



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Estudio de la expresión de genes de la biosíntesis de flavonoides
en cultivos celulares de *Rubus fruticosus* L. bajo condiciones de
estrés”**

TESIS

Que presenta

José Roberto González Hernández

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de Tesis:

Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia

Ciudad de México

Noviembre, 2021

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia.

DEDICATORIA

A mi familia y a mi novia, Verónica, que gracias a su apoyo, amor y cariño fueron mi luz y mi motivación de cada día.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, por haberme proporcionado los principios y los conocimientos para mi desarrollo profesional.

A mi comité tutorial: al Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas y a la Dra. María Teresa Ponce Noyola por haberme brindado tiempo y dedicación, en asesorarme con sus críticas y consejos durante el transcurso de este proyecto.

A mi tutora, la Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia, por darme la oportunidad de pertenecer al laboratorio de Biotecnología de Células de Plantas ofreciéndome el espacio, los consejos y las herramientas necesarias para lograr concluir este trabajo y contribuir en mi formación académica en todo momento.

A mis amigas y amigos del laboratorio, Anamarel, Lady, Alondra y Juanjo, quienes me auxiliaron y apoyaron, de diversas maneras, en cada oportunidad para finalizar este proyecto.

A la Dra. Gabriela Luna Palencia, al Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García y a la Técnico Carmen Fontaine, por todo su apoyo durante mi estancia en el laboratorio, brindándome sus mejores consejos, y su amistad.

A mi familia, mis padres Miguel y Patricia, mis hermanos Baruch y Andrés por estar a mi lado siempre que los necesité, apoyándome en cada momento permitiéndome

alcanzar un logro más en mi vida y que sé que siempre estarán a mi lado viéndome crecer tanto personal como profesionalmente.

A mi pareja y amor de mi vida, Vero, por su amor y apoyo incondicional, en cada paso de esta gran aventura que fue la maestría y por todos los momentos y recuerdos que nos faltan por compartir juntos.

A mis amigos, Julián, Elías y Luis, por haberme brindado su amistad, haberme apoyado revisando mi tesis, espero sigan creciendo y superando todas sus metas.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por otorgarme la beca Nacional para Estudios de Posgrado con el número de becario 934314 para realizar la Maestría en Ciencias con Especialidad en Biotecnología en Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Índice

Índice de tablas	VII
Índice de figuras.....	VII
Resumen.....	XII
Abstract	XIII
1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	1
2.1. Género <i>Rubus</i>	1
2.1.1. Zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i> L.) y frambuesa (<i>Rubus idaeus</i> L.).....	2
2.2. Polifenoles.....	3
2.3. Flavonoides	7
2.3.1. Enzimas clave en la vía fenilpropanoide/flavonoide	10
2.3.2. Regulación de la ruta de biosíntesis fenilpropanoide/flavonoide	12
2.4. Cultivo de células en suspensión	15
2.5. Elicitación	16
2.5.1. Elicitación en zarzamora y frambuesa.....	17
2.5.2. Elicitación con YE y jasmonatos en cultivos de células en suspensión para la producción de flavonoides	18
3. Justificación	20
4. Hipótesis	20
5. Objetivos.....	21
5.1 Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos específicos	21
6. Materiales y métodos.....	22
6.1. Material vegetal	22
6.1.1. Cultivo <i>in vitro</i> de plántulas de zarzamora y frambuesa.....	22
6.1.2. Micropropagación de zarzamora y frambuesa.....	22
6.1.3. Cultivo <i>in vitro</i> de callo de zarzamora y frambuesa	23
6.1.4. Cultivo <i>in vitro</i> de células en suspensión de zarzamora y frambuesa.....	23
6.2. Cinética de células en suspensión de zarzamora.....	25
6.3. Elicitación de cultivo de células de zarzamora	25

6.4. Análisis de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de flavonoides.....	26
6.4.1. Identificación de secuencia de genes a partir de bases de datos.....	26
6.4.2. Diseño de oligonucleótidos para ensayos de qPCR	27
6.4.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.	27
6.4.4. Evaluación de la expresión relativa de genes por qRT-PCR	28
6.5. Análisis estadístico	29
Resultados y Discusión.....	30
7.1 Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Rubus fruticosus</i> y <i>R. idaeus</i>	30
7.2. Micropropagación de <i>Rubus fruticosus</i> y <i>R. idaeus</i>	34
7.3 Inducción y establecimiento de callos <i>Rubus fruticosus</i> y <i>R. idaeus</i>	38
7.4 Cultivo de células en suspensión de <i>Rubus fruticosus</i> y <i>R. idaeus</i>	41
7.4.1. Establecimiento de cultivos celulares de <i>Rubus fruticosus</i>	42
7.4.2. Producción de polisacáridos extracelulares en cultivos de células en suspensión de <i>Rubus fruticosus</i>	47
7.4.3. Cinética de crecimiento de cultivos de células en suspensión de <i>Rubus fruticosus</i>	48
7.4.5. Establecimiento de cultivo de células en suspensión de <i>Rubus idaeus</i>	51
7.5. Expresión de genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides	52
7.5.1. Diseño de oligonucleótidos.....	52
7.5.2. Extracción de RNA	54
7.5.3. Estandarización de ensayos de qRT-PCR en células de zarzamora en oscuridad	57
7.5.4. Expresión de genes involucrados en biosíntesis de flavonoides.....	60
8. Conclusiones.....	66
9. Recomendaciones	67
10. Referencias.....	68
11. Anexos	84

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación botánica de <i>Rubus fruticosus</i> y <i>R. idaeus</i>	3
Tabla 2. Polifenoles reportados en el fruto de <i>Rubus fruticosus</i> y <i>R. idaeus</i> . Modificado de Lee et al. (2012).	7
Tabla 3. Abreviaturas de los medios de cultivo células en suspensión.	24
Tabla 4. Diseño de primers de los genes PAL1, PAL2, CHS, F3H, ANS e HisH4 para los ensayos de qPCR.....	53
Tabla 5. Datos de la concentración y pureza del RNA extraído con el método de CTAB 2.0 en células en suspensión de <i>Rubus fruticosus</i> elicidadas y controles cultivadas en medio B30, en condiciones de oscuridad.....	56

Índice de figuras

Figura 1. Frutos maduros de zarzamora color negro brillante y frambuesa color rojo.	3
Figura 2. Estructura química de compuestos fenólicos vegetales.....	6
Figura 3. Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de flavonoides en <i>Rubus</i> . Abreviaciones: PAL, fenilamonio liasa; CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; DFR, dihidroflavonol reductasa; LAR, leucoantocianidina reductasa; ANS, antocianidina sintasa; ANR, antocianidina reductasa, GT, glicosiltransferasa; FLS, flavonol sintasa. Modificado de Liu et al. (2018). Esqueleto básico de flavonoide, tomado de Taiz y Zeiger (2010).....	8
Figura 4. Mecanismo propuesto de degradación de las proteínas de domino-ZIM jasmonato (proteínas JAZ) a través de la inducción de jasmonato (AJ) para la formación del complejo MBW y la producción de antocianinas (Qi et al., 2011). Factores de transcripción R2R3 MYB; bHLH, Factores de transcripción basic helix-loop-helix; Proteínas de repetición WD; SCF-COI1, Complejo ubiquitina ligasa E3 SCF-	

COI1; JAZ, proteínas de domino-ZIM jasmonato. Con base en Pauwels y Goossens (2011) y Qi et al., (2011).14

Figura 5. Diagrama de propagación por dilución v/v (1:5) para los cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* y *Rubus idaeus*.25

Figura 6. Germinación *in vitro* de semillas de *Rubus fruticosus* y *Rubus idaeus*. A) Semillas de *R. fruticosus* (a la izquierda) y de *R. idaeus* (a la derecha). B) Porcentaje de germinación *in vitro* de *R. fruticosus* y *R. idaeus* después de 3 semanas empleando diferentes tiempos de escarificación con H₂SO₄. C) Plántulas de *R. fruticosus* germinada *in vitro* de 3 semanas de edad, después de iniciada la germinación. D) Plántulas de *R. idaeus* germinada *in vitro* de 3 semanas de edad, después de iniciada la germinación.....31

Figura 7. Curso de germinación de *Rubus idaeus* y *Rubus fruticosus* en el tiempo. Se observa el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *R. idaeus* durante 4 semanas, empleando los tratamientos de escarificación de 30 min en H₂SO₄ y 1 h en H₂SO₄ (Panel superior). Se observa el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *R. fruticosus* durante 4 semanas, empleando los tratamientos de escarificación de 3 h en H₂SO₄ y 3 h en H₂SO₄ con 150 mg/L de PVP en el medio MS con ½ de sales inorgánicas (Panel inferior). Cada punto indica la media ± desviación estándar (n=3). * indica diferencias significativas en el mismo tiempo, P <0.05.33

Figura 8. Micropropagación de *Rubus fruticosus* y *R. idaeus*. A) Brote generado a partir de explante de hoja de *R. fruticosus* después de 1 mes en medio MS adicionado con BAP 1.0 mg/L y IBA 0.1 mg/L. B) Callo generado a partir de explantes de hoja de *R. fruticosus* después de 1 mes en medio MS adicionado con BAP 2.0 mg/L y IBA 0.1 mg/L. C) Desarrollo de brotes en explantes de nodos de *R. idaeus* después de 2 semanas en medio MS adicionado con BAP 2.0 mg/L y IBA 0.1 mg/L. D) Brotes aislados a partir de explantes de nodo de *R. idaeus* después de 1 mes en medio MS adicionado con BAP 2.0 mg/L y IBA 0.1 mg/L. E y F) Desarrollo de plántulas de 2 meses y medio micropropagadas de *R. idaeus* y *R. fruticosus*, respectivamente, en medio MS adicionado con IAA 0.5 mg/L.37

Figura 9. Inducción y establecimiento de callo de *Rubus idaeus* y *R. fruticosus*. A) Callo de *R. idaeus* generado en medio Gamborg B5 adicionado 2 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN, de 3 semanas de edad. B) Callo de *R. fruticosus* generado en medio Gamborg B5 adicionado 2 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN, de 3 semanas de edad. C) Callo de *R. fruticosus* generado en medio MS adicionado 3 mg/L de NAA y 0.1 mg/L de KIN, de 3 semanas de edad. D) Callo de *R. idaeus* establecido en medio MS adicionado con 50 mg/L de L-cisteína, 2 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN, de 3 meses de edad. E) Callo de *R. fruticosus* establecido en medio Gamborg B5 adicionado con 50 mg/L de L-cisteína, 2 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN, de 3 meses de edad. F) Callo de *R. fruticosus* establecido en medio MS adicionado con 50 mg/L de L-cisteína, 3 mg/L de NAA y 0.1 mg/L de KIN, de 3 meses de edad.....39

Figura 10. Inducción de callo primario de *Rubus idaeus* en explantes de hipocótilo. A y C) Callo generado en medio MS adicionado con 3 mg/L de NAA y 0.1 mg/L de KIN, de 1 y 3 semanas de edad, respectivamente. B y D) Callo generado en medio MS adicionado con 3 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN, de 1 y 3 semanas de edad, respectivamente.....40

Figura 11. Diagrama de propagación inicial por dilución v/v (1:5) para los cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* para la prueba de crecimiento.42

Figura 12. Inducción de cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* en condiciones de oscuridad y luz continua, empleando diferentes medios de cultivos y reguladores de crecimiento.44

Figura 13. Producción de biomasa e índice de crecimiento en cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* crecidos en diferentes medios de cultivo y condiciones de luz o oscuridad por 16 d. Media de peso de biomasa (g/L) en cada grupo en peso fresco A) y peso seco C). Índice de crecimiento en relación al peso fresco B) y peso seco D). Las barras indican la desviación estándar de la media (n=3). * indica diferencias significativas con respecto a las diferentes condiciones y medios de cultivo en el tiempo final T16, P <0.05.46

Figura 14. Vista frontal de cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* en medio M21-O.48

Figura 15. Cinética de crecimiento de cultivos de células en suspensión de <i>Rubus fruticosus</i> . Los cultivos fueron crecidos en medio Gamborg B5 adicionado con 3.0 mg/L de NAA en condiciones de oscuridad. Cuadros abiertos azul – biomasa (g PF/L), círculos cerrados rojo – biomasa (g PS/L). Cada punto indica la media \pm desviación estándar (n=3).....	49
Figura 16. Regresión lineal de la fase exponencial a partir de la cinética de cultivos de células en suspensión de <i>Rubus fruticosus</i> . Correlación lineal obtenida entre ln (Biomasa (g PS/L)) y tiempo (h).....	50
Figura 17. Establecimiento de cultivos de células en suspensión de <i>Rubus idaeus</i> en medio Gamborg B5 suplementado con 3.0 mg/L de NAA bajo condiciones de oscuridad.....	52
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando la Integridad del RNA extraído empleando el método de CTAB 2.0 de células en suspensión de <i>Rubus fruticosus</i> elicitadas y control, en medio B30 en condiciones de oscuridad.	56
Figura 19.1. Estandarización de qRT-PCR de células en suspensión de <i>Rubus fruticosus</i> . Electroforesis en Gel de agarosa al 2% de los productos amplificados en de PCR usando cDNA generado a partir de RNA total aislado de células en suspensión empleando el protocolo de CTAB 2.0.	58
Figura 19.2 Estandarización de qRT-PCR de células en suspensión de <i>Rubus fruticosus</i> . Tabla de tamaño de los producto y temperatura de fusión esperados y reales. Curvas de fusión mostrando la especificidad de los productos de PCR usando cDNA generado a partir de RNA total aislado de células en suspensión empleando el protocolo de CTAB 2.0.....	59
Figura 20. Efecto del extracto de levadura y ácido jasmónico sobre el nivel de expresión relativo de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de flavonoides en cultivos de células en suspensión de <i>Rubus fruticosus</i> : <i>PAL</i> , fenilamonio liasa; <i>CHS</i> , chalcona sintasa; <i>F3H</i> , flavanona 3-hidroxilasa; <i>ANS</i> , antocianidina sintasa. Los niveles de expresión de estos genes se normalizaron con base en el valor mínimo para cada gen. El gen <i>HistonaH4</i> se utilizó como control interno. Los cultivos de células en suspensión de <i>R. fruticosus</i> se obtuvieron a los 7 días de crecimiento mediante la	

adición de extracto de levadura (1 mg/mL) y ácido jasmónico (200 μ M). Las células se cosecharon 24 h y 72 h después de la elicitación. Las barras de error indican la desviación estándar de la media (n = 3). a: indica diferencias significativas con respecto al tratamiento control 24 post-elicitación, P <0.05; b: indica diferencias significativas con respecto al tratamiento control 72 post-elicitación, P <0.05.61

Figura 21. Propuesta de mecanismo sobre la interacción a nivel celular en el cultivo de células en suspensión de *Rubus fruticosus* por el efecto de la elicitación con YE o AJ. Factores de transcripción R2R3 MYB; bHLH, Factores de transcripción basic helix-loop-helix; Proteínas de repetición WD; SCF-COI1, Complejo ubiquitina ligasa E3 SCF-COI1; JAZ, proteínas de domino-ZIM jasmonato; PAL, fenilamonioliasa; CHS, chalcona sintasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; ANS, antocianidina sintasa. Los cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* se obtuvieron a los 7 días de crecimiento mediante la adición de extracto de levadura (1 mg/mL) y ácido jasmónico (200 μ M). Las células se cosecharon 24 h y 72 h después de la elicitación. Flechas verdes: sobreexpresión, flechas rojas: subexpresado, líneas punteadas: procesos indirectos, líneas sólidas: procesos directos. Propuesta modificada de Correa-Higuera et al. (2019).64

Resumen

Rubus fruticosus (Rosaceae) es una planta de gran valor agronómico, a la que se le asocian beneficios en la salud al consumir sus frutos, ya que estos contienen altos contenidos de flavonoides. El objetivo de este trabajo fue determinar los cambios en los niveles de expresión de importantes genes de biosíntesis de flavonoides, fenilamonio liasas (*PAL*), chalcona sintasa (*CHS*), flavanona 3-hidroxilasa (*F3H*) y antocianina sintasa (*ANS*); en cultivos de células en suspensión de *R. fruticosus* bajo condiciones de estrés. Se evaluaron diferentes medios de cultivos y condiciones para el establecimiento de los cultivos celulares de *R. fruticosus*, donde el medio Gamborg B5 adicionado con 3% de sacarosa, NAA (3 mg/L) y en condiciones de oscuridad (B30-O) mostró los mejores resultados en cuanto a producción de biomasa (g PS/L) y disgregación del tejido.

Los cultivos de células en suspensión de *R. fruticosus* fueron elicitados con extracto de levadura (YE) (1 mg/mL) y ácido jasmónico (AJ) (200 μ M) durante 24 h y 72 h. La adición de YE generó 24 h post-elicitación un incremento en el nivel de transcripción de *PAL1* y *PAL2* de 6.93 y 6.75 veces, respectivamente, con respecto al control. Posteriormente, los resultados señalan que 72 h post-elicitación con YE, el nivel de transcripción de *PAL1* mantuvo un aumento en el nivel de transcripción de 6.75 veces y los genes *CHS* y *F3H* disminuyeron 95.13% y 58.83%, respectivamente, en relación con el control. Mientras que, la elicitación con AJ ocasionó un aumento en el nivel de transcripción de *PAL1*, *PAL2*, *CHS*, *F3H* y *ANS*, de 3.03, 8.02, 11.05, 4.86 y 7.52 veces, respectivamente, 24 h post-elicitación en comparación del control. Al cabo de 72 h post-elicitación con AJ los transcritos de *CHS* y *ANS* fueron más altos que el control (2.39 y 7.07 veces, respectivamente).

Los resultados sugieren dos estrategias como mecanismo de defensa. Probablemente el YE estaría generando un estado de estrés oxidativo, dirigiendo el flujo de carbono hacia la producción de ácidos clorogénicos, como sustratos para la reducción de especies reactivas de oxígeno. Por el otro lado, el AJ estaría conduciendo los intermediarios hacia la ruta de biosíntesis de flavonoides.

Abstract

Rubus fruticosus (Rosaceae) is a plant of great agronomic value, which is associated with health benefits when its fruits are consumed, since they contain high contents of flavonoids. The objective of this work was to determine the changes in the expression levels of important flavonoid biosynthesis genes, phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*), chalcone synthase (*CHS*), flavanone 3-hydroxylase (*F3H*), and anthocyanidin synthase (*ANS*), in *R. fruticosus* cell suspension cultures under stress conditions. Different culture media and conditions were evaluated for the establishment of *R. fruticosus* cell cultures. The Gamborg B5 medium added with 3% sucrose, NAA (3 mg/L), and under dark conditions (B30-O) showed the best results in terms of biomass production (g PS/L) and tissue disaggregation.

The *R. fruticosus* cell suspension cultures were elicited with yeast extract (YE) (1 mg/mL) and jasmonic acid (JA) (200 μ M) for 24 h and 72 h. The addition of YE generated 24 h post-elicitation an increase in the transcript level of *PAL1* and *PAL2* by 6.93 and 6.75-fold, respectively, with respect to the control. Subsequently, the results indicate that 72 h post-elicitation with YE, the transcript level of *PAL1* maintained an increase of 6.75-fold, and the *CHS* and *F3H* genes decreased 95.13% and 58.83%, respectively, relative to the control. Whereas, elicitation with JA caused an increase in the transcript level of *PAL1*, *PAL2*, *CHS*, *F3H*, and *ANS*, by 3.03-, 8.02-, 11.05-, 4.86- and 7.52-fold, respectively, 24 h post-elicitation compared to the control. At 72 h post-elicitation with JA the *CHS* and *ANS* transcripts were higher than the control (2.39 and 7.07-fold, respectively).

The results suggest two strategies as defense mechanisms. Probably YE would be generating a state of oxidative stress, directing the carbon flux towards the production of chlorogenic acids, as substrates for the reduction of reactive oxygen species. On the other hand, JA would be driving the intermediates towards the flavonoid biosynthesis pathway.

1. Introducción

La zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) y la frambuesa (*R. idaeus* L.) constituyen dos especies arbustivas, pertenecientes a la familia Rosaceae, de gran importancia en el sector agrícola mexicano, y se espera que su producción aumente en los próximos años a causa de los beneficios en la salud que provee el consumo de los frutos de estas especies, donde principalmente se localizan altos contenidos de flavonoides (Rao y Snyder, 2010). Estos compuestos son una clase de polifenoles, los cuales representan un grupo de metabolitos secundarios, que han tenido particular interés dadas sus propiedades antioxidantes, además de que cumplen un papel vital en la defensa y protección de la planta ante el estrés abiótico y biótico. Debido a que existen limitaciones en el campo en estas dos especies, se han desarrollado diferentes protocolos de cultivos celulares en suspensión que podría generar una producción continua y homogénea de flavonoides de interés. Sin embargo, si bien se sabe que son sintetizados a partir de la vía fenilpropanoide y/o la vía acetato/malonato (Quideau et al., 2011), todavía no se ha caracterizado como se regulan las rutas de biosíntesis de estos metabolitos, generando limitaciones de su aplicación a nivel industrial.

En este proyecto se establecieron las condiciones de cultivo de células en suspensión de *R. fruticosus* y *R. idaeus* de variedades comerciales en México. Los cultivos establecidos fueron colocados bajo condiciones de estrés, mediante el uso de ácido jasmónico y extracto de levadura como elicitadores, donde se analizó los cambios en los niveles de expresión de genes relacionados en su ruta de biosíntesis empleando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (qRT-PCR, por sus siglas en inglés).

2. Antecedentes

2.1. Género *Rubus*

El género *Rubus* pertenecen a la familia Rosaceae, subfamilia Rosoideae, con alrededor de 600 a 800 especies descritas en 12 subgéneros, distribuidas en todo el mundo en diferentes tipos de hábitats, a excepción de la Antártida (Jennings, 1988, Gutierrez et al., 2017). En México se encuentran 61 especies de *Rubus* (Rzedowsky y

Calderón de Rzedowsky, 2005), que han sido utilizadas en grupos étnicos locales (Segura et al., 2012). Los subgéneros con mayor número de especies son *Eubatus* (también conocido como *Rubus*) e *Idaeobatus*, que a su vez son los subgéneros con mayor importancia comercial ya que es donde se clasifica la zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) y la frambuesa (*R. idaeus* L.), respectivamente. La complejidad taxonómica de *Rubus* se debe principalmente a la hibridación interespecífica y la plasticidad fenotípica (Evans et al., 2007).

En la actualidad, la base de datos Genome Database for Rosaceae (<https://www.rosaceae.org/>) es un recurso que proporciona acceso a datos genómicos y genéticos disponibles de la familia Rosaceae (Jung et al., 2019). Los avances en secuenciación genómica y transcriptómica han sido un gran paso en los programas de mejoramiento de *Rubus* (Chen et al., 2018). Recientemente, diversos estudios se han enfocado en el análisis del transcriptoma del fruto de diferentes especies del género (*R. idaeus*, *R. coreanus*, *R. fruticosus*) para entender el proceso de maduración y mejorar la calidad del fruto (Hyun et al., 2014a, 2014b; García-Seco et al., 2015).

2.1.1. Zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) y frambuesa (*Rubus idaeus* L.)

Rubus fruticosus L. y *R. idaeus* L. (Tabla 1) son arbustos perennes que crecen hasta 3 m y de 1.5 a 2.5 m, respectivamente (Sønsteby y Heide, 2008; Zia-UI-Haq et al., 2014). El fruto de ambas especies es del tipo agregado y se desarrolla a partir de una flor con múltiples pistilos unidos a un solo receptáculo, donde cada pistilo se convierte en una drupa, la cual contiene una sola semilla, y cada fruta tiene muchas drupas arracimadas (polidrupas) (Skirvin et al., 2009). El fruto puede o no separarse del receptáculo cuando se recoge la baya. Esta es la forma más común en que se distinguen las zarzamoras y las frambuesas, las polidrupas de la zarzamora se encuentran unidas más firmemente al receptáculo que en el caso de las frambuesas (Fig. 1).

En México estas dos especies son consideradas como cultivos estratégicos con base en su importancia económica ya que representan el 2.15% de producto interno bruto (PIB) agrícola nacional y el 1.83% de producción de frutas (SAGARPA, 2017). Estos frutos cuentan con una demanda creciente a nivel nacional e internacional. Por otra

parte, la producción nacional de frambuesa y zarzamora tiene la capacidad de incrementar su producción potencial de 390,240 a 506,460 toneladas para el año 2030 (SAGARPA, 2017). Con base en lo anterior podemos considerar que la frambuesa y la zarzamora constituyen un cultivo de importancia a nivel económico, social y cultural.

Tabla 1. Clasificación botánica de *Rubus fruticosus* y *R. idaeus*.

Reino	Plantae	Plantae
División	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae	Rosidae
Orden	Rosales	Rosales
Familia	Rosaceae	Rosaceae
Subfamilia	Rosoideae	Rosoideae
Tribu	Rubeae	Rubeae
Género	<i>Rubus</i> L.	<i>Rubus</i> L.
Subgénero	<i>Eubatus (Rubus)</i>	<i>Idaeobatus</i>
Especie	<i>Rubus fruticosus</i> L.	<i>Rubus idaeus</i> L.
Nombre común en México	Zarzamora	Frambuesa



Figura 1. Frutos maduros de zarzamora color negro brillante y frambuesa color rojo.

2.2. Polifenoles

Rubus fruticosus y *R. idaeus* son apreciadas a nivel mundial por los diferentes tipos de polifenoles que son capaces de producir en el fruto, generando diversos beneficios en la salud. El término "fenólicos vegetales" (Fig. 2) ha sido propuesto como aquellos

metabolitos secundarios que son originados exclusivamente a través de la vía fenilpropanoide/shikimato y/o la vía acetato/malonato “policétida”, que presenten más de un anillo fenólico y que en su expresión estructural más básica carezca de cualquier grupo funcional basado en el nitrógeno (Quideau et al., 2011). Los fenoles han sido ampliamente estudiados debido a su considerable rango de propiedades fisicoquímicas (Quideau et al., 2011), además de ser los metabolitos secundarios con mayor distribución en el reino Plantae (Cheynier et al., 2013). Los fenólicos se han categorizado sobre la base del número de átomos de carbono de su esqueleto básico:

- Fenoles simples:

- Ácidos fenólicos C₆-C₁: Los ácidos fenólicos, también denominados ácidos hidroxibenzoicos, son derivados del ácido benzoico. Algunos ejemplos son el ácido gálico, el ácido *p*-hidroxibenzoico, el ácido vanílico, el ácido siríceo y el ácido protocatéquico. El ácido gálico es la unidad base de los taninos hidrolizables (Crozier et al., 2007).
- Ácidos hidroxicinámicos C₆-C₃: Los ácidos hidroxicinámicos son derivados del ácido cinámico, son productos de la ruta fenilpropanoide, por lo que se denominan fenilpropanoides. Algunos ejemplos de ácidos hidroxicinámicos son el ácido *p*-cumárico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico (Crozier et al., 2007).
- Estilbenos C₆-C₂-C₆: Los estilbenos emplean como sustratos para su biosíntesis una molécula de 4-coumaroil-CoA y tres moléculas de malonil-CoA, al igual que los flavonoides; sin embargo, a diferencia de los flavonoides que se encuentran en todas las plantas superiores, solamente pocas especies son capaces de producirlos (Flamini et al., 2013). Los estilbenos son fitoalexinas, compuestos producidos por las plantas en respuesta al ataque de hongos, bacterias y virus patógenos. El resveratrol es el estilbeno más común (Crozier et al., 2007).
- Flavonoides C₆-C₃-C₆: Los flavonoides presentan un esqueleto común de difenilpirano, formado por dos anillos de aromáticos (A y B) conectados por un puente de tres carbonos (C). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8 y los del anillo B desde 2' al 6', como se muestra en

la Fig. 3. Las principales subclases de flavonoides son las flavonas, flavonoles, flavan-3-oles, isoflavonas, flavanonas y antocianidinas.

- Fenoles complejos:
 - Taninos condensados (proantocianidinas) ($C_6-C_3-C_6$)_n: Las proantocianidinas se sintetizan a partir de monómeros simples de flavan-3-oles, (+)-catequina y su isómero (-)-epicatequina, generando estructuras oligoméricas y poliméricas (Crozier et al., 2007).
 - Taninos hidrolizables (elagitaninos y galotaninos): Los taninos hidrolizables son derivados del ácido gálico, esta unidad fenólica se esterifica con el grupo hidroxilo de β -D-glucopiranososa, para formar β -glucogalina (1-O-galoil- β -D-glucopiranososa). Posteriormente, la conversión de este monoéster en 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glucopiranososa por una serie de grupos galoil-glucosa; hasta las transformaciones secundarias de este intermediario para producir galotaninos mediante la adición de grupos galoil, o formar elagitaninos monoméricos mediante reacciones de acoplamiento C-C, seguidas de uniones C-O que conduce a derivados diméricos y oligoméricos (Gross, 2009).

