



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

División de Estudios de Posgrado

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO- BIOLÓGICAS

OPCIÓN: INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**ANÁLISIS DE RESISTENCIA Y CARACTERIZACIÓN
MORFOANATÓMICA DE MUTANTES DE ZARZAMORA
(*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) OBTENIDAS POR
RADIACIÓN GAMMA, RESISTENTES A *Botrytis cinerea***

T E S I S

Que como requisito para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

M. C. ANA MARIA HUERTA OLALDE

Director de Tesis:

D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Co-Directora de Tesis

D.C. MARÍA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO

Morelia, Michoacán, México.

Agosto 2022



**El presente trabajo se realizó en los Laboratorios
de Biotecnología Vegetal del Instituto de
Investigaciones Químico Biológicas y en el
Laboratorio de Estudios del complejo de
polisacáridos de pared celular vegetal del Centro
Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología
de la UMSNH, bajo la dirección del Dr. Rafael
Salgado Garciglia y de la Dra. María Guadalupe
Zavala Páramo.**

DEDICATORIA

*A mis padres María Del Carmen Olalde Ochoa y René Huerta
Morales por todo el apoyo y amor incondicionales.*

*A mis hermanos Alberto, Daniel y Catalina por su compañía,
comprensión, por ser mis cómplices y por todos los buenos y malos
ratos compartidos. Y a mi abuelita Adelaida Morales Guzmán que
siempre me apoyó y me alentó a seguir adelante.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a mi alma mater la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, a los Laboratorios de Biotecnología Vegetal y de Estudios del complejo de polisacáridos de pared celular vegetal, por supuesto al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado para la realización de esta tesis.

Mi eterna gratitud al Dr. Rafael Salgado Garciglia por toda su confianza, apoyo, paciencia y por compartir conmigo sus conocimientos durante el desarrollo de esta investigación y durante toda mi carrera incursionando en la investigación.

A la Dr. Alejandra Hernández García que además de brindarme sus conocimientos profesionales, en el ámbito personal me brindo su amistad, y me apoyo en cada una de las decisiones que tome durante mi estancia en el laboratorio.

A mi asesora la Dra. María Guadalupe Zavala Páramo por acogerme en su grupo de trabajo, por orientarme y compartir su amplio conocimiento.

Agradezco a los Doctores integrantes de mi mesa sinodal: Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, Dr. Juan Carlos González Hernández y al Dr. Rodolfo López Gómez, gracias por sus consejos y buena disposición al ser partícipes en este trabajo.

A la Dra. Martha Elena Pedraza Santos y al Instituto de Investigaciones Nucleares.

Agradezco a la vida por haberme permitido llegar al día de hoy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y sobre todo por haberme regalado a unos padres espectaculares y maravillosos, de los cuales me siento orgullosa y quienes siempre me apoyaron incondicionalmente con amor y paciencia, gracias mamá y papá, de igual manera agradezco a mis abuelos: Adelaida y Feliciano y a mis hermanos: Alberto, Daniel y Catalina que siempre estuvieron ahí dándome ánimos y apoyándome en cada paso que di. Quiero aprovechar la ocasión para decirles que los amo y que siempre serán el pilar de mi vida. En general agradezco a toda mi familia ya que aportaron a mi vida y a mi desarrollo personal y profesional un granito de arena.

Muy especialmente quiero agradecer a personas importantes que han estado a mi lado: a mi mejor amiga la M.C. Yoshira López Antonio, al M. C. Salvador Miguel Castillo Figueroa, y al M. C. Jesús Morales, gracias por ser parte de mi familia. Al Ing. Oscar Guzmán Virgen por cada emoción vivida, pero sobre todo por ser ahora mi familia.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. ZARZAMORA (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	4
2.1.1. Características botánicas de la zarzamora	4
2.1.2. Cultivo y producción de zarzamora	5
2.1.3. Enfermedades de zarzamora	6
2.2. <i>Botrytis cinerea</i> Pers.: Fr.	7
2.3. MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS	10
2.3.1. Mejoramiento <i>in vitro</i> de plantas	11
2.3.2. Mutagénesis <i>in vitro</i>	12
2.3.3. Radiación ionizante gamma	13
2.3.4. Selección <i>in vitro</i> de plantas resistentes a hongos	15
2.4. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS	16
2.4.1. Mecanismos de defensa en plantas resistentes a hongos	19
2.5. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES RESISTENTES	19
2.5.1. Caracterización morfoanatómica	20
2.5.2. Caracterización de resistencia a hongos	20
2.5.3. Caracterización molecular	21
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1. OBJETIVO GENERAL	24
5.2. Objetivos específicos	24

	Pág.
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
7. RESULTADOS	26
7.1. Selección <i>in vitro</i> de plantas de zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i> 'Tupy') resistentes a <i>Botrytis cinerea</i> usando ápices de brotes irradiados con rayos gamma (Artículo publicado)	26
7.2. Caracterización de la diversidad morfoanatómica y ensayos de resistencia en plantas mutantes de zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i> Cv. Tupy) resistentes a <i>Botrytis cinerea</i>	41
8. DISCUSIÓN GENERAL	66
8.1. OBTENCIÓN DE MUTANTES DE <i>R. fruticosus</i> CV. TUPY	67
8.2. SELECCIÓN DE MUTANTES EN FILTRADO ESTÉRIL DE <i>B. cinerea</i>	68
8.3. SELECCIÓN DE PLANTAS DE <i>R. fruticosus</i> CV. TUPY RESISTENTES A <i>B. cinerea</i>	69
8.4. CARACTERIZACIÓN MORFOANATÓMICA DE PLANTAS DE <i>R. fruticosus</i> CV. TUPY RESISTENTES A <i>B. cinerea</i>	70
8.5. VARIABILIDAD DE LOS CAMBIOS MORFOANATÓMICOS EN PLANTAS CULTIVADAS EN MACROTÚNEL	72
8.6. ENSAYOS DE RESISTENCIA A <i>B. cinerea</i>	73
9. CONCLUSIONES GENERALES	76
10. PERSPECTIVAS	77
11. LITERATURA CITADA GENERAL	78
12. ANEXO	93

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Ejemplo de plantas mutantes irradiadas con rayos gamma, con tolerancia a hongos.	14
Cuadro 2. Ejemplo de plantas tolerantes a hongos seleccionadas mediante el uso de filtrados estériles de cultivo de hongos.	16
CAPÍTULO 1	
Cuadro 3. Table 1. Severity index (SI), necrosis percentage, and presence of mycelium and sporulation on detached leaves of <i>Rubus fruticosus</i> 'Tupy'.	33
CAPÍTULO 2	
Cuadro 4. Matriz de las variables morfoanatómicas evaluadas.	48
Cuadro 5. Índice de severidad (IS), porcentaje de necrosis y presencia de micelio y esporulación en hojas desprendidas de plantas.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Planta de zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i>): Partes de la planta y partes del fruto.	5
Figura 2.	Síntomas de infección por hongos en zarzamora.	7
Figura 3.	Ciclo de vida y de infección de <i>Botrytis cinerea</i> .	10
Figura 4.	Esquema del modelo de defensa de las plantas frente a la infección por <i>B. cinerea</i> .	18
CAPÍTULO 1		
Figura 5.	Figure 1. Radiosensitivity curve of <i>Rubus fruticosus</i> 'Tupy' shoot tips irradiated with gamma radiation at different doses and cultured for 28 days.	31
Figura 6.	Figure 2. <i>Rubus fruticosus</i> 'Tupy' shoots grown on MS (0.05 mg l ⁻¹ BA) medium supplemented with sterile culture filtrate of <i>Botrytis cinerea</i> .	32
Figura 7.	Figure 3. Percent mortality of non-irradiated shoot tips of <i>Rubus fruticosus</i> 'Tupy' grown in the presence of different concentrations of sterile culture filtrate of <i>Botrytis cinerea</i> .	32
Figura 8.	Figure 4. Evaluation of the severity index (SI) of detached leaves of <i>Rubus fruticosus</i> 'Tupy'.	34
Figura 9.	Figure 5. <i>Rubus fruticosus</i> 'Tupy' plants in vitro-micropropagated (A) from non-irradiated shoots, (B) from rfgum5 mutant line, and (C) from rfgum6 mutant line.	34
CAPÍTULO 2		
Figura 10.	Plantas de zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i> Cv. Tupy) durante la fase de aclimatación.	46
Figura 11.	Hojas de zarzamora cultivadas <i>in vitro</i> en PDA, inoculadas con esporas y con disco de micelio, de <i>Botrytis cinerea</i> .	47
Figura 12.	Variables de altura y número de hojas en plantas de zarzamora.	50
Figura 13.	Altura de las plantas de zarzamora cultivadas en campo (macrotúnel).	51
Figura 14.	Crecimiento de plantas de zarzamora a los 90 días del cultivo en campo (macrotúnel).	53
Figura 15.	Descriptores de rama latente, sección transversal del tallo y folíolos de plantas de zarzamora.	54
Figura 16.	Descriptores de corola, cáliz y pétalos en flores de plantas de zarzamora.	55
Figura 17.	Descriptores de longitud, peso, forma y grados Brix en frutos de plantas de zarzamora.	57
Figura 18.	Evaluación del índice de severidad y necrosis en hojas cortadas de plantas de <i>Rubus fruticosus</i> 'Tupy' durante el cultivo en invernadero y campo.	59

RESUMEN

Con fines de disminuir el uso de fungicidas sintéticos para el control del hongo *Botrytis cinerea*, causante del moho gris en un gran número de cultivos de importancia agrícola, como la zarzamora (*Rubus fruticosus*), la biotecnología moderna ofrece la mutagénesis *in vitro* por radiación gamma como una alternativa para la producción de plantas resistentes a este hongo. En la presente investigación se seleccionaron plantas mutantes *in vitro* de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupy) rfgum5, rfgum6 y rfgum17, a partir de brotes irradiados con radiación gamma, potencialmente resistentes a *B. cinerea*, por lo que se realizaron ensayos de resistencia en plantas *in vitro* y cultivadas tanto en invernadero como en campo (macrotúnel), así como estudios morfoanatómicos para detectar posibles cambios fenotípicos en comparación con plantas no mutadas (no irradiadas). Se irradiaron yemas apicales de plantas micropropagadas de zarzamora Cv. Tupy con cinco dosis de radiación gamma cobalto-60 (0, 15, 30, 45 y 60 Gy) y se cultivaron en medio basal Murashige y Skoog con 1 mg/L de benciladenina y 0.06 mg/L de ácido indol-3-butírico (medio MSB). Después de 28 días de cultivo, se evaluó la supervivencia para determinar la dosis letal media (DL₅₀), y se irradiaron 200 brotes a la DL₅₀ determinada (30.8 Gy). Después de 28 días, los brotes sobrevivientes fueron micropropagados en medio MSB durante 60 días. Para la selección de brotes resistentes a *B. cinerea*, se cultivaron brotes no irradiados por 28 días en diferentes concentraciones de filtrado de cultivo estéril de *B. cinerea* (0, 2, 4, 6, 8 y 10 g/L) para determinar una concentración letal media (CL₅₀) de 4.6 g/L. En este medio de selección, se obtuvieron tres líneas sobrevivientes (rfgum5, rfgum6 y rfgum17) que no presentaron cambios en comparación con los brotes de control, los que fueron micropropagados para obtener plántulas, en la que se realizaron las pruebas de resistencia *in vitro*, utilizando hojas desprendidas inoculadas con *B. cinerea* (1×10³ esporas/mL). Las plantas de las líneas mutantes rfgum5 y rfgum6 mostraron una alta resistencia a *B. cinerea* y presentaron un crecimiento similar al de las plantas control. Para el cultivo en invernadero y campo, las plantas micropropagadas de las tres mutantes en estudio y de plantas control (no irradiadas), de 90 días de cultivo, fueron trasplantadas en una mezcla de suelo promix/vigoro, 2:1, en contenedores de 1 kg, y aclimatadas por 90 días en invernadero. Después de 180 días, fueron cultivadas en campo en condiciones de macrotúnel con riego por goteo. Las pruebas de resistencia se realizaron cada 90 días, durante el cultivo en invernadero y hasta la etapa de fructificación en campo, estos bioensayos se realizaron de manera similar al realizado con las hojas de plantas *in vitro*. Los síntomas de la enfermedad se evaluaron de acuerdo al índice de severidad establecido. Los frutos producidos en plantas cultivadas en campo, también fueron sometidos a estas pruebas, utilizando frutos maduros con inoculación en la base del pedúnculo. De acuerdo a estas pruebas, la resistencia de las plantas mutantes rfgum5 y rfgum6 a *B. cinerea* determinada en condiciones *in vitro*, se mantuvo tanto en invernadero como en campo, mostrando un IS de 1. Se determinaron diferentes descriptores de acuerdo a la UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales), observando cambios en algunos de ellos, pero las plantas de la mutante rfgum6 presentaron el menor número de cambios morfoanatómicos, mostrando un desarrollo y crecimiento óptimos en comparación al presentado por las plantas de las líneas mutantes rfgum5 y rfgum17, además de presentar la mayor similitud con las plantas control (no irradiadas), con la mayor producción de frutos, de mayor peso y grados Brix. Las plantas de la línea rfgum6 presentaron estabilidad de la resistencia a *B. cinerea* y no mostraron cambios morfoanatómicos respecto a las plantas control, por lo que las perspectivas son su cultivo en campo por más de dos ciclos y realizar su caracterización molecular para determinar el mecanismo de resistencia.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, mutantes, rayos gamma, resistencia, zarzamora.

ABSTRACT

In order to reduce the use of synthetic fungicides for the control of the fungus *Botrytis cinerea*, which causes gray mold in a large number of crops of agricultural importance, such as blackberry (*Rubus fruticosus*), modern biotechnology offers *in vitro* mutagenesis by gamma radiation as an alternative for the production of resistant plants to this fungus. In the present research, mutant *in vitro* blackberry plants (*R. fruticosus* Cv. Tupy), rfgum5, rfgum6 y rfgum17, were obtained from shoots irradiated with gamma radiation, potentially resistant to *B. cinerea*, so resistance tests were carried out on *in vitro* plants and grown both in greenhouse and in the field (macrotunnel), as well as morphoanatomical studies to detect possible phenotypic changes compared to non-mutated (non-irradiated) plants. Shoot tips of *in vitro*-micropropagated blackberry plants (*Rubus fruticosus* 'Tupy') were irradiated with five doses of Cobalt-60 gamma radiation (0, 15, 30, 45, and 60 Gy) and cultured on Murashige and Skoog basal medium containing 1.0 mg/L benzyladenine and 0.06 mg/L indole-3-butyric acid (MSB medium). After 28 days of culture, survival was evaluated to determine mean lethal dose (LD₅₀), and 200 shoots were further irradiated at the determined LD₅₀ (30.8 Gy). After 28 days, the surviving shoots were micropropagated on MSB medium for 60 days. Non-irradiated shoots were screened for the *in vitro* selection of resistant *B. cinerea*, exposing them to different concentrations of sterile culture filtrate of *B. cinerea* (0, 2, 4, 6, 8, and 10 g/L) for 28 days to determine mean lethal concentration (LC₅₀), and the irradiated surviving shoots were further exposed to the determined LC₅₀ (4.6 g/L). Three surviving lines (rfgum5, rfgum6, and rfgum17) that did not present changes compared with the control shoots were micropropagated to obtain plantlets, which were further subjected to *in vitro* resistance assays using detached leaves inoculated with *B. cinerea* (1×10³ spores/mL). Plants of rfgum5 and rfgum6 mutant lines were highly resistant and presented similar growth to control plants. For greenhouse and field cultivation, the micropropagated plants of the three mutants under study and control plants (not irradiated), of 90 days of *in vitro* culture, were transplanted in a mixture of promix/vigoro® soil, 2:1, in containers of 1 kg, and acclimatized for 90 days in greenhouse. After 180 days, they were grown in the field under macrotunnel conditions (cultivation in mulch on plowed soil added with compost, with drip irrigation). Resistance tests were performed every 90 days, during greenhouse cultivation and up to the field fruiting stage, these bioassays were performed in a similar way to that performed with *in vitro* plant leaves. The symptoms of the disease were evaluated according to the severity index established. The fruits produced in plants grown in the field were also subjected to these tests, using ripe fruits with inoculation at the base of the peduncle. According to these resistance tests, it was determined that resistance to *B. cinerea* was maintained during cultivation both in the greenhouse and in the field, of the mutant plants rfgum5 and rfgum6, showing an IS of 1. Different descriptors were determined according to UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants), observing changes in some of them, but the plants of the mutant rfgum6 presented the least number of morphoanatomical changes, showing optimal development and growth, compared to that presented by the plants of the rfgum5 and rfgum17 mutant lines, in addition to presenting the greatest similarity with the control plants (not irradiated), with the highest production of fruits, of greater weight and °Bx. Plants of the rfgum6 line presented stability of resistance to *B. cinerea* and showed no morphoanatomical changes, with respect to the control plants, so the prospects are their cultivation in the field for more than two cycles and perform their molecular characterization to determine the resistance mechanism.

Keywords: Blackberry, *Botrytis cinerea*, gamma rays, mutants, resistance.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

México es uno de los mayores productores de zarzamora (*Rubus* spp) en el mundo y el estado de Michoacán representa el 98.5% de la producción nacional, de la cual el 90% se exporta como producto fresco o congelado (FAOSTAT, 2020; SIAP, 2020). Esta frutilla es altamente nutritiva por el alto contenido de fibra soluble, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos. Estos últimos presentan principalmente propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Cuevas *et al.*, 2010; Azofeifa *et al.*, 2013).

Mediante procesos de selección y la generación de híbridos, se han establecido las bases para los programas de mejoramiento genético con los cuales se han obtenido diversas variedades comerciales (cultivares) de zarzamora (Moore y Skirvin, 1990), con frutos de mejor calidad con sabores distintivos, mejores hábitos de crecimiento (erecto, semierecto y de guía), producción de frutos más firmes, con una mayor vida de anaquel. Con este propósito, periódicamente se generan nuevos cultivares para tener un mejor manejo de esta fruta. Es así que, en nuestro país, desde la década de los 90's se cultivan variedades comerciales como la Brazos, Tupy, Choctaw, Shawnee, Kiowa, Comanche, Cheyenne y Cherokee, por mencionar algunas. El cultivar Tupy, que por sus características de la planta y del fruto, es la que se cultiva en la mayor superficie mexicana y a nivel mundial, es una zarzamora de hábito semierecto, resultante de una cruce entre Comanche y una selección nativa de Uruguay, vigorosa, de espinas prominentes y productora de frutos grandes (Barraza *et al.*, 2004; Clark y Finn, 2008; Intagri, 2021).

Este cultivo es atacado por hongos fitopatógenos, y uno de los principales es *Botrytis cinerea*, que causa la enfermedad mejor conocida como moho gris, esta se hace presente en cualquier etapa del desarrollo de la planta y puede infectar tallos, hojas, flores y frutos, estos incluso en postcosecha (Dean *et al.*, 2012). Actualmente, el control de este hongo fitopatógeno se realiza mediante técnicas de agricultura convencional, con el uso de fungicidas químicos sintéticos, los que, por su uso

desmedido, se acumulan en las plantas, en el suelo y contaminan los mantos acuíferos, por lo que son considerados compuestos tóxicos potencialmente dañinos para el humano y el medio ambiente, contribuyendo también a la aparición de cepas fúngicas resistentes (Singh *et al.*, 2007).

