
- Gajdosová**, A., Ostrolucká M. G., Libiaková G., Ondrusková E. y Simala D. 2006. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. And *Rubus* sp. And detection of genetic variability in culture in vitro. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 14(1): 103-118.
- George**, E. F., Hall, M. A: y Geert-Jan De K. 2008. Plant propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Volume 1. The Background. Springer. P. 501.
- Gill**, R.; Ozias-Akins, P. (1999). Thidiazuron-induced highly morphogenic callus and high frequency regeneration of fertile peanut (*Arachis hypogaea*L.) plants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35: 445-450.
- Hammerschlag**, F.A. and V. Ognianov. 1990. Somaclonal variation in peach: screening for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Acta Horticulturae* 280: 403-408.
- Hashmi** G., R. Huettel, R. Meyer, L. Krusberg and F. Hammerschlag. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Report*. 16:624-627.
- Henry**, M.I., B.P. Dilkes, E.S. Miller, D. Burkart-Waco, and L. Comai. 2010. Phenotypic consequences of aneuploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 186: 1231-1245.
- Hruskoci**, J.D. and R. Paul-E. 1993. In vitro shoot regeneration from internode segments and internode-derived callus of blueberry (*Vaccinium* spp.). *Acta Horticulturae* 346: 125-130.
- Israeli Y.**, O. Reuveni and E. Lahav. 1991. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by in vitro techniques. *Scientia Horticulturae*. 48:71-88.

- Jan, S.** and H. Tomás. 2013. Ploidy frequencies in plants with ploidy heterogeneity: fitting a general gametic model to empirical population data. *Royal Society Biological Sciences Proceedings* 280:20122387.
- Kaeppler, S.M.** and R.L. Phillips. 1993. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proceedings of the National Academy of Science* 90: 8773-8776.
- Kaeppler, S.M.** y Phillips R.L. 1993. DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. *In Vitro Cellular y Developmental Biology-Plant*. 29(3):125-130.
- Kaeppler, S.M., H.F. Kaeppler,** and Y. Rhee. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179-188.
- Karp, A.** 1994. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: I.K. Vasil and T.A.Thorpe (eds). *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht; Kluwer Academic Publishers. pp. 139-152.
- Karp, A.** 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85: 295-302.
- Kaushal, K., A.K. Nath, P. Kaudal,** and D.R. Sharma. 2004. Studies on somaclonal variation in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars. *Acta Horticulturae* 662: 269-275.
- Krikorian, A.D., H. Irizarry, S.S. Cronauer-Mitra,** and E. Rivera. 1993. Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa AAB*) regenerated from vegetative stem and floral axis tips *in vitro*. *Annals of Botany* 71:519-535.
- Larkin, P.** and W. Scowcroft. 1988. Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197-214.
- Larkin, P.J.** and W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60:197-214.

- Leal F.**, J. Loureiro, E. Rodríguez, M.S. Pais, C. Santos and O. Pinto-Camide. 2006. Nuclear DNA content of *Vitis vinífera* and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. *Plant Cell Report*. 25:978-985.
- Leva**, A.R., R. Petruccelli, and M.R. Rinaldi. 2012. Somaclonal variation in tissue culture: A case study with olive. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. INTECH.123-150.
- López Medina**, J. 2006. Variedades de especies de frutos pequeños apropiadas para climas subtropicales: la experiencia de México. *Memorias del III Simpósio Nacional do Morango. II Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul*. pp. 87-90.
- Loschiavo**, F., L. Pitto, G. Giuliano, G-Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli, and M. Terzi. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethy drugs. *Theoretical and Applied Genetics* 77: 325-331.
- Martin**, K., S. Pachathundikandi, C. Zhang, A. Slater, and J. Madassery. 2006. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa sp.*) cv. Grande naime and its propagation via shoot tip culture. *Plant* 42: 188-192.
- McClintock**, B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*. 226:792-801.
- McPheeters**, K.D. and R.M. Skirvin. 1989. Somaclonal variation among ex vitro 'Thornless Evergreen' trailing blackberries. *Euphytica* 42: 155-162.
- Mehtha**, Y.R. and D.C. Angra. 2000. Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat x maize hybrids. *Genetics and Molecular Biology* 23: 617-622.
- Michael**, W.B., O.A. Adeyemi, and V.S. Johannes. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63: 147-173.