Se ha descrito que los flavonoides y los estilbenos poseen diversas funciones, tales como la resistencia de las plantas contra patógenos microbianos y herbivoría, la protección contra la radiación solar, así como en la reproducción en el caso de las antocianinas. Sin embargo, la característica más estudiada de los fenoles es su capacidad antioxidante capaz de remover especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen especies de oxígeno radicales y no radicales (Quideau et al., 2011), con el fin de encontrar compuestos protectores contra enfermedades crónicas relacionadas con

el estrés oxidativo como enfermedades cardiovasculares, cáncer, trastornos neurodegenerativos y desordenes autoinmunes (Vladimir-Kneeve et al., 2012).

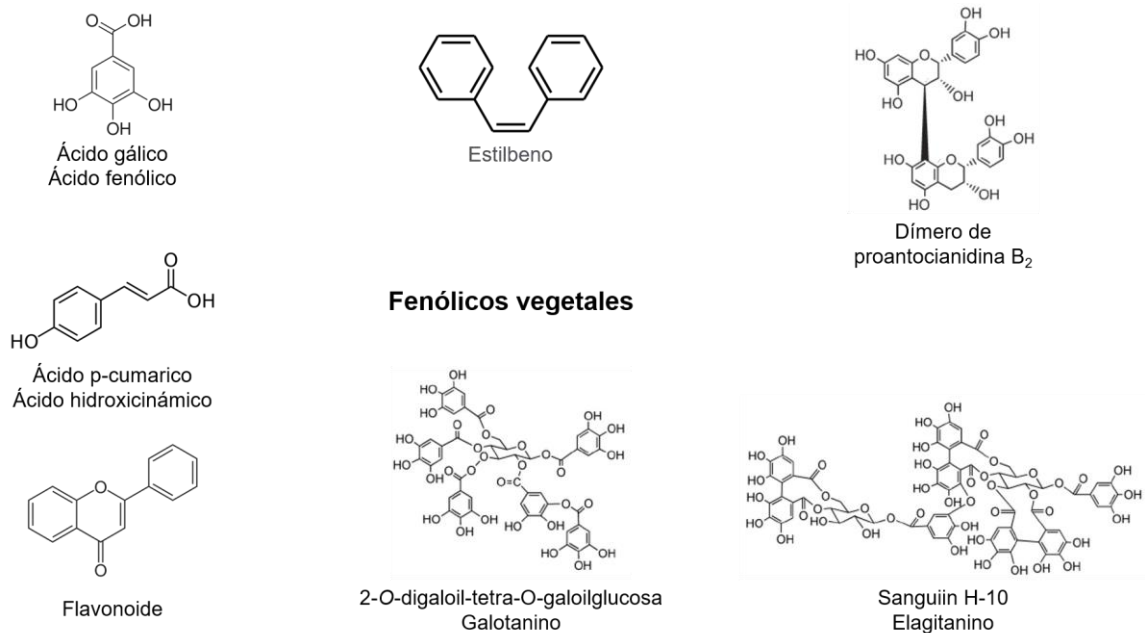


Figura 2. Estructura química de compuestos fenólicos vegetales.

2.2.1 Polifenoles en frambuesa y zarzamora

Rubus fruticosus y *R. idaeus* presentan una amplia variedad de compuestos fenólicos vegetales (Tabla 2). El grupo más abundante de fenoles en el género *Rubus* presentes en *R. fruticosus* y *R. idaeus* dentro de su fruto lo constituyen los elagitaninos₂, siendo los principales lambertianin C y sanguina H-6 (Borges et al., 2010; Vrhovsek et al., 2006, 2008). Otros fenólicos complejos reportados son conjugados de ácido elágico y en el caso de *R. idaeus* las proantocianidinas (Lee et al., 2012). De igual manera, otras subclases de fenólicos descritos han sido las antocianinas, las cuales en estas especies se encuentran en su mayoría basadas en cianidina en su forma no acilada. Sin embargo, en *R. idaeus* también se ha encontrado, aunque en niveles menores antocianinas basadas en pelargonidina (Lee et al., 2012). Por último, en estas dos especies se han identificado monómeros fenólicos tal como flavanoles (catequina y epicatequina), flavonoles glicosilados (quercetina y kaempferol) y ácido elágico (derivado de elagitaninos). No obstante, el porcentaje de cada grupo varía, en otras especies pertenecientes al género *Rubus* los flavanoles, flavonoles y ácido elágico

representan alrededor del 5% de la composición fenólica total mientras que la cantidad de antocianinas y elagitaninos representan del 25 al 40% y 50 al 70%, respectivamente (Mertz et al., 2007).

Tabla 2. Polifenoles reportados en el fruto de *Rubus fruticosus* y *R. idaeus*. Modificado de Lee et al. (2012).

	Zarzamora - <i>Rubus fruticosus</i>	Frambuesa - <i>Rubus idaeus</i>
Fenoles monoméricos	Flavanoles: catequina y epicatequina Flavonoles glicosilados: quercetina y kaempferol Ácido elágico	Flavanoles: catequina y epicatequina Flavonoles glicosilados: quercetina y kaempferol Ácido elágico y ácidos elágicos derivados
Fenoles complejos	Elagitaninos: lambertianin C y sanguina H-6 Conjugados de ácido elágico	Elagitaninos: lambertianin C y sanguina H-6 Conjugados de ácido elágico Proantocianidinas
Antocianinas	Base cianidina	Base cianidina y pelargonidina

2.3. Flavonoides

Los flavonoides comprenden una de las clases más grandes de fenólicos vegetales, de los cuales se han identificado más de 6,000 compuestos diferentes (Ferrer et al., 2008). Los flavonoides presentan un esqueleto común de difenilpirano, formado por dos anillos de aromáticos (A y B) conectados por un puente de tres carbonos (C) (Fig. 3), la conjugación entre los anillos A y B permite un efecto de resonancia del núcleo aromático que brinda estabilidad al radical flavonoide que contribuye en su actividad antioxidante (Heim et al., 2002). En las plantas, los flavonoides poseen una amplia variedad de actividades biológicas como actividad antioxidante, señales visuales y aromas en flores y frutos para atraer a polinizadores y dispersores de semillas, protección frente a los rayos UV, compuestos alopáticos, defensa contra los fitopatógenos y control del transporte auxinas (Kitamura, 2006; Panche et al., 2016). De igual manera, los flavonoides se han asociado a diversos efectos que promueven la salud por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y

anticancerígenas, siendo considerados un componente clave en aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas (Panche et al. 2016).

La ruta de biosíntesis de los flavonoides (Fig. 3) inicia previamente a través de la vía fenilpropanoide, transformando la L-fenilalanina en trans-cinamato (o ácido cinámico) por medio de la fenilamonio liasa (PAL). Posteriormente, la chalcona sintasa (CHS)

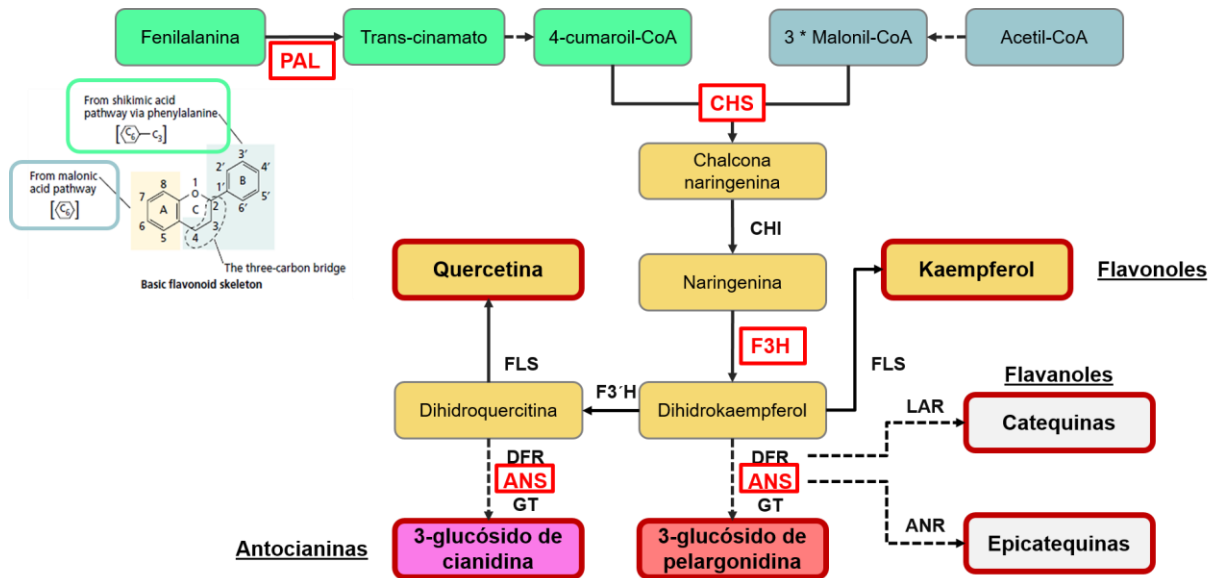


Figura 3. Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de flavonoides en *Rubus*. Abreviaciones: PAL, fenilamonio liasa; CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; DFR, dihidroflavonol reductasa; LAR, leucoantocianidina reductasa; ANS, antocianidina sintasa; ANR, antocianidina reductasa; GT, glicosiltransferasa; FLS, flavanol sintasa. Modificado de Liu et al. (2018). Esqueleto básico de flavonoide, tomado de Taiz y Zeiger (2010).

forma chalcona naringenina para dar inicio a la biosíntesis de los flavonoides, a partir de este intermediario es que se derivan todos los flavonoides (Falcone Ferreyra et al., 2012); esta reacción emplea una molécula de 4-cumaroil-CoA (generado a partir de la vía fenilpropanoide) y tres moléculas de malonil-CoA (generadas a través de la vía acetato/malonato). Si bien en las plantas la vía central para la biosíntesis de flavonoides se encuentra conservada, según la especie, diferentes enzimas tales como isomerasas, reductasas, hidroxilasas y dioxigenasas dependientes de $Fe^{2+}/2$ -oxoglutarato modifican el esqueleto flavonoide básico generando las subclases de este grupo de fenoles (Martens et al., 2010). Además, grupos de tranferasas pueden también cambiar el esqueleto del flavonoide mediante la adición de carbohidratos,

grupos metilo y/o acilo, variando su actividad fisiológica al cambiar su solubilidad, reactividad e interacción con objetivos celulares (Bowles et al., 2005; Ferrer et al., 2008). Los flavonoides se pueden subdividir de acuerdo con el carbono del anillo C en el que se une el anillo B y el grado de insaturación y oxidación del anillo C como son: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, flavanoles, antocianinas y chalconas.

Las antocianinas representan la subclase más amplia de flavonoides pigmentados, donde se ha logrado identificar en la naturaleza más de 600 compuestos (Smeriglio et al., 2016). Las antocianinas son polifenólicos glicosilados con una gama de colores que se distribuyen entre naranja, rojo, púrpura y azul en flores, frutos y tejidos vegetativos. La biosíntesis de las antocianinas se inicia a partir de la chalcona naringenina, la cual se transforma en naringenina por la chalcona isomerasa. Después, la naringenina es hidroxilada por la flavanona-3-hidroxilasa (F3H) convirtiéndose en dihidrokaempferol, este intermediario puede seguir dos rutas: puede hidroxilarse nuevamente por la flavonoide-3'-hidroxilasa para generar dihidroquercetina o por la flavonoide-3',5'-hidroxilasa para formar dihidromiricetina. Estas tres moléculas (dihidroflavonoles) se reducen por la dihidroflavonol reductasa (DFR) para obtener leucopelargonidina, leucocianidina o leucodelfinidina, respectivamente, denominados como leucoantocianidinas. A partir de este punto, la antocianidina sintasa genera pelargonidina, cianidina o delfinidina.

Las antocianinas protegen a las plantas contra diversos estreses bióticos y abióticos que son debido a sus propiedades antioxidantes (Chalker-Scott, 1999; Ahmed et al., 2014). Esta alta actividad antioxidante ha sido ampliamente estudiada por los beneficios asociados a la salud humana (Pojer et al., 2013). Se ha descrito que las antocianinas ofrecen protección contra ciertas enfermedades asociadas al estrés oxidativo relacionadas con la edad, cáncer, enfermedades cardiovasculares; así como actividad antiinflamatoria, antidiabética y prevención de la obesidad (Gutierrez et al., 2017; Khoo et al., 2017), así como la capacidad para modular las vías de señalización de las células de los mamíferos (Meiers et al., 2001; Williams et al., 2004).

2.3.1. Enzimas clave en la vía fenilpropanoide/flavonoide

La PAL, CHS, F3H y ANS constituyen enzimas importantes en la vía fenilpropanoide/flavonoide. La PAL es una enzima homotetramérica, que da inicio a la vía fenilpropanoide, que cataliza la desaminación no oxidativa de L-fenilalanina para producir trans-cinamato, esta reacción es un punto clave en el que se controla el flujo de carbono (Kumar y Ellis, 2001; Saito et al., 2013). Se han reportado cuatro isoformas de esta enzima en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh; sin embargo, AtPAL1 y AtPAL2 son las principales responsables de la formación de fenilpropanoides, donde plantas dobles mutantes *pal1 pal2* disminuyeron tanto la producción de antocianinas y de proantocianidinas (Huang et al., 2010). En la frambuesa se han reportado hasta la fecha, dos isoformas (RiPAL1 y RiPAL2) que son 81% idénticas entre ellas, las cuales se expresan más activamente en flores fertilizadas y en frutos y una expresión moderada en brotes y raíces (Kumar y Ellis, 2001). RiPAL2 presentó dos picos máximos de expresión en flores completamente fertilizadas y en fruto maduro, mientras que RiPAL1 aumento su expresión en frutos verdes inmaduros y su expresión disminuyó a medida que los frutos se acercaban a la madurez, lo cual sugiere que su expresión está controlada por distintas señales (Kumar y Ellis, 2001).

Por su parte, la CHS es la primera enzima en la biosíntesis de todos los flavonoides, la cual pertenece a la familia de policétido sintasa tipo III (PKS). La CHS es una proteína homodimérica que cataliza la condensación de éster de Claisen junto con la liberación de tres moléculas de CO₂, cuatro moléculas de CoA y un tetracétido unido a tioéster, este último sufre una ciclación espontánea que genera naringenina chalcona (Saito et al., 2013). En *A. thaliana* se han reportado tres genes correspondientes a PKS tipo III, de los cuales solamente AtCHS participa en la síntesis de flavonoides (Saito et al., 2013). Borejsza-Wysocki y Hrazdina (1993) fueron los primeros en reportar la actividad enzimática de CHS en cultivos de células en suspensión de frambuesa cv. Royalty. Posteriormente, se han reportado cinco genes en frambuesa correspondientes a PKS tipo III; sin embargo, solamente *PKS1* y *PKS5* han demostrado tener actividad de CHS (Zheng et al., 2001; Zheng y Hrazdina, 2008). En cultivos en células en suspensión de frambuesas *PKS1* es capaz de responder a la inducción por la elicitación con extracto de levadura (Zheng et al., 2001). Por otro lado,

en frutos de frambuesa cv. Royalty, *PKS1* aumentó su expresión durante el desarrollo del fruto, lo que sugiere que pudiera estar relacionada con la biosíntesis de flavonoides, mientras que *RiPKS5* solo presentó un pico de expresión cuando el fruto alcanza su talla máxima con coloración rosada. Siendo este pico *RiPKS5* inferior en comparación con el nivel de expresión de *RiPKS1*, se ha propuesto que probablemente estos dos genes poseen un papel diferente durante el desarrollo del fruto y pueden responder a diferentes estímulos (Zheng y Hrazdina, 2008).

La F3H es una dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato que cataliza la oxigenación en la posición 3 de la naringenina para formar dihidrokaempferol con la consecuente producción de CO₂ y succinato, empleando oxígeno y 2-oxoglutarato como co-sustratos (Saito et al., 2013). En *A. thaliana* se ha reportado que el gen TT6 es el único que codifica para una F3H (Saito et al., 2013). Hasta el momento, en frambuesa no se ha reportado genes de esta enzima; sin embargo, varios grupos han publicado el transcriptoma de especies del género *Rubus* permitiendo la identificación putativa de genes correspondientes a F3H (Hyun et al., 2014a, 2014b; García-Seco et al., 2015; Travisany et al., 2019). No obstante, frutos de fresa (*Fragaria × ananassa* (Weston) Duchesne) fueron silenciados mediante RNAi para el gen de F3H donde resultó en la disminución del 98% del contenido de antocianinas comparado con el fruto control; así como de flavonoles, quercetina y kaempferol, 82% y 64%, respectivamente (Jiang et al., 2013), lo que sugiere que la F3H es una enzima clave necesaria para la biosíntesis de flavonoides.

Finalmente, la ANS, también denominada como leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX), cataliza la formación de antocianidina a partir de leucoantocianidina con 2-oxoglutarato y oxígeno como co-sustratos (Saito et al., 2013). En *Arabidopsis*, el gen TT18 codifica para la proteína ANS. Previamente se demostró que el nivel de expresión de ANS en frutos de zarzamora cv. Arapoho aumenta durante el desarrollo de este tejido y su relación con la cantidad de antocianinas (Chen et al., 2012a). Por otro lado, Rafique et al. (2016) reportaron en frutos de frambuesa amarilla, que muestran un bajo contenido de antocianinas, presentan un alelo *ans* inactivo por la inserción de 5 pb en la región codificante que genera un codón de STOP prematuro,

resultando en una proteína truncada que conduce a la pérdida de la función de la proteína codificada, generando este fenotipo amarillo.

2.3.2. Regulación de la ruta de biosíntesis fenilpropanoide/flavonoide

Varios grupos han realizado esfuerzos por entender cómo se regula la ruta de biosíntesis fenilpropanoide/flavonoide, al comprender los aspectos básicos de esta vía es posible diseñar estrategias para mejorar la producción de flavonoides, y ser utilizados con fines farmacológicos, alimenticios y cosméticos (Ananga et al., 2013; Shi y Xie, 2014). Se ha observado que en diferentes especies (*Petunia hybrida*, *Perilla frutescens*, *Zea mays* y *A. thaliana*) la regulación de la expresión de genes de biosíntesis fenilpropanoide/flavonoide son a través de un complejo integrado por factores de transcripción R2R3 MYB, factores de transcripción basic helix-loop-helix (bHLH) y proteínas de repetición WD, denominado complejo MBW (Stracke et al., 2007).

En la familia de Rosaceae, se ha descrito que el factor R2R3 MYB10 se expresa durante la maduración del fruto de las siguientes especies: manzana (*Malus × domestica* Borkh.), cereza (*Prunus avium* L.) y la fresa (*Fragaria vesca* L. y *F. ananassa*); además se ha visto que existe una correlación entre la expresión de este factor y el aumento de los niveles de antocianina (Espley et al., 2007; Wang et al., 2016). Lin-Wan et al. (2010) reportaron la secuencia del gen MYB10 en *R. idaeus*, que al ser expresado con el cofactor bHLH indujo la zona del promotor de la DFR de *Arabidopsis*, en hojas transformadas de *Nicotianum benthamiana*. Asimismo, en frutos silenciados mediante RNAi para el factor MYB10 en *F. ananassa* cv. Camarosa, se ha demostrado que provoca una reducción en los niveles de expresión de genes involucrados tanto en la vía fenilpropanoide/flavonoide (PAL, CHS, CHI, F3H y DFR) como en la ruta del Shikimato (Shikimato dehidrogenasa), que es responsable de la síntesis de la fenilalanina (Medina-Puche et al., 2014).

Los factores de transcripción MYB poseen diversos roles como: MYBs específicos de flavonoles y proantocianidinas (Bogs et al., 2007; Stracke et al., 2007), MYBs que controlan la vía de biosíntesis de las antocianinas, así como su conjugación, su transporte a la vacuola (Tohge et al., 2005) y la acidificación de este organelo que

modifica el color de diversos tejidos (Quattrocchio et al., 2006). No obstante, en la familia Rosaceae, la formación del complejo MBW todavía no ha sido completamente elucidada, aunque Jin et al. (2016) han reportado la formación de un putativo complejo MBW en *Prunus avium*. En conjunto, todos estos datos indican claramente que MYB10 desempeña un rol regulatorio general en la vía fenilpropanoide/flavonoide en la familia Rosaceae.

Se ha demostrado que la regulación del complejo MBW y genes de la vía fenilpropanoide/flavonoide se encuentran regulados por el estrés biótico y abiótico (Shi y Xie, 2014). Además, la luz es considerada uno de los factores ambientales más importantes que afecta la biosíntesis de las antocianinas (Ananga et al., 2013; Shi y Xie, 2014). En plántulas *Arabidopsis* se ha demostrado que, en condiciones de luz de alta intensidad, la producción de antocianinas y la expresión de todos los genes de su biosíntesis se incrementaron, probablemente a través de la expresión de miembros del complejo MBW (Rowan et al., 2009). EL nitrógeno es un elemento que también se ha asociado con la biosíntesis de flavonoides. Se ha reportado que plántulas de *Arabidopsis* sometidas a condiciones deficientes de nitrógeno, la acumulación de flavonoles y antocianinas se vio aumentada, de igual manera los factores MYB y bHLH se encontraron sobrerregulados (Lea et al., 2007). Por último, también se ha observado que el jasmonato incrementa la biosíntesis de antocianinas. Las proteínas de dominio ZIM jasmonato (proteínas JAZ) pueden interactuar con las regiones C-terminal de factores bHLH y MYB lo que interfiere en la activación del complejo MBW. El jasmonato induce la degradación de las proteínas JAZ a través de la formación del complejo ubiquitina ligasa E3 SCF-COI1, basado en CORONATINE INSENSITIVE1 (Fig. 4), permitiendo la producción de antocianinas (Pauwels y Goossens, 2011; Qi et al., 2011).

En la familia Rosaceae, varios grupos han reportado la regulación de factores MYB bajo condiciones de estrés abiótico. En condiciones de luz de alta intensidad, los

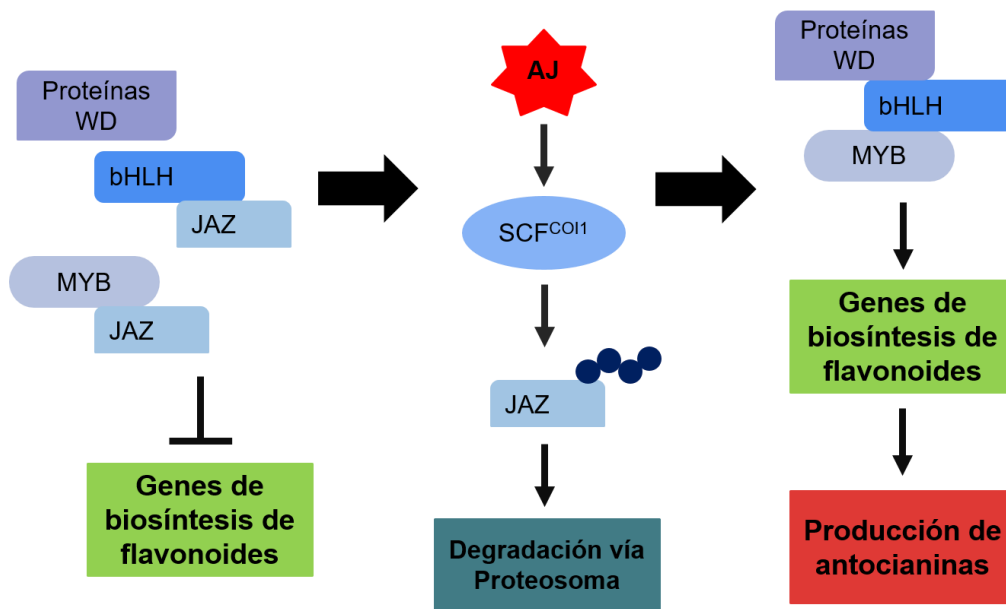


Figura 4. Mecanismo propuesto de degradación de las proteínas de dominio-ZIM jasmonato (proteínas JAZ) a través de la inducción de jasmonato (AJ) para la formación del complejo MBW y la producción de antocianinas (Qi et al., 2011). Factores de transcripción R2R3 MYB; bHLH, Factores de transcripción basic helix-loop-helix; Proteínas de repetición WD; SCF-COI1, Complejo ubiquitina ligasa E3 SCF-COI1; JAZ, proteínas de dominio-ZIM jasmonato. Con base en Pauwels y Goossens (2011) y Qi et al., (2011).

pétalos de *F. vesca* se volvieron pigmentados y los niveles de transcripción de MYB10 aumentaron (Lin-Wang et al., 2010). En *F. ananassa* la expresión del factor MYB10 en la maduración del fruto es reprimido por auxinas e inducido por ácido abscísico (ABA) y estrés hídrico (que induce el incremento de ABA) (Medina-Puche et al., 2014). Lo que demuestra que MYB10 participa en la regulación en la acumulación de antocianinas.

Por otro lado, García Seco et al. (2015a) a través de la estimulación biótica de zarzamora (*Rubus spp.* cv. Lochness) por rizobacterias (*Pseudomonas fluorescens* N21.4), generó cambios en la expresión de diferentes genes de la vía fenilpropanoide/flavonoide a lo largo del desarrollo del fruto. Si bien, no se determinaron cambios en la expresión de factores homólogos MYB y bHLH, el estrés biótico también pudo generar cambios en la concentración de diferentes flavonoides.

Aunque en este proyecto la búsqueda de factores de transcripción pertenecientes al complejo MBW no es un objetivo, al emplear las variables que generaron estrés, como

ácido jasmónico y extracto de levadura, es probable esperar cambios en la expresión de genes relacionados a la ruta de biosíntesis fenilpropanoide/flavonoides en nuestros cultivos.

2.4. Cultivo de células en suspensión

La biotecnología vegetal constituye una rama de la biotecnología, la cual ha sido aplicada para mejorar la producción de metabolitos secundarios para el tratamiento o prevención de diferentes enfermedades a través del cultivo de células vegetales (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004).

La zarzamora y la frambuesa son dos especies que, por su valor comercial, se han desarrollado diversos protocolos de micropropagación. Sin embargo, debido a las problemáticas generadas por las variaciones climáticas de temporada de los cultivos, la contaminación ambiental y la sobreexplotación de especies o variedades amenazadas, el cultivo de células en suspensión resulta una buena alternativa para obtener una producción continua y homogénea de algunos flavonoides generados por las plantas. En este punto a partir células desdiferenciadas totipotentes es posible a través de cultivos de células en suspensión aumentar los rendimientos en la obtención de metabolitos secundarios de zarzamora y frambuesa, llegando hasta el desarrollo de biorreactores como se ha logrado en otras especies del mismo género (Nohynek et al., 2014; Oksman-Caldentey y Inzé, 2004).

El cultivo de células vegetales provee una herramienta para analizar y comprender los procesos bioquímicos y fisiológicos de las plantas, mediante el aislamiento y el control de las variables en el modelo. Los cultivos de células en suspensión proporcionan una población celular relativamente homogénea que responde de manera uniforme a diferentes señales tanto abióticas o bióticas (Moscatiello et al., 2013; Mustafa et al., 2011).

La obtención de cultivos de células en suspensión de zarzamora, frambuesa y otras especies del género *Rubus* ha sido previamente reportados. Dziadczyk et al. (2013) publicaron el procedimiento para la inducción de cultivos celulares en suspensión de frambuesa, de una variedad europea. Para ello, se obtuvo la mejor respuesta en la

obtención de callo friable, usando explantes de hojas cultivados en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con ácido indolacético (IAA) 4.0 mg/L y 6-bencilaminopurina (BAP) 1.0 mg/L. Posteriormente, se determinó que los medios MS que generaban las condiciones adecuadas para obtener células en suspensión a partir del callo generado, fueron los adicionados con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 1.0 mg/L o IAA 8.0 mg/L y BAP 1.0 mg/L (Dziadczyk et al., 2013). Por su parte, Schmidt-Durán et al. (2016) determinaron que en *R. adenotrichos* obtuvo una mejor formación de callo en medio MS utilizando 2,4-D 1.5 mg/L, mientras que medio MS libre de hormonas provee el mejor tratamiento para la disgregación y el crecimiento de células en suspensión, además de producir 0.0256 mg de ácido gálico/g de muestra fresca.