Con el fin de reducir las pérdidas en los cultivos agrícolas, de contribuir en la disminución de la contaminación por agroquímicos y bajar la emergencia de cepas fúngicas resistentes a estos, es imprescindible realizar investigaciones que propongan alternativas viables. En la actualidad, los métodos de selección genética vegetal como las mutaciones inducidas mediante el uso de radiaciones gamma han permitido la obtención de plantas con nuevas características, entre ellas la resistencia a hongos. Las pérdidas ocasionadas por *B. cinerea* en los campos de cultivo de zarzamora en México, justifica la obtención de nuevos genotipos resistentes a este patógeno.

La generación de mutaciones es una estrategia confiable para obtener genotipos de zarzamora resistentes a los hongos. Los mutágenos físicos se han utilizado con más frecuencia que los químicos, y los rayos gamma son los mutágenos más utilizados (Beyas y Yildiz, 2017; Li *et al.*, 2019). Cerca de 3,200 variedades mutantes de más de 210 especies de plantas, incluidos numerosos cultivos, plantas ornamentales y árboles, se han registrado oficialmente para uso comercial en todo el mundo (FAO/IAEA Mutant Variety Database, 2012). Con esta técnica, se han obtenido plantas con nuevas características, seleccionadas a través de la mutagénesis *in vitro* utilizando irradiación gamma (Shu *et al.*, 2012; Çelik y Atak, 2017). En el desarrollo de estas investigaciones, es importante determinar la dosis letal media (DL₅₀), la dosis de radiación que se espera que cause la muerte de hasta el 50% de la población expuesta, una proporción considerada como el rango dentro del cual se producen mutaciones útiles en los programas de mejoramiento genético (Mudibu *et al.*, 2012). La combinación de la mutagénesis con la selección *in vitro* facilita la selección de características controladas y mejora la recuperación de las mutantes deseadas. Además, los agentes de selección eficientes son esenciales para

identificar las nuevas características en las células o tejidos irradiados (Liu *et al.* 2005).

Los filtrados estériles de diferentes hongos son de utilidad para seleccionar líneas o genotipos resistentes a hongos, discriminándolos de los susceptibles, utilizando cultivos *in vitro* de tejidos, brotes o plántulas irradiados (Gupta y Acharya, 2018). La combinación de irradiación gamma y la selección con filtrados estériles de hongos, ha sido utilizada para la selección de plantas mutantes resistentes a hongos, tales como crisantemo, frijol común y jengibre (Kumar *et al.* 2012; Solís-Ramos *et al.* 2015; Sharma *et al.* 2020). Los estudios *in vitro*, de invernadero y de campo en diferentes especies como cardamomo (*Elettaria cardamomum*), crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) y palma (*Phoenix dactylifera*), han confirmado la presencia de mutantes resultantes de procesos de selección cuya progenie retuvo características de la resistencia adquiridas durante la fase de cultivo de tejidos (Zuñiga *et al.* 2010; Jain, 2012; Kumar *et al.* 2012). No hay estudios que demuestren la resistencia fúngica en mutantes de especies de *Rubus* y otras frutillas, obtenidas por irradiación gamma.

Es por ello, que, en la presente investigación, se determinó la tasa de supervivencia (DL₅₀) de brotes cultivados *in vitro* de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy), irradiados con rayos gamma (0-60 Gy) para seleccionar genotipos resistentes a *B. cinerea* utilizando filtrado estéril de este hongo. Se seleccionaron tres líneas mutantes (*rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*), obteniendo plantas micropropagadas de estas, a las que se le determinó la resistencia a *B. cinerea*, en cultivos *in vitro* y bajo cultivo en invernadero y campo, mediante bioensayos *in vitro*, y se realizó la caracterización morfoanatómica de las mutantes cultivadas bajo condiciones de invernadero y cultivadas en una huerta comercial (macrotúnel).

2. ANTECEDENTES

2.1. ZARZAMORA (*Rubus fruticosus* L.)

2.1.1. Características botánicas de la zarzamora

La zarzamora (*Rubus fruticosus*) es una planta arbustiva de aspecto sarmentoso perteneciente a la familia de las rosáceas (Rosaceae). Presenta flores compuestas de 5 sépalos y 5 pétalos blancos o rosados sobre un receptáculo ensanchado, con numerosos estambres que crecen en racimos dando lugar a inflorescencias de forma oblonga o piramidal, sus ramas son arqueadas y espinosas, con hojas compuestas de 3 o 5 folíolos elípticos y de borde aserrado dispuestos de forma palmeada de color verde oscuro por el haz y blanco-tomentoso por el envés. Se caracteriza por la presencia de un fruto pequeño llamado polidrupa, redondo o ligeramente alargado, compuesto por pequeños glóbulos sobre un receptáculo que contienen en su interior una semilla diminuta, es verde al principio, pasa por tonalidades rojizas y finalmente es negro brillante intenso cuando madura (Rzedowski *et al.*, 2005; Sánchez-García, 2009; Lim, 2012) (Figura 1).

La planta fructifica en aproximadamente siete meses de edad, sus frutos crecen rápidamente obteniendo su tamaño completo a los 30 días, después de la antesis, dependiendo de las condiciones de cultivo. El tiempo que lleva en alcanzar el color rojo está relacionado con la temperatura y puede variar entre 20 y 60 días. Por sus características fisiológicas, el fruto de zarzamora es considerado como no climatérico, ya que no tiene la capacidad de madurar después de la cosecha, por lo que debe ser cosechada justo en el momento en el que ha adquirido su madurez de consumo (color homogéneo y característico del fruto maduro, sabor dulce, calidad de azúcar y sólidos adecuados), lo que reduce su vida postcosecha. Contiene un 80% de su peso de agua y el resto está compuesto por azúcares, vitaminas, ácidos orgánicos, y sales de calcio. Tienen un alto contenido en fibras, lo que mejora el tránsito intestinal, contiene gran cantidad de carotenoides y antocianinas que presentan actividad antioxidante (Sánchez-García, 2009).

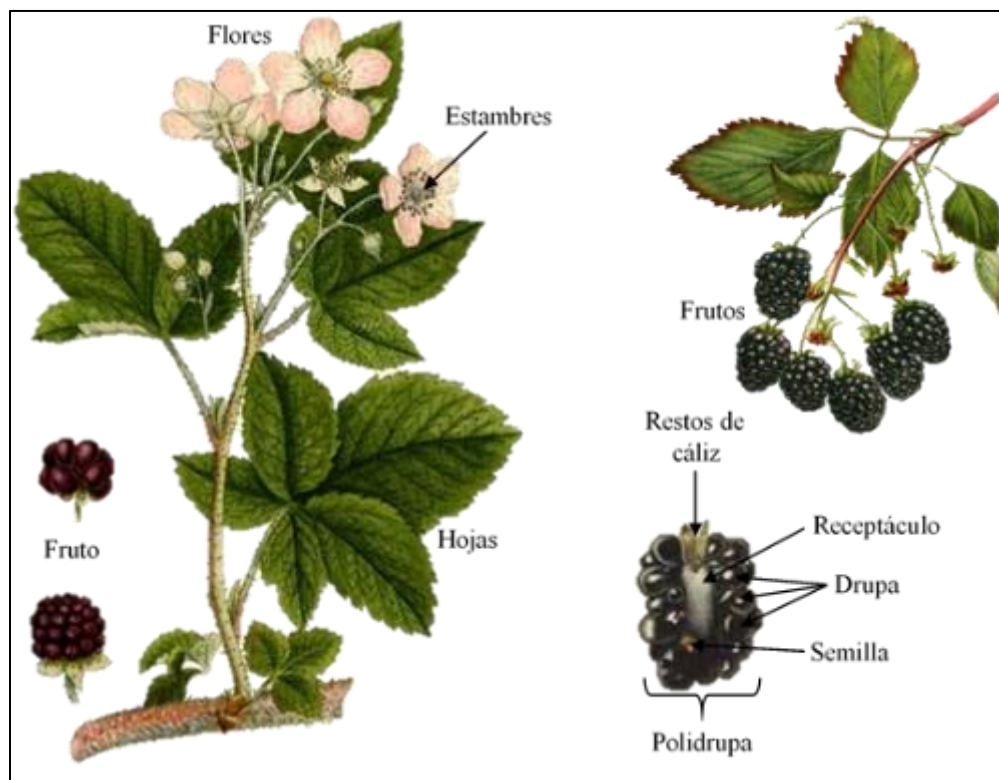


Figura 1. Planta de zarzamora (*Rubus fruticosus*): Partes de la planta y partes del fruto. Tomada de: <https://www.pinterest.com/pin/562035228472475410/>

2.1.2. Cultivo y producción de zarzamora

El cultivo de zarzamora (*Rubus* spp) tiene gran importancia comercial, ya que constituye inversiones considerables de capital en nuestro país, por lo que en los últimos años la producción de zarzamora ha aumentado en un 335%, siendo los estados de Michoacán, Jalisco, Hidalgo y México, los principales productores. Su importancia como cultivo a nivel mundial se debe a su sabor, versatilidad en la industria de alimentos y propiedades antioxidantes (Oszmiański *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2015). En Latinoamérica, los primeros países en incursionar en el cultivo de la zarzamora fueron Chile, México, Guatemala y Colombia, de los cuales en solo una década México ha logrado posicionarse como el principal productor y exportador de esta frutilla (SAGARPA, 2016).

Desde inicios del cultivo, Michoacán ha tenido una participación superior al 90% del total de la producción nacional (SAGARPA, 2018), debido a que en este estado existen las condiciones edafoclimáticas óptimas para el cultivo de zarzamora, esto es, suelos ligeramente ácidos, agua con bajo contenido de sales y temperaturas templadas, lo cual lo hace un estado altamente productivo, con un alto potencial frutícola (SAGARPA, 2018). En los últimos 6 años, la producción de zarzamora en Michoacán aumentó casi un 100 por ciento, al pasar de 146 mil toneladas en el 2014, a más de 285 mil en 2019; además, el valor de la producción creció 125 por ciento, al pasar de 4 mil 990 millones, a casi 11 mil millones, en ese mismo periodo (SEDRUA, 2019). Según información presentada por FAOSTAT en el año 2020 la producción mundial de zarzamora fue de 927, 344 ton y se destina en su mayor parte a congelado (75%).

En México se han introducido diversos cultivares como Cherokee, Comanche, “Cheyene”, “Shawnee”, “Choctaw” y “Brazos”, originarias del programa de mejoramiento genético de la Universidad de Arkansas en E.U.A. Sin embargo, en Michoacán más del 90% de la producción es del cultivar Tupy, de origen brasileño. Este cultivar destacó del resto dado que presenta un fruto de buena consistencia que permite una mayor vida de anaquel, lo cual facilita su transporte en camiones refrigerados, reduciendo los costos de comercialización, además de tener un excelente tamaño, color y sabor (SEDRUA, 2020).

2.1.3. Enfermedades de zarzamora

Las enfermedades fúngicas son las más importantes en el cultivo de zarzamora, ya que causan enormes pérdidas y su control eleva el costo de producción debido al uso de fungicidas químicos (INFOAGRO, 2002). Entre las enfermedades fúngicas, se encuentra la cenicilla la cual es ocasionada por *Sphaerotheca macularis*, ésta se hace presente por decoloraciones en el haz de las hojas y en el envés se presentan las masas de esporas generalmente de color blancas que después se tornan grises (Figura 2A). *Peronospora sparsa* ocasiona la enfermedad de mildiu, para la cual el

cultivar Tupy es altamente susceptible, su principal afectación se presenta en etapas tempranas del fruto ocasionando malformaciones en el mismo y limitando el crecimiento de la planta (Figura 2B). Sin embargo, la enfermedad más importante para este cultivo es la podredumbre gris, ocasionada por *Botrytis cinerea*, esta enfermedad se manifiesta como una mancha polvosa de color grisáceo que avanza hasta cubrir el tejido y finalmente momificarlo, el mayor problema se presenta cuando se cosechan frutos contaminados ya que el hongo es capaz de hacerse presente en postcosecha (Figura 2C) (Revollar- Alviter, 2011).

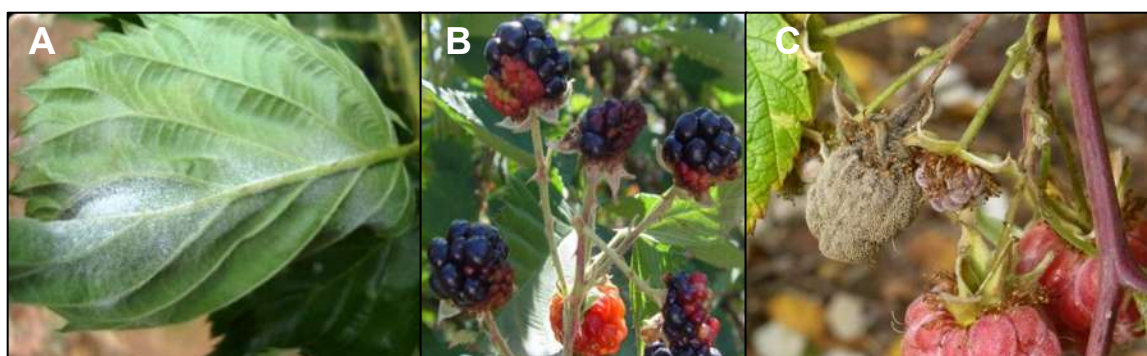


Figura 2. Síntomas de infección por hongos en zarzamora: A) Abundante esporulación en hojas, por *Sphaerotheca macularis*; B) Malformación de frutos por *Peronospora sparsa*; C) Frutos momificados por *Botrytis cinerea*. Tomadas de Revollar-Alviter, 2011.

2.2. *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.

Botrytis cinerea Pers.:Fr causa la enfermedad del moho gris o podredumbre gris y ha sido clasificado como el segundo patógeno de plantas más importante (Dean *et al.*, 2012), es la forma asexual del hongo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz, pertenece a la división Ascomycota, clase Leotiomycetes, orden Helotiales y familia Sclerotiniaceae (Williamson *et al.*, 2007). Aunque normalmente se designa a los hongos por el estado sexual o teleomorfo, en este caso, el estado anamorfo o forma asexual *B. cinerea*, es la especie más estudiada y comúnmente observada en la naturaleza (Abbey *et al.*, 2018).

El impacto global de *B. cinerea* en los cultivos y los derivados de estos es evidente debido a su amplio rango de hospederos, se ha reportado que infecta más de 230 especies vegetales (Elad *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2015). *B. cinerea* es un hongo necrotrófico, que puede infectar varias partes de la planta como las flores, las hojas, los tallos y los frutos, aprovechándose generalmente cuando hay heridas y se puede presentar en diferentes etapas de desarrollo del cultivo, es decir, desde la plántula hasta la etapa de maduración de los frutos (Yahaya *et al.*, 2015).

B. cinerea se caracteriza por las abundantes conidias (esporas asexuales), las cuales tiene forma oval adheridas en el extremo de conidióforos grises ramificados. Tiene la habilidad de sobrevivir como saprófito en cultivos viejos al producir estructuras de resistencia, pasa el invierno en forma de esclerocio o como micelio intacto sobre los tallos muertos u otros desechos de las plantas, esta habilidad permite que el patógeno prospere en los cultivos y áreas de almacenamiento año tras año (Dewey y Downton, 2016). En condiciones climáticas favorables, estas estructuras de supervivencia germinan para producir abundantes conidias que se dispersan por el viento y el agua hacia los tejidos sanos para iniciar la infección. El patógeno no solo es un patógeno oportunista que puede infectar fácilmente sitios de heridas o aberturas naturales, sino que también puede penetrar superficies intactas del huésped (Phillips *et al.*, 1987; Williamson *et al.*, 1995; Cole *et al.*, 1996).

Los tejidos infectados se caracterizan principalmente por una masa de conidios grises, que son visibles a simple vista y pueden dispersarse fácilmente para causar infecciones secundarias, en el fruto se produce un ablandamiento y cuando es muy severo se cubre completamente con vello gris (Figura 2C). Las flores abiertas son fácilmente infectadas debido a la humedad aprisionada entre sus estructuras y a la exudación de jugos azucarados en los estigmas. También daña tejidos vegetativos como hojas y tallos, denominados tizones o pudriciones (Pérez-Marín, 1991). Se ha estimado que el patógeno causa pérdidas anuales \$10 mil millones a \$100 mil millones de dólares (Boddy, 2016).

El ciclo de vida comienza con la formación de las conidias en los conidióforos y su posterior liberación y propagación por corrientes de aire, éstas germinan cuando las condiciones son favorables (alta humedad relativa y presencia de nutrientes). El tubo germinal se prolonga e inicia la penetración del tejido vegetal, dando lugar a una lesión primaria (Van Kan, 1997). En todo este proceso, el hongo secreta diversos componentes para debilitar las defensas del hospedero, destacando enzimas hidrolíticas que degradan las paredes celulares como celulasas, xilanasas, poligalacturonasas, etc. (Schumacher y Tudzynski, 2012). La lesión en el hospedero se generaliza cuando los tejidos sanos circundantes son colonizados y macerados, produciéndose una necrosis generalizada y la muerte de la planta o parte infectada de ésta. Se inicia, entonces, la producción de nuevas conidias que serán diseminadas por el aire, pudiendo colonizar nuevos hospedantes, completándose así, el ciclo de vida del hongo (Schumacher y Tudzynski, 2012) (Figura 3).

Dada la importancia del patógeno en la producción agrícola, su control es de gran preocupación, aunque se han utilizado diversas estrategias de control, los fungicidas sintéticos siguen siendo el método más común utilizado en todo el mundo, principalmente en nuestro país. Sin embargo, su uso continuo presenta desventajas; una mayor preocupación pública sobre la contaminación de frutas y verduras con residuos de fungicidas sintéticos y su efecto en la salud humana (Tripathi *et al.*, 2008; Farquhar *et al.*, 2009); un mayor desarrollo de resistencia en poblaciones de patógenos (Leroux, 2004; Fa *et al.*, 2017; Rupp *et al.*, 2017); y contaminación ambiental (Howell, 2001; Elmer y Michailides, 2004). Estas desventajas hacen que se potencie la búsqueda de nuevas alternativas de control más efectivas y menos dañinas para el medio ambiente. Una alternativa es el mejoramiento genético de plantas, con el que se ha contribuido a mejorar el grado de sostenibilidad de los sistemas agropecuarios de producción, mediante el desarrollo de genotipos adaptados a nuevos requerimientos ambientales y nuevas demandas del mercado de consumo.