- Murashige**, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473.
- Orlando**, S., González P., Margarita H. E., Juan J., Silva P. y Ángel E. R. 2011. Evaluación de la dinámica del crecimiento *in vitro* en callos de *Ipomoea batatas*. *Revista Colombiana de Biotecnología*.13 (1): 148-155
- Orton**, T.J. 1984. Somaclonal variation: Theoretical and practical considerations. *Gene manipulation in plant improvement*. Plenum Press, New York. pp. 427-468.
- Pérez** M., E.M., M.R. Ramírez, P.H.G. Núñez y A.N. Ochoa. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 179 p.
- Pérez**, P.O., C.R. Quintana, N. González, and R.Q. Ramos. 2007. *In vitro* and *ex vitro* selection of potato plantlets for resistance to early blight. *Journal of Phytopathology* 155: 582–586.
- Peschke**, V.M. and R.L. Phillips. 1992. Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics* 30: 41-75.
- Phillips**, R.L., S.M. Kaeppler, and P. Olhoft. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal control. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 91: 5222-5226.
- Poehlman**, J. M. y D. Allen. 2003. *Mejoramiento Genético de las Cosechas*. 2ª Edición. Limusa. México DF.
- Predieri**, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64: 185-210.
- Rainey** P.B. 1999. Evolutionary Genetics: The economics of mutation. *Curr Biol*. 9:371-373.
- Reuveni**, O., Israeli Y, Golubowicz S. Factors influencing the occurrence of somaclonal variations in micropropagated bananas. *Acta Horticulturae* 1993; 336:357-364.

- Robert, M., R.M. Skirvin, D. Kenneth, N. D. McPheeters y Margaret, 1994.** Sources and Frequency of Somaclonal Variation. HortScience. 29(11):1232-1237.
- Rodríguez, C. P.Ponce y A. Fuchs. 2006.** Genética y mejoramiento de plantas. Editorial Félix. Varela. Habana, Cuba. 1-12 Pp. Consultado en línea 29/08/2013, Referencia:
<http://www.sisman.utm.edu.ec/libros/FACULTAD%20DE%20INGENIER%20C3%8>
- Rzedowski, J. y G. Calderón. 2005.** Flora del Bajío y regiones adyacentes. Fascículo 135. Imprenta Talavera Hermanos. Morelia, Michoacán, México. 163 P.
- Sahijram, L., J. Soneji, and K. Bollamma. 2003.** Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). In vitro Cellular Developmental Biology Plant 39:551-556.
- Sánchez R., G., J.J. Valdespino, S.J.J. Hernández, y C.G. Calleros.2008.** La red de valor de la zarzamora: El Cluster de los Reyes Michoacán, un ejemplo de reconversión competitiva. Fundación PRODUCE Michoacán. Láser Impresores. Morelia, Michoacán, México. pp. 3-6.
- Santana, N. 1982.** Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) *in vitro*. Cultivos Tropicales. 4(3):35-40.
- Sharma, C.B.S. 1990.** Chemically induced aneuploidy in higher plants. Mutagenesis 5: 105-126.
- Shawn, M. K., Heidi F. K. y Yong R. 2000.** Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology. 43:179-188.
- Singh, G, S.M. Sandhu, K. Meeta, R. Singh, and S. Gosal. 2008.** *In vitro* induction and characterization of somaclonal variation for red rot and other agronomic traits in sugarcane. Euphytica 160:35-47.
- Skirvin, R.M. and J. Janick. 1976.** Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* ssp. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 101:281-290.

- Skirvin**, R.M., K.D. McPheeters, and M. Norton. 2004. Sources and frequency of somaclonal variation. *Horticultural Science* 29: 1232-1237.
- Skirvin**, R.M., M. Norton, and K.D. McPheeters. 1993. Somaclonal variation: has it proved useful for plant improvement?. *Acta Horticulturae* 336: 333-340.
- Steward**, F.C. 1958. Growth and development of cultivated cells. III. Interpretation of the growth from free cell to carrot plant. *American Journal of Botany* 45:709-713.
- Stirk** W.A., Strnad M., Novak O. & Van Staden J. 2003. Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regul.* 41, 13-24.
- Strik**, B. C. and Finn, C. E. 2012. Blackberry Production Systems – a Worldwide Perspective. *Acta Hort.* 946: 341-348.
- Strik**, B., J.R. Clark, C.E. Finn, and M.P. Bañados. 2007. Worldwide blackberry production. *HortTechnology* 17:205-213.
- Talcott**, S.T. 2007. Chemical components of berry fruits. In: Y. Zhao (ed.). *Berry Fruit Value Added Products for Health Promotion.*; CRC: Boca Raton Vol.1. pp. 51-72.
- Unai**, E., T. Iselen, and E. de Garcia, 2004. Comparison of characteristics of bananas (*Musa* sp.) from the somaclones CIEN BTA-03 and its parental clone Williams. *Fruit* 59: 257-263.
- UPOV** (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales). 2006. Zarzamora. Código UPOV: RUBUS_EUB RUBUS_IEU (*Rubus* subgénero *Eubatus*). Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad. www.upov.int/edocs/tgdocs/es/tg022.pdf (Fecha de acceso: 18/10/2013).
- Veilleux**, R.E. and Johnson, A.T. 1998. Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization. *Plant. Breed. Rev.* 16:229-268.

Vidal, M.D.C. and E. De García. 2000. Analysis of a *Musa* spp. somaclonal variant resistant to yellow Sigatoka. Plant Molecular Biology Report 18: 23–31.