2.5. Elicitación

En el género *Rubus*, el contenido de fenólicos vegetales puede variar de acuerdo a factores genéticos (género, especie, cultivar/genotipo) y ambientales (maduración de la fruta, edad de la planta, temporada de crecimiento, locación en campo) (Lee et al., 2012). Por lo que una de las estrategias que se han planteado para mejorar la producción y el contenido de metabolitos secundarios en los cultivos, como son los polifenoles, es el uso y aplicación de elicitores (Poulev et al., 2003; Ruiz-García y Gómez-Plaza, 2013). Los elicitores bióticos son moléculas que tienen un origen biológico, a partir de hongos, bacterias, virus, animales o plantas, que pueden ser lipopolisacáridos, polisacáridos, proteínas e incluso presentar una composición compleja como extractos de levadura (YE, por sus siglas en inglés), que pueden generar cambios fisiológicos en las plantas al someterla a un estrés e inducir el metabolismo secundario. Así, el YE presenta diversos componentes que pueden generar respuestas de defensa en la planta, tales como quitina, oligómeros N-acetilglucosamina, β -glucanos, glicopéptidos y ergosterol, que estarían estimulando el estrés oxidativo y la producción de metabolitos secundarios (Baenas et al., 2014). De igual manera, hormonas vegetales como ácido salicílico jasmonatos (ácido jasmónico (AJ) y metil jasmonato (MJ)) se han considerado elicitores al inducir la expresión de genes relacionados con vías de biosíntesis de diferentes metabolitos (Baenas et al., 2014).

2.5.1. Elicitación en zarzamora y frambuesa

Se ha reportado la aplicación de diferentes elicitores en cultivos de zarzamora y frambuesa. La aplicación de MJ (0.01 o 0.1 mM) en frutos jóvenes (etapa rosada) de frambuesa y zarzamora aumentó el contenido de flavonoides y de antocianinas, generando además en el fruto maduro, un incremento en su capacidad antioxidante (Wang et al., 2007; Wang y Zheng, 2005). De igual manera, Flores y Ruiz del Castillo (2014) reportaron que la aplicación de MJ (0.01 o 0.1 mM) en frutos jóvenes (etapa verde) de diferentes variedades de frambuesa, produjo un aumento en la concentración de flavonoides (quercetina y miricetina) y de ácido elágico, al igual que un incremento en la actividad de PAL, probablemente a que constituye una enzima clave en la vía de biosíntesis de flavonoides, mientras que la flavonol sintasa fue inhibida por este mismo elicitador. Otros grupos han reportado que la inoculación en raíz de rizobacterias de *Pseudomonas fluorescens* N21.4, que promueven el crecimiento de las plantas, estarían actuando como elicitores bióticos incrementando tanto la calidad y rendimiento de los frutos de zarzamora, como el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides, pero sin modificar la concentración de antocianinas (García-Seco et al., 2013, 2015).

Además de la aplicación de elicitores en plantas también se ha evaluado el uso de elicitores en cultivos de células en suspensión en zarzamora y frambuesa. Pedapudi et al. (2000) determinaron que la adición de MJ (12.5, 25 o 50 μ M) a cultivos de células en suspensión de frambuesa, incrementó después 24 horas la concentración de ácido *p*-cumarico, *p*-hidroxifenilbut-3-eno-2-ona (benzalacetona) y *p*-hidroxifenil-2-butanona (cetona de frambuesa), siendo este un efecto transitorio ya que los niveles basales regresan después de 3-4 días). Por otro lado, Forni et al. (2016) evaluaron el uso de elicitadores abióticos frío 5 °C, luz azul (450 nm) y luz roja (675 nm) en células en suspensión de frambuesa y zarzamora. El cultivo de células en suspensión de frambuesa no tuvo cambios en el contenido de fenoles o antocianinas en ningún tratamiento, mientras que en cultivos celulares de zarzamora se observó un aumento en la concentración de antocianinas con el uso de luz roja.

2.5.2. Elicitación con YE y jasmonatos en cultivos de células en suspensión para la producción de flavonoides

El uso de elicidores en cultivos de células en suspensión es una estrategia de producción biotecnológica permitiendo incrementar la producción de metabolitos secundarios, de interés. Cai et al. (2014) reportaron que en células en suspensión de manzana (*Malus x domestica* Borkh.) cv. Cox's Orange Pippin elicidadas con una concentración final de 100 mg/L de YE hubo un incremento significativo de 2.7 y 5.1 veces de ácido clorogénico y ácido *p*-cumárico en el día 3 post-elicitación, respectivamente, y 1.2, 2.5 y 2.6 veces, de ácido 4-hidroxibenzoico, ácido clorogénico y ácido *p*-cumárico en el día 5 post-elicitación, respectivamente. Del mismo modo, en cultivos celulares de manzana cv. Florina elicidadas con una concentración final de 3 g/L de YE hubo un aumento significativo de ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácido 4-cumárico, ácido ferúlico y ácido benzoico) y flavonoides (como rutina) llegando a su máximo 48 h post-elicitación, precedido por un aumento en la actividad enzimática de PAL (Sarkate et al. (2017). No obstante, Cai et al. (2012) en cultivos de células en suspensión de *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Fréaux elicidadas con una concentración final de 100 mg/L de YE no hubo diferencias en la producción de antocianinas.

Por otro lado, Fang et al. (1999) en cultivos de células en suspensión de *Vaccinium pahalae* elicidadas con MJ a una concentración final de 0.5 μ M estimuló la producción de antocianinas. Igualmente, Qu et al. (2011) en cultivos celulares de *V. vinifera* L. cv. Gamay Fréaux incrementó la concentración de antocianinas al ser elicidadas con MJ a una concentración final de 0.223 μ M. También se ha reportado que en cultivos de células en suspensión de *Hypericum perforatum* la adición de MJ con una concentración final de 100 μ M incrementa 2.7 veces la cantidad de flavonoides totales (Wang et al., 2015).

El trabajo publicado por el grupo de Suzuki et al. (2005) en cultivos de células en suspensión del modelo leguminosa *Medicago truncatula* demostró que en esta especie el uso de dos diferentes elicidores (YE vs. MJ) genera cambios en la expresión de genes de diferentes rutas de biosíntesis con respecto al control. En el caso de la elicitación de YE (40 g de glucosa equivalente/L) resultado en un aumento en los

niveles de expresión de PAL y CHS, mientras que al elicitar con MJ (0.5 mM) incremento la expresión de ANS y β -amirina sintasa (Suzuki et al., 2005). Con base en los anteriores estudios mencionados, podemos observar que la elicitación con YE vs jasmonatos genera cambios en la producción de diferentes metabolitos secundarios e induce diferentes genes de la vía de biosíntesis de los flavonoides.

3. Justificación

Rubus idaeus (frambuesa) y *R. fruticosus* (zarzamora) producen compuestos fenólicos y flavonoides, de interés, con reconocida actividad farmacológica y antioxidante, entre otros efectos benéficos para la salud. El cultivo de células en suspensión de estas especies ofrece una alternativa para investigar la biosíntesis de estos compuestos, aún poco conocida en estas especies, así como las condiciones que permitan el desarrollo de estrategias biotecnológicas para su producción. La estrategia de utilizar dos diferentes tipos de elicitadores de manera independiente, en el presente estudio (YE vs. AJ) podría permitir diseñar estrategias de producción diferentes dependiendo de los metabolitos de interés.

Con base en lo anterior en el presente trabajo se plantea realizar las condiciones para el establecimiento y mantenimiento de cultivos celulares en suspensión de frambuesa y zarzamora. Así como, el efecto de elicitadores como YE y AJ sobre la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de polifenoles (fenoles, flavonoides y antocianinas) en los cultivos celulares.

4. Hipótesis

La adición de elicitadores a los cultivos celulares de *Rubus fruticosus* provocará cambios diferenciales en el perfil de polifenoles y en los niveles de expresión de importantes genes de su biosíntesis.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar los cambios en el perfil de polifenoles y niveles de expresión de importantes genes de biosíntesis, (fenilamonio liasa (*PAL*), chalcona sintasa (*CHS*), flavanona 3-hidroxilasa (*F3H*) y antocianina sintasa (*ANS*); en cultivos celulares en suspensión de *Rubus fruticosus* bajo condiciones de estrés.

5.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones para el cultivo de células en suspensión de *Rubus idaeus* (frambuesa) y de *Rubus fruticosus* (zarzamora).
- Establecer condiciones de la elicitación con ácido jasmónico y extracto de levadura en cultivos celulares de *Rubus fruticosus*.
- Analizar los cambios en los niveles de expresión génica de *PAL*, *CHS*, *F3H* y *ANS* en cultivos elicitados de *Rubus fruticosus*.

6. Materiales y métodos

6.1. Material vegetal

6.1.1. Cultivo *in vitro* de plántulas de zarzamora y frambuesa

Las semillas de *Rubus fruticosus* (zarzamora) y *Rubus idaeus* (frambuesa) fueron obtenidas de frutos maduros distribuidos por la empresa Naturipe® y Driscoll's®, respectivamente. Los frutos fueron homogeneizados mediante el uso de una licuadora comercial, la pulpa fue descartada y se colectaron las semillas mediante el uso de una malla coladora. Posteriormente, las semillas lavadas fueron sometidas a un pretratamiento con H₂SO₄ puro, 3 horas para las semillas de zarzamora y 1 hora para las semillas de frambuesa, condiciones que han sido reportado que inducen la germinación en especies del género *Rubus* al romper la dormancia mediante la escarificación de la testa (Wada y Reed, 2011a, 2011b). Al término del tratamiento de H₂SO₄, las semillas fueron lavadas 3 veces con agua desionizada y se llevó a cabo su desinfestación en el siguiente orden en condiciones bajo una campana flujo laminar: 1) solución de cloro comercial 50% (NaClO 2.5% m/v) por 15 minutos, 2) tres lavados de agua desionizada estéril.

Se colocaron 50 semillas por especie en cajas Petri estériles de 100 x 15 mm conteniendo 25 mL medio (MS) Murashige y Skoog (1962) con ½ de la concentración de las sales inorgánicas, al que se le adiciono 1% (P:V) de sacarosa y 2 g/L de Gelrite a un pH ajustado de 5.8, antes de esterilizarlos en autoclave. Las placas con las semillas fueron colocadas a 4 °C durante 48 horas para su sincronización, posteriormente se colocaron en fotoperíodo largo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25 °C. Después de 3 semanas las semillas germinadas fueron sembradas en medio MS completo adicionado con 2% (P:V) de sacarosa, 0.5 mg/L de ácido indolacético (IAA) y 2 g/L de phytigel (Sigma), a un pH ajustado de 5.8, en condiciones de fotoperíodo largo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25°C.

6.1.2. Micropropagación de zarzamora y frambuesa

A partir de plántulas germinadas *in vitro* se seleccionaron diferentes tipos de explantes para su micropropagación. En condiciones de esterilidad se procedió a seleccionar

hojas jóvenes y nodos (0.5 cm) de plántulas de frambuesa y zarzamoras. Los explantes fueron cultivados en medio MS completo adicionado con 3% (P:V) de sacarosa, 2 g/L de phytigel (Sigma), 1 o 2 mg/L de bencilaminopurina (BAP) y 0.1 o 0.5 mg/L de IBA, a un pH ajustado de 5.8, antes de esterilizarlos en autoclave, y se colocaron en condiciones de fotoperiodo largo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25 °C. Después de 1 mes los brotes generados fueron aislados y subcultivados en medio MS completo adicionado con 2% (P:V) de sacarosa, 2g/L de phytigel (Sigma), 0.5 mg/L de ácido indolacético (IAA), a un pH ajustado de 5.8, en condiciones de fotoperiodo largo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25°C.

6.1.3. Cultivo *in vitro* de callo de zarzamora y frambuesa

A partir de las plántulas micropropagadas, generadas *in vitro* en medio MS con 0.5 mg/L de IAA de 2 meses y medio de edad, las hojas jóvenes se emplearon como explantes y se colocaron en medio MS o Gamborg B5 (Gamborg et al., 1968) completos llamados medios de inducción de callos adicionados con 3% (P:V) de sacarosa, 2 g/L de phytigel, 0.1 mg/L de cinetina (KIN) y 1, 2 o 3 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o 2, 3 y 4 mg/L de NAA a pH ajustado de 5.8, antes de ser esterilizados en autoclave, en condiciones de oscuridad a 25 °C. Posteriormente, se subcultivaron los callos generados de zarzamora en medio MS completo llamados medios de callos de resiembra adicionado con 3% (P:V) de sacarosa, 2 g/L de phytigel, 50 mg/L de L-cisteína suplementado con 0.1 mg/L de KIN y 3 mg/L de NAA o 0.1 mg/L de KIN y 2 mg/L de 2,4-D a pH ajustado de 5.8, en condiciones de oscuridad a 25 °C. Mientras que los callos generados de frambuesa se subcultivaron en medio MS completo adicionado con 3% (P:V) de sacarosa, 2 g/L de phytigel, 0.1 mg/L de KIN, 2 mg/L de 2,4-D y 50 mg/L de L-cisteína a pH ajustado de 5.8, en condiciones de oscuridad a 25 °C.

6.1.4. Cultivo *in vitro* de células en suspensión de zarzamora y frambuesa

Los callos de zarzamora generados del medio Gamborg B5 suplementado con 2 mg/L de 2,4-D, 0.1 mg/L de KIN y 50 mg/L de L-cisteína en condiciones de oscuridad fueron seleccionados para proceder a su cultivo en suspensión. Empleando 3 g de peso fresco (PF) de callo fueron disgregados en matraces Erlenmeyer de 125 mL

conteniendo 50 mL de medio MS o Gamborg B5 completos adicionados con 3% (P:V) de sacarosa, a pH ajustado de 5.8, adicionados con 0.1 mg/L de KIN y 2 mg/L de 2,4-D o 3 mg/L de NAA como reguladores de crecimiento, usando agitación orbital constante de 110 rpm y bajo intensidad de luz continua de $14.63 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o en condiciones de oscuridad, 25 ° C (Tabla 3). Para el establecimiento Las células se subcultivaron cada 3 semanas por dilución v/v (1:5), posteriormente después de 6 semanas fueron transferidos a matraces de 250 mL con un volumen de medio de 75 mL a partir de 5 g de PF de los cultivos celulares establecidos, de los cuales se evaluó el crecimiento calculando la diferencia del peso seco (PS) inicial frente al peso final del tejido. Los cultivos celulares del medio Gamborg B5 adicionado con 3 mg/L de NAA en condiciones de oscuridad fueron llevados a un volumen final de 250 mL en matraz de 1 L, y fueron empleados como inóculo para los experimentos de elicitación y el ensayo de cinética (Fig. 5).

Los cultivos de células de suspensión de frambuesa se originaron de los callos producidos en medio MS adicionado con 2 mg/L de 2,4-D, 0.1 mg/L de KIN y 50 mg/L de L-cisteína. Empleando 3 g de PF de callo fueron disgregados matraces de 125 mL con 50 mL de medio Gamborg B5 completos adicionados con 3% de sacarosa, a pH ajustado de 5.8, suplementado con 3 mg/L de NAA, usando agitación orbital constante de 110 rpm y bajo condiciones de oscuridad 25 °C. Para el establecimiento del cultivo las células fueron subcultivadas cada 3 semanas por dilución v/v (1:5). Los cultivos celulares establecidos fueron llevados a un volumen final de 250 mL en matraz de 1 L.

Tabla 3. Abreviaturas de los medios de cultivo células en suspensión.

Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Condiciones de cultivo	Abreviatura
Murashige & Skoog	2.0 mg/L de 2,4-D + 0.1 mg/L de KIN	Oscuridad	M21-O
Murashige & Skoog	2.0 mg/L de 2,4-D + 0.1 mg/L de KIN	Luz continua	M21-L
Gamborg B5	2.0 mg/L de 2,4-D + 0.1 mg/L de KIN	Oscuridad	B21-O
Gamborg B5	2.0 mg/L de 2,4-D + 0.1 mg/L de KIN	Luz continua	B21-L
Gamborg B5	3.0 mg/L de NAA	Oscuridad	B30-O

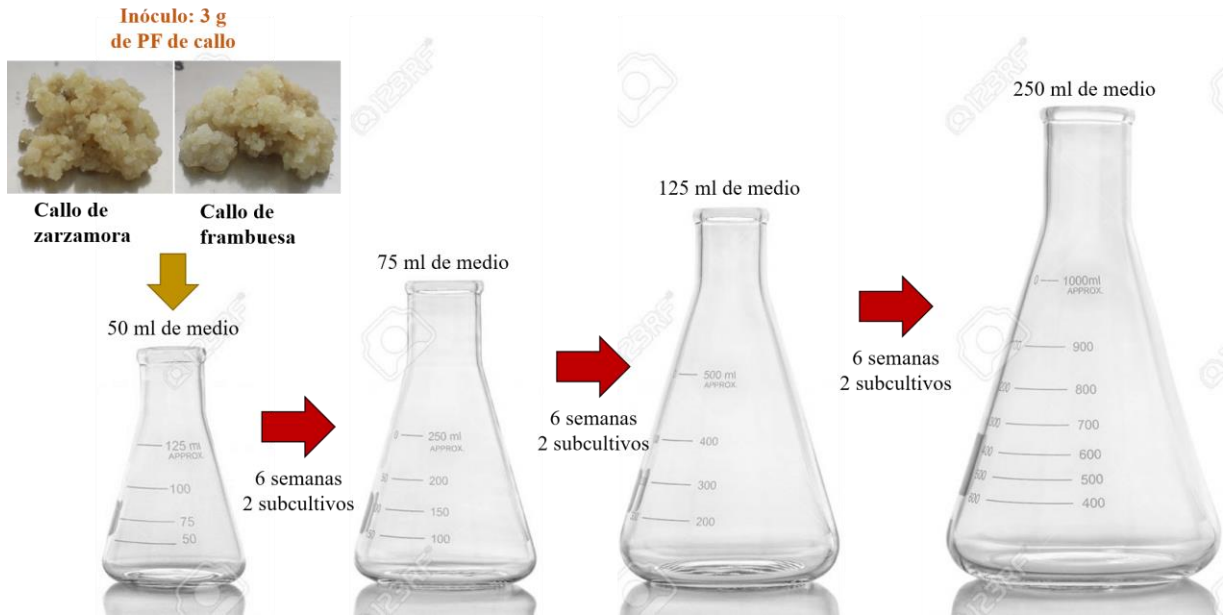


Figura 5. Diagrama de propagación por dilución v/v (1:5) para los cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* y *Rubus idaeus*.

6.2. Cinética de células en suspensión de zarzamora

Los cultivos de células en suspensión de zarzamora generados en medio Gamborg B5 adicionado con 3 mg/L de NAA en condiciones de oscuridad fueron seleccionados para realizar una cinética. Las células obtenidas del cultivo inóculo fueron filtradas y pesadas 5.4 ± 0.34 g de PF y llevadas a matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio Gamborg B5 al 3% (P:V) de sacarosa, pH 5.8 y 3 mg/L de NAA y cultivadas en condiciones de oscuridad a 25 C, y agitación orbital constante de 110 rpm. Posteriormente, se determinó la producción de biomasa, separando las células por filtración, donde se determinó su peso fresco (PF) y peso seco (PS) (llevándolas a sequedad durante 48 h a 37°C), cada tercer día durante 24 días por triplicado.

6.3. Elicitación de cultivo de células de zarzamora

Las células obtenidas del cultivo inóculo (de 3 meses de edad) fueron pesadas (2.5 g PF) e inoculadas en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio Gamborg B5 al 3% (P:V) de sacarosa, pH 5.8 y adicionado con 3 mg/L de NAA. Los cultivos fueron incubados bajo condiciones anteriormente descritas. Después de 7 días de crecimiento (fase exponencial) se adicionaron 1 mL de extracto de levadura (Sigma) disuelto en

agua destilada y previamente esterilizado, para obtener una concentración por frasco de 1.0 mg/mL, o por aplicación de 20 µL de solución de ácido jasmónico (AJ) disuelto en etanol puro para obtener una concentración final de 200 µM. Se utilizó 20 µL de etanol puro para el tratamiento control, las soluciones alcohólicas fueron esterilizadas por filtración a través de membranas de nylon tipo PDVF 0.22 µm. Después de 24 y 72 h post-elicitación las células elicidadas fueron recolectadas por filtración, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas en congelación (-80 °C) para su análisis posterior. La elicitación se realizó por triplicado para cada condición.

6.4. Análisis de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de flavonoides

Se analizaron los cambios en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de flavonoides bajo el tratamiento de elicitación con 1 mg YE/mL y 200 µM de AJ a los cultivos de células en suspensión de zarzamora como se describe anteriormente 6.3. Para lo cual se hizo una selección de genes claves en la ruta de fenilpropanoides/flavonoides.

6.4.1. Identificación de secuencia de genes a partir de bases de datos

Se desarrolló una búsqueda de las enzimas involucradas en la vía fenilpropanoides (fenilamonio liasa (*PAL*)) y la vía de biosíntesis de flavonoides (chalcona sintasa (*CHS*), flavanona 3-hidroxilasa (*F3H*) y antocianina sintasa (*ANS*)), reportadas en *Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh. en el sitio <https://www.arabidopsis.org/>. Para cada proteína se realizó un tBLASTn aplicando como criterio organismo “*Rubus* (taxid:23216)” en la plataforma <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, se seleccionaron aquellos genes con un porcentaje de cobertura $\geq 90\%$, un umbral de E $> 10^{-10}$ y porcentaje de identidad $\geq 80\%$. Por último, se descargó el transcriptoma disponible de *Rubus idaeus* cv. Heritage reportado por Travisany et al. (2019), en la plataforma Genome Database for Rosaceae. (<https://www.rosaceae.org/>, Jung et al., 2019). Utilizando el programa Bioedit 7.0.4 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) se realizó un tBlastn de las enzimas obtenidas del género *Rubus* en National Center for Biotechnology Information (NCBI) para encontrar los mRNA correspondientes a los genes antes mencionados.

Para la selección del gen de referencia se empleó el gen de Histona H4 (*HisH4*), que ha sido reportado, que se expresa de manera más estable ante diferentes condiciones experimentales en fresa (*Fragaria x ananassa*) (Zhang et al., 2018), perteneciente a la misma familia y subfamilia (Rosoidae) que el género *Rubus*. Para la identificación de este gen en *Rubus idaeus* se realizó un tBLASTn empleando el programa Bioedit 7.0.4 utilizando la secuencia de aminoácidos para la proteína de *HisH4* de la fresa en el transcriptoma de *R. idaeus* cv. Heritage para seleccionar la secuencia correspondiente al mRNA de este gen, dado que no se encuentra reportado en la plataforma NCBI.

6.4.2. Diseño de oligonucleótidos para ensayos de qPCR

Se realizó un alineamiento con las secuencias de genes reportados en el género *Rubus* y de las secuencias del transcriptoma de *R. idaeus* (Anexo 1) para determinar las zonas que presentaran menor variación en las secuencias de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos fueron diseñados empleando el sitio web Primer3plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) empleando los parámetros estándar, a excepción de los siguientes parámetros: rango de tamaño de productos 150-200 pb, tamaño de primer 20-27 (óptimo 21) y temperatura de fusión (T_m) del primer 63-66°C (óptima 64.5°C, diferencia máxima de T_m 1°C). Para la determinación de la estructura secundaria y la dimerización, se utilizó el sitio web "Beacon designer Free Edition" (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>). Se seleccionaron el par de oligonucleótidos con valores de $\Delta G > -5$. Para la selección del par de oligonucleótidos que no amplifican los productos de PCR que forman estructuras secundarias con doble T_m , se utilizó la herramienta bioinformática uMELT (Dwight et al., 2011) con los siguientes parámetros: [Mono⁺] 50 mM y free [Mg⁺⁺] 1.5 mM.

6.4.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

El RNA fue extraído empleado el método reportado por Huded et al. (2018) con algunas modificaciones descritas a continuación. Las células (250 mg de PF) fueron pulverizadas con mortero y pistilo de porcelana en nitrógeno líquido junto con 0.12 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Se adicionó 1.5 mL de buffer de extracción (30 g/L

CTAB, 20 g/L polivinilpirrolidona (PVP) K-30, 200 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl y 2% β -mercaptoetanol, descrito por Chen et al. (2012b), previamente calentado por 5 minutos a 65°C, a las células y el PVPP y se molieron en conjunto en nitrógeno líquido. Se transfirió el material a tubos nuevos de 15 mL y se incubó a baño María por 20 min a 65°C, se dejó enfriar por 2 min en hielo. Se adicionó 750 μ L de fenol y 750 μ L de cloroformo, se agitó por vórtex por 2 min y se dejó 5 min en hielo. El tubo fue centrifugado a 5,000 g a 4°C por 30 min y el sobrenadante se transfirió a tres tubos de 2 mL (500 μ L del sobrenadante a cada tubo), a los cuales se les adicionó 150 μ L de acetato de potasio 3 M (pH 5), 175 μ L de fenol y 175 μ L de cloroformo. Los tubos fueron mezclados vigorosamente por 30 s y mantenidos por 10 min a -20°C y centrifugados a 15,000 g a 4°C por 10 min. El sobrenadante colectado fue transferido a tubos nuevos de 1.5 mL, se le adicionó 50 μ L de acetato de sodio 3 M (pH 5) y 500 μ L de isopropanol frío y fueron agitados brevemente por vórtex, para después ser incubados a -20°C por 2 horas y finalmente centrifugados a 15,000 g por 15 min a 4°C. El pellet obtenido fue lavado con etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 15,000 g por 15 min a 4°C. El etanol fue eliminado cuidadosamente, mientras el RNA se pudo observar al fondo en la parte inferior de las paredes del tubo. Finalmente, el RNA obtenido se disolvió en 5 μ L de agua desionizada estéril por 5 min a 60°C y se juntaron los pellets, obteniendo un volumen final de 15 μ L.

La concentración y la pureza del RNA obtenido se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo scientific) y su integridad se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en condiciones desnaturalizantes con tinción de bromuro de etidio. La contaminación con DNA genómico se eliminó con el kit de DNAasa I #ENO521 (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cDNA fue sintetizado a partir de 1 μ g de RNA utilizando el kit de síntesis de cDNA de primera cadena de RevertAid #K1622 (Thermo Scientific).

6.4.4. Evaluación de la expresión relativa de genes por qRT-PCR

El análisis de RT-qPCR para cada gen se realizó empleando 1.5 μ L (150 ng) del cDNA en un volumen final de reacción de 16 μ L, con una concentración de oligonucleótidos

de 0.1 μM (0.05 μM para el gen F3H) utilizando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR (Thermo Scientific).

Para la evaluación se utilizó el sistema de detección PCR en tiempo real touch CFX96 (Bio-Rad Laboratories) y el software CFX Manager™, bajo las siguientes condiciones: 50 °C durante 2 min a 1 ciclo, 95 °C durante 10 min a 1 ciclo y luego 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s, alineación y extensión a 60 °C durante 60 s. Para la confirmación de la formación de un sólo producto, se realizó una curva de fusión y un gel de electroforesis al 2% de agarosa. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y para cada uno se utilizó un control negativo de agua libre de nucleasas.

La cuantificación relativa de la expresión génica se calculó a partir de los datos de ΔRn , obtenidos en el análisis de qPCR, los cuales fueron procesados en la aplicación en línea "MINER" (<http://ewindup.info/miner/>) para obtener los valores de eficiencia (E) y de umbral Ct para cada gen. Los niveles de expresión génica se calcularon a partir del ΔCt (Zhao y Fernald, 2005) usando *HisH4* como gen de referencia y fueron normalizados al valor mínimo para gen y tiempo post-elicitación, respectivamente.

6.5. Análisis estadístico

Los experimentos fueron realizados por triplicado y se reportaron los valores de la media y su desviación estándar. Los resultados fueron sujetos a un análisis de varianza a una vía (ANOVA). Las diferencias significativas entre las medias de los parámetros fueron determinadas aplicando la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

Resultados y Discusión

7.1 Germinación *in vitro* de semillas de *Rubus fruticosus* y *R. idaeus*

Las semillas de la zarzamora (*R. fruticosus*, Fig. 6A izquierda) tienen una morfología ovalada con una longitud de 3 mm y un ancho de 1.5 mm, presentan una testa notablemente reticulada con una región de rafe derecha. Por el otro lado, las semillas de frambuesa (*R. idaeus*, Fig. 6A derecha) tienen una morfología ovalada con una longitud de 2.5 mm y un ancho de 1 mm, presentan una testa reticulada con una región de rafe derecha y un borde inferior cóncavo.