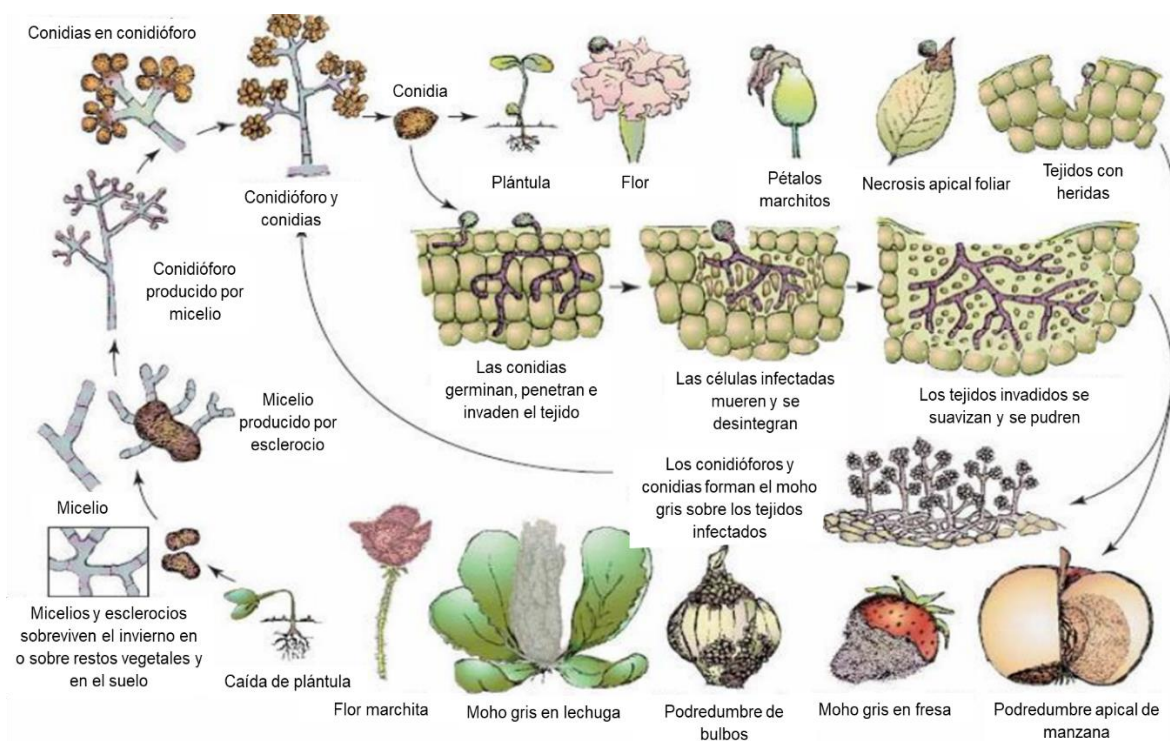


Figura 3. Ciclo de vida y de infección de *Botrytis cinerea* (Tomado de Agrios, 1988).

2.3. MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Con el mejoramiento genético de plantas de valor agronómico se ha conseguido la selección y generación de cultivares e híbridos mediante diferentes técnicas, con fines de obtener nuevas características en los cultivos y aumentar la producción agrícola. Uno de los propósitos del mejoramiento genético vegetal es incorporar la resistencia a enfermedades y a plagas, o a condiciones adversas del ambiente, así como para mejorar el sabor, el color, la forma y el tamaño de los frutos. Sin embargo, mediante los métodos tradicionales de selección, en ocasiones es difícil obtener plantas mejoradas y hay que recurrir a métodos alternativos para producir variantes genéticas útiles, como los que ofrece la biotecnología moderna (Pierik, 1990; Jain, 2010).

2.3.1. Mejoramiento *in vitro* de plantas

La biotecnología vegetal aporta herramientas que permiten romper barreras físicas y genéticas que interrumpen el buen funcionamiento de las hibridaciones normales por vía sexual para la transferencia de genes de las plantas silvestres a las cultivadas. Mediante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se realizan diversos métodos para conseguir plantas mejoradas, la variación somaclonal, las mutaciones inducidas y la ingeniería genética son ejemplos de ellos (Jain, 2010).

Para todas las técnicas *in vitro* de mejoramiento genético de plantas desarrolladas hasta el momento, es necesario disponer de una metodología eficiente que permita la regeneración de plantas mediante distintas técnicas de cultivo de tejidos (Bernal-Parra, 2013). La ingeniería genética se ha aplicado en diferentes ámbitos, en horticultura para obtener variedades de flores con cambios o variaciones en el color imposibles de obtener mediante cruzamiento o hibridación, como la rosa azul obtenida a partir de la introducción de un gen de petunia responsable de la síntesis de delfinidinas (pigmento responsable del color azul). También se han desarrollado plantas transgénicas capaces de producir vacunas frente enfermedades como el tétanos y la malaria (en plantas de plátano, lechuga o mango) (Vega y Rivera, 2001). Sin embargo, aunque ya hace 40 años desde que se obtuvo la primera planta transgénica, el cultivo y consumo de estos alimentos transgénicos no es totalmente aceptado (Massieu-Trigo, 2009).

Sin embargo, los métodos de selección de mutantes, ya sea espontáneos por la variación somaclonal e inducidos, representan una alternativa viable, ya que, con ésta, se han obtenido genotipos con tolerancia a sequía, salinidad, bajas y altas temperaturas y principalmente con tolerancia a patógenos como bacterias y hongos, que cuentan con una mayor aceptación para su cultivo en el campo y para la industria de alimentos (Lestari, 2012; FAO/IAEA Mutant Variety Database, 2012).

2.3.2. Mutagénesis *in vitro*

Las mutaciones espontáneas son el motor natural de la evolución y el medio de que se valen los genetistas para domesticar cultivos y crear variedades mejoradas. Las mutaciones inducidas han contribuido significativamente al mejoramiento vegetal, con lo que se ha logrado un impacto sobresaliente en la productividad de cultivos particulares. La combinación del cultivo *in vitro* con la técnica de mutagénesis puede acelerar los programas de mejoramiento, generando variabilidad, a través de selección y mediante la multiplicación de los genotipos de interés. Este procedimiento se ha convertido en una de las mayores herramientas en el mejoramiento de especies hortícola-ornamentales (Ahloowalia *et al.*, 2004). La mutación inducida como ayuda del mejoramiento ha dado lugar a la introducción de nuevas variedades de muchos cultivos como el arroz, trigo, cebada, manzana, cítricos, caña de azúcar y plátano. La base de datos sobre variedades mutantes de la FAO/IAEA contiene más de 3, 200 variedades distribuidas oficialmente en 210 especies, que incuyen plantas de ornato, de alto valor agrícola y árboles (FAO/IAEA Mutant Variety Database, 2012).

La aplicación de la mutación inducida al mejoramiento de cultivos ha tenido enormes consecuencias económicas en la agricultura y la producción de alimentos, actualmente valoradas en miles de millones de dólares, lo cual, se ha traducido en millones de hectáreas de tierra cultivada. En los últimos 20 años se ha observado un resurgimiento de las técnicas de mutación, que han trascendido de su utilización directa en el mejoramiento para ser aplicadas en nuevos campos, como el descubrimiento de genes y el mejoramiento genético (FAO, 2018).

Desde los inicios de la técnica, se prefiere inducir mutagénesis en tejidos vegetativos más que en semillas, ya que con estas últimas no hay homogeneidad en la obtención de mutantes por la producción de quimeras. Pueden utilizarse diferentes materiales, tales como protoplastos, células en suspensión, callos y explantes (fragmentos de plantas), a partir de los cuales se establecen los sistemas

de regeneración de plantas (Predieri y Zimmerman, 2001). A diferencia de la transformación genética, la mutagénesis inducida no introduce material genéticamente modificado ajeno a la planta. La principal ventaja de la mutagénesis, con respecto a otras técnicas productoras de variabilidad genética, es que a partir de una misma población irradiada se pueden obtener genotipos con alteraciones en genes muy diversos debido a su acción aleatoria en el genoma (Novak y Brunner, 1992).

Existen varios métodos de mutagénesis clasificados como físicos y químicos: dentro de los primeros están las radiaciones UV (ultravioleta), X o γ (gamma); y los principales mutágenos químicos son etilmetanosulfonato, metilmetanosulfonato, nitrosoguanidina y etilnitrosourea. La obtención de mutantes es efectiva al aplicar estos métodos de selección y de mutación inducida por la exposición directa de un tejido u órgano (yemas axilares, hojas, brotes, semillas y tubérculos), que por medio de su regeneración a plantas completas dan lugar a especies mejoradas, modificadas genéticamente (Pacheco-Gómez *et al.*, 2000). Con esta tecnología se logra el mejoramiento de plantas mediante la mutagénesis con la finalidad de desarrollar aquellos caracteres y cualidades internas de la planta (Bermúdez *et al.* 1999), siendo exitosa en especies como plátano, jitomate, papa, caña de azúcar, arroz, etc. Una de las técnicas para desarrollar variedades de plantas con características superiores es inducir mutaciones usando radiación gamma.

2.3.3. Radiación ionizante gamma

La inducción de mutantes por medio de radiación ionizante gamma (generada por Cesio 137 o Cobalto 60) es ampliamente propuesta para el mejoramiento de plantas (Lu *et al.*, 2007). Esta radiación produce alteraciones de tipo estructural, fenotípico y de comportamiento de células, tejidos, órganos y plantas completas (Cervantes *et al.*, 1996). Estas mutaciones permiten ampliar la variabilidad genética y facilitan la selección de plantas con características mejoradas. El uso combinado de las técnicas biotecnológicas y nucleares ha hecho posible que se acorte el tiempo

necesario para la obtención de una nueva variedad y que se propaguen aceleradamente los nuevos mutantes obtenidos, especialmente en el caso de cultivos que como la zarzamora se propagan principalmente de forma vegetativa y responden satisfactoriamente al cultivo de tejidos. Las mutaciones inducidas por rayos gamma se han utilizado para mejorar cultivos como trigo, arroz, cebada, algodón y frijol. A la fecha se han obtenido más de 3,200 variedades mutantes de plantas de cultivo mediante mutagénesis inducidas (Jain, 2005; Barakat y El-Sammak, 2011; FAO/IAEA Mutant Variety Database, 2012) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ejemplo de plantas mutantes irradiadas con rayos gamma, con tolerancia a hongos.

ESPECIE	HONGO	REFERENCIA
TRIGO (<i>Triticum sativum</i>)	<i>Puccinia graminis</i>	Little, 1971
SOYA (<i>Glycine max</i>)	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Lenné, 1992
PLÁTANO (<i>Musa</i> Cv. Gran Enano)	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	García-Rodríguez <i>et al.</i> , 2000
AJO (<i>Allium sativum</i>)	<i>Sclerotium cepivorum</i>	Al-Safadi <i>et al.</i> , 2000
CHÍCHARO (<i>Pisum sativum</i>)	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>sp.pisi</i>	Sharma <i>et al.</i> , 2010
CRISANTEMO (<i>Dendranthema grandiflora</i>)	<i>Septoria obesa</i>	Kumar <i>et al.</i> , 2012

En las plantas propagadas vegetativamente, la obtención de mutantes se realiza a partir de la irradiación de meristemos, yemas, tallos y hojas individuales. La principal estrategia en el mejoramiento basado en mutación, ha sido la utilización de variedades bien adaptadas en las que se han alterado uno o dos rasgos mayores, que limitan su productividad o incrementan su valor cualitativo. En muchas variedades derivadas por mutación, el cambio en los rasgos ha sido el resultado de

efectos sinérgicos en el aumento del rendimiento, calidad del cultivo, rotación del cultivo y aceptación del consumidor (Ahloowalia *et al.*, 2004). La selección de plantas resistentes/tolerantes a diversos hongos se ha obtenido mediante el uso de cultivos celulares o vegetativos *in vitro* con el uso de mutágenos, principalmente con radiación gamma (Cuadro 1).

2.3.4. Selección *in vitro* de plantas resistentes a hongos

La producción *in vitro* de compuestos fitotóxicos en medios de cultivos ha sido reportada para diferentes especies de hongos (Van den Bulk, 1991; Mathew *et al.*, 2009) y la importancia de los filtrados de sus cultivos está siendo ampliamente estudiada, ya que se ha demostrado que, en estos, se encuentran diferentes compuestos que producen síntomas de la enfermedad correspondiente, lo que apoya a la selección de mutantes resistentes (Jayasankar *et al.*, 1999). Existen reportes que demuestran que metabolitos fitotóxicos producidos en estos medios, inducen en plantas síntomas similares a los que produciría el patógeno mismo. Algunas de estas toxinas se han utilizado para selección de tolerancia y se ha demostrado que tienen un papel importante en la patogénesis. Con esta metodología Nodarse *et al.* (1992), obtuvieron mutantes de caña de azúcar con alta tolerancia a la roya (*Puccinia melanocephala* H y P Sydow), sometiendo explantes de hoja inmadura a 80 Kv de Rayos X. Así mismo, Yongjian y Li (2006), utilizando explantes de plantas de bananos cultivadas *in vitro* (*Musa* spp., AAA Grupo Highgate), obtuvieron líneas tolerantes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, al irradiarlos a diferentes dosis de rayos gamma. Los resultados de este trabajo mostraron que con las dosis de 0.8 y 2.0 krad, se logró la selección de plantas tolerantes a *Fusarium* en condiciones de invernadero. Más recientemente, Sharma *et al.* (2010) reportaron la selección de plantas mutantes de chícharo (*Pisum sativum*) con tolerancia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* por radiación con rayos gamma (30-35 gray) en yemas apicales y axilares; y la tolerancia a *Septoria obesa* en plantas de crisantemo (Kumar *et al.*, 2012) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Ejemplo de plantas tolerantes a hongos seleccionadas mediante el uso de filtrados estériles de cultivo de hongos.

ESPECIE VEGETAL	FUENTE DEL FILTRADO	REFERENCIA
ALFALFA (<i>Medicago sativa</i>)	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hartman <i>et al.</i> , 1984
APIO (<i>Apium graveolens</i>)	<i>Septoria apiicola</i>	Evenor y Pressman, 1994
TRIGO (<i>Triticum sativum</i>)	<i>Fusarium sp</i>	Ahmed <i>et al.</i> , 1996
UVA (<i>Vitis vinifera</i>)	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Jayasankar <i>et al.</i> , 1999 Faniza <i>et al.</i> , 1995
CARDAMOMO (<i>Elettaria cardamomum</i>)	<i>Fusarium oxysporum</i>	Zúñiga <i>et al.</i> , 2010
TOMATE DE ÁRBOL (<i>Solanum betaceum</i>)	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Patiño-Torres <i>et al.</i> , 2007

2.4. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS

Las plantas son organismos sésiles que se encuentran en continuo contacto con un gran número de microorganismos, estas interacciones entre plantas y microorganismos pueden ser benéficas, como las micorrizas, o adversos para la planta como los patógenos. Cuando las plantas se enfrentan a los patógenos, éstas al reconocerlos activan los mecanismos de defensa a través de un sistema complejo de múltiples niveles que actúan de forma sincronizada y casi simultáneamente. Algunas defensas son constitutivas, es decir, que se producen durante todo el ciclo de la célula, mientras que otras son inducidas por el estrés generado por agentes patógenos (Nimchuk *et al.*, 2003).

La pared celular o la cutícula son algunos ejemplos de barreras defensivas que forman parte de estos mecanismos, dificultando así la entrada de diferentes agentes

invasores (Thatcher *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005), mientras que otras son inducidas tras la percepción del patógeno y proporcionan protección no sólo en el sitio de infección sino también sistémicamente a lo largo de toda la planta (Shah y Klessig, 1999; Nimchuk *et al.*, 2003). Esto incluye la activación de genes involucrados en funciones de defensa, como los genes R, la apertura de canales para el intercambio de iones, la modificación de proteínas y la activación de enzimas preexistentes (Menjiste, 2012; Armijo *et al.*, 2017; AbuQamar *et al.*, 2017) (Figura 4).

Tras el reconocimiento del patógeno, se desencadenan las respuestas de defensa con rápido flujo de iones, el estallido oxidativo extracelular, la reprogramación transcripcional dentro y alrededor de los sitios de infección y en la mayoría de los casos la respuesta hipersensible (HR). Esta respuesta es un proceso de muerte celular programada rápido y localizado de una o varias células de la planta huésped en respuesta a una invasión, se caracteriza por una pérdida rápida de la integridad de la membrana en las células huésped afectadas y por la acumulación de diversas sustancias que restringen el crecimiento y la dispersión del patógeno (Heath, 2000; AbuQamar *et al.*, 2017; Armijo *et al.*, 2017).

Si las plantas sobreviven al ataque inicial del patógeno, estas pueden protegerse contra ataques posteriores, una capacidad de las células que les permite repeler los ataques subsecuentes y se dispersa a través de toda la planta. A esta respuesta se le llama resistencia sistémica adquirida (RSA). Un requerimiento esencial para la resistencia sistémica adquirida es que la primera infección por un patógeno cause una lesión necrótica. La necrosis inducida puede ser el resultado de la muerte celular programada después del reconocimiento del patógeno en una interacción incompatible (dada en la RH) o de la muerte celular causada por la acción del patógeno en una interacción compatible (infección e invasión exitosa) (Camarena-Gutiérrez y Torre-Almaráz, 2007).

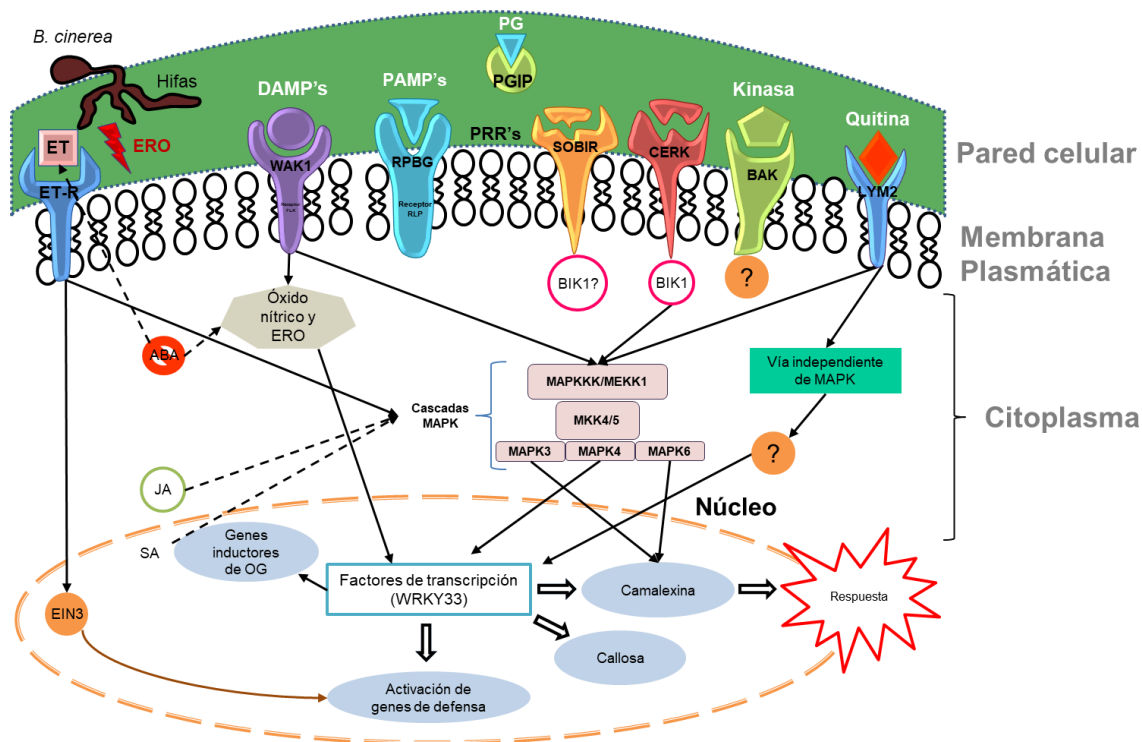


Figura 4. Esquema del modelo de defensa de las plantas frente a la infección por *B. cinerea*. AbuQamar *et al.*, 2017.

La secuencia de eventos que permiten la RSA comienza localmente, es decir, en las células adyacentes a la respuesta hipersensible se observa el engrosamiento de las paredes celulares por incorporación de proteínas estructurales o lignina, deposición de callosa y la inducción de la síntesis de fitoalexinas (Camarena-Gutiérrez y Torre-Almaráz, 2007).

En las células más distantes, o sea las partes no infectadas de la planta, las primeras reacciones de defensa tipo RSA son la síntesis de proteínas relacionadas a la patogénesis, llamadas proteínas PRs, las enzimas β -1,3 glucanasas, endohidrolasas, quitinasas, inhibidores de enzimas como la taumatina, inhibidores de amilasa y proteasas. Los genes que son inducidos en las infecciones primarias por el patógeno, se expresan localmente y también sistémicamente en la planta por lo que son llamados genes RSA. Otros genes que también gobiernan las reacciones de defensa no son expresados sistémicamente (Sha *et al.*, 1999).

2.4.1. Mecanismos de defensa en plantas resistentes a hongos

La resistencia de las plantas a los hongos se explica de modo general por los diferentes mecanismos de defensa que éstas han desarrollado, en algunas investigaciones encaminadas a la obtención de plantas resistentes a hongos, se han elucidado ciertos mecanismos. Por ejemplo, Birch *et al.* (1999), determinaron que la ruta metabólica de los esfingolípidos está implicada en los procesos de defensa de la papa y que están asociados con la respuesta hipersensible. Años más tarde, Patiño-Torres *et al.* (2007), al seleccionar plantas resistentes de tomate de árbol (*Solanum betacea* cav. Sendta) mediante filtrado crudo de *Colletotrichum acutatum*, determinaron que la resistencia podría deberse a la acción de diferentes tipos de compuestos asociados a la fitotoxicidad.

La resistencia que poseen algunas plantas a patógenos productores de fitotoxinas, puede estar asociada a su falta de sensibilidad hacia estas o a la capacidad de desplegar mecanismos que permiten su degradación o inactivación. Con el avance en las técnicas de biología molecular, se han utilizado genes de quitinasa de diferentes especies de plantas para inducir resistencia a patógenos fúngicos (Asao *et al.*, 1997; Terakawa *et al.*, 1997). El conocimiento de los mecanismos que subyacen a la regulación de la respuesta defensiva de la planta ha permitido diseñar nuevas estrategias encaminadas a la obtención de cultivares resistentes, la selección plantas mutantes por mutagénesis inducida ha sido una alternativa viable con la que se han seleccionado mutantes con resistencia a diferentes hongos.

2.5. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES RESISTENTES

La obtención de genotipos mejorados con resistencia a patógenos, es uno de los principales objetivos de los programas de selección de nuevos rasgos productivos. El análisis fenotípico y genético de estas mutantes ha proporcionado un conjunto de herramientas útiles para comprender los mecanismos implicados en la interacción

planta-patógeno y llevar a cabo mejores programas de control de las enfermedades (Rossi *et al.*, 2018).

2.5.1. Caracterización morfoanatómica

La caracterización agromorfológica o morfoanatómica es el registro de aquellos caracteres que son altamente heredables, visibles y que se expresan en todos los ambientes. Son características fenotípicas de fácil identificación visual tales como forma, color, tamaño o altura. Muchos de estos caracteres se convierten en importantes “descriptores” de los cultivares, y corresponden a caracteres preferentemente controlados por un solo gen, y que muestran un fenotipo constante en diferentes ambientes. Su principal ventaja es la sencillez de su evaluación, mientras que la desventaja es que la dependencia de su eficacia viene determinada por los efectos ambientales. Desde el punto de vista del mejoramiento genético, la información sobre caracteres morfológicos y agronómicos (caracterización agromorfológica) es insustituible, ya que incorpora variantes en estos caracteres y que en muchos casos son el objetivo de los programas de selección de nuevas características (Poonam *et al.*, 2006).

2.5.2. Caracterización de resistencia a hongos

El uso de cultivares resistentes es el método más apropiado para el manejo de enfermedades fúngicas, como la secadera. Sin embargo, para el proceso de evaluación y selección de genotipos resistentes, es necesario inducir el desarrollo de los síntomas de la enfermedad mediante un método de inoculación eficiente. Los métodos de inoculación artificial permiten observar la variabilidad en los periodos de incubación y de latencia, el proceso de colonización, el mecanismo de patogénesis, edad óptima de susceptibilidad al agente causante de la enfermedad y la severidad ocasionada por el patógeno (Ortíz y Hoyos, 2012; Silva *et al.* 2013).

El método *in vitro* es uno de los ensayos de resistencia a hongos que mayormente se utiliza, consiste en cultivar partes susceptibles de una planta en medio de cultivo o en agar-agua, por ejemplo, la inoculación de hojas de plantas seleccionadas, las cuales son inoculadas de preferencia en el área central, aunque también en los bordes o en la base del pecíolo, con una cantidad conocida de esporas, que previamente se determina para causar los síntomas de la enfermedad del hongo correspondiente, es un método empleado con éxito (Wan *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2018).

2.5.3. Caracterización molecular

La caracterización molecular de mutantes ha permitido el descubrimiento de genes importantes en diferentes procesos metabólicos, así como el entendimiento de la función de dichos genes. El conocimiento de los genes que controlan y/o determinan los caracteres de interés de una especie puede ayudar a seleccionarla de una forma más rápida y eficaz mediante el empleo de mutantes. En estos casos, se intenta generar amplias poblaciones ya que el proceso de mutagénesis es totalmente aleatorio y no es posible controlar los genes que se afectarán (Cubero, 2003).

Mediante el análisis de los perfiles de expresión generados a partir de interacciones planta-patógeno, bajo diferentes condiciones, es posible identificar genes que se expresan en las interacciones compatibles y no lo hacen en las incompatibles o establecer si la regulación de estos genes varía en ambas situaciones (Pinzán *et al.*, 2009). De este modo podrían identificarse genes involucrados en la resistencia, pero también genes involucrados en la susceptibilidad, los cuales son mucho menos conocidos (Henriquez y Daayf, 2010). En los últimos años, el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, como la secuenciación de ARN (RNA-seq) ha permitido la detección y cuantificación de transcritos con mayor sensibilidad (Rollano-Peñaloza y Mollinedo-Portugal, 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

En México, el cultivo de zarzamora tiene una gran trascendencia, ya que constituye inversiones considerables de capital en nuestro país. Sin embargo, las pérdidas ocasionadas por *B. cinerea* generó la necesidad de obtener nuevos genotipos mutantes resistentes que contrarresten los estragos que genera este hongo.

En nuestro grupo de trabajo se obtuvieron genotipos mutantes de zarzamora Cv. Tupy por radiación gamma, los cuales fueron seleccionados para la resistencia a *B. cinerea* mediante ensayos *in vitro*. Es importante realizar ensayos de resistencia tanto en plantas cultivadas *in vitro* como en invernadero y campo, para asegurar la estabilidad de la(s) mutación(es) generada(s), así como realizar estudios morfoanatómicos, para evaluar los posibles cambios fenotípicos durante el crecimiento y desarrollo.

4. HIPÓTESIS

Las plantas mutantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) seleccionadas *in vitro* por radiación gamma, mantienen la resistencia a *Botrytis cinerea* durante su cultivo en invernadero y campo, y presentan cambios morfoanatómicos respecto a las plantas no irradiadas.

5. OBJETIVOS

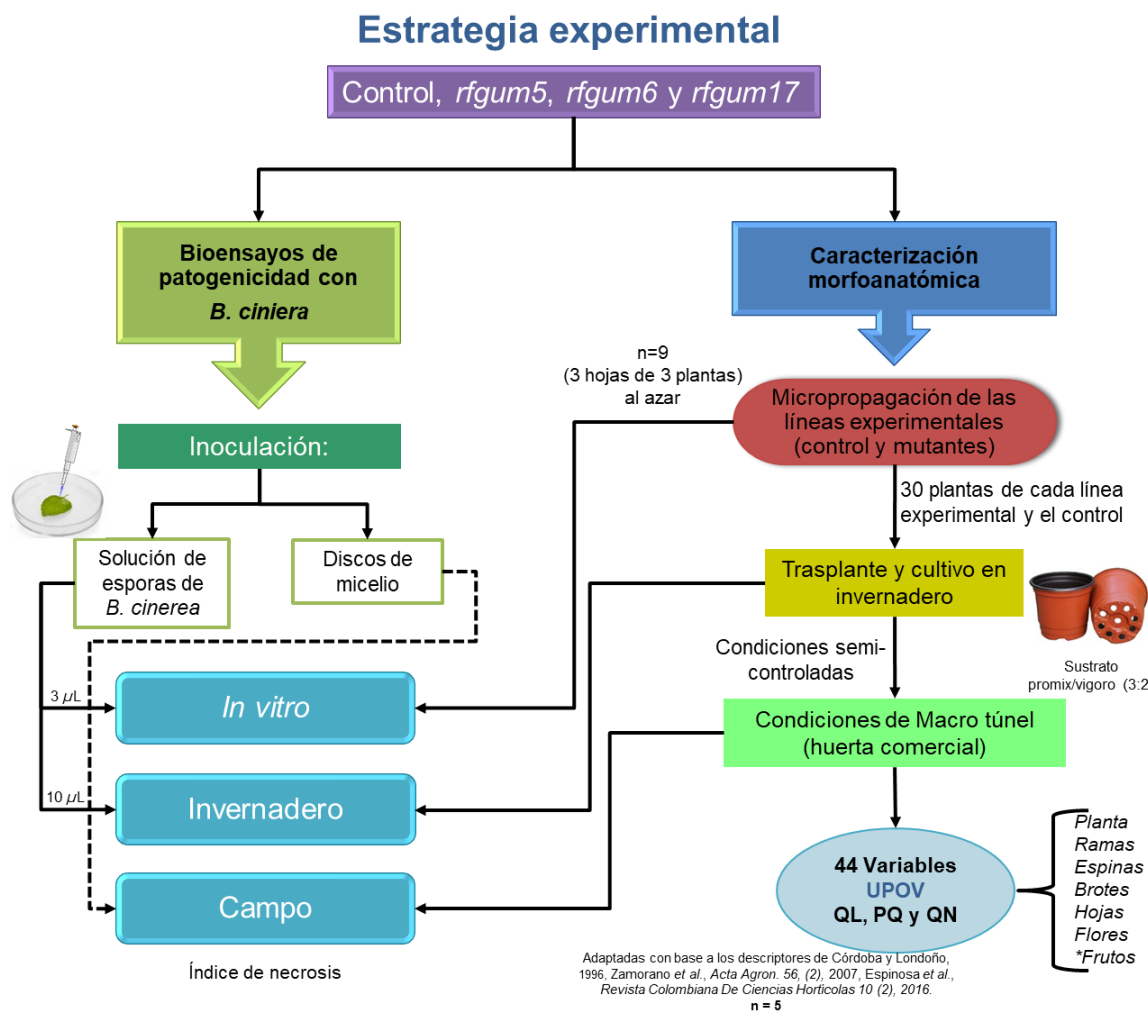
5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la resistencia a *Botrytis cinerea* y la diversidad morfoanatómica en plantas mutantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) obtenidas por radiación gamma.

5.1.1. Objetivos específicos

1. Determinar la resistencia a *B. cinerea* con bioensayos de patogenicidad en plantas cultivadas *in vitro*, en invernadero y en campo de líneas mutantes de zarzamora Cv. Tupy.
2. Caracterizar la diversidad morfoanatómica de líneas mutantes de zarzamora Cv. Tupy, resistentes a *B. cinerea*, cultivadas en invernadero y campo.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. RESULTADOS

7.1. CAPÍTULO 1. Artículo publicado.

Selección in vitro de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* ‘Tupy’) resistentes a *Botrytis cinerea* usando ápices de brotes irradiados con rayos gamma.

Liga web de acceso:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/plantbiotechnology/39/2/39_22.0312b/_article

Original Paper

Plant Biotechnology 39, 1–7 (2022)

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.22.0312b

In vitro selection of blackberry (*Rubus fruticosus* ‘Tupy’) plants resistant to *Botrytis cinerea* using gamma ray-irradiated shoot tips

Ana Maria Huerta-Olalde¹, Alejandra Hernández-García¹,
Rodolfo López-Gómez¹, Sylvia Patricia Fernández-Pavía²,
María Guadalupe Zavala-Páramo³, Rafael Salgado-Garciglia^{1,*}

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Edif. B3, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Ciudad Universitaria, Ave. Francisco J. MÚGICA S/N, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México; ² Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSNH, Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, C.P. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México; ³Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Morelia, Michoacán, México. UMSNH, C.P. 58194, * E-mail: rsalgadogarciglia@gmail.com Tel: +52-443-2002091 Fax: +52-443-3265790

Received January 6, 2022; accepted March 12, 2022 (Edited by T. Kobayashi)

Abstract. Blackberry is an economically important crop in Mexico, and its yield is substantially reduced by gray mold, a disease caused by *Botrytis cinerea*. One of the means to obtain *B. cinerea*-resistant plants is gamma irradiation. Shoot tips of in vitro-micropropagated blackberry plants (*Rubus fruticosus* ‘Tupy’) were irradiated with five doses of Cobalt-60 gamma radiation (0, 15, 30, 45, and 60 Gy) and cultured on Murashige and Skoog basal medium containing 1.0 mg l⁻¹ benzylaminopurine and 0.06 mg l⁻¹ indole-3-butyric acid (MSB medium). After 28 days of culture, survival was evaluated to determine mean lethal dose (LD₅₀), and 200 shoots were further irradiated at the determined LD₅₀ (30.8 Gy). After 28 days, the surviving shoots were micropropagated on MSB medium for 60 days. Non-irradiated shoots were screened for the in vitro selection of resistant *B. cinerea*, exposing them to different concentrations of sterile culture filtrate of *B. cinerea* (0, 2, 4, 6, 8, and 10 g l⁻¹) for 28 days to determine mean lethal concentration (LC₅₀), and the irradiated surviving shoots were further exposed to the determined LC₅₀ (4.6 g l⁻¹). Three surviving lines (rfgum5, rfgum6, and rfgum17) that did not present changes compared with the control shoots were micropropagated to obtain plantlets, which were further subjected to in vitro resistance assays using detached leaves inoculated with *B. cinerea* (1×10³ spores ml⁻¹). Plants of rfgum5 and rfgum6 mutant lines were highly resistant and presented similar growth to control plants. Therefore, this methodology is useful to obtain *B. cinerea*-resistant blackberry plants.

Key words: *Botrytis cinerea*, gamma radiation, mutagenesis, *Rubus fruticosus*, sterile culture filtrate.

Introduction

Mexico is one of the largest producers of blackberry in the world. In Mexico, the Michoacán state accounts for 98.5% of the domestic production, of which 90% is exported as fresh or frozen product (FAOSTAT 2020; SIAP 2020). Gray mold caused by *Botrytis cinerea* is one of the most important diseases of this crop (Dean et al. 2012). This fungus is responsible for substantial losses of up to 100% in extreme cases. It can attack at any stage of crop development and can infect all aerial plant parts. Pathogen control is achieved through the indiscriminate use of synthetic fungicides, which leads to the rapid emergence of resistant strains. Moreover, environmental pollution caused by these chemicals is a severe problem. Thus, breeding programs aimed at developing *B.cinerea* resistant blackberry cultivars must be established (Hu et al. 2016).

Mutation breeding is a reliable strategy to obtain fungus-resistant blackberry genotypes. Physical mutagens have been used more frequently than chemical ones, and gamma rays are the most widely used mutagen (Ahloowalia and Maluszynski 2001; Beyaz and Yildiz 2017; Li et al. 2019). Nearly 3,200 mutant varieties of over 210 plant species, including numerous crops, ornamental plants, and trees, have officially been released for commercial use worldwide (FAO/IAEA Mutant Variety Database). In recent years, many plant germplasms with novel traits have been selected through in vitro mutagenesis using gamma irradiation (Çelik and Atak 2017; Parry et al. 2007; Shu and Lagoda 2007; Shu et al. 2012).

The sensitivity of plant tissues and organs to mutagenic treatments depends on material, species, and genotype (Shu et al. 2009), presenting significant variations in plant survival, growth, development, and morphology according to the frequency and dose of gamma radiation (Al-Salhi et al. 2004; Kiong et al. 2008; Quintana et al. 2019; Sumira et al. 2012). Therefore, it is important to determine the mean lethal dose (LD50)—the radiation dose that is expected to cause the death of up to 50% of the exposed population—a proportion considered to be the range within which useful mutations occur in genetic improvement programs (Mudibu et al. 2012).

Combining mutagenesis with in vitro selection can facilitate the selection of controlled traits and improve recovery of the desired mutants. Moreover, efficient selection agents are essential to identify the traits of interest in a large number of mutagenized cells (Liu et al. 2005). For decades, host-specific or selective toxins were the only known agents used in the in vitro selection of disease-resistant plants, with successful results in several species (Gupta and Acharya 2018; Kumar et al. 2008; Lebeda and Svábová 2010; Thakur et al. 2002).

Several studies have demonstrated the utility of sterile culture filtrates of different fungal species for discriminating between resistant and susceptible cultivars using the tests of in vitro-micropropagated plants or tissues (Gupta and Acharya 2018). The combination of gamma irradiation and pathogen culture filtrate inoculation has been reported to confer fungal resistance in chrysanthemum, common bean and ginger (Kumar et al. 2012; Sharma et al. 2020; Solís-Ramos et al. 2015). In vitro, greenhouse and field studies on different species as cardamom (*Elettaria cardamomum*), chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*), and palm (*Phoenix dactylifera*) have confirmed the presence of mutants resulting from selection processes whose progeny retained resistance characteristics acquired during the tissue culture phase (Jain 2012; Kumar et al. 2012; Zúñiga et al. 2010). No studies have been reported on the maintenance of fungal resistance in mutants of *Rubus* species and other berries, obtained by gamma irradiation. To this end, the present study aimed to determine the

survival rate (LD50) of blackberry (*Rubus fruticosus* ‘Tupy’) shoots tips irradiated with gamma rays (0–60Gy) to select genotypes resistant to *B. cinerea* using sterile culture filtrate of this fungus.

Materials and methods

Plant and fungal material

Adult plants of *R. fruticosus* ‘Tupy’ (age, ~2 years) at the reproductive stage, which were propagated from cuttings, were used as the source of explants for in vitro culture.

The *B. cinerea* strain used in the present study was obtained from blackberry fruits exhibiting typical symptoms of gray mold. The fungus was maintained on potato–dextrose–agar (PDA) culture medium in a growth chamber (24°C, 16 h light at 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and 60% humidity). The isolated strain was genotyped through the PCR amplification of ITS, NS, and 18S markers. The colonies were transferred on the fresh medium every 15 days.

In vitro establishment of apical buds

The methodology used for the surface sterilization of explants (apical buds) is described elsewhere (Cortés-Rodríguez et al. 2011). Briefly, the apical segments (3–5 cm) were immersed in distilled water for 30 min, followed by 70% ethanol (v/v) for 2 min and 1.2% commercial sodium hypochlorite (available chlorine) plus 1% thiabendazole fungicide (Tecto® 60, Syngenta, Mexico) (w/v) for 20 min with gentle stirring.