Para la germinación de las semillas se realizó un ensayo con 50 semillas utilizando diferentes tiempos de escarificación en H₂SO₄ concentrado (98%), y su posterior desinfección en condiciones bajo una campana flujo laminar. Las semillas de la frambuesa (*Rubus idaeus*) obtuvieron el mayor porcentaje de germinación de 71.2% al cabo de 3 semanas cuando fueron sometidas a 1 h de escarificación comparado con el conseguido de solo 12.5% con los tratamientos de 30 min y de 20% cuando se expuso las semillas por 2 h (Fig. 6B). En el caso del tratamiento de 3 h ninguna semilla germinó, probablemente debido a que un mayor tiempo de exposición al H₂SO₄ disminuye la viabilidad de las semillas (Wada y Reed, 2011a). No obstante, las plántulas germinadas por el tratamiento de sus semillas no presentan diferencias morfológicas en los tres tiempos de exposición al ácido. Por su parte, en las semillas de zarzamora (*R. fruticosus*) se observó un porcentaje de germinación del 60.3% cuando fueron sometidas a 3 horas de H₂SO₄ (Fig. 6B), siendo el único tratamiento que permitió su germinación al cabo de 3 semanas. Los tratamientos de escarificación permitieron la obtención plántulas *in vitro* de zarzamora (Fig. 6C) y frambuesa (Fig. 6D).

Posteriormente, se evaluó por triplicado el curso de la germinación de *R. idaeus* y *R. fruticosus* en el tiempo (Fig. 7), donde se consideró como semilla germinada aquellas plántulas que presentarán hojas y raíz. En el caso de *R. idaeus* se evaluó el tiempo de escarificación óptimo, después de 1 semana de ser sembradas las semillas con tratamiento de 1 h en H₂SO₄ mostraron $13.89 \pm 4.81\%$ de germinación mientras que las semillas con tratamiento de 30 min en H₂SO₄ mostraron $1.85 \pm 1.60\%$ de

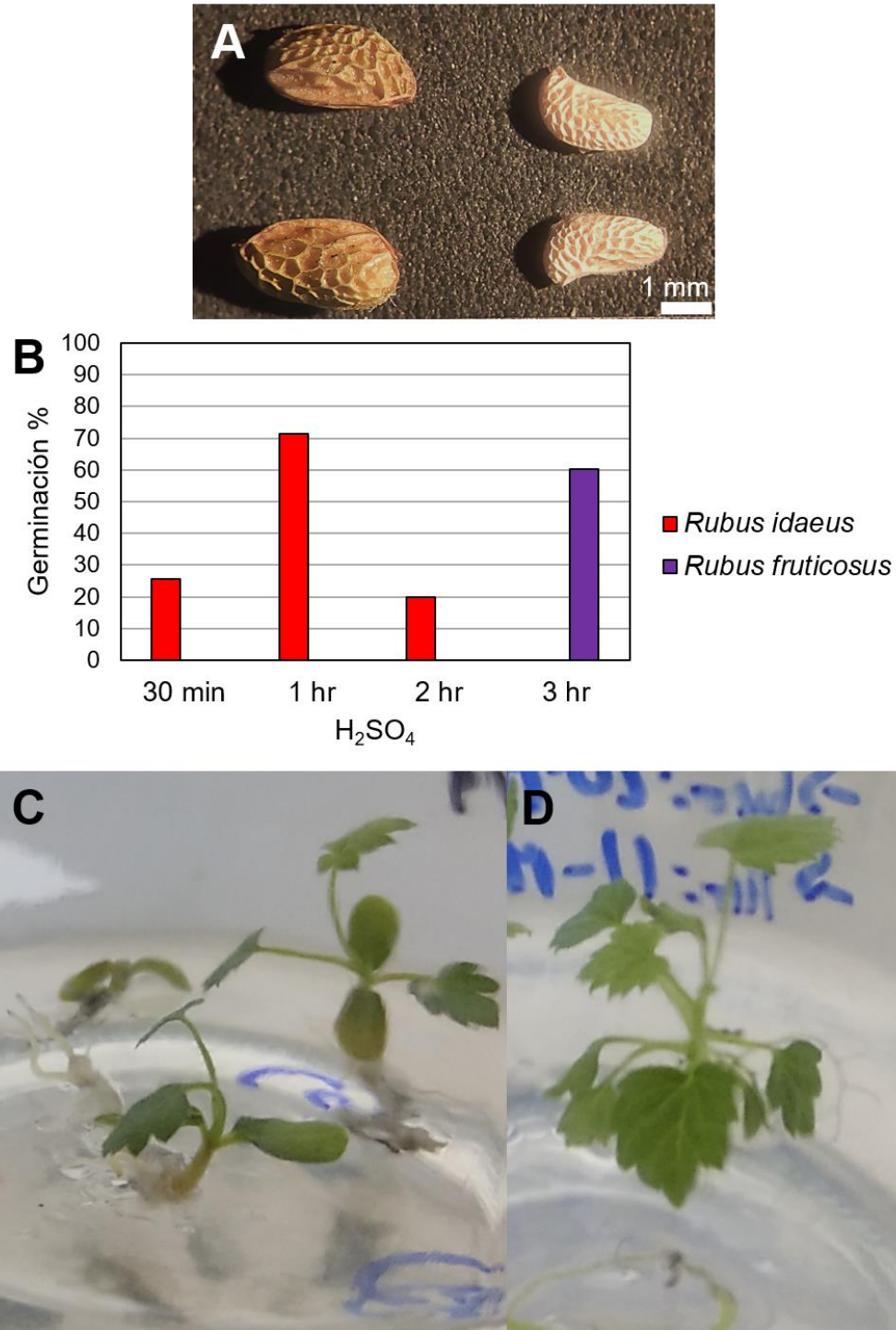


Figura 6. Germinación *in vitro* de semillas de *Rubus fruticosus* y *Rubus idaeus*. A) Semillas de *R. fruticosus* (a la izquierda) y de *R. idaeus* (a la derecha). B) Porcentaje de germinación *in vitro* de *R. fruticosus* y *R. idaeus* después de 3 semanas empleando diferentes tiempos de escarificación con H₂SO₄. C) Plántulas de *R. fruticosus* germinada *in vitro* de 3 semanas de edad, después de iniciada la germinación. D) Plántulas de *R. idaeus* germinada *in vitro* de 3 semanas de edad, después de iniciada la germinación

germinación, en la semana 2 las semillas con 1 h de tratamiento obtuvieron $46.30 \pm 14.25\%$ de germinación en tanto que las semillas con 30 min de tratamiento obtuvieron $12.04 \pm 3.21\%$ de germinación, posteriormente en la semana 3 las semillas con 1 h de tratamiento lograron $61.11 \pm 13.89\%$ de germinación durante ese tiempo las semillas con 30 min de tratamiento obtuvieron $27.78 \pm 5.56\%$ de germinación, y finalmente, en la semana 4 las semillas con 1 h de tratamiento alcanzaron $67.59 \pm 15.30\%$ a la vez que las semillas con 30 min de tratamiento alcanzaron $37.04 \pm 10.52\%$. Las semillas tratadas con 1 h de H_2SO_4 mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) desde la semana 1 post-siembra comparadas con las tratadas con 30 min, mostrando que este tiempo es el adecuado para la germinación *in vitro* de semillas de frambuesa. Lo cual concuerda a lo reportado en especies del mismo subgénero (*Idaeobatus*) que su tiempo de escarificación es de 1 hora en H_2SO_4 para romper la dormancia (Wada y Reed, 2011a, 2011b). Donde reportaron que la escarificación de H_2SO_4 reducía las capas de las semillas, y que además puede tener efectos adicionales sobre la química de la cubierta de la semilla.

En el caso del curso de la germinación de *R. fruticosus* se evaluó el efecto de PVP (150 mg/L) en el medio de cultivo con el fin de mejorar la germinación de sus semillas. Después de una semana, las semillas tratadas con H_2SO_4 por 3 h que fueron germinadas en medio MS con $\frac{1}{2}$ de la concentración de las sales inorgánicas, 1% (P:V) de sacarosa y 2 g/L de Gelrite a un pH ajustado de 5.8, con o sin 150 mg/L de PVP mostraron $1.85 \pm 1.60\%$ de germinación, en la semana 2 las semillas en medio sin PVP obtuvieron $37.04 \pm 8.02\%$ de germinación en tanto que las semillas en medio con PVP obtuvieron $29.63 \pm 11.23\%$, posteriormente en la semana 3 las semillas en medio sin PVP lograron $39.81 \pm 8.02\%$ de germinación durante ese tiempo las semillas en medio con PVP lograron $37.96 \pm 10.52\%$ de germinación, y finalmente, en la semana 4 las semillas en medio sin PVP alcanzaron $43.52 \pm 4.24\%$ de germinación a la vez que las semillas en medio con PVP alcanzaron $47.22 \pm 12.11\%$ de germinación. Los resultados muestran que no hubo diferencias en cuanto al porcentaje de germinación de las semillas con PVP adicionado al medio de cultivo y las semillas control, por lo que demuestra que la adición de PVP no tuvo un efecto en la germinación de las

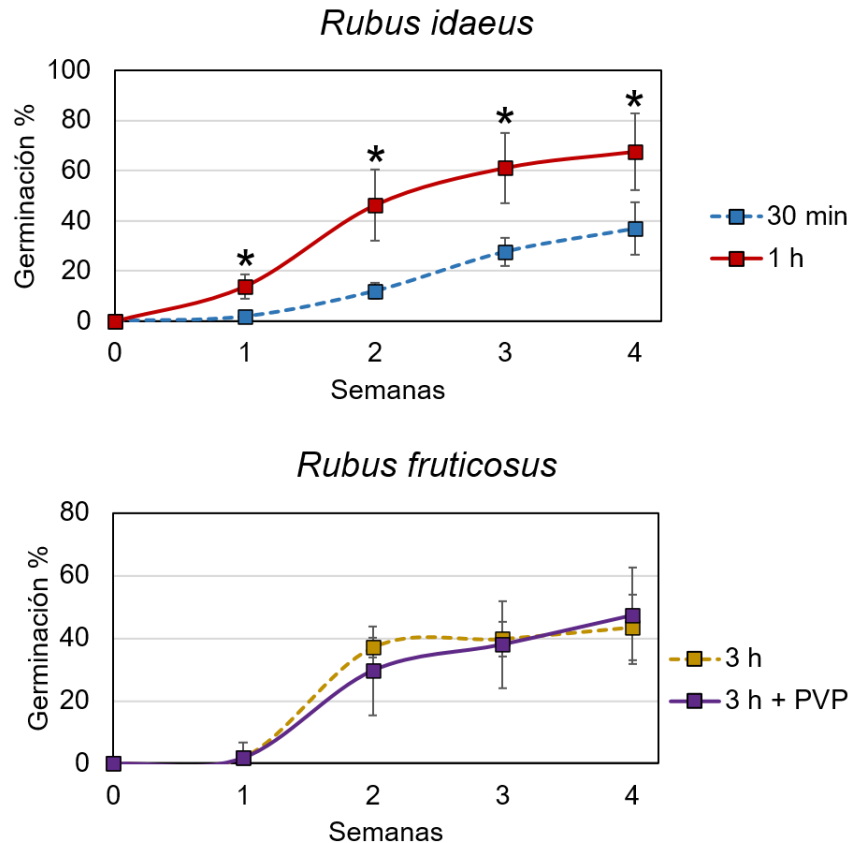


Figura 7. Curso de germinación de *Rubus idaeus* y *Rubus fruticosus* en el tiempo. Se observa el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *R. idaeus* durante 4 semanas, empleando los tratamientos de escarificación de 30 min en H₂SO₄ y 1 h en H₂SO₄ (Panel superior). Se observa el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *R. fruticosus* durante 4 semanas, empleando los tratamientos de escarificación de 3 h en H₂SO₄ y 3 h en H₂SO₄ con 150 mg/L de PVP en el medio MS con ½ de sales inorgánicas (Panel inferior). Cada punto indica la media ± desviación estándar (n=3). * indica diferencias significativas en el mismo tiempo, P <0.05.

semillas de zarzamora. En concordancia a reportes previos de especies del mismo subgénero, *Rubus*, el tiempo de escarificación fue de 3 h en H₂SO₄ para su germinación (Wada y Reed, 2011a, 2011b).

Diversos estudios han descrito que las semillas de la zarzamoras y la frambuesa poseen una dormancia doble causada por una testa dura e impermeable, que restringe la absorción de agua y oxígeno y evita mecánicamente que el embrión se hinche, y además varios mecanismos adicionales como inhibidores químicos, tales como polifenoles (Wada y Reed, 2011a, 2011b). Se ha reportado la presencia de proantocianidinas en la testa de diferentes especies del género *Rubus*, que

aparentemente contribuyen a la dureza de la capa de las semillas y la latencia resultante de las semillas. Esta dormancia puede ser rota si la testa de la semilla es removida o escarificada con agentes químicos, como el H_2SO_4 , para permitir una germinación satisfactoria (Hummer y Peacock, 1994). Los resultados obtenidos demuestran que es necesario la escarificación de las semillas con H_2SO_4 para su germinación *in vitro*, no obstante el tiempo puede variar dependiendo del subgénero al que pertenezca la especie (Wada y Reed, 2011a, 2011b). Se adicionó PVP K-30 a una concentración de 150 mg/L al medio de cultivo en el que fueron sembradas las semillas de zarzamora con el fin de mejorar el porcentaje de germinación al evitar la oxidación de los polifenoles liberados en el proceso de germinación. El PVP es una poliamida que, en el caso de contacto con los fenoles, estos son adsorbidos a través de uniones hidrógeno, previniendo así su oxidación (George, 1993). No obstante, no hubo diferencias en cuanto a la adición de PVP en el medio de cultivo, por lo que la degradación de proantocianidinas, como otros posibles polifenoles, se logra solamente con la escarificación de H_2SO_4 . La germinación no es sincrónica es así que el mayor porcentaje se obtuvo al mes de siembra, no obstante en otras especies del género *Rubus* (*R. caesius*, *R. georgicus* y *R. ursinus*) su germinación puede iniciarse en el mes 4 y su mayor porcentaje de germinación, alrededor del 90-100%, se lograría al mes 5 (Wada y Reed, 2011b).

7.2. Micropropagación de *Rubus fruticosus* y *R. idaeus*

Durante el desarrollo de este proyecto se realizó un protocolo de micropropagación con el fin de lograr un stock de plantas madre para los siguientes experimentos de inducción de callo. Se empleó como explantes, hojas jóvenes, de 1 mes y medio de edad, y nodos, de 0.5 cm con una yema axilar. Se utilizó el medio MS adicionado con diferentes concentraciones de la auxina IBA (0.1 ó 0.5 mg/L) y la citocinina BAP (1 o 2 mg/L) en condiciones de fotoperíodo (16 h luz/8 h oscuridad), con 4 explantes de hojas jóvenes y 4 explantes de nodo por cada tipo por combinación (IBA 0.1 mg/L + BAP 1 mg/L, IBA 0.1 mg/L + BAP 2 mg/L, IBA 0.05 mg/L + BAP 1 mg/L y IBA 0.05 mg/L + BAP 2 mg/L) (Fig. 8).

En los explantes de hojas jóvenes de plantas *in vitro* no se observó respuesta de formación de brotes empleando los diferentes tratamientos en ninguna de las dos especies. Con la excepción de un único explante de hoja de zarzamora que generó un brote en medio MS suplementado con IBA 0.1 mg/L y BAP 1 mg/L (Fig. 8A), mientras que en los demás explantes de ambas especies se observó el desarrollo de callo verde compacto (Fig. 8B). Por otro lado, los explantes de nodos mostraron buenos resultados en la formación de brotes para ambas especies (Fig. 8C). Los explantes de nodo de zarzamora solo indujeron brotes cuando se adicionó IBA a una concentración de 0.1 mg/L, mientras que los explantes de nodo de frambuesa, indujeron brotes en todas las combinaciones de reguladores de crecimiento, de IBA y BAP empleadas. Además, los explantes de nodo de frambuesa tuvieron un mayor porcentaje de supervivencia (50%) a comparación de los explantes de zarzamora (33.3%), los cuales se oxidaron.

La zarzamora y la frambuesa son dos especies de gran valor comercial por lo que se han desarrollado diversos protocolos de micropropagación (Anderson, 1980; Debnath, 2004, 2010; Donnelly y Daubney, 1986; Fiola et al., 1990; Vujović et al., 2010). Varios grupos han mostrado resultados exitosos empleando hojas jóvenes de plantas *in vitro* como explante (Mezzetti et al., 1997; Meng et al., 2004; Gupta y Mahalaxmi, 2009). No obstante, las variedades empleadas en el proyecto no mostraron respuesta al utilizar este mismo tipo de explante, pese de manejar los mismos reguladores de crecimiento y sus concentraciones con mayor número de brotes que los reportados por Mezzetti et al., (1997) Meng et al., (2004) y Gupta y Mahalaxmi, (2009). Asimismo, Fira et al., (2011) han descrito el uso de nodos como explantes para protocolos de micropropagación. Los resultados obtenidos muestran que este tipo de explante es el mejor para la inducción de brotes en ambas especies. El genotipo de las variedades de frambuesa y de zarzamora es un factor clave para la inducción de organogénesis directa, por lo que esto podría explicar la respuesta de cada tejido, así como las diferencias con los trabajos previos.

Al cabo de 1 mes, los brotes generados fueron aislados y colocados en medio MS adicionado con IAA 0.5 mg/L para su crecimiento y enraizamiento (Fig. 8D). Después de un mes del crecimiento en medio MS adicionado con IAA 0.5 mg/L se registró el

número de hojas y la longitud del tallo de cada planta. Las plantas de frambuesa generadas a partir de 1.0 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de IBA obtuvieron 12.5 ± 4.9 hojas y una longitud de tallo de 3.0 ± 1.4 cm, mientras que las plantas de zarzamora desarrolladas de esta misma concentración de reguladores obtuvieron 12.3 ± 9.3 hojas y una longitud de tallo de 1.7 ± 0.8 cm. Las plantas de frambuesa producidas empleando 1.0 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de IBA alcanzaron 11.5 ± 0.7 hojas y una longitud de tallo de 2.5 ± 0.7 cm. Las plantas de frambuesa resultantes utilizando 2.0 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de IBA lograron 8.0 ± 2.8 hojas y una longitud de tallo de 3.5 ± 0.7 cm, en ese tiempo las plantas de zarzamora generadas con la misma concentración de reguladores lograron 24.5 ± 7.8 hojas y una longitud de tallo de 2.2 ± 0.3 cm. Por último, las plantas de frambuesa producidas al usar 2.0 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de IBA consiguieron 12.7 ± 5.7 hojas y una longitud de tallo de 3.0 ± 1.0 cm. Adicionalmente, todas las plantas generadas desarrollaron raíz. Sin embargo, no hubo diferencias en el número de hojas ni en la longitud del tallo de las plantas generadas en los diferentes medios empleados, al ser analizadas con su respectiva especie. Por lo tanto, es necesario seguir evaluando la combinación adecuada de reguladores de crecimiento que permita obtener el mayor número de brotes.

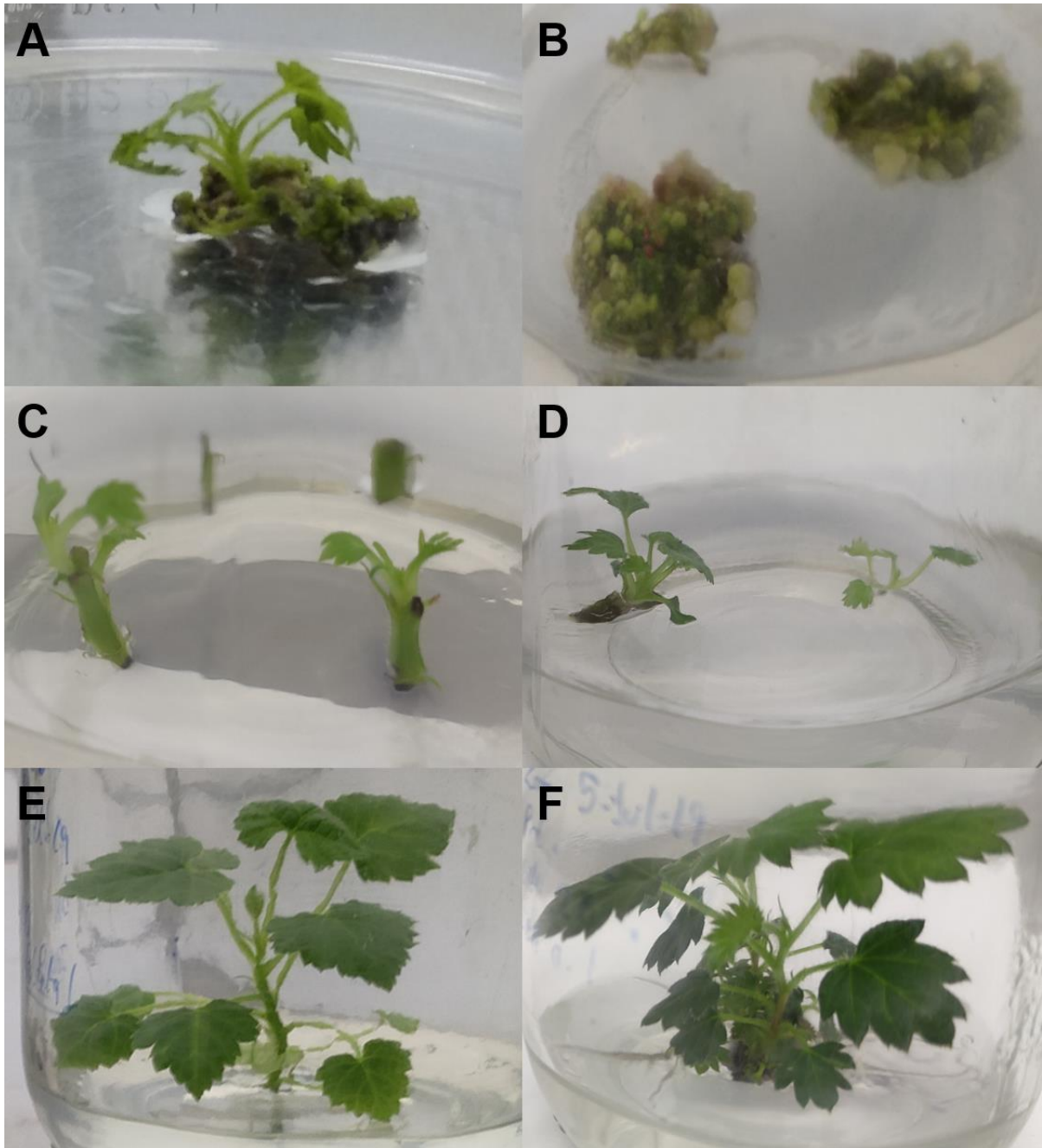


Figura 8. Micropropagación de *Rubus fruticosus* y *R. idaeus*. A) Brote generado a partir de explante de hoja de *R. fruticosus* después de 1 mes en medio MS adicionado con BAP 1.0 mg/L y IBA 0.1 mg/L. B) Callo generado a partir de explantes de hoja de *R. fruticosus* después de 1 mes en medio MS adicionado con BAP 2.0 mg/L y IBA 0.1 mg/L. C) Desarrollo de brotes en explantes de nodos de *R. idaeus* después de 2 semanas en medio MS adicionado con BAP 2.0 mg/L y IBA 0.1 mg/L. D) Brotes aislados a partir de explantes de nodo de *R. idaeus* después de 1 mes en medio MS adicionado con BAP 2.0 mg/L y IBA 0.1 mg/L. E y F) Desarrollo de plántulas de 2 meses y medio micropropagadas de *R. idaeus* y *R. fruticosus*, respectivamente, en medio MS adicionado con IAA 0.5 mg/L.

7.3 Inducción y establecimiento de callos *Rubus fruticosus* y *R. idaeus*

Las hojas jóvenes provenientes de plantas micropropagadas *in vitro* de zarzamora y frambuesa, de 2 meses y medio de edad desarrolladas en medio MS adicionado con IAA 0.5 mg/L, fueron seleccionadas como explantes para la inducción de callo primario (Fig. 9, Anexo 3). Las hojas fueron dañadas mecánicamente realizando cortes transversales con bisturí y se colocaron con orientación adaxial en medio MS o Gamborg B5 adicionado con 0.1 mg/L de KIN y diferentes concentraciones de 2,4-D (1 o 2 mg/L) o NAA (2, 3 o 4 mg/L) en condiciones de obscuridad por 1 mes. Los mejores resultados para la inducción de callo de ambas especies fue el medio Gamborg B5 adicionado con 0.1 mg/L de KIN y 2.0 mg/L de 2,4-D (Fig. 9 A y B), además en la zarzamora el medio MS adicionado con 0.1 mg/L de Kin y 3.0 mg/L de NAA también mostro buenos resultados en la inducción de callo (Fig. 9C).

Posteriormente, se subcultivaron los callos de ambas especies en su respectivo medio en el que fueron inducidas, MS o Gamborg B5 empleando 0.1 mg/L de KIN y las concentraciones de 2.0 mg/L de 2,4-D o 3.0 mg/L NAA, que fueron las que mostraron mejor respuesta comparada con sus diferentes concentraciones en el proceso de inducción, además se agregó 50 mg/L de L-cisteína para evitar la oxidación del callo (Donnelly et al., 1980).

Los callos de frambuesa después del segundo subcultivo se oxidaron por completo o mostraron nulo crecimiento en los medios MS con 3 mg/L NAA y 0.1 mg/L KIN, B5 con 3 mg/L NAA y 0.1 mg/L KIN y B5 con 2 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN, mientras que los callos desarrollados en el medio MS con 2 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN crecieron favorablemente. Después de 2 subcultivos se logró establecer un callo altamente friable de color amarillo claro empleando este medio de cultivo (Fig. 9D).

Por otro lado, los callos de zarzamora del medio Gamborg B5 con 2 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN y MS con 3 mg/L NAA y 0.1 mg/L KIN desarrollaron el mayor crecimiento y friabilidad a comparación de los callos en medio MS con 2 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN y Gamborg B5 con 3 mg/L NAA y 0.1 mg/L KIN. Después de 2 subcultivos el callo de zarzamora establecido en medio Gamborg B5 con 2 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN formó un callo poco friable de color amarillo-dorado (Fig. 9E), mientras que el callo

establecido en medio MS con 3 mg/L NAA y 0.1 mg/L KIN desarrolló un callo altamente friable de color café claro (Fig. 9F).

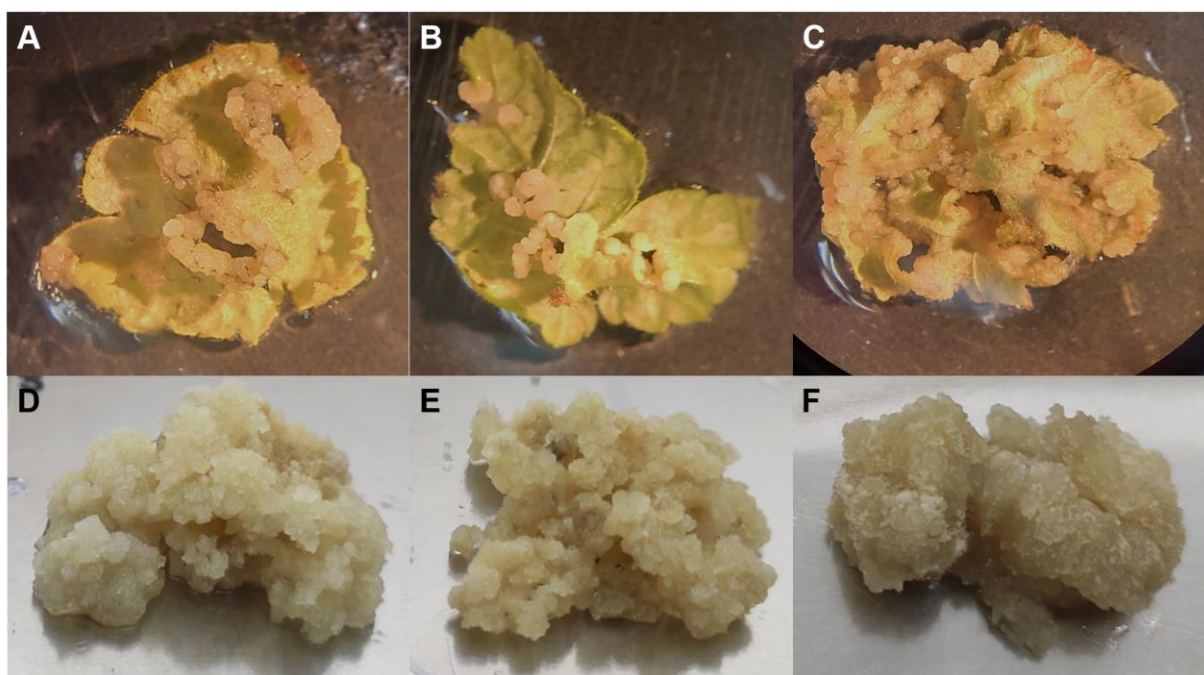


Figura 9. Inducción y establecimiento de callo de *Rubus idaeus* y *R. fruticosus*. A) Callo de *R. idaeus* generado en medio Gamborg B5 adicionado 2 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN, de 3 semanas de edad. B) Callo de *R. fruticosus* generado en medio Gamborg B5 adicionado 2 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN, de 3 semanas de edad. C) Callo de *R. fruticosus* generado en medio MS adicionado 3 mg/L de NAA y 0.1 mg/L de KIN, de 3 semanas de edad. D) Callo de *R. idaeus* establecido en medio MS adicionado con 50 mg/L de L-cisteína, 2 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN, de 3 meses de edad. E) Callo de *R. fruticosus* establecido en medio Gamborg B5 adicionado con 50 mg/L de L-cisteína, 2 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN, de 3 meses de edad. F) Callo de *R. fruticosus* establecido en medio MS adicionado con 50 mg/L de L-cisteína, 3 mg/L de NAA y 0.1 mg/L de KIN, de 3 meses de edad.