Under aseptic conditions, the sterilized explants were rinsed three times with sterile distilled water, and the apical buds were removed and cultured on Murashige and Skoog (MS) basal medium (Murashige and Skoog 1962) containing 3% sucrose (w/v) (Sigma-Aldrich, Mexico), 0.1% myoinositol (Sigma-Aldrich), and 0.8% agar (w/v) (Sigma-Aldrich) and supplemented with 0.05 mg l^{-1} benzylaminopurine (BA) (Sigma-Aldrich). pH of the medium was adjusted to 5.7 with KOH or HCl (0.1 N).

Culture conditions for *in vitro* establishment, shoot culture, multiplication, plantlet regeneration, and maintenance were 16 h photoperiod with 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance provided by white fluorescent lamps and 25±1°C temperature.

Shoot multiplication and plant regeneration

Multiple shoots were obtained through the culture of apical buds from initial shoots on MS medium supplemented with 1.0 mg l^{-1} of BA and 0.06 mg l^{-1} of indole-3-butyric acid (IBA) (Sigma-Aldrich) and modified as described by Gonzalez et al. (2000) (hereafter

referred as MSB medium). For plant regeneration, rooting was induced in micropropagated shoots (0.5 cm long) on MS supplemented with 0.05 mg l⁻¹ BA for 28 days.

Determination of DL₅₀ of gamma radiation

To determinate the suitable dose of gamma radiation, individual actively growing shoot tips (0.5 cm long) from 28-day-old micropropagated shoots were collected and cultured on MS medium supplemented with 0.05 mg l⁻¹ BA under aseptic conditions in sealed Petri dishes. The shoot tips were irradiated with 0, 15, 30, 45, and 60 Gy of gamma rays using a Cobalt-60 (⁶⁰Co) source in a Gammacell irradiator (GO-220®, Ontario, Canada) at the facilities of the National Institute for Nuclear Research (ININ, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Mexico).

Approximately 50 shoot tips were tested at each dose (10 shoot tips per Petri dish). The irradiated shoot tips were cultured on MSB medium for 28 days as described above. At the end of the culture period, the percent survival of the shoot tips was evaluated as described by Predieri and Di Virgilio (2007) using the formula following: Percent survival (%) = (Number of explants surviving after irradiation/Total number of explants irradiated) × 100.

Radiosensitivity curves were created through linear regression plotting of percent mortality (%) versus radiation dose, and LD₅₀ was determined using the resulting regression equation. Subsequently, 200 shoot tips (10 tips per Petri dish) were irradiated at the determined LD₅₀. After 28 days of culture, the surviving shoot tips were micropropagated for 60 days on MSB medium to obtain different lines.

Preparation of sterile B. cinerea culture filtrate

To prepare sterile fungal culture filtrate, *B. cinerea* was cultured for 21 days in PDA medium in a growth chamber. The mycelium (with spores) was scraped using a sterile spatula, and a concentrated suspension was prepared by mixing 10 g l⁻¹ of mycelium in water, following the methodology described by Kumar et al. (2014). This suspension was autoclaved for 30 min and filtered to remove solid waste. Before addition to the culture media, the suspension was subjected to a sterility test by inoculating 50 µl of the filtrate in PDA medium for 5 days for ensuring the safety of the sterile filtrate.

Determination of LC₅₀ fungal culture filtrate

To select mutant blackberry lines resistant to *B. cinerea*, in vitro-propagated, non-irradiated shoots were cultured on MS medium (0.05 mg l⁻¹ BA) supplemented with 0, 2, 4, 6, 8,

and 10 g l⁻¹ of the sterile culture filtrate of *B. cinerea* (10 shoots per treatment) for determining LC₅₀. After 28 days culture, mortality, chlorosis, and necrosis percentages were determined for each concentration. A linear regression plot of percent mortality versus culture filtrate concentration (g l⁻¹) was created, and LC₅₀ was calculated using the resulting regression equation.

In vitro selection of *B. cinerea* resistant blackberry shoots

Surviving irradiated shoot tips of blackberry were cultured on MS medium (0.05 mg l⁻¹ BA) supplemented with LC₅₀ of the sterile culture filtrate of *B. cinerea* for 28 days (n=9). The shoots exhibiting minimal or no symptoms (chlorosis or necrosis) were selected as the resistant lines. The lines were labeled rfgum#, based on by the initials of r(rubus), f(fruticosus), g(gamma), u(universidad), and m(michoacana) and line number (#). The putative resistant shoots of mutant lines were cultured on MS supplemented with 0.05 mg l⁻¹ BA to obtain blackberry mutant plantlets, which were further subjected to in vitro assays of resistance to *B. cinerea*.

In vitro assays of resistance to *B. cinerea*

In vitro *B. cinerea* resistance assays were performed using detached leaves of the putative resistant plantlets. Briefly, detached leaves of similar age and size were randomly selected from the in vitro-grown plantlets of each mutant line (n=9), and cultured in agar–water medium (0.8% agar) in Petri dish. The leaves were inoculated in the central area with 3 µl of *B. cinerea* suspension at the density of 1×10³ spores ml⁻¹, which was pre-determined to be the optimal conidial concentration of *B. cinerea* for inoculation.

Leaves from the negative control (control–, inoculated with distilled water), positive control (control+, inoculated with *B. cinerea* from non-irradiated shoots), and others inoculation treatments were incubated under a 16/8 h light/dark regime at 24°C. The Petri dishes were covered with preservative film to ensure relative humidity of 90–100%. At 3, 7, and 14 days post- inoculation (dpi), infection was evaluated using a modified scale proposed by Rubio et al. (2014), comprising severity index (SI) on the scale of 1 to 6: SV1, no disease symptoms; SV2, 20% leaf blade necrotic; SV3, 30% leaf blade necrotic; SV4, 40% leaf blade necrotic; SV5, 50% leaf blade necrotic; and SV6, +60% leaf blade necrotic.

Statistical analysis

To determine the LD50 of gamma radiation and LC50 of sterile filtrate culture, percent mortality was analyzed using linear regression models (n=10).

Results

LD₅₀ gamma radiation

The survival of irradiated shoot tips of ‘Tupy’ blackberry cultured for 28 days on MSB medium, expressed as percent mortality, increased with increasing irradiation dose. The LD₅₀ of 30.8 Gy was obtained using the equation of radiosensitivity curve based on data presented in Figure 1 (Figura 5). The highest percent mortality (100%) was obtained in 60 Gy treatment, and no mortality was observed in non-irradiated shoot tips (100% survival).

Once the LD₅₀ was determined, 200 individual shoot tips were treated with 30.8 Gy of gamma radiation, and 96 surviving lines were obtained and micropropagated. After 60 days of culture, the shoots that did not present visible changes in shoot number, shoot length, and leaf formation and exhibited similar growth to non-irradiated shoots (five to six 3.2-cm-long leaves without chlorosis or necrosis) were selected (Figure 2A) (Figura 6A).

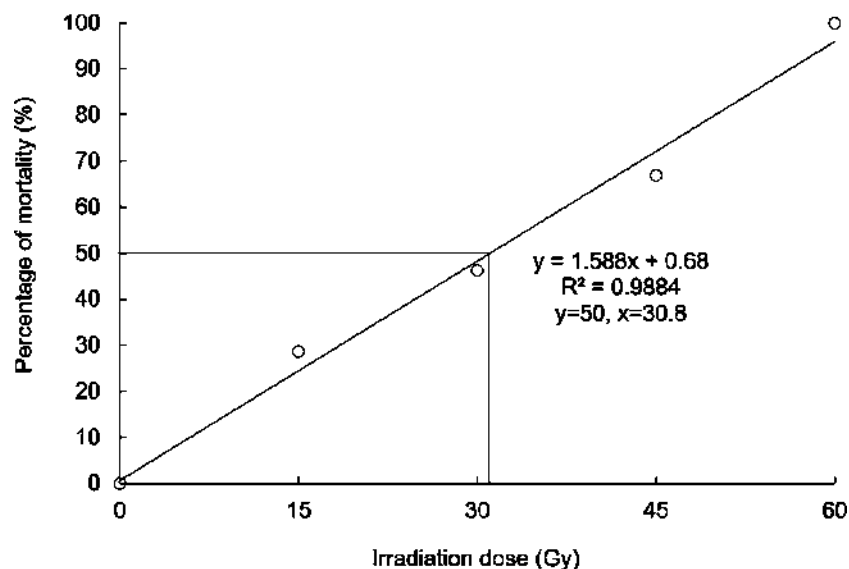


Figura 5. Figure 1. Radiosensitivity curve of *Rubus fruticosus* ‘Tupy’ shoot tips irradiated with gamma radiation at different doses and cultured for 28 days.

In vitro selection of blackberry shoots cultured with sterile fungal filtrate

The percent mortality of non-irradiated shoots after 28 days of culture with 10 g l⁻¹ of *B. cinerea* sterile culture filtrate was 100%, with evident chlorosis and necrosis on stems and leaves (Figure 2B) (Figura 6B). LC₅₀ of 4.6 g l⁻¹ was calculated using linear regression equation (Figure 3) (Figura 7). At the lowest concentration of sterile culture filtrate (2 g l⁻¹), the shoots showed 70% survival, while those grown without culture filtrate showed no mortality (Figure 3) (Figura 7).

From the 96 surviving lines, individual shoots were cultured for 28 days in the presence of LC₅₀ of *B. cinerea* sterile culture filtrate (4.6 g l⁻¹). Of these, 10 lines presented percent survival of >50% (rfgum2, rfgum5, rfgum6, rfgum9, rfgum14, rfgum17, rfgum24, rfgum27, rfgum28, and rfgum32), exhibiting <50% tissue chlorosis or necrosis (Figure 2C) (Figura 6C). Of these, three lines (rfgum5, rfgum6, and rfgum17) did not present changes compared with the controls (Figure 2D) (Figura 6D).

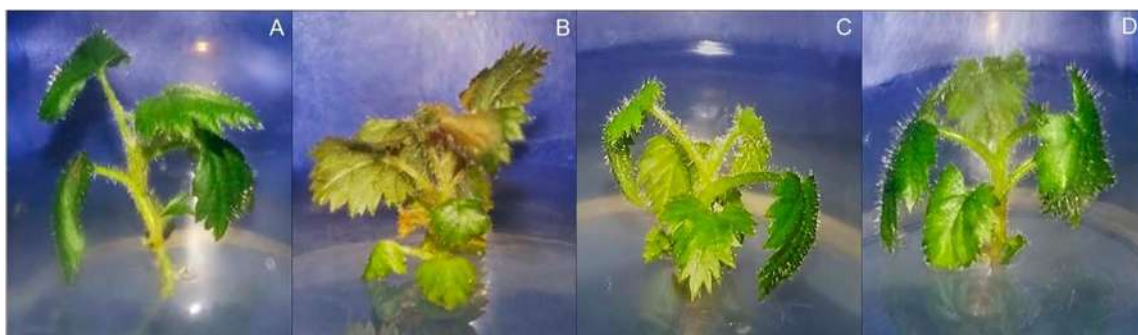


Figura 6. Figure 2. *Rubus fruticosus* 'Tupy' shoots grown on MS (0.05 mg l⁻¹ BA) medium supplemented with sterile culture filtrate of *Botrytis cinerea*: (A) non-irradiated shoots (0 g l⁻¹); (B) non-irradiated shoot (10 g l⁻¹); (C) irradiated shoots (rfgum2) (4.6 g l⁻¹); and (D) irradiated shoots (rfgum5) (4.6 g l⁻¹).

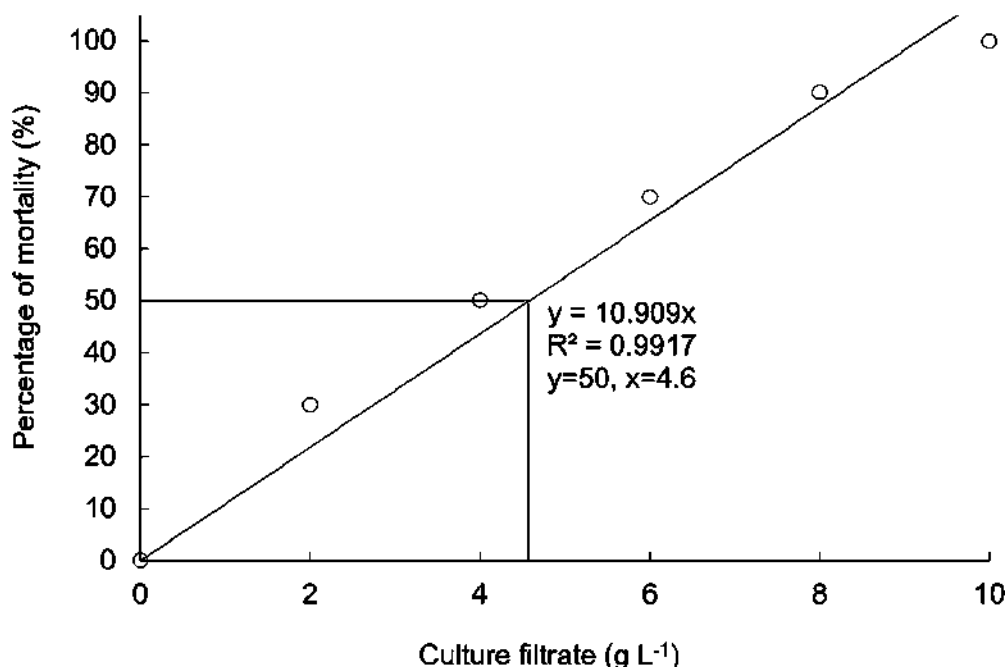


Figura 7. Figure 3. Percent mortality of non-irradiated shoot tips of *Rubus fruticosus* 'Tupy' grown in the presence of different concentrations of sterile culture filtrate of *Botrytis cinerea* for 28 days.

In vitro assays of resistance to *B. cinerea*

Three *R. fruticosus* ‘Tupy’ mutant plant lines (rfgum5, rfgum6, and rfgum17) were selected to investigate resistance to *B. cinerea* and compared with control[−] and control⁺, analyzing the SI of each line. The first typical symptoms of *B. cinerea* infection were observed at 3 dpi in control⁺ leaves, and the infection progressed reaching the SI of 4 and 6 at 7 and 14 dpi, respectively. The leaves of the mutant lines rfgum5 and rfgum6 did not exhibit disease symptoms at 3, 7, and 14 dpi, although those of the mutant line rfgum17 exhibited disease symptoms from 3 dpi (Table 1) (Cuadro 3). At 14 dpi, the three mutant lines were classified according to their SI. As such, rfgum5 and rfgum6 were classified as resistant, with a SI of 1, as necrosis, mycelium and sporulation were not observed on detached leaves in these lines. However, rfgum17 presented a SI of 6, with 60% necrotic leaves. Mycelium and sporulation were observed in control⁺ and rfgum17. Although no signs of infection were observed on detached leaves of rfgum5 and rfgum6, the growth of *B. cinerea* mycelium on the culture medium was observed (Table 1, Figure 4) (Cuadro 3, Figura 8).

The mutant lines selected as resistant to *B. cinerea* (rfgum5 and rfgum6) were micropropagated, and their shoots presented in vitro growth similar to non- irradiated shoots. No phenotypic changes related to plant development were observed. Figure 5 presents in vitro blackberry ‘Tupy’ plants micropropagated from non- irradiated (Figure 5A) (Figura 9A), rfgum5 (Figure 5B) (Figura 9B), and rfgum6 (Figure 5C) (Figura 9C) shoots. The plantlets presented the height of 7.2 cm, up to 6 pairs of leaves, and optimal rooting, indicating that they were suitable for transplantation and acclimatization.

Cuadro 3. Table 1. Severity index (SI), necrosis percentage, and presence of mycelium and sporulation on detached leaves of *Rubus fruticosus* ‘Tupy’ control (control[−] and control⁺) and mutant (rfgum5, rfgum6, and rfgum17) lines, inoculated with *Botrytis cinerea* (1×10^3 spores ml^{−1}), at 3, 7 and 14 days post-inoculation (dpi).

Line	dpi	SI	Necrosis (%)	Mycelium/sporulation
Control [−] (non-inoculated)	3	1	0	−
	7	1	0	−
	14	1	0	−
Control ⁺ (inoculated)	3	4	40	+
	7	6	60	+
	14	6	100	+
rfgum5	3	1	0	−
	7	1	0	−
	14	1	0	−
rfgum6	3	1	0	−
	7	1	0	−
	14	1	0	−

7.1. Cap. 1. Selección in vitro de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) resistentes a *Botrytis cinerea* usando ápices de brotes irradiados con rayos gamma.

rfgum17	3	3	30	+
	7	4	40	+
	14	6	60	+

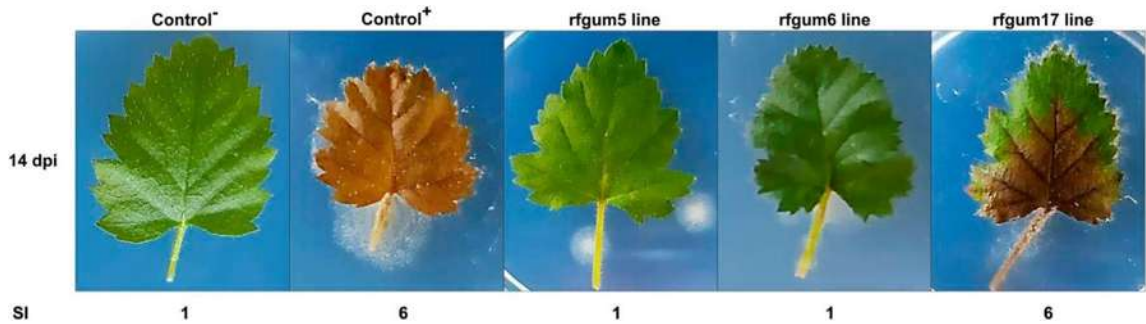


Figura 8. Figure 4. Evaluation of the severity index (SI) of detached leaves of *Rubus fruticosus* 'Tupy.' Negative control (control⁻, non-inoculated leaves), positive control (control⁺, inoculated leaves of plants from non-irradiated shoot), and mutant lines (rfgum5, rfgum6, and rfgum17), inoculated with *Botrytis cinerea* (1×10^3 spores ml⁻¹) at 14 days post-inoculation (14 dpi).

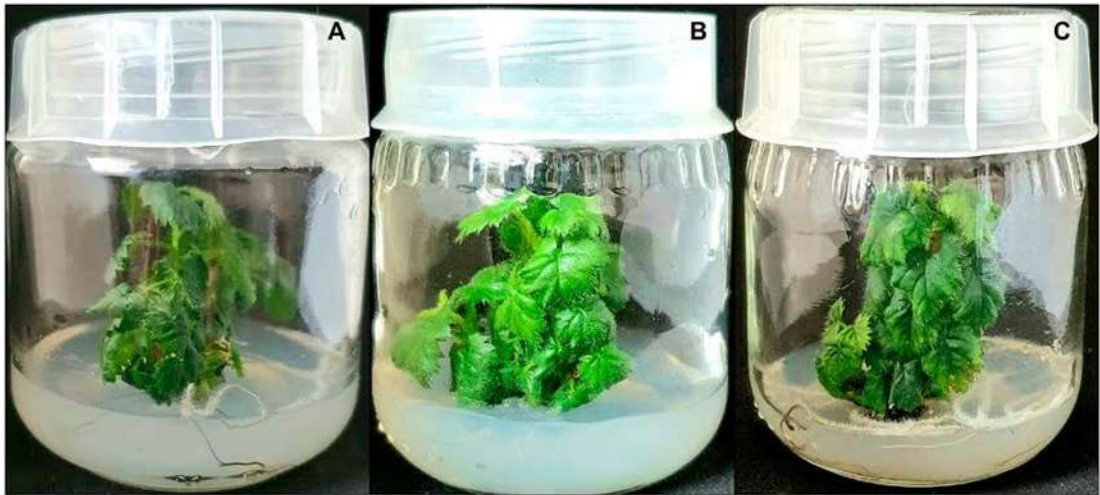


Figura 9. Figure 5. *Rubus fruticosus* 'Tupy' plants in vitro-micropropagated (A) from non-irradiated shoots, (B) from rfgum5 mutant line, and (C) from rfgum6 mutant line.