De igual manera se utilizaron cotiledones y segmentos del hipocótilo 1 cm de plántulas de frambuesa, germinadas *in vitro* de 2-3 semanas de edad, para la inducción de callo primario (Fig. 10, Anexo 3) para ser comparados con los callos inducidos de hoja, debido a los problemas de oxidación presentes en este tejido. Los explantes fueron colocados en condiciones de obscuridad en medio MS adicionado con las mismas concentraciones de 2 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN o 3 mg/L NAA y 0.1 mg/L KIN. Los explantes de cotiledones fueron incapaces de inducir formación de callo bajo todos los

tratamientos probados. No obstante, los segmentos de hipocótilo empezaron a mostrar respuesta a la semana de ser inoculados (Fig. 10 A y B), y al cabo de 3 semanas los callos producidos en medio MS adicionado con 3 mg/L NAA y 0.1 mg/L KIN produjeron callos de mayor tamaño (Fig. 10C) a comparación de los callos producidos en este mismo medio con 2 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN (Fig. 10D). Sin embargo, después de un mes de inducción los callos se oxidaron. Debido a este problema, los explantes de cotiledones e hipocótilo se descartaron para la inducción de callo primario.

La inducción de callo es un proceso multifactorial que depende de la especie, del tipo

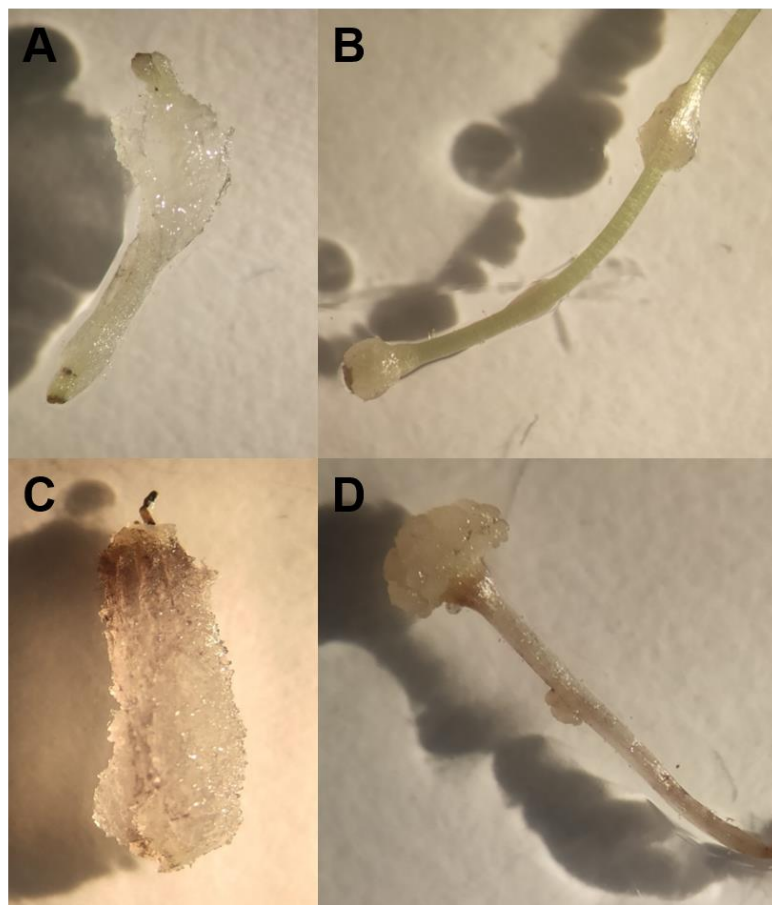


Figura 10. Inducción de callo primario de *Rubus idaeus* en explantes de hipocótilo. A y C) Callo generado en medio MS adicionado con 3 mg/L de NAA y 0.1 mg/L de KIN, de 1 y 3 semanas de edad, respectivamente. B y D) Callo generado en medio MS adicionado con 3 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN, de 1 y 3 semanas de edad, respectivamente.

de medio, los reguladores de crecimiento y su radio de concentración, así también a las condiciones de cultivo, el tipo de explante, el genotipo, entre otros. Diversos autores

han señalado el uso de hojas como explante para la generación de callo en diferentes especies del género *Rubus* (McNicol y Graham, 1990; Berejsza-Wysecki y Hrazdin, 1994; Nohynek et al., 2014), mientras que solamente un grupo ha empleado hipocótilo para la inducción de callo primario (Ismaini et al., 2017). Berejsza-Wysecki y Hrazdin (1994) reportaron que las hojas jóvenes de *R. idaeus* cv. Royalty fueron más eficientes para la formación de callo comparadas con hojas más viejas correspondiente a la parte media del brote. Los resultados observados demuestran que el uso de hojas jóvenes, de plantas *in vitro*, son capaces de inducir callo en zarzamora y frambuesa, mientras que los callos producidos a partir de hipocótilo y cotiledones de frambuesa se oxidaron al mes de edad. Por otro lado, el uso de 2,4-D o NAA han sido los principales tipos de auxinas reportadas para la generación y mantenimiento de callo (McNicol y Graham, 1990; Berejsza-Wysecki y Hrazdin, 1994; Nohynek et al., 2014). Mezzetti et al. (1997) describieron que en *R. fruticosus* cv. Chester, la adición de 2,4-D (1 mg/L) mostró una gran producción de callo mientras que en *R. fruticosus* cv. Hull Thornless, elevadas concentraciones de NAA (5 mg/L) lograron este mismo resultado. Sin embargo, en otra especie como *R. idaeus* cv. Autumn Bliss el uso de 2,4-D generó una baja tasa de desdiferenciación. Comparado con los resultados obtenidos, nuestra variedad de frambuesa mostró los mejores resultados en producción de callo al utilizar 2 mg/L 2,4-D (2 mg/L) y 0.1 mg/L KIN, al tratarse de diferentes variedades la respuesta en el proceso de desdiferenciación puede ser distinto y explicaría la selectividad por esta auxina de la variedad de frambuesa empleada en el proyecto. Nuestra variedad de zarzamora mostró la mayor producción y friabilidad de callo con NAA (3 mg/L) en medio MS, al igual que la variedad Chester reportada por Mezzetti et al. (1997), lo que sugiere que elevadas cantidades de esta auxina es un requerimiento para la formación y crecimiento de callo en algunos cultivares de zarzamora.

7.4 Cultivo de células en suspensión de *Rubus fruticosus* y *R. idaeus*

El grupo de investigación liderado por Jean-Paul Joseleau ha sido hasta el momento el único en reportar el establecimiento de cultivos de células en suspensión de *R. fruticosus* (Cartier et al., 1987, 1988; Joseleau et al., 1992); donde describen, la producción de diferentes tipos de polisacáridos extracelulares en los cultivos. Igualmente, Berejsza-Wysecki y Hrazdin (1994) y Dziadczyk et al. (2013) han

generado cultivos de células en suspensión de *R. idaeus* de diferentes tipos de variedades.

7.4.1. Establecimiento de cultivos celulares de *Rubus fruticosus*

A partir del callo producido en el medio Gamborg B5 adicionado con 2.0 mg/L de 2,4-D, 0.1 mg/L de KIN y 50 mg/L de L-cisteína se realizó la inducción de los cultivos de células en suspensión de *R. fruticosus* en dos diferentes medios de cultivos, pero la misma concentración de reguladores, Murashige y Skoog (MS) y Gamborg B5 suplementados sea con 2.0 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN o con 3.0 mg/L de NAA, bajo condiciones de oscuridad o de luz continúa (como se describen en la Tabla 3). Se colocó 3 g de peso fresco (PF) de callo en 50 mL de medio en matraces de 125 mL, posteriormente fueron subcultivados cada 3 semanas, al cabo de 6 semanas (2



Figura 11. Diagrama de propagación inicial por dilución v/v (1:5) para los cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* para la prueba de crecimiento.

subcultivos) fueron transferidos a matraces de 250 mL con 75 mL de medio para ser utilizados como inóculo para la evaluación de crecimiento (Fig. 11).

Como se observa en la figura 12, la mejor combinación para generar la disgregación de las células ha sido utilizando el medio B5 adicionado 3.0 mg/L de NAA en condiciones de oscuridad (B30-O). Mientras que los cultivos inducidos empleando el medio MS integrado con 2.0 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN en condiciones de

oscuridad (M21-O) presenta una disgregación moderada. Sin embargo, el medio B5 suplementado con 2.0 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de KIN con y sin 50 mg/L de L-cisteína, como antioxidante, en ambas condiciones de crecimiento (B21-O y B21-L) no hubo disgregación del tejido calloso, generando cúmulos celulares con un tamaño promedio de 0.5-1 cm, produciendo poblaciones celulares heterogéneas. La disgregación del tejido es necesario para la obtención de poblaciones celulares que respondan de manera homogénea al adicionar elicitadores (Mustafa et al., 2011). Además, en condiciones de luz continúa se observa la presencia de una moderada oxidación por parte del tejido, sin mostrar ningún tipo de pigmentación (antocianinas). Probablemente, esta oxidación se deba al papel que juegan las auxinas, en concentraciones elevadas, en la represión de genes de biosíntesis y transporte de antocianinas como ha sido reportado en callo de *Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana* (Ji et al., 2015).

Se realizó una evaluación del crecimiento con el fin de determinar las condiciones óptimas para el mantenimiento y crecimiento de las células por subcultivo. Los cultivos establecidos de 2 meses de edad fueron empleados como inóculo (4 g de PF), en matraces de 250 mL con 50 mL de su respectivo medio y condiciones de establecimiento inicial. Se colectó las muestras por duplicado en el tiempo inicial/día 0 y por triplicado en el tiempo final/día 16, donde se evaluó el crecimiento en relación con biomasa en peso fresco (PF) y peso seco (PS) obtenida al inicio y al final del cultivo, así como el índice de crecimiento (relación peso final entre peso inicial).

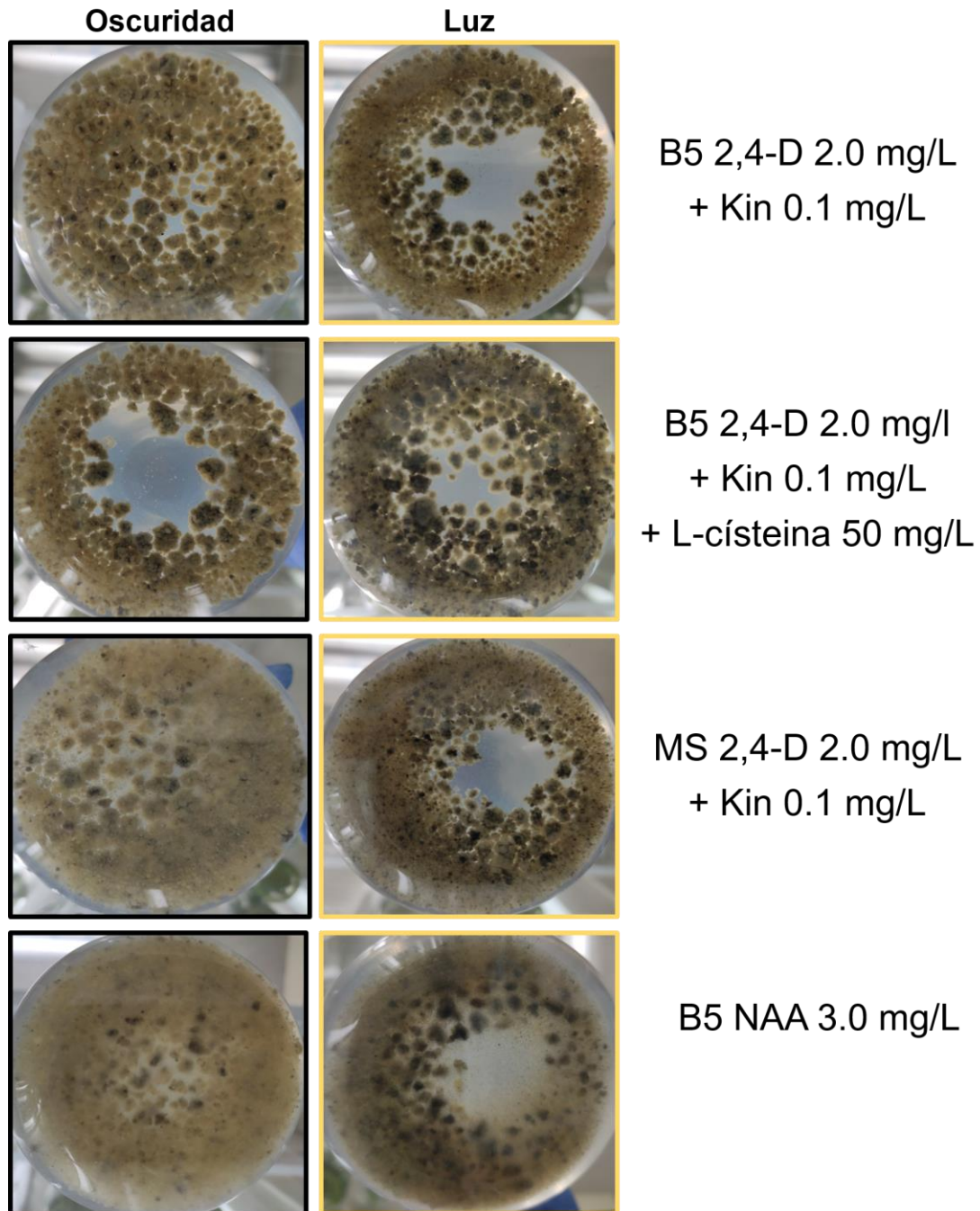


Figura 12. Inducción de cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* en condiciones de oscuridad y luz continua, empleando diferentes medios de cultivos y reguladores de crecimiento.

Como se muestra en la Figura 13, cuando se utilizó el medio Gamborg B5 suplementado con 2 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN en condiciones de luz (B21-L) con un inóculo inicial de 83.33 ± 1.15 g PF/L (9.06 ± 0.13 g PS/L), al término del día 16 produjo una biomasa de 184 ± 55.23 g PF/L (11.14 ± 1.73 g PS/L). En cuanto a su índice de crecimiento con relación al PF fue de 2.2 ± 0.66 y al PS fue de 1.2 ± 0.19 . Cuando los cultivos fueron llevados en condiciones de oscuridad en el medio Gamborg B5 suplementado con 2 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN (B21-O) y con un inóculo inicial de 89 ± 1.41 g PF/L (6.72 ± 0.11 g PS/L), al término de la prueba produjo una biomasa de 220.90 ± 6.93 g PF/L (12.74 ± 0.18 g PS/L). En cuanto a su índice de crecimiento con relación al PF fue de 2.5 ± 0.08 y al PS fue de 1.9 ± 0.03 . El medio MS suplementado con 2 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN en condiciones de luz (M21-L) con un inóculo inicial de 82.0 ± 1.41 g PF/L (5.86 ± 0.14 g PS/L), al término del día 16 produjo una biomasa de 203.13 ± 15.20 g PF/L (12.97 ± 2.08 g PS/L), en cuanto a su índice de crecimiento en relación al PF fue de 2.5 ± 0.19 y al PS fue de 2.2 ± 0.35 . Mientras que, el medio MS suplementado con 2 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN en condiciones de oscuridad (M21-O) con un inóculo inicial de 81.33 ± 1.15 g PF/L (4.95 ± 0.07 g PS/L), al término del día 16 de crecimiento produjo una biomasa de 167.40 ± 48.48 g PF/L (11.93 ± 2.03 g PS/L), en cuanto a su índice de crecimiento en relación al PF fue de 2.1 ± 0.6 y al PS fue de 2.4 ± 0.41 . Finalmente, cuando se evaluó el crecimiento después de 16 días utilizando el medio Gamborg B5 suplementado con 3 mg/L NAA en condiciones de oscuridad (B30-O), se produjo una biomasa de 365.13 ± 5.00 g PF/L (20.83 ± 0.22 g PS/L) a partir de un inóculo inicial de 82.30 ± 0.42 g PF/L (4.90 ± 0.14 g PS/L). Con este medio y condiciones se obtuvo el mayor índice de crecimiento que en PF fue de 4.4 ± 0.06 y fue similar al de PS de 4.3 ± 0.05 . Con base en nuestros resultados obtenidos, existe diferencias significativas ($P < 0.05$) en cuanto a la producción de biomasa y el índice de crecimiento de las células en suspensión en el medio B30-O en PS y PF, comparado con los cultivos en medios adicionados con 2 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN.

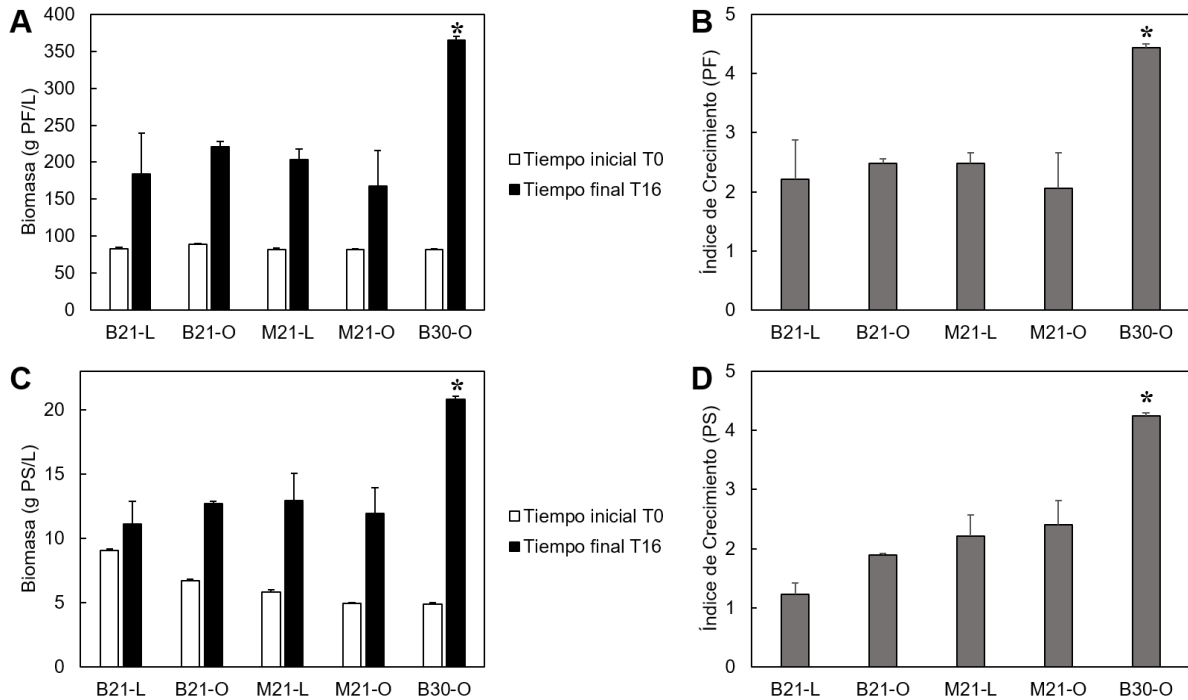


Figura 13. Producción de biomasa e índice de crecimiento en cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* crecidos en diferentes medios de cultivo y condiciones de luz o oscuridad por 16 d. Media de peso de biomasa (g/L) en cada grupo en peso fresco A) y peso seco C). Índice de crecimiento en relación al peso fresco B) y peso seco D). Las barras indican la desviación estándar de la media (n=3). * indica diferencias significativas con respecto a las diferentes condiciones y medios de cultivo en el tiempo final T16, P <0.05.

Las condiciones para el establecimiento y mantenimiento de un cultivo de células en suspensión dependen del genotipo de la especie, de ahí la importancia de analizar diferentes tipos de medio y reguladores de crecimiento, así como en condiciones de luz u oscuridad que nos permita la mayor producción de biomasa y disgregación, que en esta variedad de *R. fruticosus* se logró empleando el medio Gamborg B5 adicionado con 3.0 mg/L de NAA. Mori y Sakurai (1994) analizaron diferentes medios de cultivo en cultivos celulares de fresa (*Fragaria x ananassa* cv. Shikinari) donde determinaron que los medios Linsmaier y Skoog (LS) y MS mostraron una mayor producción de biomasa comparado con el medio Gamborg B5, probablemente la alta concentración de amonio (1650.0 mg/L de nitrato de amonio) en los medios MS y LS estimula el crecimiento de las células en esta especie. No obstante, nuestros resultados muestran que el elemento clave involucrado en la producción de biomasa en los cultivos de células en suspensión de zarzamora serían los tipos reguladores de crecimiento y no

la concentración de amonio, siendo la concentración de 3 mg/L de NAA sin adición de citocininas la mejor condición para nuestros cultivos celulares de zarzamora.

Diversos autores han publicado el establecimiento de cultivos celulares de diferentes especies del género *Rubus*. Berejsza-Wysecki & Hrazdin (1994) reportaron el incremento de la biomasa en PS de 1.4 veces en cultivos de células en suspensión frambuesa (*R. idaeus*) cv. Royalty durante un período de 10 días, utilizando el medio Anderson suplementado con 2.0 mg/L de 2,4-D, 1.0 mg/L de IBA y 1 mg/L de 2iP. Asimismo, Nohynek et al. (2014) describieron el aumento de la biomasa en PF de 5 a 6 veces en cultivos de células en suspensión de cloudberry (*R. chamaemorus*) durante un período de 10 días, empleando el medio MS adicionado con 1 mg/L de NAA y 0.1 mg/L de KIN. Comparado con los cultivos celulares de zarzamora el incremento de 4.3 veces en PS y de 4.4 veces en PF empleando el medio B30-O durante 16 días es mayor a lo descrito en *R. idaeus* cv. Royalty y similar al de *R. chamaemorus*.

El establecimiento y mantenimiento de las condiciones de cultivos de células en suspensión de *R. fruticosus* en matraces se logró a través del medio de cultivo Gamborg B5 adicionado con 3.0 mg/L de NAA en condiciones de oscuridad (B30-O) y agitación orbital constante de 110 rpm con un tamaño de inóculo inicial de 82.30 ± 0.42 g PF/L (4.90 ± 0.14 g PS/L), generando la mayor producción de biomasa y disgregación, comparado con los otros medios de cultivo y condiciones.

7.4.2. Producción de polisacáridos extracelulares en cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus*.

Un aspecto relevante durante el establecimiento de los cultivos celulares de zarzamora fue la presencia de una matriz secretada por las células que tornaba el medio a un color blanco-amarillento (Fig. 14). Con el objeto de analizar la matriz secretada se siguió el protocolo de Gamar et al., (1997) en resumen: el medio fue filtrado se precipitó adicionando etanol (70% v/v) y se llevó a cabo una incubación por 24 horas a 4°C, el precipitado se centrifugó a 600 g por 15 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, la muestra fue hidrolizada y analizada empleando la técnica de HPLC, donde se determinó la presencia de glucosa y galactosa, lo que sugiere la producción de polisacáridos extracelulares en nuestros cultivos de células en suspensión de *R.*

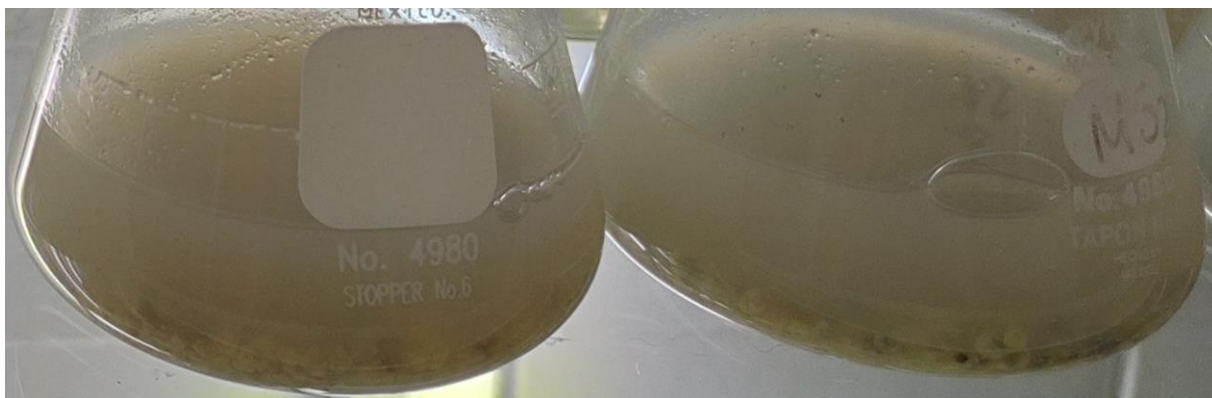


Figura 14. Vista frontal de cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* en medio M21-O.

fruticosus. Probablemente, las moléculas que se encuentran en el medio de cultivo son polisacáridos extracelulares como xiloglucanos, galactoglucomananas y/o arabinogalactanos que ha sido reportado previamente por el grupo de Joseleau en cultivos de células en suspensión de *R. fruticosus* (Cartier et al., 1987, 1988; Joseleau et al., 1992) en cultivos en suspensión de esta misma especie, así como en cultivos celulares de manzana (Reid et al., 1999).

7.4.3. Cinética de crecimiento de cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus*.

Una vez determinada las condiciones para el mantenimiento de los cultivos celulares a partir de la evaluación de su crecimiento, se realizó una cinética de los cultivos procedentes del medio B30-O. Los cultivos celulares establecidos de 1 semana en fase exponencial fueron empleados como inóculo (5.4 ± 0.34 g de PF), en matraces de 250 mL con 50 mL de medio. Cada tercer día durante 24 días totales se colectaron tres matraces, de los cuales se obtuvo tanto en PF como en PS los gramos de biomasa producida.

En la figura 15, se muestra que los cultivos presentaron una fase lag de alrededor de 6 días, posteriormente inician la fase exponencial donde finalmente la fase estacionaria la alcanzan a partir del día 12. Se registró igualmente el pH en cada tiempo donde osciló entre 5.5 y 5.0. La fase lag de este cultivo celular podría acortarse disminuyendo el tiempo de resiembra de los cultivos (Mustafa et al., 2011). Además, la disminución en el PS de las células durante la fase estacionaria podría estar indicando cambios

fisiológicos acompañados de la senescencia, posiblemente al decremento en la actividad de peroxidasas que ha sido reportado previamente en cultivos de células en suspensión de zarzamora (Cortelazzo et al., 1996).