Discussion

In the present study, we used gamma radiation to induce mutations in *R. fruticosus* 'Tupy' shoot tips and sterile filtrate culture of *B. cinerea* as the selection system to select mutant lines resistant to this fungus.

The irradiated shoot tips showed different responses depending on the radiation dose; specifically, shoot tips exposed to high doses (45 and 60 Gy) presented foliar and stem

chlorosis, necrosis, and death. Following exposure to high-dose gamma radiation, plant cells lose vitality and adaptability to new physiological changes, leading to cell death, as evidenced in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) (Soliman et al. 2014) and ginger (*Zingiber officinale*) (Yoon et al. 2014). The results of the present study are consistent with previous reports of LD₅₀ less than 40 Gy. For instance, LD₅₀ of 30 Gy was obtained for in vitro henequen (*Agave fourcroydes*) shoots (González-Oramas et al. 2007), and of 37 Gy for in vitro banana plantlets (*Musa acuminata* ‘Berangan’) (Hassim et al. 2021). However, the sensitivity to gamma radiation is dependent on the plant families and genera, explant type, genotype, as well as the size of the genome (Kim et al. 2021; Marcu et al. 2013; Shu et al. 2009; Yadav 2016).

At present, the use of sterile culture filtrate of phytopathogenic fungi as a selective agent capable of exerting selection pressure is a very useful approach to obtain genetic materials resistant to various pathogens (Gupta and Acharya 2018; Mahlanza et al. 2013). In this approach, in vitro shoots or plantlets are selected from surviving explants in a modified medium supplemented with sterile culture filtrate and regenerated to obtain disease-resistant plantlets. To our best knowledge, the present study is first to evaluate the utility of *B. cinerea* sterile culture filtrate for in vitro selection of *R. fruticosus* ‘Tupy’ plantlets resistant to gray mold. Borrás et al. (2001) noted a direct correlation between the concentration of the sterile culture filtrate of *Fusarium subglutinans* and the necrotic area of leaf segments of susceptible pineapple varieties inoculated with the fungus. The authors also observed much lesser foliar necrosis in different resistant varieties than in susceptible varieties of pineapple. Similar findings have been reported in carnation (*Dianthus caryophyllus*) (Thakur et al. 2002), in passion fruit (*Passiflora edulis*) (Flores et al. 2012), and sugarcane (Mahlanza et al. 2013).

Furthermore, to the best of our knowledge, the present study is the first to report the in vitro phytotoxicity of sterile *B. cinerea* filtrate in *R. fruticosus*, as evidenced by 100% mortality at 10 g l⁻¹. Based on the LC₅₀ of sterile *B. cinerea* filtrate (4.6 g l⁻¹), three lines without any symptoms of toxicity were selected (rfgum5, rfgum6, and rfgum17). Although the precise mechanism of action of sterile *B. cinerea* filtrate for the selection of resistant mutant plants remains unknown, the pathogen culture filtrate contains phytotoxins and lytic enzymes involved in pathogenesis (Svábová and Lebeda 2005). For instance, *Fusarium* produces fumonisin B1, which triggers the salicylic acid pathway and promotes necrotrophic colonization (Smith et al. 2015). Studies in corn (Gengenbach et al. 1977), rice (Ling et al. 1985), barley, wheat (Wenzel and Foroughi-Wehr 1990), and sugarcane (Sengar et al. 2009) have confirmed a correlation between plant resistance and selection using sterile culture filtrates.

To confirm the degree of in vitro resistance against *B. cinerea*, non-irradiated plants and the three selected lines (rfgum5, rfgum6, and rfgum17) were subjected to in vitro assays of detached leaves and classified according to SI at 3, 7, and 14 dpi. The mutant lines rfgum5 and rfgum6 were resistant to *B. cinerea*, exhibiting no disease symptoms at all time points.

Therefore, the selection of blackberry shoots using sterile culture filtrate of *B. cinerea* was directly related to the resistance to this fungus; this result is consistent with previous reports in other plant species, such as sugarcane, rice, banana, and tobacco, among others, some of which were tested in the field and proven to be resistant to various phytopathogenic fungi (Gupta and Acharya 2018).

When a genetic improvement system is applied to select plants exhibiting a trait of interest, such as resistance to fungal pathogens, there should be no visible changes with respect to the control plants. Accordingly, rfgum5 and rfgum6 mutant plants showed comparable growth and development to control plants, indicating that these lines are suitable for use in greenhouse- and field-based trials of resistance as well as molecular studies to determine the possible mechanisms underlying resistance. This implies the necessity of carry out *B. cinerea* pathogenicity assays under greenhouse and field conditions, and to evaluate undesirable changes due to mutations.

Conclusions

The combination of gamma irradiation and *in vitro* selection using sterile culture filtrate obtained *R. fruticosus* ‘Tupy’ mutant lines resistant to *B. cinerea*. Survival in the presence of sterile culture filtrate of *B. cinerea* and resistance to this fungus in vitro assays were directly linked.

Financial support

This work was supported by grants from CIC/UMSNH to RSG.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Ahloowalia BS, Maluszynski M (2001) Induced mutations—A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118: 167–173
- Al-Salhi M, Ghannam MM, Al-Ayed MS, El-Kameesy SU, Roshdy S (2004) Effect of gamma irradiation on the biophysical and morphological properties of corn. *Nahrung* 48: 95–98
- Beyaz R, Yildiz M (2017) The use of gamma irradiation in plant mutation breeding. In: Snježana J (ed) *Plant Engineering*. IntechOpen, London, pp 33–46

7.1. Cap. 1. Selección in vitro de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Ev. Tupy) resistentes a *Botrytis cinerea* usando ápices de brotes irradiados con rayos gamma.

- Borras O, Santos AR, Matos AP, Cabral RS, Arzola M (2001) A first attempt to use a *Fusarium subglutinans* culture filtrate for the selection of pineapple cultivars resistant to fusariose disease. *Plant Breed* 120: 435–438
- Çelik Ö, Atak Ç (2017) Applications of ionizing radiation in mutation breeding. In: Maghraby AM (ed) *New Insights on Gamma Rays*. IntechOpen, London, pp 111–132
- Cortés-Rodríguez MA, López-Gómez R, Martínez-Pacheco MM, Suárez-Rodríguez LM, Hernández-García A, Salgado-Garciglia R, Vidales-Fernández I, Ángel-Palomares ME (2011) In vitro propagation of Mexican race avocado (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). *Acta Hort* 923:47–52
- Dean R, Kan JALV, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Pietro AD, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, et al. (2012) The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13: 414–430
- FAOSTAT (2020) FAOSTAT Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved 02/08/2020. URL: <http://www.fao.org/faostat/es/#data> (Accessed Dec 20, 2020)
- Flores PS, Otoni WC, Dhingra OD, de Souza-Diniz SPS, dos Santos TM, Bruckner CH (2012) In vitro selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to *Fusarium* vascular wilt. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 108: 37–45
- Gengenbach BG, Green CE, Donovan CM (1977) Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5113–5117
- Gonzalez MV, Lopez M, Valdes AE, Ordas RJ (2000) Micropropagation of three berry fruits species using nodal segments from field grown plants. *Ann Appl Biol* 137: 73–78
- González-Oramas G, Alemán-García S, Garriga M, Ortíz R, de la Fe C (2007) Radio sensitivity to gamma rays (^{60}Co) in shoot tips of henequen. *Biot Veg* 7: 115–117
- Gupta NS, Acharya K (2018) Fungal toxin as potential tool for in vitro selection and regeneration of resistant plants. *Asian J Plant Pathol* 12: 38–45
- Hassim AA, Shamsiah A, Hussein S (2021) Induced mutations using gamma ray and multiplication of plantlet through micro cross section culture of banana (*Musa acuminata* cv. Berangan). *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci* 757: 012007
- Hu M-J, Fernández-Ortuño D, Schnabel G (2016) Monitoring resistance to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea* from strawberry fields. *Plant Dis* 100: 959–965
- Jain SM (2012) In vitro mutagenesis for improving date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Emir J Food Agric* 24: 400–407

7.1. Cap. 1. Selección in vitro de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) resistentes a *Botrytis cinerea* usando ápices de brotes irradiados con rayos gamma.

- Kim SH, Kim SY, Ryu J, Jo YD, Choi H-I, Kim J-B, Kang SY (2021) Suggested doses of proton ions and gamma-rays for mutation induction in 20 plant species. *Int J Radiat Biol* 97: 1624–1629
- Kiong AL, Lai AG, Hussein S, Harun AR (2008) Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. *Am-Eurasian J Sustain Agric* 2: 135–149
- Kumar A, Singh PK, Parihar R, Dwivedi V, Lakhotia SC, Ganesh S (2014) Decreased o-linked glcnacylation protects from cytotoxicity mediated by huntingtin exon1 protein fragment. *J Biol Chem* 289: 13543–13553
- Kumar B, Kumar S, Thakur M (2012) In vitro mutation induction and selection of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) lines with improved resistance to *Septoria obesa* Syd. *Int J Plant Res* 2: 103–107
- Kumar S, Kumar S, Negi P, Kanwar JK (2008) In vitro selection and regeneration of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Tzelev) plants resistant to culture filtrate of *Septoria obesa* Syd. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 44: 474–479
- Lebeda A, Svábová L (2010) In vitro screening methods for assessing plant disease resistance. In: IAEA (ed) *Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Diseases, Joint FAO/ IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture*, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp 5–46
- Li S, Shen L, Hu P, Liu Q, Zhu X, Qian Q, Wang K, Wang Y (2019) Developing disease-resistant thermosensitive male sterile rice by multiplex gene editing. *J Integr Plant Biol* 61: 1201–1205
- Ling DH, Vidhyaseharan P, Borromeo ES, Zapata FJ, Mew TW (1985) In vitro screening of rice germplasm for resistance to brown spot disease using phytotoxin. *Theor Appl Genet* 71: 133–135
- Liu S, Wang H, Zhang J, Fitt BDL, Xu Z, Evans N, Liu Y, Yang W, Guo X (2005) In-vitro mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Rep* 24: 133–144
- Mahlanza T, Rutherford RS, Snyman SJ, Watt MP (2013) In vitro generation of somaclonal variant plants of sugarcane for tolerance to *Fusarium sacchari*. *Plant Cell Rep* 32: 249–262
- Marcu D, Damian G, Cosma C, Cristea V (2013) Gamma radiation effects on seed germination, growth and pigment content, and ESR study of induced free radicals in maize (*Zea mays*). *J Biol Phys* 39: 625–634
- Mudibu J, Nkongolo KKC, Kalonji-Mbuyi A, Kizungu RV (2012) Effect of gamma irradiation on morpho-agronomic characteristics of soybeans (*Glycine max* L.). *Am J Plant Sci* 3: 331–337

7.1. Cap. 1. Selección in vitro de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) resistentes a *Betrytis cinerea* usando ápices de brotes irradiados con rayos gamma.

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497
- Parry MAJ, Madgwick PJ, Carvalho JFC, Andralojc PJ (2007) Prospects for increasing photosynthesis by overcoming the limitations of Rubisco. *J Agric Sci* 145: 31–43
- Predieri S, Di Virgilio N (2007) *In vitro* mutagenesis and mutant multiplication. In: Jain SM, Häggman H (eds) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, Dordrecht, pp 323–333
- Quintana V, Alvarado L, Saravia D, Borjas R, Castro-Cepero V, Julca-Otiniano A, Gómez L (2019) Gamma radiosensitivity of coffee (*Coffea arabica* L. var. typica). *Peruv J Agron* 3: 74–80
- Rubio J, Montes C, Castro Á, Álvarez C, Olmedo B, Muñoz M,
- Tapia E, Reyes F, Ortega M, Sánchez E, et al. (2014) Genetically engineered Thompson seedless grapevine plants designed for fungal tolerance: Selection and characterization of the best performing individuals in a field trial. *Transgenic Res* 24: 43–60
- Sengar AS, Thind KS, Kumar BAS, Pallavi M, Gosal SS (2009) In vitro selection at cellular level for red rot resistance in sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Growth Regul* 58: 201–209
- Sharma V, Thakur M, Tomar M (2020) In vitro selection of gamma irradiated shoots of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) against *Fusarium oxysporum* f.sp. zingiberi and molecular analysis of the resistant plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 143: 319–330
- Shu QY, Forster BP, Nakagawa H (2012) *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. CABI, Wallingford UK, p 608
- Shu QY, Lagoda PJJ (2007) Mutation techniques for gene discovery and crop improvement. *Mol Plant Breed* 5: 193–195
- Shu X, Jia L, Ye H, Li C, Wu D (2009) Slow digestion properties of rice different in resistant starch. *J Agric Food Chem* 57: 7552–7559
- SIAP (2020) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Panorama Agroalimentario 2020 (p 142). URL: [https:// www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2020/11/Atlas- Agroalimentario-2020.pdf](https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2020/11/Atlas-Agroalimentario-2020.pdf) (Accessed Dec 20, 2020)
- Smith S, Kroon J, Simon W, Slabas A, Chivasa S (2015) A novel function for *Arabidopsis* CYCLASE1 in programmed cell death revealed by isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) analysis of extracellular matrix proteins. *Mol Cell Proteomics* 14: 1556–1568
- Soliman TMA, Lv S, Yang H, Hong B, Ma N, Zhao L (2014) Isolation of flower color and shape mutations by gamma radiation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Youka. *Euphytica* 199: 317–324

7.1. Cap. 1. Selección in vitro de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) resistentes a *Betrytis cinerea* usando ápices de brotes irradiados con rayos gamma.

- Solís-Ramos LY, Valdez-Melara M, Alvarado-Barrantes R, Mora- Umaña F, Hernández-Jiménez E, Barboza-Vargas N, Ramírez- Fonseca P (2015) Effect of gamma irradiation and selection with fungus filtrate (*Rhizoctonia solani* Kuhn) on the in vitro culture of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Am J Plant Sci* 6: 2672–2685
- Sumira J, Parween T, Siddiqi TO (2012) Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. *Environ Rev* 20: 17–39
- Svábová L, Lebeda A (2005) *In-vitro* selection of improved plant resistance to toxin-producing pathogens. *J Phytopathol* 153: 52–64
- Thakur M, Sharma DR, Sharma SK (2002) *In-vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Plant Cell Rep* 29: 825–828
- Wenzel G, Foroughi-Wehr B (1990) Progeny tests of barley, wheat, and potato regenerated from cell cultures after in vitro selection for disease resistance. *Theor Appl Genet* 80: 359–365
- Yadav V (2016) Effect of gamma radiation on various growth parameters and biomass of *Canscora decurrens* Dalz. *Int J Herb Med* 4: 109–115
- Yoon AR, Rashid K, Tajudin A, Zainoldin KH, Daran AB, Nezhadahmadi A, Golam F (2014) The contribution of muslim scientists in botanical science: Studies on the using of gamma rays for ginger plants (*Zingiber officinale*). *Stem Cells* 5: 88–94
- Zúñiga DS, Hoyos RS, Afanador L (2010) Seedlings of cardamom (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) evaluation by resistance *in vitro* at culture filtrates of *Fusarium oxysporum*. *Vitae* 17: 155–164

7.2.CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD MORFOANATÓMICA Y ENSAYOS DE RESISTENCIA EN PLANTAS MUTANTES DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) RESISTENTES A *Botrytis cinerea*.

RESUMEN

La radiación gamma en plantas induce inestabilidad genómica, comportamiento que se utiliza para la obtención de mutantes, con lo que se ha logrado la selección de diversas plantas de valor agrícola con nuevas características como la resistencia a hongos fitopatógenos. Sin embargo, la exposición a los rayos gamma puede inducir varios eventos mutacionales, algunos de los cuales provocan cambios genéticos no deseables que afectan el crecimiento, desarrollo y forma, de diferentes partes de las plantas mutantes. Así mismo, la inestabilidad de los nuevos caracteres como la resistencia a hongos, puede llevar a la pérdida de estos cuando las plantas son cultivadas en invernadero y campo. Por lo tanto, realizar la caracterización morfoanatómica y confirmar la resistencia a un hongo, es determinante para el mejoramiento genético conseguido por radiación. En la presente investigación se realizó la caracterización morfoanatómica y se determinó la resistencia a *Botrytis cinerea* de tres líneas mutantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) obtenidas por radiación gamma (*rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*) y de plantas control (no irradiadas), cultivadas en invernadero y campo (macrotúnel). En estas, a los 90 y 180 días del cultivo en invernadero, se determinaron las variables de altura y número de hojas, y en campo, se determinó la altura y los descriptores de rama latente, sección transversal del tallo, de folíolos, flores y frutos, de acuerdo a la UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales). Los ensayos de resistencia a *B. cinerea* fueron realizados en hojas de las plantas cultivadas tanto en invernadero como en campo, utilizando el método de hoja cortada, cultivadas *in vitro* en agar-agua, las que fueron inoculadas con 1×10^3 esporas/mL. A los 7 y 14 días posteriores a la inoculación (dpi), se determinó el índice de severidad (IS). De acuerdo a los resultados de los diferentes descriptores, se encontraron cambios en la altura de las plantas, en la lámina foliar, en la sección transversal del tallo y en la rama latente; en el número, color y forma de las flores; y en el número, peso, tamaño y forma de los frutos, así como en la dulzura (°Bx). Las plantas de la mutante *rfgum6* presentaron el menor número de cambios morfoanatómicos, mostrando un desarrollo y crecimiento óptimos, en comparación al presentado por las plantas de las líneas mutantes *rfgum5* y *rfgum17*, además de presentar la mayor similitud con las plantas control (no irradiadas), con la mayor producción de frutos, de mayor peso y °Bx. La resistencia a *B. cinerea* se mantuvo durante el cultivo tanto en invernadero como en campo, de las plantas mutantes *rfgum5* y *rfgum6*, mostrando un IS de 1, aunque las plantas de la mutante *rfgum5*, presentaron un mayor número de cambios morfoanatómicos.

Palabras clave: *B. cinerea*, descriptores, mutantes, resistencia a hongos, zarzamora.