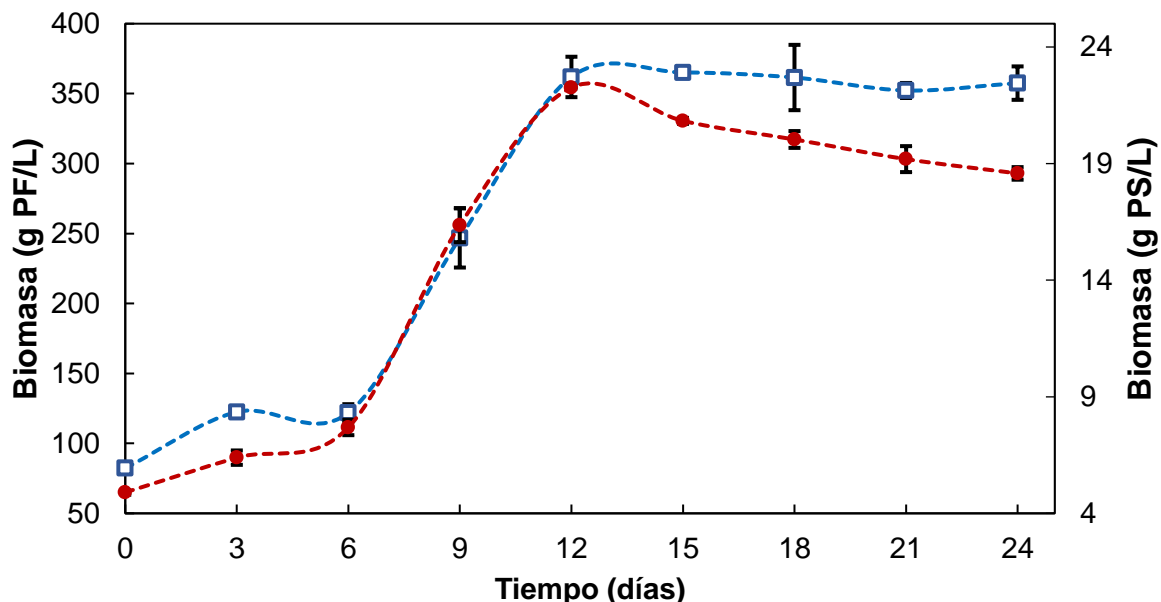


Figura 15. Cinética de crecimiento de cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus*. Los cultivos fueron crecidos en medio Gamborg B5 adicionado con 3.0 mg/L de NAA en condiciones de oscuridad. Cuadros abiertos azul – biomasa (g PF/L), círculos cerrados rojo – biomasa (g PS/L). Cada punto indica la media \pm desviación estándar (n=3).

Igualmente, se construyó una regresión lineal a partir de los datos obtenidos en la fase exponencial de la cinética (del día 6 al día 12) empleando la producción de biomasa (g PS/L) y tiempo. Se obtuvo un R^2 de 0.9442 (Fig. 16). La correlación lineal obtenida entre biomasa y tiempo fue utilizada para determinar la tasa específica de crecimiento (μ) con un valor de 0.0074 h^{-1} (0.1773 d^{-1}) (Fig. 16).

A partir de la información obtenida de esta curva de crecimiento, para la fase final del proyecto se propuso que la elicitación de los cultivos de células en suspensión se realizará en el día 7 que es cuando iniciaría la fase exponencial de cultivo, con base en que este momento de la fase los cultivos poseen una mayor tolerancia a agentes externos (Mustafa et al., 2011).

Cortelazzo et al. (1996) reportaron que cultivos de células en suspensión de *R. fruticosus* en medio Heller sin reguladores de crecimiento en condiciones de

fotoperíodo (12 h luz:12 h oscuridad) con un inóculo inicial de 73 g PS/L, los cultivos se caracterizaron por poseer una fase de lag corta, que no excedió los tres días, seguido de un crecimiento exponencial que abarcó del día 4 al día 12. Posteriormente, los cultivos presentaron una fase estacionaria desde el día 12 hasta los días 20-22 antes de que ocurriera la senescencia. Igualmente, Nohynek et al. (2014) demostraron que en cultivos de células en suspensión de cloudberry (*R. chamaemorus*) presentan una fase lag de alrededor de 2 días y posteriormente un crecimiento exponencial hasta el día 10. Sin embargo, después de un período de cultivo de 12 días, los cultivos al entrar a la fase estacionaria comenzaron a perder su color amarillo brillante y se oxidaron, señales de muerte celular.

En el caso de nuestros cultivos celulares muestran una fase lag más larga comparada con los estudios previos. No obstante, a diferencia de lo reportado en *R. chamaemorus*, al llegar a la fase estacionaria los cultivos mantuvieron una misma coloración sin presentar signos de oxidación aparentes.

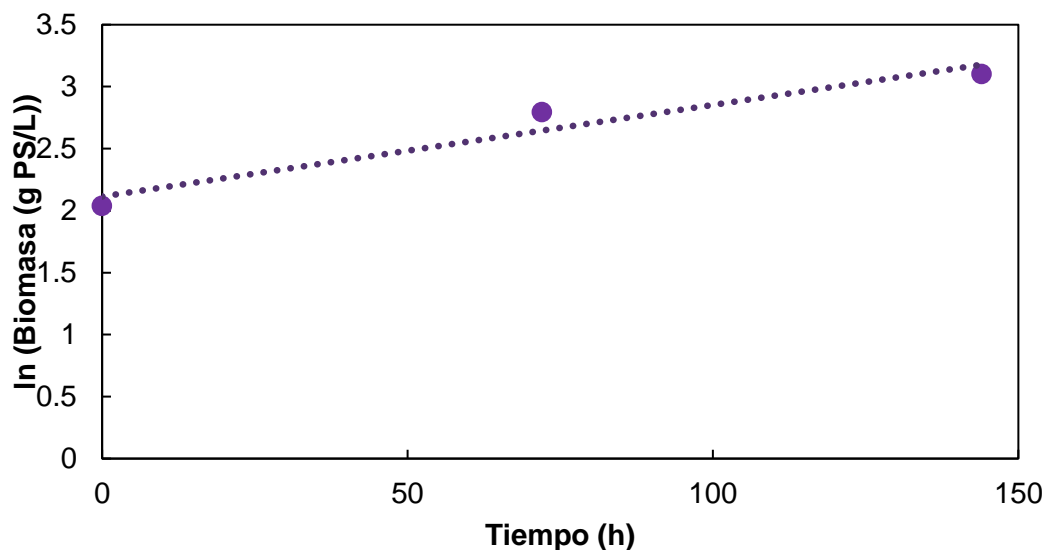


Figura 16. Regresión lineal de la fase exponencial a partir de la cinética de cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus*. Correlación lineal obtenida entre ln (Biomasa (g PS/L)) y tiempo (h).

Sin embargo, una comparación directa, entre los cultivos desarrollados en este proyecto y los reportes antes mencionados, no es posible debido a que existen diferentes variables a considerar como el tamaño de inóculo inicial, genotipo de la especie, tiempo de subcultivo, medio de cultivo, condiciones de cultivo, entre otras; que pudiera modificar el tiempo de las fases durante la cinética, así como la tasa específica de crecimiento de las células, que no ha sido reportada en cultivos de células en suspensión del género *Rubus*.

7.4.5. Establecimiento de cultivo de células en suspensión de *Rubus idaeus*

Se realizó el establecimiento de los cultivos de células en suspensión de *R. idaeus* en el medio Gamborg B5 suplementado con 3.0 mg/L de NAA bajo condiciones de oscuridad (Fig. 17), con base en que fueron las condiciones para el establecimiento y mantenimiento de los cultivos celulares de zarzamora. El cultivo celular se inició a partir del callo de frambuesa producido en el medio MS adicionado con 2.0 mg/L de 2,4-D, 0.5 mg/L de KIN y 50 mg/L de L-cisteína. Se colocó 3 g de peso fresco (PF) de callo en matraces de 125 mL conteniendo 50 mL de medio, fueron resembrados por dilución V:V (1:5) cada 3 semanas, y al cabo de varios subcultivos fueron escalados hasta llegar un matraz de 1 L con 250 mL de medio.

Sin embargo, debido a diferentes acontecimientos derivados por la pandemia de COVID-19 y el confinamiento solo se logró su establecimiento, quedando en perspectivas futuras para el grupo de trabajo evaluar la producción de biomasa, determinar las fases del crecimiento y la tasa específica de crecimiento, así como establecer estrategias de elicitación de los cultivos de células en suspensión de frambuesa.

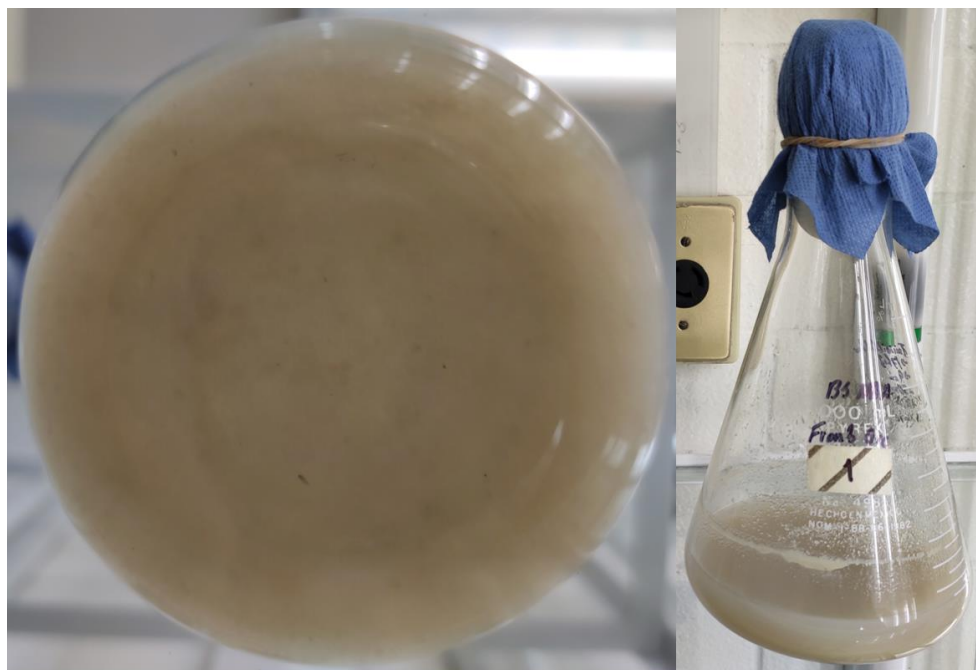


Figura 17. Establecimiento de cultivos de células en suspensión de *Rubus idaeus* en medio Gamborg B5 suplementado con 3.0 mg/L de NAA bajo condiciones de oscuridad.

7.5. Expresión de genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides

7.5.1. Diseño de oligonucleótidos

Como parte del objetivo de analizar los cambios en los niveles de expresión génica de *PAL*, *CHS*, *F3H* y *ANS* en relación a la producción de flavonoides, se diseñaron primers para estos genes, con su correspondiente gen constitutivo de referencia Histona H4 (Tabla 4). A partir de genes reportados en *Arabidopsis thaliana* se realizó una búsqueda en la plataforma National Center for Biotechnology Information (NCBI) con un filtro de selección para el género *Rubus*, así también en el transcriptoma disponible de *R. idaeus* cv. Heritage (Travisany et al., 2019). Dado que se ha reportado la presencia de dos isoformas de *PAL* en *R. idaeus* (*PAL1* y *PAL2*) (Kumar y Ellis, 2001), se realizaron primers para cada isoforma. En el caso de los primers correspondientes de *CHS*, se utilizó como base el gen reportado para *PSK1* de *R. idaeus*, con base que ha sido previamente reportada con actividad chalcona sintasa, además de ser el responsable en la biosíntesis de flavonoides (Zheng y Hrazdina, 2008). Para *F3H* se

realizó un alineamiento para los genes reportados para esta enzima de *R. spp.*, *R. occidentalis*, *R. coreanus* y el mRNA del transcriptoma de *R. idaeus*, donde se seleccionaron las zonas que tuvieran el mayor porcentaje de similitud en nucleótidos. Para el diseño de los primers de la ANS solo se ha reportado un gen que presenta esta función en *R. idaeus* cv. Tulameen (Rafique et al., 2016). Finalmente, se seleccionó la *HisH4* como gen constitutivo dado que se ha reportado que en fresa (*Fragaria x ananassa*) presenta la menor variación ante diferentes condiciones (Zhang et al., 2018). Al ser la fresa una especie cercana al género *Rubus* pudiera comportarse de manera similar, por lo que para su diseño se empleó un gen putativo del transcriptoma de *R. idaeus* que presentaba el mayor porcentaje de similitud e identidad comparado con el gen de *F. ananassa*.

Tabla 4. Diseño de primers de los genes PAL1, PAL2, CHS, F3H, ANS e HisH4 para los ensayos de qPCR.

GEN	Secuencia	Sentido
<i>PAL1</i>	CCCCTCTCCTACATTGCGGGG	Forward
	AGGCCATACCAGACCCAACGG	Reverse
<i>PAL2</i>	ACAAGACCGCTACGCTCTCCG	Forward
	CCCTGGAAGTTGCCACCATGC	Reverse
<i>CHS</i>	ACAGTGACGGGGCCATCGAC	Forward
	ACCGGGGTGTGCAATCCAGA	Reverse
<i>F3H</i>	GAACGCCGATCACCAAGCAGT	Forward
	TTCAGCCTGGCAAGCTCAAGGT	Reverse
<i>ANS</i>	GCACATCGGCGACACCTTGG	Forward
	AGTCCGAGGCGGAAAGATGGC	Reverse
<i>HisH4</i>	CGGAGCCAAGCGTCACAGGA	Forward
	CCTCCTGGCGTGCTCAGTGT	Reverse

7.5.2. Extracción de RNA

La extracción de RNA, en este caso específico, fue el principal reto para los análisis de expresión de genes por qPCR, debido a los bajos rendimientos y contaminación en los protocolos de extracción de RNA en las muestras de células y callo de *Rubus*. Se emplearon varios protocolos de extracción de RNA, tanto utilizados por el grupo de trabajo como de diferentes artículos consultados. Los resultados obtenidos de concentración, pureza e integridad de los protocolos empleados se muestran en el Anexo 2.

Los primeros protocolos evaluados fueron el método de CTAB (MacRae, 2007) y el método de Trizol (Invitrogen™), utilizados previamente en el grupo de trabajo. No obstante, en el primer método, aunque si bien el RNA se encontraba integró, al evaluarse mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en condiciones desnaturalizantes, presentó bajos valores de pureza 1.19 y 1.05 (absorbancia 260/280 y 260/230, respectivamente). Por el otro lado, al realizar el método de Trizol, el RNA fue completamente degradado; probablemente debido a la alta concentración de polisacáridos y/o polifenoles de los callos de zarzamora que pudiera ser una limitante usando el método de Trizol (Hummon et al., 2007).

Posteriormente, se empleó el método de SDS (Huded et al., 2018) que demostró buenos resultados tanto en pureza e integridad, comparados con los métodos anteriores. Sin embargo, los rendimientos obtenidos fueron bajos, menos de 200 ng/μl. Por lo que a partir del protocolo original, se sustituyó la solución de potasio (3 M, pH 5) por una solución de acetato de sodio (3M, pH 5), dado que se ha reportado que la adición de acetato de sodio aumenta el rendimiento de RNA (Deepa et al., 2014). Sin embargo, no hubo diferencia en la cantidad de RNA obtenida, por lo que se procedió a buscar otros protocolos reportados específicamente para especies del género *Rubus*.

Con este propósito se seleccionó aplicar en muestras de células en suspensión de zarzamora, el método basado en CTAB reportado por Chen et al. (2012b) para la extracción de RNA de frutos de zarzamora (*Rubus spp.*). Como resultado este nuevo protocolo mantuvo una concentración de RNA aceptable y una mejor integridad,

probablemente debido a una mayor capacidad de amortiguación de 200 mM Tris-HCl en el buffer de extracción. Sin embargo, la integridad de estas muestras de RNA seguía siendo insuficiente debido a la degradación presente. Finalmente, los últimos ensayos se procedieron a utilizar nuevamente el método de SDS (Huded et al., 2018) con ciertas modificaciones.

- SDS 2.0: A partir del protocolo original de Huded et al., (2018) se modificó la cantidad de tejido requerida (500 mg PF total) y se aumentó la cantidad de PVPP a 0.12 g de PVPP.
- CTAB 2.0: Se incluyeron las mismas modificaciones que el método anterior donde la diferencia fue el buffer de extracción (30 g/L CTAB, 20 g/L polivinilpirrolidona (PVP) K-30, 200 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl y 2% β -mercaptoetanol) descrito en Chen et al. (2012b) (Descrito detalladamente en Materiales y Métodos: 6.4.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.).

El aumento de PVPP a 0.12 g se realizó con base en que se ha reportado que una alta concentración de este reactivo es capaz de remover compuestos polifenólicos durante el aislamiento de RNA de fruto de frambuesa (*R. idaeus*) ya que al adsorberse con los polifenoles, previene su oxidación y su posterior unión a ácidos nucleicos y proteínas (Jones et al., 1997; Chen et al., 2012b). Estas modificaciones permitieron finalmente obtener con el protocolo CTAB 2.0 un RNA de células en suspensión de zarzamora elicidas y control con un buen rendimiento, pureza e integridad (Tabla 6 y Fig. 18).

Tabla 5. Datos de la concentración y pureza del RNA extraído con el método de CTAB 2.0 en células en suspensión de *Rubus fruticosus* elicidadas y controles cultivadas en medio B30, en condiciones de oscuridad.

Cultivos celulares	RNA (ng/μl)	260/280	260/230
Células control 24 post-elicitación.	1958.7 ± 287.3	2.04	2.13
Células elicidadas con YE 24 post-elicitación.	3176.9 ± 833.2	2.05	2.17
Células elicidadas con AJ 24 post-elicitación.	2827.2 ± 867.3	2.06	2.15
Células control 72 post-elicitación.	2360.08 ± 1044.8	2.04	2.11
Células elicidadas con YE 72 post-elicitación.	3000.4 ± 562.1	2.04	2.14
Células elicidadas con AJ 72 post-elicitación.	2338.93 ± 126.3	2.06	2.11

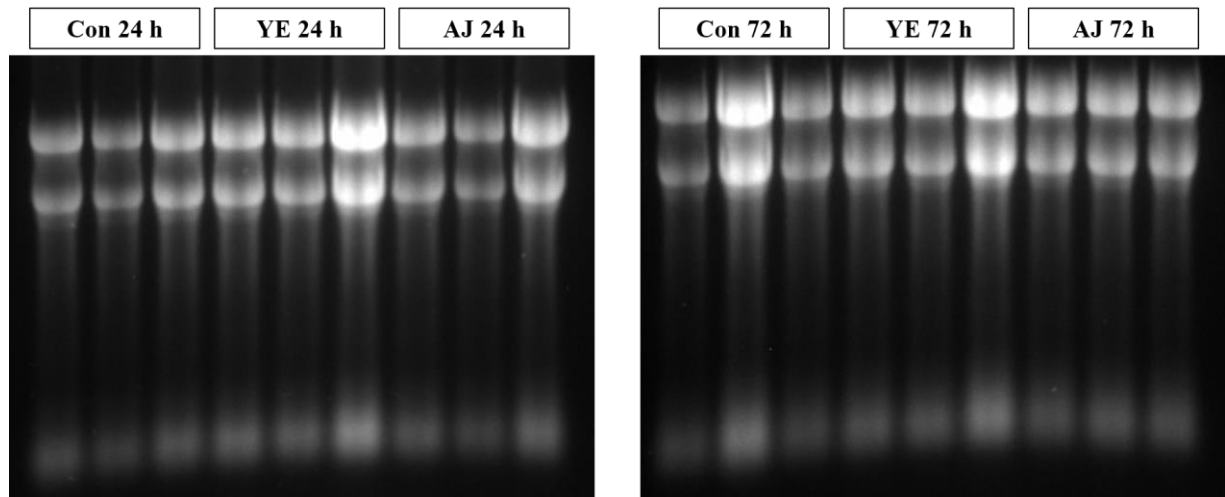


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando la Integridad del RNA extraído empleando el método de CTAB 2.0 de células en suspensión de *Rubus fruticosus* elicidadas y control, en medio B30 en condiciones de oscuridad.

7.5.3. Estandarización de ensayos de qRT-PCR en células de zarzamora en oscuridad

Para evaluar la amplificación de los productos esperados se realizó la estandarización de los ensayos de qRT-PCR, a partir de RNA extraído por el método de CTAB 2.0 (Modificado de Huded et al., 2018) de células en suspensión de *R. fruticosus* crecidas en medio B30-O en condiciones de oscuridad, utilizando los primers diseñados en el apartado 7.5 Diseño de oligonúcleotidos. Además se evaluó llevar a cabo una digestión con DNasa (+DNasa) o sin DNasa (-DNasa) y con transcriptasa reversa (+RT) o sin transcriptasa reversa (-RT).

Como se observa en la Fig. 19.1 hubo amplificación en todos los genes *HisH4*, *PAL1*, *PAL2*, *CHS*, *F3H* y *ANS* en las condiciones -DNasa -RT, -DNasa +RT y +DNasa +RT, lo cual demuestra que los primers diseñados también pueden amplificar DNA genómico al igual que el cDNA generado por acción de la transcriptasa reversa. Además, el tamaño esperado de los productos de PCR (Fig. 19.2) en todas las condiciones señaladas es aproximadamente el mismo debido a que los primers se diseñaron en un solo exón para cada uno de los genes. Las curvas de fusión corresponden a solo un producto específico con base en que solo hay presente un pico por cada gen. No obstante, en los resultados la temperatura de fusión (T° melting) predicha de la herramienta bioinformática uMELT no fue la misma (Fig. 19.2), probablemente debido a la concentración de iones monovalente y divalentes del kit de SBYR.

Los ensayos realizados para la técnica de qRT-PCR permitieron tener las concentraciones adecuadas de cDNA y de primers para los experimentos finales de evaluación de los cambios en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de flavonoides en los cultivos elicitados.

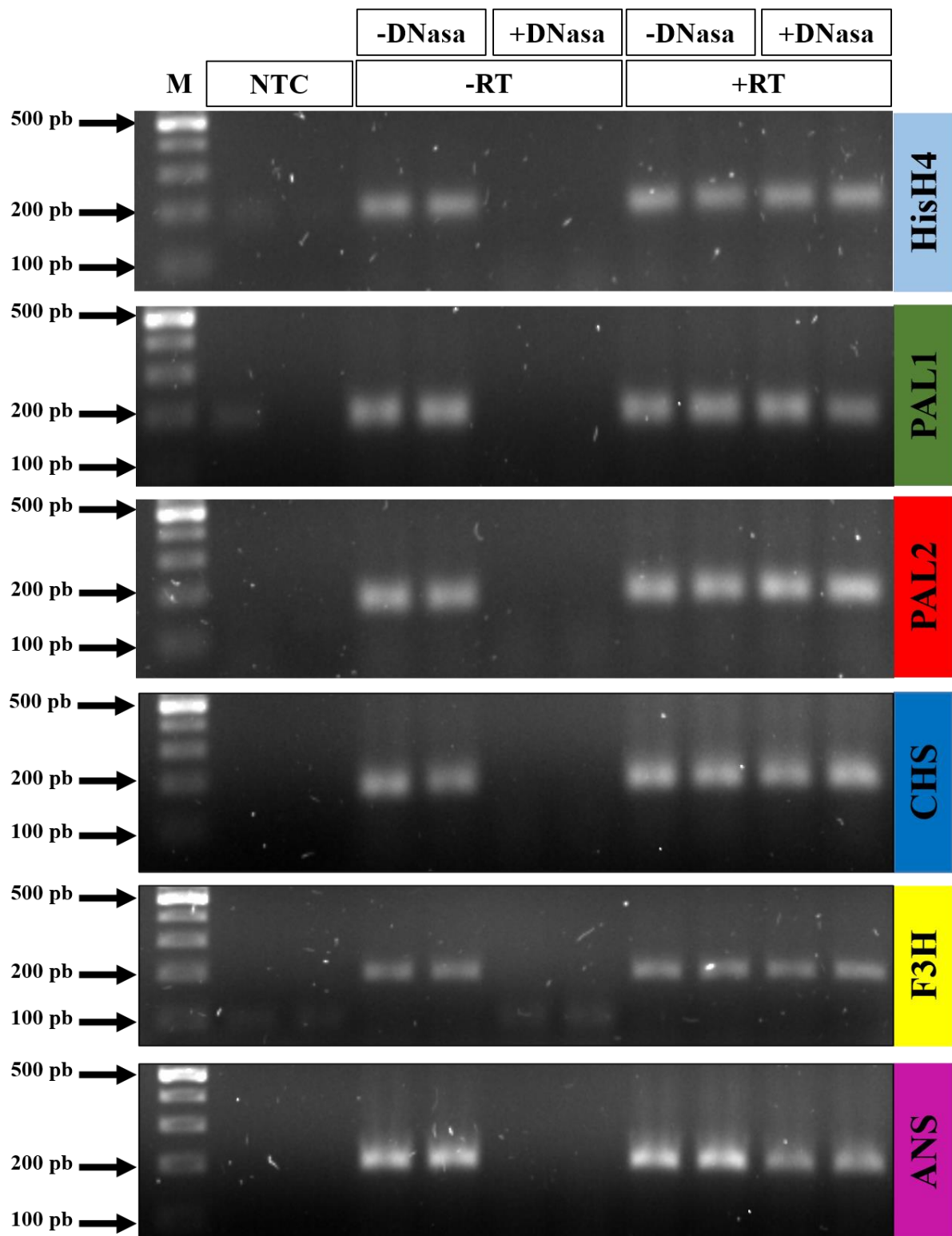


Figura 19.1. Estandarización de qRT-PCR de células en suspensión de *Rubus fruticosus*. Electroforesis en Gel de agarosa al 2% de los productos amplificados en de PCR usando cDNA generado a partir de RNA total aislado de células en suspensión empleando el protocolo de CTAB 2.0.

Gen	Tamaño esperado (pb)	Tamaño aproximado (pb)	T° melting esperada	T° melting real
<i>HisH4</i>	196	~ 195	91 °C	82.00
<i>PAL1</i>	187	~ 190	90.5 °C	82.50
<i>PAL2</i>	165	~ 165	85.5 °C	79.00
<i>CHS</i>	170	~ 170	88.5 °C	80.50
<i>F3H</i>	198	~ 200	90 °C	81.00
<i>ANS</i>	193	~ 195	91 °C	82.00

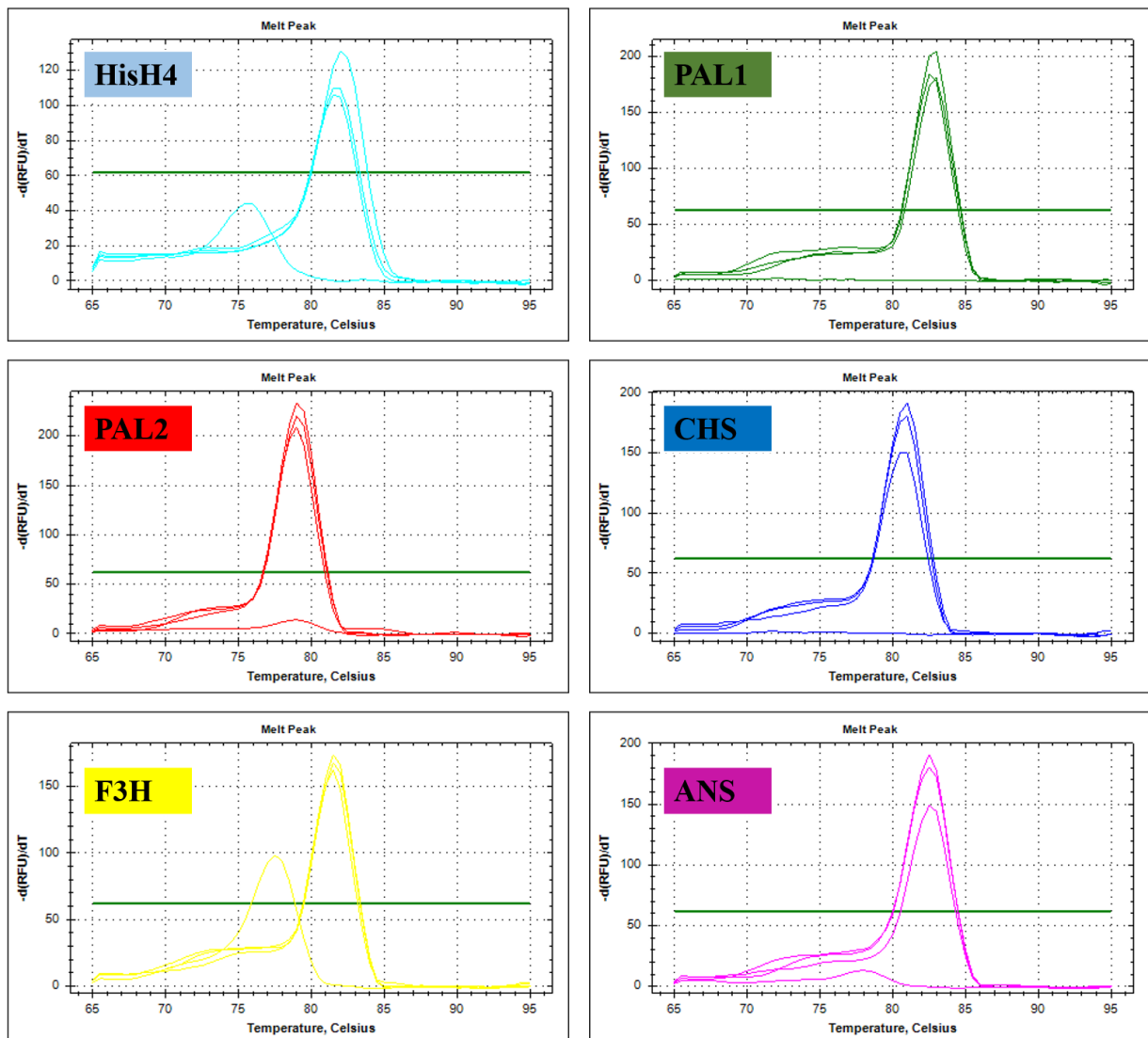


Figura 19.2 Estandarización de qRT-PCR de células en suspensión de *Rubus fruticosus*. Tabla de tamaño de los producto y temperatura de fusión esperados y reales. Curvas de fusión mostrando la especificidad de los productos de PCR usando cDNA generado a partir de RNA total aislado de células en suspensión empleando el protocolo de CTAB 2.0.