ABSTRACT

Gamma radiation in plants induces genomic instability, a behavior that is used to obtain mutants, which has achieved the selection of various crops with new characteristics such as resistance to phytopathogenic fungi. However, exposure to gamma rays can induce several mutational events, some of which cause undesirable genetic changes that affect the growth, development, and shape of different parts of mutant plants. Also, the instability of new characters such as resistance to fungi, can lead to the loss of these, when the plants are grown in greenhouse and field. Therefore, performing morphoanatomical characterization and confirming fungal resistance is decisive for the genetic improvement achieved by gamma radiation. In the present research, the morphoanatomical characterization was carried out and the resistance to *Botrytis cinerea* was determined in three mutant lines of blackberry (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) obtained by gamma radiation (*rfgum5*, *rfgum6* and *rfgum17*) and control plants (not irradiated), grown in greenhouse and field (macrotunel). In these, at 90 and 180 days of greenhouse cultivation, the variables of height and number of leaves were determined, and in the field, the height and descriptors of latent branch, cross section of the stem, leaflets, flowers and fruits were determined, according to UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants). The tests of resistance to *B. cinerea* were carried out on leaves of the plants grown both in greenhouse and in the field, using the undetached leaf method, grown *in vitro* in agar-water, which were inoculated with 1×10^3 spores/mL. At 7- and 14-days post-inoculation (dpi), the severity index (SI) was determined. According to the results of the different descriptors, changes were found in the height of the plants, in the leaf sheet, in the cross-section of the stem and in the latent branch; in the number, color and shape of the flowers; and in the number, weight, size and shape of the fruits, as well as in the sweetness ($^{\circ}\text{Bx}$). The plants of the *rfgum6* mutant presented the lowest number of morphoanatomical changes, showing optimal development and growth, compared to that presented by the plants of the *rfgum5* and *rfgum17* mutant lines, in addition to presenting the greatest similarity with the control plants (not irradiated), with the highest production of fruits, of greater weight and $^{\circ}\text{Bx}$. The resistance to *B. cinerea* was maintained during the cultivation both in the greenhouse and in the field, of the mutant plants *rfgum5* and *rfgum6*, showing an SI of 1, although the plants of the mutant *rfgum5*, presented a greater number of morphoanatomical changes.

Keywords: *B. cinerea*, blackberry, descriptors, mutants, fungal resistance.

INTRODUCCIÓN

La caracterización morfoanatómica de plantas es la determinación de un conjunto de caracteres mediante el uso de descriptores definidos que permiten su diferenciación, los que son evaluados en diferentes partes de la planta, así como durante diferentes estadios de desarrollo de la misma, de acuerdo a lo establecido por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) y por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI, por sus siglas en inglés). Algunos caracteres pueden ser altamente heredables, fácilmente observables y expresables en la misma forma en cualquier ambiente. Las características morfoanatómicas se utilizan para estudiar la variabilidad genética, para identificar plantas y para conservar los recursos genéticos (Hernández-Villarreal, 2012).

A partir de los programas de mejora genética, como las radiaciones gamma por la vía de mutaciones inducidas, se han conseguido logros de interés, orientados a mejorar la arquitectura de la planta, a optimizar la floración, diversificar el tipo de fruto y a mejorar la resistencia a algunas enfermedades, permitiendo la obtención de cultivares de alta adaptación en muchas especies (Martínez-Valdivieso *et al.*, 2012; Begum y Dasgupta, 2014).

La radiación gamma puede inducir inestabilidad genómica en células, la cual es transmitida a su progenie a través de generaciones, principalmente con la inducción de mutaciones. En este sentido se debe tener en cuenta que la exposición a la radiación puede inducir varios eventos mutacionales por célula, con el riesgo creciente de que una mutación favorable sea acompañada por cambios genéticos no deseables (Kim *et al.*, 2019). Por lo tanto, realizar la caracterización morfoanatómica de los mutantes obtenidos es sumamente importante para la selección de caracteres de interés de los cultivos y programas de conservación (Hernández-Villarreal, 2012).

7.2. Cap. 2. Caracterización de la diversidad morfoanatómica y ensayos de resistencia en plantas mutantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) resistentes a *Botrytis cinerea*.

En el estado de Michoacán, el cultivo de zarzamora (*Rubus* spp) contribuye de manera significativa con la economía del país y ha sido uno de los cultivos que más aportado al producto interno bruto nacional, en la última década nuestro país se posicionó como el mayor exportador de esta frutilla principalmente a los mercados de Estados Unidos y Europa (SIAP, 2019). El interés generado hacia el consumo de esta frutilla con propiedades nutraceuticas y sus altos niveles de antioxidantes, flavonoides, antocianinas y taninos, encontrados principalmente en la epidermis y en las semillas (De Carvalho *et al.*, 2010), ha sido un factor importante para el rápido crecimiento de la producción y comercialización a nivel mundial. Sin embargo, las normas mundiales demandan frutas con mayor calidad nutricional y sensorial, con estándares de sanidad elevados sin la presencia de compuestos químicos, y que además permitan realizar una agricultura más respetuosa con el medio ambiente (Singh *et al.*, 2007).

Uno de los principales factores que afectan al cultivo de zarzamora, es la alta incidencia de patógenos, como el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, que causa la enfermedad del moho gris, antes y después de la cosecha de frutos y es considerado uno de los más importantes, ya que de no ser controlado ocasiona pérdidas de hasta el 100% (Rebollar-Alviter, 2011; Shao *et al.*, 2013). Con el fin de contrarrestar los daños ocasionados por este patógeno y cumplir con los requerimientos mundiales de exportación, nuestro grupo de trabajo seleccionó tres líneas mutantes por radiación gamma (*rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*) con resistencia a *B. cinerea* mediante ensayos *in vitro* (Capítulo 1, Huerta-Olalde *et al.*, 2022).

Las líneas mutantes *rfgum5* y *rfgum6* mostraron índices de severidad mínimos en comparación con las plantas de la línea *rfgum17* y las plantas control (no irradiadas), confirmando que la radiación con rayos gamma fue útil para la selección de genotipos de zarzamora Cv. Tupy con resistencia a *B. cinerea*. Estos resultados se han reportado también en otras especies de plantas, como la caña de azúcar, el arroz, el plátano y el tabaco, entre otros, algunos de los cuales fueron probados en campo y demostraron ser resistentes a diversos hongos fitopatógenos (Gupta y

Acharya, 2018). Sin embargo, se desconoce si estas mutantes mantienen la resistencia a *B. cinerea*, bajo cultivo de invernadero y en campo, así como si estas presentan alteraciones fenotípicas no deseables, ocasionadas por la radiación.

En la presente investigación se realizó la caracterización morfoanatómica de las mutantes de zarzamora (*rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*) cultivadas bajo condiciones de invernadero y cultivadas en una huerta comercial (macrotúnel), así como la confirmación de la estabilidad de la resistencia a *B. cinerea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Se utilizaron plantas micropropagadas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) de las líneas mutantes *rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*, así como de plantas no irradiadas (control), las que se mantuvieron bajo cultivo en medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento por 90 días en condiciones de cuarto de cultivo ($25\pm 1^\circ$ C, 16 h de luz, $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Huerta-Olalde *et al.*, 2022).

Botrytis cinerea fue mantenido bajo cultivo en medio papa-dextrosa, agar (PDA) a 24° C, 16 h de luz ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 60% de humedad), para la producción de esporas. Esta cepa fue aislada de frutos de zarzamora y fue tipificada por amplificación (PCR) de marcadores de ITS, NS y 18S (Huerta-Olalde *et al.*, 2022), los resultados de la tipificación molecular se presentan en el Anexo 12.1. Cada 15 días se realizaron subcultivos a medio fresco con inóculo de fragmento de micelio.

Caracterización morfoanatómica

a) Establecimiento y cultivo en invernadero (Trasplante y aclimatación)

Las plántulas de 90 días de cultivo *in vitro*, de cada mutante y no irradiadas (control), fueron trasplantadas en forma individual en una mezcla de suelo comercial

promix/vigoro (3:2, v/v) y se cultivaron en un invernadero bajo condiciones de cámara húmeda (100% humedad relativa, HR). Para la aclimatación, estas fueron cubiertas con plástico transparente por 30 días y paulatinamente se redujo la HR hasta alcanzar un 70% (Figura 10A). Posteriormente las plantas aclimatadas fueron cultivadas en macetas de mayor tamaño y mantenidas bajo condiciones de invernadero, con riego cada tres días (Figura 10B). Se determinó la altura de la planta (AP en cm) y el número de hojas (NH) a los 90 y 180 días del cultivo en invernadero, utilizando una *n* de 30 plantas por línea mutante y control.

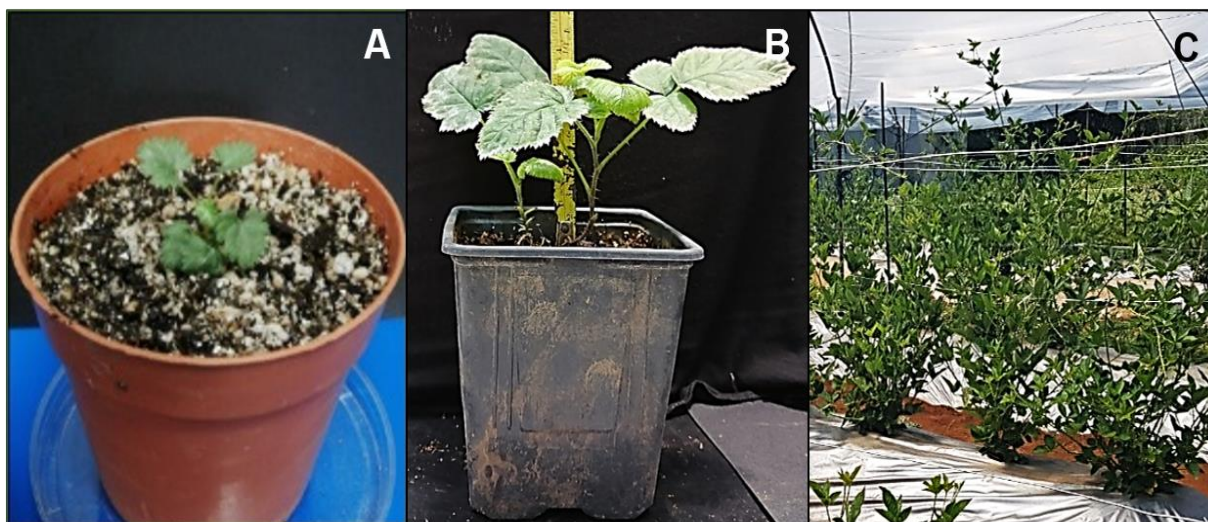


Figura 10. Plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) durante la fase de aclimatación (A) y cultivadas por 90 días en invernadero (B) y en macrotúnel en campo (C).

b) Establecimiento y cultivo en macrotúnel

Posterior al establecimiento de las plantas en invernadero, estas fueron llevadas a cultivo en una huerta comercial bajo condiciones de macrotúnel en el Municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, Carretera Uruapan-Taretan, cerca de la comunidad de Patuan (Figura 10C). Las plantas se mantuvieron en un clima semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano (53.07%). En el campo se llevó a cabo la medición de los descriptores morfoanatómicos establecidos por la UPOV en cinco plantas diferentes de cada una de las líneas mutantes, así como del control (Cuadro 4).

Ensayos de resistencia a *B. cinerea*

Se realizaron ensayos de resistencia a *B. cinerea*, utilizando el método de hoja cortada en agar-agua (0.8% agar) de plantas cultivadas tanto en invernadero y campo, de cada una de las líneas mutantes y del control. Los ensayos en hojas de plantas cultivadas en invernadero se realizaron con la inoculación de una solución de esporas (1×10^3) de acuerdo a lo establecido por Huerta-Olalde *et al.* (2022) (Capítulo 1) (Figura 11A). Mientras que, para los ensayos realizados en hojas de plantas cultivadas en campo, la inoculación se realizó utilizando un disco de micelio de 0.5 cm de diámetro en etapa de esporulación, el cual fue colocado en la parte central de la hoja (Figura 11B).

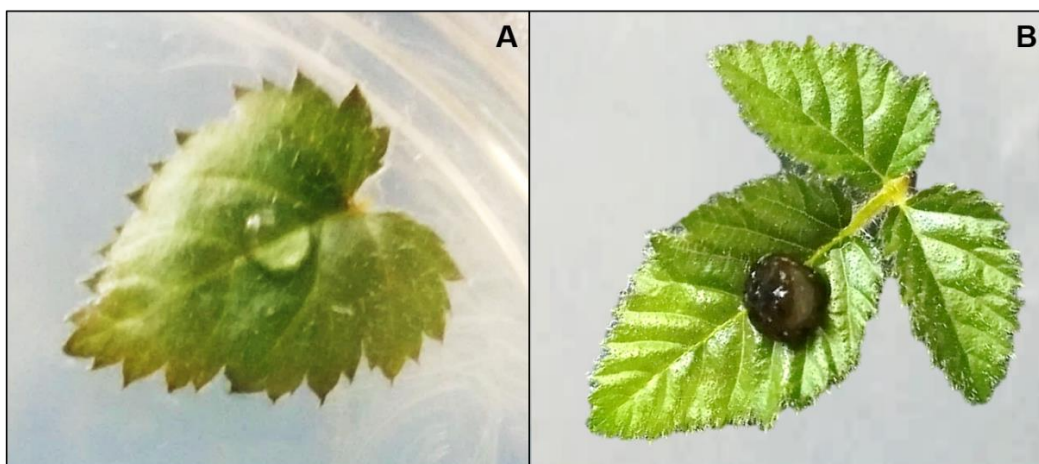


Figura 11. Hojas de zarzamora cultivadas *in vitro* en PDA, inoculadas con esporas (A) y con disco de micelio de *Botrytis cinerea*.

Evaluación del índice de severidad (IS)

Los síntomas de la enfermedad ocasionados por *B. cinerea* se evaluaron utilizando la escala establecida por Huerta-Olalde *et al.* (2022), la cual comprende índice de severidad (SI) en la escala de 1 a 6 donde: SV1, sin síntomas de enfermedad; SV2, 20% lamina foliar necrosada; SV3, 30% lamina foliar necrosada; SV4, 40% lamina foliar necrosada; SV5, 50% lamina foliar necrosada; y SV6, +60% lamina foliar necrosada.

7.2. Cap. 2. Caracterización de la diversidad morfoanatómica y ensayos de resistencia en plantas mutantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) resistentes a *Botrytis cinerea*.

Cuadro 4. Matriz de las variables morfoanatómicas evaluadas en líneas mutantes y no mutantes de *Rubus fruticosus* Cv. Tupy, de acuerdo a lo establecido por la UPOV.

DESCRPTORES MORFOANTÓMICOS		control	rfgum5	rfgum6	rfgum17
PLANTA ^A	Altura de la planta (m)	3.34	1.8	3.51	3.7
	Número hojas	15.04	21.12	28.19	35.1
	Porte	Erecto/semierecto	Rastrero	Erecto/semierecto	Erecto/semierecto
HOJA ^C	Número predominante de folíolos	5	5	5	5
	Tipo	Palmada	Palmada	Palmada	Palmada
	Intensidad del color verde del haz	Oscuro	Medio	Oscuro	Oscuro
	Brillo del haz	Débil	Débil	Débil	Débil
	Tamaño de las estípulas	Grande	Medio	Grande	Grande
RAMA LATENTE ^A	Longitud (m)	4.5	1.64	5.3	5
	Pigmentación por antocianinas	Ausente	Ausente	Ausente	Fuerte
	Número de ramas	10	21	24	22
	Distribución predominante de las ramas	Solo en el tercio superior	Solo en el tercio superior	Solo en el tercio superior	Solo en el tercio superior
	Sección transversal	Redondeada	Redondeada a angular	Redondeada	Redondeada
	Espinas	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes
	Tamaño de la espina (cm)	2.8	2.1	3.5	4.1
ESPINAS ^A	Postura del ápice en relación con la rama	Hacia abajo	Hacia abajo	Hacia abajo	Hacia abajo
	Longitud	Media	Pequeña	Media	Media
FOLIOLO ^C	Anchura	Media	Media	Media	Media
	Lobulado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	Forma en sección transversal	En forma de V	En forma de V	En forma de V	En forma de V
	Ondulación del borde	Ausente o muy débil	Ausente o muy débil	Ausente o muy débil	Ausente o muy débil
	Abullonado entre las venas	Fuerte	Medio	Muy fuerte	Muy fuerte
	Tipo de incisión del margen	Biserrada	Biserrada	Biserrada	Biserrada
	Profundidad de las incisiones	Muy profunda	profunda	Muy profunda	Muy profunda
	Pigmentación por antocianinas	Ausente	Ausente	Ausente	Fuerte
	Intensidad del color verde	Medio	Medio	Oscuro	Oscuro
BROTE JOVEN ^B	Densidad de la pilosidad glandular	Alta	Baja	Alta	Alta
	Color del pétalo	Rosáceo	Blanco con trazas violeta	Blanca	Blanca
	Fructificación lateral	Larga	Corta	Larga	Muy larga
FLORES ^C	Longitud (cm)	5.8	6.3	6	8.4
	Número de flores	7	9	7	13
	Forma de los pétalos	Poco alargados	Redondos	Poco alargados	Alargados
	Longitud (cm)	1.76	1.99	2.02	1.2
	Anchura	1.60	1.70	1.63	1.47
FRUTOS ^D	Relación entre longitud/anchura	Pequeña	Mediana	Grande	Mediana
	Número de drupas	Medio	Muy alto	Muy alto	Bajo
	Tamaño de la drupa	Medio	Grande	Grande	Muy pequeño
	Forma en sección longitudinal	Oval media	Oblonga	Oval media	Amorfos
	Color	Negro rojizo	Negro rojizo	Negro rojizo	Negro rojizo
	Peso (g)	3.49	4.82	4.73	2.45
	Grados Brix	10.45	14.23	14.14	7.46

A, Latencia invernal; B, Crecimiento rápido y antes de la floración; C, Floración; F, Fructificación.

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), utilizando la prueba de diferenciación de medias de TUKEY ($p < 0.05$), analizando una $n=30$ (programa estadístico JMP 8).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfoanatómica

a) Altura y número de hojas en plantas cultivadas en invernadero

El análisis del comportamiento promedio de las variables cuantitativas evaluadas durante esta etapa de desarrollo de las plantas en estudio, mostró que a los 90 días de cultivo en invernadero no se observaron cambios en la altura y en el número de hojas de las líneas mutantes *rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*, respecto al presentado por las plantas control.

Sin embargo, 180 días después de su establecimiento, se observaron cambios significativos entre las plantas de cada una de las líneas mutantes y del control, tanto en la altura como en el número de hojas. Las plantas de la línea mutante *rfgum17* presentaron la mayor altura (31.14 cm) y el mayor número de hojas/planta (35.1), seguidas de las plantas de la línea mutante *rfgum6* con 26.43 cm de altura y 28.19 hojas/planta, presentándose la menor altura y número de hojas en las plantas de la línea mutante *rfgum5* (20.84 cm, 21.12 hojas/planta) y en las plantas control (13.21 cm, 15.04 hojas/planta) (Figuras 12A y 12B).