7.5.4. Expresión de genes involucrados en biosíntesis de flavonoides.

Finalmente, se evaluó el nivel de expresión relativa de algunos genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides en cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* elicidadas con YE 1 mg/mL o AJ 200 µM y un control. Los cultivos celulares se colectaron 24 h y 72 h después de la adición de YE o AJ, a los 7 días de crecimiento. Asimismo, en paralelo se colectaron cultivos controles (sin tratamiento) a los mismos tiempos.

Los resultados del análisis de qRT-PCR (Fig. 20) demostraron que el YE y el AJ indujeron cambios en la expresión de algunos genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides. La adición de YE 24 h post-elicitación generó un aumento en el nivel de transcripción de los genes *PAL1* y *PAL2* de 6.93 y 6.75 veces, respectivamente, en comparación al control, mientras que *CHS*, *F3H* y *ANS* no mostraron cambios. Asimismo, el efecto del AJ en los cultivos celulares de zarzamora ocasionó un aumento en el nivel de transcripción de todos los genes evaluados, *PAL1*, *PAL2*, *CHS*, *F3H* y *ANS*, de 3.03, 8.02, 11.05, 4.86 y 7.52 veces, respectivamente, 24 h post-elicitación en comparación al control.

Posteriormente, al evaluar el resultado del YE 72 h post-elicitación demostró que solamente el gen *PAL1* mantuvo un aumento en el nivel de transcripción de 6.75 veces en contraste con su respectivo control, entretanto los genes *PAL2* y *ANS* no reflejaron cambios y los genes *CHS* y *F3H* disminuyeron 95.13% y 58.83%, respectivamente. Por otra parte, la elicitación ocasionada por el AJ 72 h post-elicitación continuó con el aumento en el nivel de transcripción de *CHS* y *ANS* de 2.39 y 7.07 veces, respectivamente, en comparación al control, mientras que *PAL1*, *PAL2* y *F3H* no mostraron diferencias significativas.

Dentro del grupo de trabajo se ha demostrado en cultivo de raíces de *Uncaria tomentosa* que la elicitación por YE muestra un incremento en la producción de H₂O₂, el cual está relacionado directamente con la concentración de YE (Correa-Higuera et al., 2019). Probablemente, el YE en los cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* generó un estado de estrés oxidativo por el aumento de H₂O₂ y otras especies reactivas de oxígeno (ROS). Jiang et al. (2018) evaluaron el papel del factor

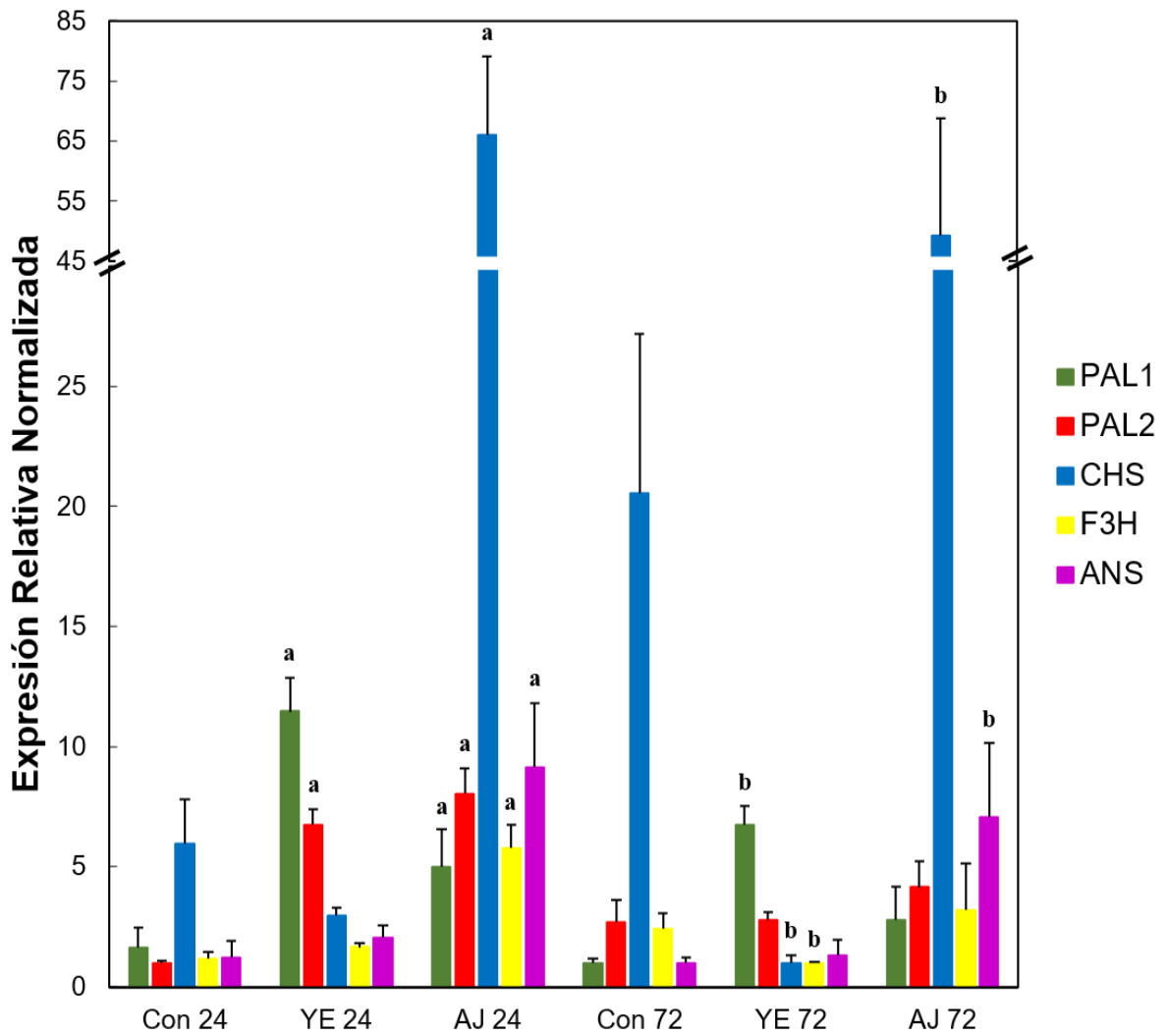


Figura 20. Efecto del extracto de levadura y ácido jasmónico sobre el nivel de expresión relativo de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de flavonoides en cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus*: *PAL*, fenilamonio liasa; *CHS*, chalcona sintasa; *F3H*, flavanona 3-hidroxilasa; *ANS*, antocianidina sintasa. Los niveles de expresión de estos genes se normalizaron con base en el valor mínimo para cada gen. El gen *HistonaH4* se utilizó como control interno. Los cultivos de células en suspensión de *R. fruticosus* se obtuvieron a los 7 días de crecimiento mediante la adición de extracto de levadura (1 mg/mL) y ácido jasmónico (200 µM). Las células se cosecharon 24 h y 72 h después de la elicitación. Las barras de error indican la desviación estándar de la media (n = 3). a: indica diferencias significativas con respecto al tratamiento control 24 post-elicitación, P <0.05; b: indica diferencias significativas con respecto al tratamiento control 72 post-elicitación, P <0.05.

de transcripción MYB96 de *Rosa hybrida* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* sobreexpresando *RhMYB96*, donde determinaron su función como un factor de transcripción sensible al estrés salino a través de una vía dependiente de ABA. De igual manera, en otra especie de la familia Rosaceae *Fragaria × ananassa*, la sobreexpresión del factor MYB10 en la maduración del fruto a través de estrés hídrico, indujo el incremento de ABA (Medina-Puche et al., 2014). Si bien en la familia Rosaceae la formación del complejo MBW todavía no ha sido completamente elucidada, nuestros resultados del análisis de la expresión de genes sugieren que probablemente miembros de la familia de factores de transcripción MYB podría estar participando ante el estrés oxidativo generado por la elicitación por YE aumentando los niveles de expresión de *PAL1* y *PAL2*. No obstante, es preciso mencionar que al no generar cambios o inclusive disminuir los niveles de transcripción de los genes de biosíntesis de flavonoides evaluados (*CHS*, *F3H* y *ANS*), se pudiera desviar los intermediarios de la vía fenilpropanoide a la producción de ácidos clorogénicos en lugar de seguir la ruta de flavonoides. Lo que concuerda con lo reportado en diferentes grupos de investigación que han demostrado que la elicitación por YE en cultivos de células en suspensión de manzana provoca un incremento significativo en ácido 4-hidroxibenzoico, ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico (Cai et al., 2014; Sarkate et al., 2017). Asimismo, en la elicitación por YE en cultivos de raíces de *U. tomentosa*, la producción de ácido clorogénico y su isómero podrían participar en los ciclos de depuración de ROS o en la biosíntesis de compuestos fenólicos complejos (flavonoides o lignina). (Correa-Higuera et al., 2019).

Los factores de transcripción MYB poseen diversos roles, incluyendo miembros de esta familia que participan en la interacción planta-patógeno (Zhang et al., 2015). La respuesta de los cultivos celulares de zarzamora ante la elicitación biótica por el YE podría ser evidencia de un mecanismo de defensa ante el estrés oxidativo generando la inducción de algún miembro de la familia MYB, bifurcando el flujo de carbono hacia la producción de ácidos clorogénicos (Fig. 21), que a su vez sería independiente de AJ ya que no hubo aumento los niveles de expresión de algunos genes relacionados con la biosíntesis de flavonoides como resultó al adicionar AJ a los cultivos de células en suspensión de *R. fruticosus* (Fig. 20). Con base en lo anterior, podemos considerar

además, que la producción de ácidos clorogénicos podrían participar como sustrato en los ciclos de depuración de ROS que se ha propuesto que ocurre en la vacuola a través de los sistemas de peroxidasas (Takahama, 2004).

El papel de los jasmonatos (AJ y MJ) en la producción de flavonoides y antocianinas en frutos de zarzamora y frambuesa, al igual que en cultivos celulares de diferentes especies, ha sido previamente demostrada por diferentes grupos de investigación (Fang et al. 1999; Qu et al. 2011; Wang et al., 2015). Sin embargo, es de resaltar que este es el primer trabajo en demostrar el efecto de AJ en cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* y los cambios en la expresión de genes de biosíntesis de flavonoides. La elicitación generada a partir del AJ aumento los niveles de expresión de todos los genes involucrados en la vía fenilpropanoide/flavonoide después de 24 h post-elicitación y la mantuvo en los genes *CHS* y *ANS* al cabo de 72 h post-elicitación. Estos genes codifican para dos enzimas claves en la biosíntesis de flavonoides, la *CHS* es la primera enzima en esta ruta y la *ANS* participa en la reacción final de biosíntesis de antocianinas. En concordancia con nuestros resultados, Belhadj et al. (2008) demostraron los efectos de MJ (20 μ M) en cultivos celulares de uva (*Vitis vinifera*) con un incremento de 48 y 3 veces en los niveles de transcritos de *PAL* y *CHS*, respectivamente, en comparación al control. Probablemente, la elicitación por AJ en los cultivos celulares de zarzamora sea debido a la degradación de las proteínas JAZ a través del complejo SCF-COI1, basado en CORONATINE INSENSITIVE1, permitiendo la activación del complejo MBW (Qi et al., 2011) (Fig. 21). La activación de este complejo pudiera involucrar otros miembros de la familia de factores MYB, independientes de la respuesta de YE.

El uso de diferentes elicidores en un mismo cultivo es una estrategia que nos puede permitir entender la respuesta ante diferentes condiciones, con el fin de propiciar condiciones para la producción de ciertos metabolitos de interés. Suzuki et al. (2005) en cultivos de células en suspensión del *Medicago truncatula* demostraron que, en esta especie, el uso de dos diferentes elicidores (YE vs. MJ) genera cambios en la expresión de genes diferentes. En el caso de la elicitación de YE (40 g de glucosa

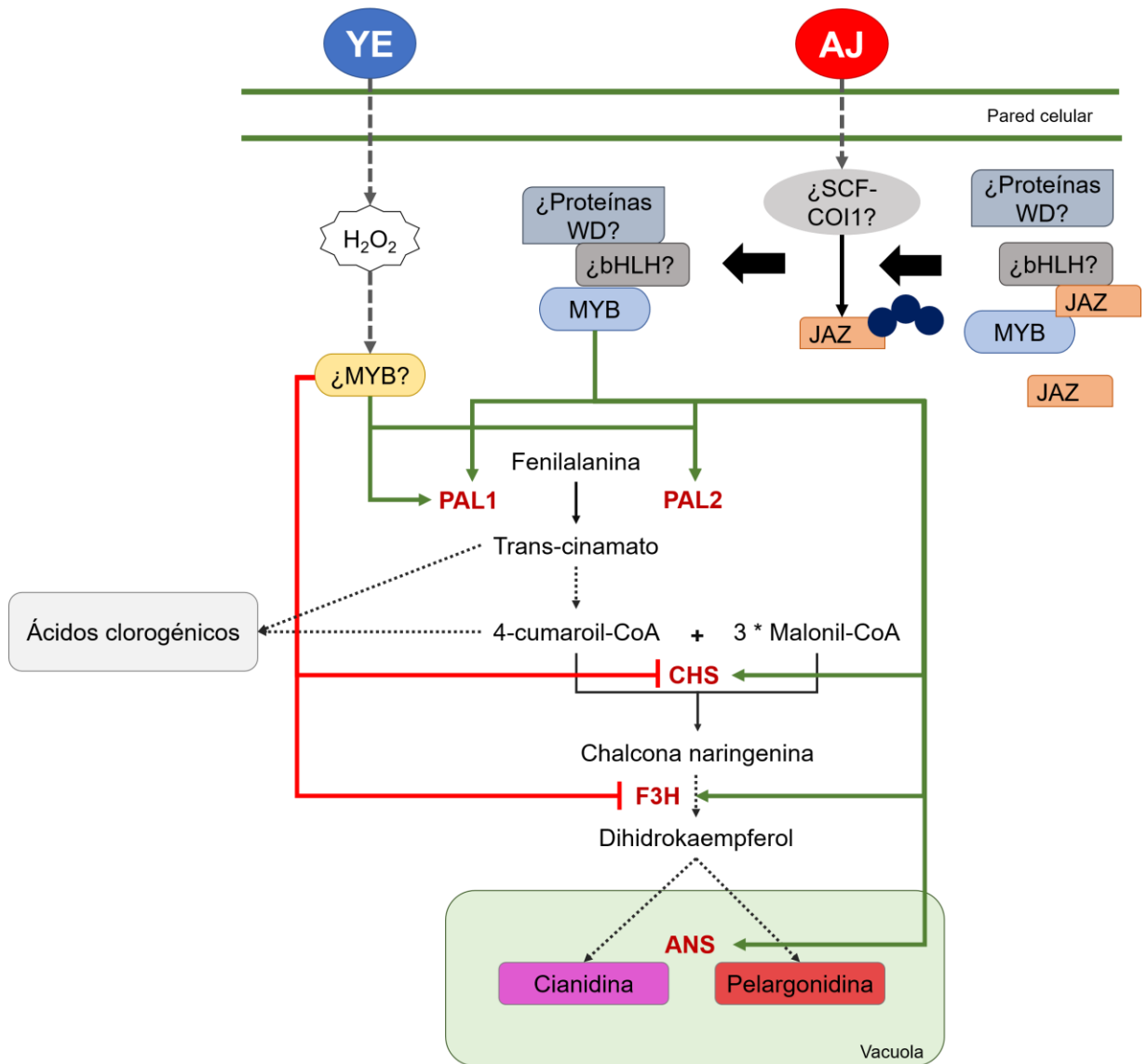


Figura 21. Propuesta de mecanismo sobre la interacción a nivel celular en el cultivo de células en suspensión de *Rubus fruticosus* por el efecto de la elicitación con YE o AJ. Factores de transcripción R2R3 MYB; bHLH, Factores de transcripción basic helix-loop-helix; Proteínas de repetición WD; SCF-CO11, Complejo ubiquitina ligasa E3 SCF-CO11; JAZ, proteínas de domino-ZIM jasmonato; PAL, fenilamonioliasa; CHS, chalcona sintasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; ANS, antocianidina sintasa. Los cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus* se obtuvieron a los 7 días de crecimiento mediante la adición de extracto de levadura (1 mg/mL) y ácido jasmónico (200 μM). Las células se cosecharon 24 h y 72 h después de la elicitación. Flechas verdes: sobreexpresión, flechas rojas: subexpresado, líneas punteadas: procesos indirectos, líneas sólidas: procesos directos. Propuesta modificada de Correa-Higuera et al. (2019).

equivalente/L) resultó en un aumento en los niveles de expresión de *PAL* y *CHS*, mientras que al elicitar con MJ (0.5 mM) incrementó la expresión de *ANS* (Suzuki et al., 2005). De igual manera, nuestros resultados muestran que dependiendo del elicitor empleado existe una sobreexpresión o subexpresión de los diferentes genes analizados en este proyecto, debido a que pudieran inducirse diferentes factores de transcripción para cada tipo de respuesta.

La regulación de la biosíntesis de los metabolitos secundarios depende a partir de diferentes factores de transcripción, que están relacionados con el tipo de estímulo (elicitor), tipo de tejido, condiciones del cultivo, genotipo de la especie, entre otros. La figura 21 representa una propuesta de la interacción entre los dos elicitores empleados en cultivos de células en suspensión de *Rubus fruticosus*, con base a lo reportado por Correa-Higuera et al., (2019). El YE probablemente incrementó la producción de H₂O₂ generando un estrés oxidativo en las células, induciendo la activación de algún miembro de la familia MYB como un mecanismo de defensa del sistema con la activación de la transcripción de los genes *PAL1* y *PAL2*, y a su vez subexpresando genes de la vía de biosíntesis de flavonoides (*CHS* y *F3H*). De esa manera se dirige la ruta hacia la biosíntesis de ácidos clorogénicos que estarían participando como sustratos de la reducción de H₂O₂ y otras ROS. Por el otro lado, la elicitación con AJ probablemente generó la degradación de proteínas JAZ para la formación del complejo MBW permitiendo la transcripción de genes relacionados con la vía fenilpropanoide/flavonoide como respuesta ante esta hormona, y por consiguiente darse el incremento de la producción de flavonoides como una vía alternativa de un mecanismo de defensa.

8. Conclusiones

Fue posible lograr la germinación *in vitro* de semillas de *Rubus fruticosus* (zarzamora) y *R. idaeus* (frambuesa) a partir del tratamiento de escarificación utilizando H₂SO₄ (98%), de 3 h y 1 h, respectivamente. La escarificación con H₂SO₄ fue un paso crítico para romper con la dormancia de las semillas, no obstante, el tiempo vario dependiendo del subgénero al que pertenecía cada especie.

Se establecieron los cultivos de células en suspensión de *R. fruticosus* utilizando el medio Gamborg B5 suplementado con NAA (3 mg/L). Los resultados demuestran que la producción de biomasa en los cultivos de células en suspensión de zarzamora depende de los tipos de reguladores en el medio de cultivo, independiente del medio utilizado.

La elicitación con YE o AJ en los cultivos de células en suspensión de *R. fruticosus* tuvieron un cambio en los niveles de expresión de los genes de biosíntesis de flavonoides característico. Los cultivos elicitados con YE (1 mg/mL) mostraron una sobreexpresión de los genes *PAL1* y *PAL2*, así como una subexpresión de los genes *CHS* y *F3H*. Entretanto, la elicitación por AJ (200 µM) generó un aumento en los niveles de expresión de todos los genes evaluados *PAL1*, *PAL2*, *CHS*, *F3H* y *ANS*.

Probablemente, la elicitación generada por YE incrementó la producción de H₂O₂ permitiendo la inducción de algún miembro de la familia de factores de transcripción MYB induciendo los genes *PAL1* y *PAL2*, bifurcando el flujo de carbono hacia la biosíntesis de ácidos clorogénicos como una estrategia para la reducción de ROS. Mientras que, el uso de AJ pudo promover la formación del complejo MBW en los cultivos celulares de zarzamora hacia la producción de flavonoides, como una estrategia alternativa de defensa.

9. Recomendaciones

Es necesario determinar las condiciones óptimas de crecimiento de los cultivos de células en suspensión de *R. idaeus*, así como realizar una cinética de estos cultivos para conocer sus parámetros.

Se debe realizar un análisis en la producción de polifenoles y flavonoides por HPLC-MS, para determinar los cambios en la concentración y el perfil de estos metabolitos secundarios por el uso de elicitadores en cultivos celulares de *R. fruticosus*, con el fin de evaluar la hipótesis de bifurcación del flujo de carbono hacia la biosíntesis de ácidos clorogénicos versus la producción de flavonoides.

Es necesario realizar experimentos de elicitación en los cultivos de células en suspensión *R. idaeus*, para evaluar los cambios en la expresión de genes de biosíntesis de flavonoides, así como de la producción de polifenoles y flavonoides. Con el fin de comparar los resultados de la elicitación en los cultivos de *R. fruticosus*.

Se debe hacer un análisis del transcriptoma de los cultivos celulares de *R. fruticosus* bajo condiciones de estrés mediante el uso de elicitadores (YE y AJ) para determinar la identidad de los factores de transcripción involucrados en cada respuesta.

10. Referencias

Ahmed NU, Park J-I, Jung H-J, Yang T-J, Hur Y, Nou I-S. Characterization of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) genes and their association with cold and freezing stress in *Brassica rapa*. *Gene* 2014;550:46–55. doi:10.1016/j.gene.2014.08.013.

Ananga A, Georgiev V, Ochieng J, Phills B, Tsolov V. Production of anthocyanins in grape cell cultures: A potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. *Mediterr. Genet. Code - Grapevine Olive*, vol. 2, InTech; 2013, p. 247–87. doi:10.5772/54592.

Anderson WC. Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. *Acta Hort* 1980;112:13–20. doi:10.17660/ActaHortic.1980.112.1.

Baenas N, García-Viguera C, Moreno D. Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules* 2014;19:13541–63. doi:10.3390/molecules190913541.

Belhadj A, Telef N, Saigne C, Cluzet S, Barrieu F, Hamdi S, et al. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiol Biochem* 2008;46:493–9. doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.001.

Berejsza-Wysecki W, Hrazdin G. Establishment of callus and cell suspension cultures of raspberry (*Rubus idaeus* cv. Royalty). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1994;37:213–6. doi:10.1007/BF00043620.

Bogs J, Jaffé FW, Takos AM, Walker AR, Robinson SP. The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiol* 2007;143:1347–61. doi:10.1104/pp.106.093203.

Borejsza-Wysocki W, Hrazdina G. Biosynthesis of *p*-hydroxyphenyl-2-one fruits and tissue cultures. *Phytochemistry* 1993;35:623–8. doi:10.1016/S0031-9422(00)90575-2

Borges G, Degeneve A, Mullen W, Crozier A. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants and cranberries. *J Agric Food Chem* 2010;58:3901–9. doi:10.1021/jf902263n.

Bowles D, Isayenkova J, Lim E-K, Poppenberger B. Glycosyltransferases: Managers of small molecules. *Curr Opin Plant Biol* 2005;8:254–63. doi:10.1016/j.pbi.2005.03.007.

Cai Z, Kastell A, Mewis I, Knorr D, Smetanska I. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2012;108:401–9. doi:10.1007/s11240-011-0051-3.

Cai Z, Kastell A, Smetanska I. Chitosan or yeast extract enhance the accumulation of eight phenolic acids in cell suspension cultures of *Malus × domestica* Borkh. *J Hortic Sci Biotechnol* 2014;89:93–9. doi:10.1080/14620316.2014.11513054.

Cartier N, Chambat G, Joseleau JP. An arabinogalactan from the culture medium of *Rubus fruticosus* cells in suspension. *Carbohydr Res* 1987;168:275–83. doi:10.1016/0008-6215(87)80030-7.

Cartier N, Chambat G, Joseleau J-P. Cell wall and extracellular galactoglucomannans from suspension-cultured *Rubus fruticosus* cells. *Phytochemistry* 1988;27:1361–4. doi:10.1016/0031-9422(88)80194-8.

Chalker-Scott L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol* 1999;70:1–9. doi:10.1111/j.1751-1097.1999.tb01944.x.

Chen Q, Liu X, Hu Yueyang, Sun B, Hu Yaodong, Wang X, et al. Transcriptomic profiling of fruit development in black raspberry *Rubus coreanus*. *Int J Genomics* 2018;2018. doi.org/10.1155/2018/8084032

Chen Q, Yu H, Tang H, Wang X. Identification and expression analysis of genes involved in anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in the fruit of blackberry. *Sci Hortic (Amsterdam)* 2012a;141:61–8. doi:10.1016/j.scienta.2012.04.025.

Chen Q, Yu HW, Wang XR, Xie XL, Yue XY, Tang HR. An alternative cetyltrimethylammonium bromide-based protocol for RNA isolation from blackberry (*Rubus* L.). *Genet Mol Res* 2012b;11:1773–82. doi:10.4238/2012b.June.29.10.

Cheyrier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem* 2013;72:1–20. doi:10.1016/j.plaphy.2013.05.009.

Correa-Higuera LJ, Sepúlveda-García EB, Ponce-Noyola T, Trejo-Espino JL, Jiménez-Aparicio AR, Luna-Palencia GR, et al. Glucoindole alkaloid accumulation induced by yeast extract in *Uncaria tomentosa* root cultures is involved in defense response. *Biotechnol Lett* 2019;41:1233–44. doi.org/10.1007/s10529-019-02714-1.

Cortelazzo AL, Marais M-F, Joseleau J-P. Changes in peroxidases in the suspension culture of *Rubus fruticosus* during growth. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1996;46:27–33. doi:10.1007/BF00039693.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. En *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.* : Crozier, A., Clifford, M.N. and Ashihara, H. (eds). Blackwell Publishing, Oxford, UK. pp. 1-24. doi.org/10.1002/9780470988558.ch1.

Debnath S. A scaled-up system for *in vitro* multiplication of thidiazuron-induced red raspberry shoots using a bioreactor. *J Hortic Sci Biotechnol* 2010;85:94–100. doi:10.1080/14620316.2010.11512637.

Debnath SC. Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through *in vitro* axillary shoot proliferation. *Plant Growth Regul* 2004;43:179–86. doi:10.1023/B:GROW.0000040110.53216.6a.

Deepa K, Sheeja TE, Santhi R, Sasikumar B, Cyriac A, Deepesh P V., et al. A simple and efficient protocol for isolation of high quality functional RNA from different tissues of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Physiol Mol Biol Plants* 2014;20:263–71. doi:10.1007/s12298-013-0218-y.

Donnelly DJ, Daubney A. Tissue culture of *Rubus* species. *Acta Hort* 1986;183:305–14. doi:10.17660/ActaHortic.1986.183.44.

Donnelly DJ, Stace-Smith R, Mellor FC. *In vitro* culture of three *Rubus* species. *Acta Hort* 1980;112:69–75. doi:10.17660/ActaHortic.1980.112.9.

Dwight Z, Palais R, Wittwer CT. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinformatics*, 2011;27:1019–1020. doi:10.1093/bioinformatics/btr065

Dziadczyk E, Domaciuk M, Dziadczyk P, Pawelec I, Szczuka E, Bednara J. Optimization of *in vitro* culture conditions influencing the initiation of raspberry (*Rubus idaeus* L. cv. Nawojka) cell suspension culture. *Ann UMCS, Biol* 2013;68:15–24. doi:10.2478/v10067-012-0030-z.

Espley R V., Hellens RP, Putterill J, Stevenson DE, Kutty-Amma S, Allan AC. Red coloration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *Plant J* 2007;49:414–27. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02964.x.

Evans KJ, Symon DE, Whalen MA, Hosking JR, Barker RM, Oliver JA. Systematics of the *Rubus fruticosus* aggregate (Rosaceae) and other exotic *Rubus* taxa in Australia. *Aust Syst Bot* 2007;20:187. doi:10.1071/SB06044.

Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* 2012;3:1–15. doi:10.3389/fpls.2012.00222.

Fang Y, Smith MAL, Pépin M-F. Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin-producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium phalae*). *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 1999;35:106–13. doi:10.1007/s11627-999-0019-8.

Ferrer J-L, Austin MB, Stewart C, Noel JP. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol Biochem* 2008;46:356–70. doi:10.1016/j.plaphy.2007.12.009.

Fiola JA, Hassan MA, Swartz HJ, Bors RH, McNicols R. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus*

cotyledons and leaves. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1990;20:223–8. doi:10.1007/BF00041885.

Fira A, Clapa D, Rakosy-Tican E. *In vitro* propagation of the thornless blackberry cultivar Loch Ness. *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca Horticult* 2011;68:39–46.

Flores G, Ruiz del Castillo ML. Influence of preharvest and postharvest methyl jasmonate treatments on flavonoid content and metabolomic enzymes in red raspberry. *Postharvest Biol Technol* 2014;97:77–82. doi:10.1016/j.postharvbio.2014.06.009.

Forni C, Frattarelli A, Lentini A, Beninati S, Lucoli S, Caboni E. Assessment of the antiproliferative activity on murine melanoma cells of extracts from elicited cell suspensions of strawberry, strawberry tree, blackberry and red raspberry. *Plant Biosyst - An Int J Deal with all Asp Plant Biol* 2016;150:1233–9. doi:10.1080/11263504.2015.1018981.

Gamar L, Blondeau K, Simonet JM. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *J Appl Microbiol* 1997;83:281–7. doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00228.x.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 1968;50:151–8. doi:10.1016/0014-4827(68)90403-5.

García-Seco D, Bonilla A, Algar E, García-Villaraco A, Mañero JG, Ramos-Solano B. Enhanced blackberry production using *Pseudomonas fluorescens* as elicitor. *Agron Sustain Dev* 2013;33:385–92. doi:10.1007/s13593-012-0103-z.

García-Seco D, Zhang Y, Gutierrez-Mañero FJ, Martin C, Ramos-Solano B. RNA-Seq analysis and transcriptome assembly for blackberry (*Rubus sp.* Var. Lochness) fruit. *BMC Genomics* 2015;16:5. doi:10.1186/s12864-014-1198-1.

George E. *Plant propagation by tissue culture; part 1. The technology.* Exegetics Limited, England; 1993, p. 574.

Gupta S, Mahalaxmi V. *In vitro* high frequency direct plant regeneration from whole leaves of blackberry. *Sci Hortic (Amsterdam)* 2009;120:22–6.

doi:10.1016/j.scienta.2008.09.010.

Gutierrez E, Velasco AG, Lucas JA, Gutierrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B. The flavonol-anthocyanin pathway in blackberry and *Arabidopsis*: State of the art. *Flavonoids - From Biosynth. to Hum. Heal.*, vol. 2, InTech; 2017, p. 64. doi:10.5772/67902.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002;13:572–84. doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5

Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou Y-H, et al. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiol* 2010;153:1526–38. doi.org/10.1104/pp.110.157370.

Huded AKC, Jingade P, Mishra MK. A rapid and efficient SDS-based RNA isolation protocol from different tissues of coffee. *3 Biotech* 2018;8:183. doi.org/10.1007/s13205-018-1209-z.

Hummer KE, Peacock DN. Seed dimension and weight of selected *Rubus* species. *HortScience* 1994;29:1034-36. doi:10.21273/hortsci.29.9.1034.

Hummon AB, Lim SR, Difilippantonio MJ, Ried T. Isolation and solubilization of proteins after TRIzol® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *Biotechniques* 2007;42:467–72. doi:10.2144/000112401.

Hyun TK, Lee S, Kumar D, Rim Y, Kumar R, Lee SY, et al. RNA-seq analysis of *Rubus idaeus* cv. Nova: transcriptome sequencing and de novo assembly for subsequent functional genomics approaches. *Plant Cell Rep* 2014a;33:1617–28. doi:10.1007/s00299-014-1641-4.

Hyun TK, Lee S, Rim Y, Kumar R, Han X, Lee SY, et al. De-novo RNA sequencing and metabolite profiling to identify genes involved in anthocyanin biosynthesis in Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel). *PLoS One* 2014b;9:1–13. doi:10.1371/journal.pone.0088292.

Ismaini L, Surya MI, Destri. *In vitro* plant regeneration from hypocotyl of arben (*Rubus fraxinifolius* Poir.). Aust J Crop Sci 2017;11:474–8. doi:10.21475/ajcs.17.11.04.359.

Jennings D. Raspberries and Blackberries: Their breeding, disease, and growth. London: Academic Press; 1988.

Ji X-H, Zhang R, Wang N, Yang L, Chen X-S. Transcriptome profiling reveals auxin suppressed anthocyanin biosynthesis in red-fleshed apple callus (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). Plant Cell, Tissue Organ Cult 2015;123:389–404. doi:10.1007/s11240-015-0843-y.

Jiang F, Wang J-Y, Jia H-F, Jia W-S, Wang H-Q, Xiao M. RNAi-mediated silencing of the flavanone 3-hydroxylase gene and its effect on flavonoid biosynthesis in strawberry fruit. J Plant Growth Regul 2013;32:182–90. doi:10.1007/s00344-012-9289-1.

Jiang X, Li S, Ding A, Zhang Z, Hao Q, Wang K, et al. The novel rose MYB transcription factor *RhMYB96* enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. Plant Mol Biol Report 2018;36:406–17. doi.org/10.1007/s11105-018-1094-y

Jin W, Wang H, Li M, Wang J, Yang Y, Zhang X, et al. The R2R3 MYB transcription factor PavMYB10.1 involves in anthocyanin biosynthesis and determines fruit skin colour in sweet cherry (*Prunus avium* L.). Plant Biotechnol J 2016;14:2120–33. doi:10.1111/pbi.12568.

Jones CS, Iannetta PPM, Woodhead M, Davies H V., McNicol RJ, Taylor MA. The isolation of RNA from raspberry (*Rubus idaeus*) fruit. Appl Biochem Biotechnol - Part B Mol Biotechnol 1997;8:219–21. doi:10.1007/BF02760775.

Joseleau JP, Cartier N, Chambat G, Faik A, Ruel K. Structural features and biological activity of xyloglucans from suspension-cultured plant cells. Biochimie 1992;74:81–8. doi:10.1016/0300-9084(92)90187-J.

Jung S, Lee T, Cheng C-H, Buble K, Zheng P, Yu J, et al. 15 years of GDR: New data and functionality in the Genome Database for Rosaceae. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D1137–45. doi:10.1093/nar/gky1000.

Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res* 2017;61:1361779. doi:10.1080/16546628.2017.1361779.

Kitamura S. Transport of flavonoids: From cytosolic synthesis to vacuolar accumulation. En: *The Science of Flavonoids*. Grotewold E. (eds) Springer, New York, NY. 2006, p. 123-46. doi:10.1007/978-0-387-28822-2_5.

Kumar A, Ellis BE. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiol* 2001;127:230–9. doi:10.1104/pp.127.1.230.

Lea US, Slimestad R, Smedvig P, Lillo C. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta* 2007;225:1245–53. doi:10.1007/s00425-006-0414-x.

Lee J, Dossett M, Finn CE. *Rubus* fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chem* 2012;130:785–96. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.022.

Lin-Wang K, Bolitho K, Grafton K, Kortstee A, Karunairetnam S, McGhie TK, et al. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biol* 2010;10:50. doi:10.1186/1471-2229-10-50.

Liu Y, Tikunov Y, Schouten RE, Marcelis LFM, Visser RGF, Bovy A. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in solanaceous vegetables: A Review. *Front Chem* 2018;6. doi:10.3389/fchem.2018.00052.

MacRae E. 2007. Extraction of plant RNA BT. En: Hilario E, Mackay J (eds) Protocols for nucleic acid analysis by nonradioactive probes. Humana Press, Totowa; 2007, p. 15–24. doi:10.1385/1-59745-229-7:15

Martens S, Preuß A, Matern U. Multifunctional flavonoid dioxygenases: Flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. Phytochemistry 2010;71:1040–9. doi:10.1016/j.phytochem.2010.04.016.

McNicol RJ, Graham J. *In vitro* regeneration of *Rubus* from leaf and stem segments. Plant Cell Tissue Organ Cult 1990;21:45–50. doi:10.1007/BF00034490.

Medina-Puche L, Cumplido-Laso G, Amil-Ruiz F, Hoffmann T, Ring L, Rodríguez-Franco A, et al. MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria x ananassa* fruits. J Exp Bot 2014;65:401–17. doi:10.1093/jxb/ert377.

Meiers S, Kemény M, Weyand U, Gastpar R, von Angerer E, Marko D. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. J Agric Food Chem 2001;49:958–62. doi:10.1021/jf0009100.

Meng R, Chen THH, Finn CE, Li Y. Improving *in vitro* plant regeneration from leaf and petiole explants of “Marion” blackberry. HortScience 2004;39:316–20. doi:10.21273/HORTSCI.39.2.316.

Mertz C, Cheynier V, Günata Z, Brat P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. J Agric Food Chem 2007;55:8616–24. doi:10.1021/jf071475d.

Mezzetti B, Savani G, Carnevali F, Mott D. Plant genotype and growth regulators interaction affecting *in vitro* morphogenesis of blackberry and raspberry. Biol Plant 1997;39:139–50. doi:10.1023/A:100038161.

Mori T, Sakurai M. Production of anthocyanin from strawberry cell suspension cultures; effects of sugar and nitrogen. J Food Sci 1994;59:588–93. doi:10.1111/j.1365-2621.1994.tb05569.x.

Moscatiello R, Baldan B, Navazio L. Plant cell suspension cultures. En: Plant Mineral Nutrients: Methods and Protocols. Maathuis FJM (eds). Humana Press, Totowa, NJ. 2013, p. 77–93. doi:10.1007/978-1-62703-152-3_5.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962;15:473–97. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Mustafa NR, De Winter W, Van Iren F, Verpoorte R. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat Protoc* 2011;6:715–42. doi:10.1038/nprot.2010.144.

Nohynek L, Bailey M, Tähtiharju J, Seppänen-Laakso T, Rischer H, Oksman-Caldentey K-M, et al. Cloudberry (*Rubus chamaemorus*) cell culture with bioactive substances: Establishment and mass propagation for industrial use. *Eng Life Sci* 2014;14:667–75. doi:10.1002/elsc.201400069.

Oksman-Caldentey K-M, Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci* 2004;9:433–40. doi:10.1016/j.tplants.2004.07.006.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci* 2016;5:e47. doi:10.1017/jns.2016.41.

Pauwels L, Goossens A. The JAZ proteins: A crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* 2011;23:3089–100. doi:10.1105/tpc.111.089300.

Pedapudi S, Chin C-K, Pedersen H. Production and elicitation of benzalacetone and the raspberry ketone in cell suspension cultures of *Rubus idaeus*. *Biotechnol Prog* 2000;16:346–9. doi:10.1021/bp000033i.

Pojer E, Mattivi F, Johnson D, Stockley CS. The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2013;12:483–508. doi:10.1111/1541-4337.12024.

Poulev A, O'Neal JM, Logendra S, Pouleva RB, Timeva V, Garvey AS, et al. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J Med Chem* 2003;46:2542–7. doi:10.1021/jm020359t.

Qi T, Song S, Ren Q, Wu D, Huang H, Chen Y, et al. The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2011;23:1795–814. doi:10.1105/tpc.111.083261.

Qu J, Zhang W, Yu X. A combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2011;107:261–9. doi:10.1007/s11240-011-9977-8.

Quattrocchio F, Verweij W, Kroon A, Spelt C, Mol J, Koes R. PH4 of *Petunia* is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *Plant Cell* 2006;18:1274–91. doi:10.1105/tpc.105.034041.

Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chemie - Int Ed* 2011;50:586–621. doi:10.1002/anie.201000044.

Rafique MZ, Carvalho E, Stracke R, Palmieri L, Herrera L, Feller A, et al. Nonsense mutation inside anthocyanidin synthase gene controls pigmentation in yellow raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Front Plant Sci* 2016;7:1892. doi:10.3389/fpls.2016.01892.

Rao AV, Snyder DM. Raspberries and human health: A review. *J Agric Food Chem* 2010;58:3871–83. doi:10.1021/jf903484g.

Reid S, Sims IM, Melton LD, Gane AM. Characterisation of extracellular polysaccharides from suspension cultures of apple (*Malus domestica*). *Carbohydr Polym* 1999;39:369–76. doi:10.1016/S0144-8617(98)00155-6.

Rowan DD, Cao M, Lin-Wang K, Cooney JM, Jensen DJ, Austin PT, et al. Environmental regulation of leaf colour in red 35S:PAP1 *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 2009;182:102–15. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02737.x.

Ruiz-García Y, Gómez-Plaza E. Elicitors: A tool for improving fruit phenolic content. *Agriculture* 2013;3:33–52. doi:10.3390/agriculture3010033.

Rzedowsky J, Calderón de Rzedowski G. Familia Rosaceae. En: Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Rzedowski J, Calderón de Rzedowski G (Eds), Instituto de Ecología A.C. y Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán. 2005.

SAGARPA. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 Frutas del Bosque. México: 2017.

Saito K, Yonekura-Sakakibara K, Nakabayashi R, Higashi Y, Yamazaki M, Tohge T, et al. The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity. *Plant Physiol Biochem* 2013;72:21–34. doi:10.1016/j.plaphy.2013.02.001.

Sarkate A, Banerjee S, Mir JI, Roy P, Sircar D. Antioxidant and cytotoxic activity of bioactive phenolic metabolites isolated from the yeast-extract treated cell culture of apple. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 2017;130:641–9. doi:10.1007/s11240-017-1253-0.

Schmidt-Durán A, Alvarado-Ulloa C, Chacón-Cerdas R, Alvarado-Marchena LF, Flores-Mora D. Callogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schldl.) and its microscopic analysis. *Springerplus* 2016;5:1717:1-9. doi:10.1186/s40064-016-3381-0.

Segura S, Rebollar-Alviter A, Boyzo-Marín J, Hernández-Bello M, López-Medina J. Genetic resources of blackberry wild species in Michoacan, Mexico. *Acta Horti* 2012:107–11. doi:10.17660/ActaHortic.2012.946.14.

Shi M-Z, Xie D-Y. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana*. *Recent Pat Biotechnol* 2014;8:47–60. doi:10.2174/1872208307666131218123538.

Skirvin RM, Motoike S, Coyner M, Norton MA. *Rubus spp.* cane fruit. Biotechnol. fruit nut Crop., Wallingford: CABI; 2009, p. 566–82. doi:10.1079/9780851996622.0566.

Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. *Phyther Res* 2016;30:1265–86. doi:10.1002/ptr.5642.

Sønsteby A, Heide OM. Environmental control of growth and flowering of *Rubus idaeus* L. cv. Glen Ample. *Sci Hortic (Amsterdam)* 2008;117:249–56. doi:10.1016/j.scienta.2008.05.003.

Stracke R, Ishihara H, Huet G, Barsch A, Mehrtens F, Niehaus K, et al. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant J* 2007;50:660–77. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03078.x.

Suzuki H, Reddy MSS, Naoumkina M, Aziz N, May GD, Huhman D V., et al. Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* 2005;220:696–707. doi:10.1007/s00425-004-1387-2.

Takahama U. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochem Rev* 2004;3:207–19. doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047805.08470.e3.

Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, Yano M, Nakajima J, Awazuhara M, et al. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J* 2005;42:218–35. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02371.x.

Travisany D, Ayala-Raso A, Di Genova A, Monsalve L, Bernales M, Martínez JP, et al. RNA-Seq analysis and transcriptome assembly of raspberry fruit (*Rubus idaeus* "Heritage") revealed several candidate genes involved in fruit development and ripening. *Sci Hortic (Amsterdam)* 2019;254:26–34. doi:10.1016/j.scienta.2019.04.018.

Vladimir-Kneevi S, Blaekovi B, Bival M, Babac M. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. En: *Phytochemicals as Nutraceuticals:*

Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health. Rao V (eds). InTech; 2012, p. 64. doi:10.5772/27843.

Vrhovsek U, Giongo L, Mattivi F, Viola R. A survey of ellagitannin content in raspberry and blackberry cultivars grown in Trentino (Italy). *Eur Food Res Technol* 2008;226:817–24. doi:10.1007/s00217-007-0601-4.

Vrhovsek U, Palchetti A, Reniero F, Guillou C, Masuero D, Mattivi F. Concentration and mean degree of polymerization of *Rubus* ellagitannins evaluated by optimized acid methanolysis. *J Agric Food Chem* 2006;54:4469–75. doi:10.1021/jf060404w.

Vujović T, Ružić Đ, Cerović R, Šurlan Momirović G. Adventitious regeneration in blackberry (*Rubus fruticosus* L.) and assessment of genetic stability in regenerants. *Plant Growth Regul* 2010;61:265–75. doi:10.1007/s10725-010-9474-9.

Wada S, Reed BM. Optimized scarification protocols improve germination of diverse *Rubus* germplasm. *Sci Hortic (Amsterdam)* 2011a;130:660–4. doi:10.1016/j.scienta.2011.08.023.

Wada S, Reed BM. Standardizing germination protocols for diverse raspberry and blackberry species. *Sci Hortic (Amsterdam)* 2011b;132:42–9. doi:10.1016/j.scienta.2011.10.002.

Wang J, Qian J, Yao L, Lu Y. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresour Bioprocess* 2015;2:5. doi:10.1186/s40643-014-0033-5.

Wang N, Zhang Z, Jiang S, Xu H, Wang Y, Feng S, et al. Synergistic effects of light and temperature on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 2016;127:217–27. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1044-z>.

Wang S, Bowman L, Ding M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of

human cancer cells. Food Chem 2007;107:1261–9.
doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.065.

Wang S, Zheng W. Preharvest application of methyl jasmonate increases fruit quality and antioxidant capacity in raspberries. Int J Food Sci Technol 2005;40:187–95. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.00930.x.

Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radic Biol Med 2004;36:838–49.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001.

Zhang Y, Peng X, Liu Y, Li Y, Luo Y, Wang X, et al. Evaluation of suitable reference genes for qRT-PCR normalization in strawberry (*Fragaria x ananassa*) under different experimental conditions. BMC Mol Biol 2018;19:1–10. doi:10.1186/s12867-018-0109-4.

Zhang Z, Chen J, Su Y, Liu H, Chen Y, Luo P, et al. *TaLHY*, a 1R-MYB transcription factor, plays an important role in disease resistance against stripe rust fungus and ear heading in wheat. PLoS One 2015;10:e0127723.
doi.org/10.1371/journal.pone.0127723.

Zhao S, Fernald RD. Comprehensive algorithm for quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. J Comput Biol 2005;12:1047–64.
doi.org/10.1089/cmb.2005.12.1047

Zheng D, Hrazdina G. Molecular and biochemical characterization of benzalacetone synthase and chalcone synthase genes and their proteins from raspberry (*Rubus idaeus* L.). Arch Biochem Biophys 2008;470:139–45.
doi:10.1016/j.abb.2007.11.013.

Zheng D, Schröder G, Schröder J, Hrazdina G. Molecular and biochemical characterization of three aromatic polyketide synthase genes from *Rubus idaeus*. Plant Mol Biol 2001;46:1–15. doi:10.1023/A:1010642517738.

Zia-Ul-Haq M, Riaz M, De Feo V, Jaafar HZE, Moga M. *Rubus fruticosus* L.: Constituents, biological activities and health related uses. *Molecules* 2014;19:10998–1029. doi:10.3390/molecules190810998.

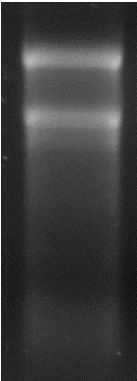


11. Anexos


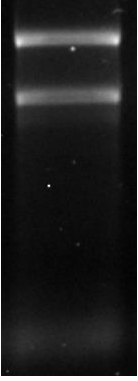

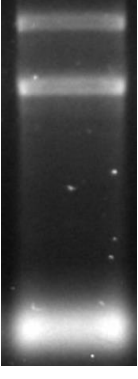
Anexo 1. Números de acceso y código de transcriptoma de los genes empleados para el diseño de los oligonucleótidos.





Gen	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Rubus</i> (taxid:23216) NCBI	Transcriptoma <i>Rubus idaeus</i> cv. Heritage
Fenilamonio liasa <i>PAL</i>	AT2G37040.1 <i>PAL1</i>	AF237954.1 <i>Rubus idaeus PAL1</i> AF304366.1 <i>Rubus idaeus PAL1</i>	RIT000009144 16060Bras_G16482 GO:0089701 GO:0006559 GO:0030628 GO:0046872 GO:0005737 GO:0005681 GO:0016841 GO:0000398
		AF237955.1 <i>Rubus idaeus PAL2</i> AF304367.1 <i>Rubus idaeus PAL2</i>	RIT000002707 27009Bras_G27621 GO:0089701 GO:0006559 GO:0030628 GO:0046872 GO:0005737 GO:0005681 GO:0016841 GO:0000398
Chalcona sintasa <i>CHS</i>	AT5G13930.1	AF292367.1 <i>Rubus idaeus</i> * <i>PKS1</i> EU862821.1 <i>Rubus idaeus</i> * <i>PKS1</i>	RIT00000831 21303Bras_G21824 GO:0009288 GO:0006629

		AF292368.1 <i>Rubus idaeus</i> * PKS2 AF292369.1 <i>Rubus idaeus</i> * PKS3 EF694717.1 <i>Rubus idaeus</i> * PKS4 EF694718.1 <i>Rubus idaeus</i> * PKS5	* PSK1
Flavanona 3-hidroxilasa <i>F3H</i>	AT3G51240.1	EU123532.1 <i>Rubus sp.</i> EU255776.1 <i>Rubus coreanus</i> EU078685.1 <i>Rubus coreanus</i> FJ554630.1 <i>Rubus occidentalis</i>	RIT000001253 1133Bras_G01174 G O:0004185 GO:0016491 GO:0006508 GO:0055114
Antocianina sintasa <i>ANS</i>	AT5G13930.1	KX950789.1 <i>Rubus idaeus</i>	RIT000006506 14497Bras_G14884 GO:0004672 GO:0005488 GO:0016491 GO:0007275 GO:0019538 GO:0044260 GO:0050794 GO:0055114
Histona H4 <i>HisH4</i>	AB197150.1 * <i>Fragaria x ananassa</i>		RIT000002524 1949Bras_G02015 G O:0005524 GO:0016887

Anexo 2. Datos de concentración, pureza e integridad del RNA empleando diferentes protocolos de extracción en tejidos de *Rubus fruticosus* y *R. idaeus*.

Tejido	Método	RNA (ng/μl)	260/280	260/230	Integridad
<p>Callo en medio MS adicionado con 1.0 mg/L de NAA y 0.25 mg/L de BAP, en condiciones de fotoperíodo.</p> <p>Especie: Zarzamora</p>	<p>CTAB (McRae, 2007)</p>	<p>901.55 ± 713.4</p>	<p>1.19</p>	<p>1.05</p>	
<p>Callo en medio MS adicionado con 1.0 mg/L de NAA y 0.25 mg/L de BAP, en condiciones de fotoperíodo.</p> <p>Especie: Zarzamora</p>	<p>Trizol (InvitrogenTM)</p>	<p>149.85 ± 68.2</p>	<p>1.18</p>	<p>0.45</p>	
<p>Callo en medio Gamborg B5 adicionado con 2.0 mg/L de 2,4-D, 0.1 mg/L de Kin y 50 mg/L de L-cisteína, en condiciones de oscuridad.</p> <p>Especie: Zarzamora</p>	<p>SDS (Huded et al., 2018)</p>	<p>148.57 ± 25.9</p>	<p>1.69</p>	<p>1.92</p>	

<p>Callo en medio Gamborg B5 adicionado con 2.0 mg/L de 2,4-D, 0.1 mg/L de Kin y 50 mg/L de L-cisteína, en condiciones de oscuridad.</p> <p>Especie: Zarzamora</p>	<p>SDS/Na (Huded et al., 2018)</p>	<p>170.7 ± 13.8</p>	<p>1.82</p>	<p>2.11</p>	
<p>Cultivos de células en suspensión en medio B30, en condiciones de oscuridad.</p> <p>Especie: Zarzamora</p>	<p>SDS/Na (Huded et al., 2018)</p>	<p>89.75 ± 9.4</p>	<p>1.88</p>	<p>2.16</p>	
<p>Cultivos de células en suspensión en medio B30, en condiciones de oscuridad.</p> <p>Especie: Zarzamora</p>	<p>SDS (Huded et al., 2018)</p>	<p>121.95 ± 25.1</p>	<p>1.82</p>	<p>1.99</p>	
<p>Cultivos de células en suspensión en medio B30, en condiciones de oscuridad.</p> <p>Especie: Zarzamora</p>	<p>CTAB (Chen et al., 2012)</p>	<p>310.15 ± 247.02</p>	<p>2.0475</p>	<p>1.70</p>	

<p>Cultivos de células en suspensión en medio B30, en condiciones de oscuridad.</p> <p>Especie: Zarzamora</p>	<p>SDS 2.0 (Huded et al., 2018)</p>	<p>1115.5 ± 11.60</p>	<p>1.765</p>	<p>1.605</p>	
<p>Cultivos de células en suspensión en medio B30, en condiciones de oscuridad.</p> <p>Especie: Zarzamora</p>	<p>CTAB 2.0 (Modificado de Huded et al., 2018)</p>	<p>714.8 ± 0.71</p>	<p>1.98</p>	<p>1.925</p>	
<p>Cultivos de células en suspensión en medio B30, en condiciones de oscuridad.</p> <p>Especie: Frambuesa</p>	<p>CTAB 2.0 (Modificado de Huded et al., 2018)</p>	<p>1427.1 ± 63.64</p>	<p>2.035</p>	<p>2.125</p>	
<p>Cultivos de células en suspensión en medio Gamborg B5 sin RG, en condiciones de luz continúa</p> <p>Especie: Zarzamora</p>	<p>CTAB 2.0 (Modificado de Huded et al., 2018)</p>	<p>654.4 ± 84.71</p>	<p>1.955</p>	<p>2.01</p>	

Anexo 3. Inducción y establecimiento de callo en *Rubus fruticosus* y *R. idaeus*

Especie	Tipo de explante	Medio de inducción	Medio de establecimiento	Características de callo
<i>Rubus fruticosus</i>	Hojas jóvenes de plantas <i>in vitro</i>	MS con 0.1 mg/L de Kin + 3.0 mg/L de NAA	MS con 3 mg/L NAA + 0.1 mg/L KIN + 50 mg/L de L-cisteína	Callo altamente friable de color café claro
<i>Rubus fruticosus</i>	Hojas jóvenes de plantas <i>in vitro</i>	Gamborg B5 con 0.1 mg/L de KIN + 2.0 mg/L de 2,4-D	Gamborg B5 con 2 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L KIN + 50 mg/L de L-cisteína	Callo poco friable de color amarillo-dorado
<i>Rubus idaeus</i>	Hojas jóvenes de plantas <i>in vitro</i>	Gamborg B5 con 0.1 mg/L de KIN + 2.0 mg/L de 2,4-D	MS con 2 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L KIN + 50 mg/L de L-cisteína	Callo altamente friable de color amarillo claro
<i>Rubus idaeus</i>	Segmentos del hipocótilo 1 cm	MS con 2 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L KIN o 3 mg/L NAA + 0.1 mg/L KIN.	-	Callo friable de color blanco brillante, se oxidó al mes de edad