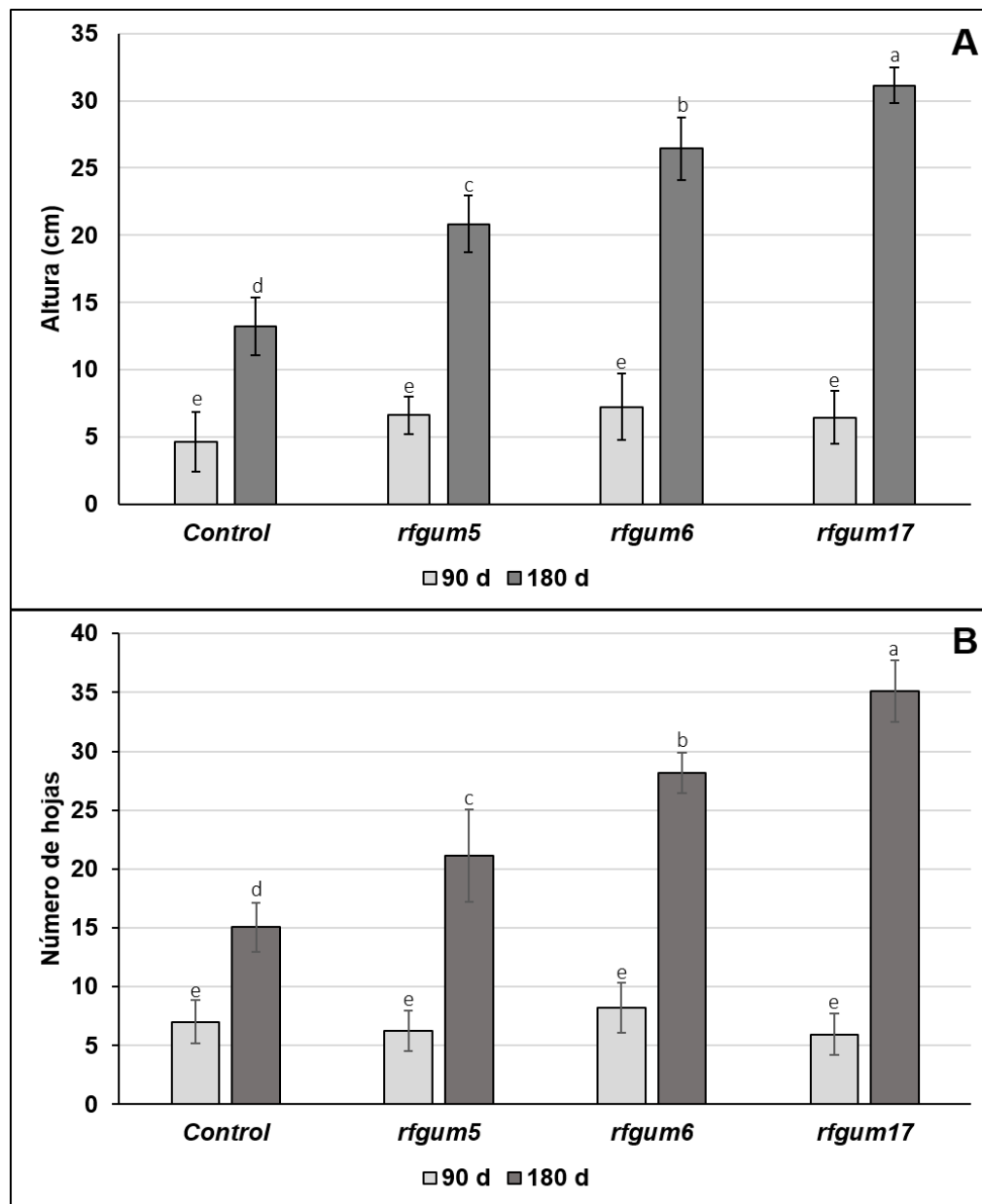


Figura 12. Variables de altura (A) y número de hojas (B) en plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy), determinadas a los 90 días y 180 días en cada una de las líneas mutantes (*rfum5*, *rfum6* y *rfum17*) y de plantas control. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$, $n = 30$).

b) Altura en plantas cultivadas en macrotúnel

En las plantas de las tres líneas mutantes y de las plantas control, establecidas en campo bajo el cultivo en macrotúnel, se determinó solamente la altura de estas, no observando diferencias significativas a los 90 días, en las plantas control y de la línea *rfgum5* con una altura de 158 y 135 cm, respectivamente. A este tiempo, las plantas de las líneas *rfgum6* y *rfgum17*, mostraron alturas mayores de 174 y de 184 cm, respectivamente. A los 180 días, las plantas con mayor crecimiento fueron las de la línea mutante *rfgum17* (548 cm) con diferencia significativa respecto a las plantas de las otras líneas y de las plantas control. La altura de las plantas de la línea mutante *rfgum6* fueron estadísticamente iguales a la de las plantas control, con 351 y 334 cm, respectivamente. Sin embargo, las plantas de la línea mutante *rfgum5*, mostraron el menor tamaño con 180 cm de altura (Figura 13).

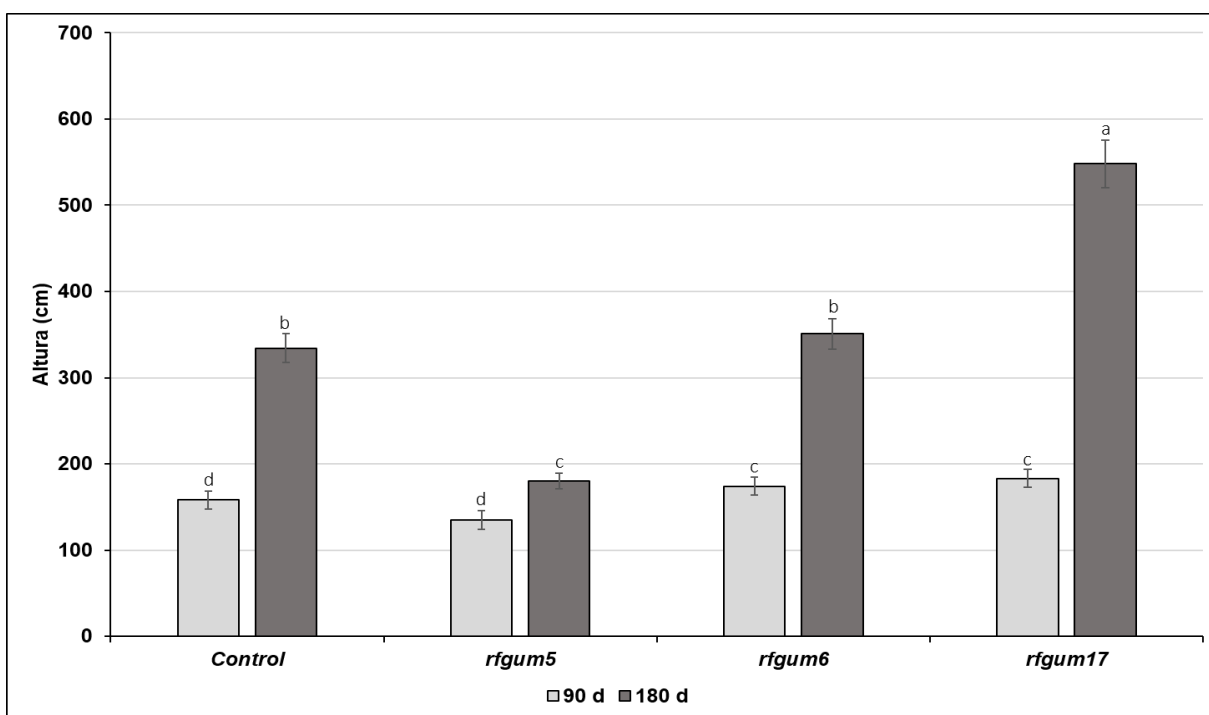


Figura 13. Altura de las plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) cultivadas en campo (macrotúnel), determinada a los 90 días y 180 días en cada una de las líneas mutantes (*rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*) y de plantas control. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$, $n = 30$).

Estos resultados muestran que existen cambios en cuanto al crecimiento y el desarrollo de las plantas de las líneas mutantes en comparación al control, particularmente en las líneas mutantes *rfgum17* y *rfgum5*, las que presentaron la mayor y menor altura, respecto a las plantas control, tanto durante el cultivo en invernadero (Figura 12) como en campo (Figura 13).

A los 180 días del cultivo en macrotúnel se observó que el crecimiento de la línea mutante *rfgum6* fue similar al presentado por las plantas control, indicativo de que las plantas de estas líneas, no mostraron cambios significativos debido a la radiación gamma. En la figura 14, se muestra la diferencia en el crecimiento de las plantas cultivadas en campo bajo el sistema de macrotúnel, a los 90 días del cultivo, en donde se aprecia la diferencia del crecimiento de las plantas mutantes respecto al de plantas control, con excepción al presentado por la línea mutante *rfgum5*.

Esta disminución en la altura de las plantas mutantes de la línea *rfgum5* y el aumento en las de la línea *rfgum17*, es un efecto relacionado con la radiación ionizante gamma, que se ha reportado en diferentes especies vegetales como en plantas de crisantemo (*Dendrathera grandiflora*), en las que se detectó una mutante con plantas de baja altura, por presentar entrenudos muy cortos, el cual redujo su crecimiento de 100 cm a 18.41 cm (Castillo-Martínez *et al.*, 2015).

Así mismo, esto se ha observado en plantas mutadas con rayos gamma de comino negro (*Nigella sativa*), en las que la altura de las plantas disminuyó de 54.86 a 36.84 cm (Kumar y Gupta, 2007) y en plantas de tomatillo (*Physalis peruviana*), en las que se observó esta disminución de la altura de las plantas (de 2.2 a 1.8 cm (Estrada-Basaldúa *et al.*, 2011)).



Figura 14. Crecimiento de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) a los 90 días del cultivo en campo (macrotúnel) de cada una de las líneas mutantes y del control: A, Control; B, *rfgum5*; C, *rfgum6*; D, *rfgum17*.

Álvarez *et al.* (2000) reportaron en plantas de banana del cultivar ‘Dominico Hartón’ (AAB), diferencias en la altura de las plantas, las cuales clasificó según su tamaño: altas (3.66 m) (24.2%), medianas (3.23 m) (54.5%) y bajas (2.65 m) (21.2%). La altura de la planta es uno de los caracteres altamente evaluados en especies vegetales irradiadas, los resultados de la presente investigación demuestran que esta varía entre cada una de las líneas mutantes y el control, en congruencia con lo reportado por Ángeles-Espino (2013), quién observó en un estudio con irradiación *in vitro* de plántulas de *Agave tequilana* var. Azul, que las radiaciones tuvieron un efecto directo en el desarrollo de las plántulas obtenidas. También, Gómez *et al.* (2017), evaluaron las características morfológicas de plantas mutantes de trigo (*Triticum aestivum*), las cuales mostraron una reducción en el tamaño de la espiga.

c) Variabilidad de los cambios morfoanatómicos en plantas cultivadas en macrotúnel

La evaluación del resto de los descriptores morfoanatómicos permitió examinar la variabilidad existente entre cada una de las líneas mutantes y de las plantas control, con lo que se identificaron las diferencias fenotípicas relacionadas con el fruto, las

flores y las partes vegetativas. A pesar de la variabilidad morfológica detectada, se observó que en todas las plantas evaluadas predominaron hojas palmadas compuestas por cinco folíolos de color verde con margen biserrado. Sin embargo, la lámina foliar de la línea mutante *rfgum5* exhibió un color verde claro por el haz y con un abullonado entre las venas poco marcado, este carácter alterado ha sido descrito en plantas mutantes de sorgo (*Sorghum bicolor*) (Xin et al., 2008). Por otra parte, la sección transversal de la rama latente presentó una forma angular, diferente a la forma redondeada que presentaron el resto de las mutantes, de igual manera, el tamaño de las espinas de esta línea mutante presentó diferencias significativas (0.21 cm) con respecto al resto de las líneas mutantes evaluadas (Figura 15). Las plantas de las líneas mutantes *rfgum6* y *rfgum17* no mostraron diferencias significativas con respecto a las plantas control en este descriptor.

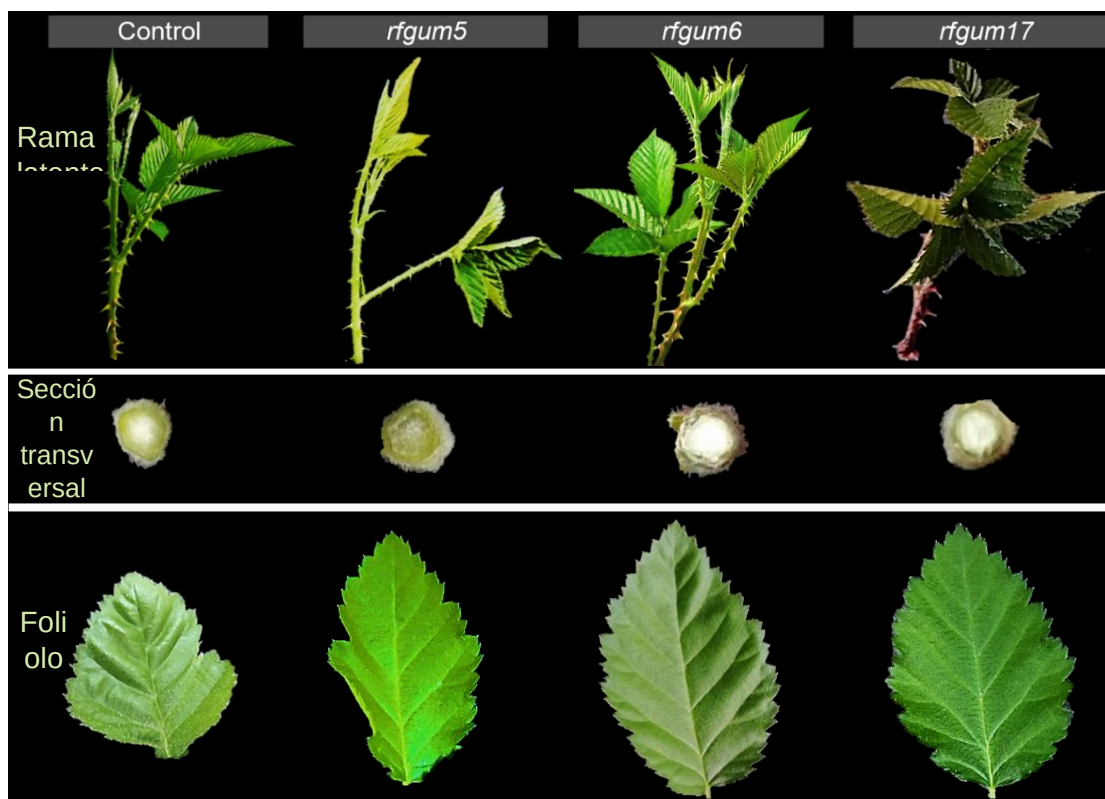


Figura 15. Descriptores de rama latente, sección transversal del tallo y folíolos de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy), cultivadas por 180 días en macrotúnel de las líneas mutantes *rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*, así como del control.

Los descriptores que permitieron discriminar fácilmente las plantas de cada una de las líneas mutantes y del control, fueron aquellos evaluados durante la floración y la fructificación, ya que, durante la etapa de floración, se observaron alteraciones respecto a la morfología de la flor. Las plantas control presentaron en promedio 7 flores/racimo, compuestas de 5 pétalos, de color rosáceo de 5.8 cm de longitud, siendo estas las flores las más pequeñas evaluadas, pero que son características típicas de la especie (Rzedowski *et al.*, 2005). Por su parte, las flores de la línea mutante *rfgum6* presentaron 7 flores/racimo, blancas de 6 cm de longitud, compuestas por 7-9 pétalos poco alargados, resultados similares presentados por las plantas de la línea mutante *rfgum5*, la cual presentó 9 flores/racimo, blancas con trazas violetas de 6.3 cm de longitud, compuestas por 6-9 pétalos poco ovalados. Es importante mencionar que a pesar de que el 80% de las plantas de la línea mutante *rfgum5* presentaron muy baja altura, el 20% restante no presentó diferencias significativas con respecto al control (Figura 16).

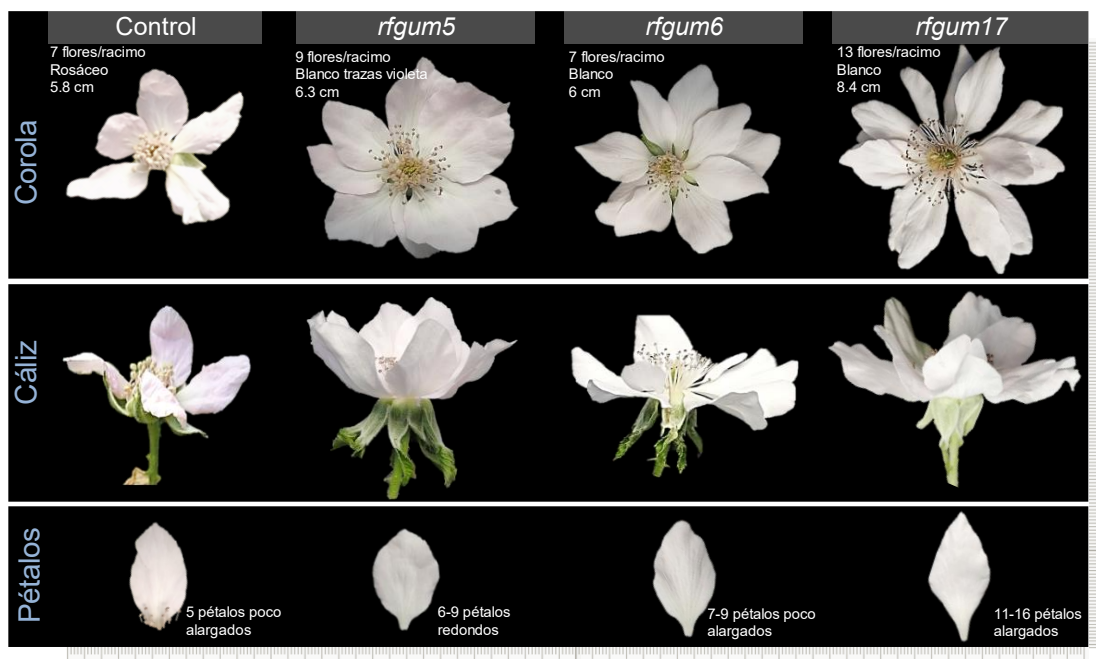


Figura 16. Descriptores de corola, cáliz y pétalos en flores de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy), cultivadas por 180 días en macrotúnel de las líneas mutantes *rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*, así como de las plantas control.

Por su parte, las plantas de la línea mutante *rfgum17*, mostraron diferencias significativas en estos descriptores, ya que mostraron hasta 13 flores/racimo, de color blanco de 8.4 cm de longitud, las cuales estaban compuestas por 11-16 pétalos alargados, presentando las flores de mayor tamaño (Figura 16).

Este tipo de alteraciones han sido observadas también en otras especies que han sido mutagenizadas por distintos métodos (Jambhulkar, 2007). Rubio *et al.* (2014), observaron diferencias fenotípicas importantes en algunas líneas mutantes seleccionadas, en las que el tamaño de la planta y la forma del racimo floral se vieron marcadamente afectados. Cambios en el tamaño, número y color de las flores, han sido reportados en diversas especies vegetales, mayormente en estudios con plantas ornamentales, como en híbridos de *Torenia* (Sawangmee *et al.*, 2011), *Zinnia elegans* (Pallavi *et al.*, 2017) y *Tulipa gesneriana* (Li *et al.*, 2022), aunque también en plantas como *Curcuma heyneana* (Hapsari *et al.*, 2021).

Los descriptores evaluados durante la fructificación mostraron que las plantas de las líneas mutantes *rfgum5* y *rfgum6* presentaron los frutos de mayor tamaño con 2.02 cm de longitud/1.77 cm ancho, un peso de 4.82 g y 14.23 °Brix (°Bx), y 2.02 cm longitud/1.66 cm ancho, un peso 4.63 g, y 14.14 °Bx, respectivamente. Estos valores son superiores a los obtenidos de los frutos de las plantas control (1.80 cm longitud/ 1.61 cm ancho, un peso de 3.49 g y 10.45 °Bx). En cuanto a la forma del fruto, la mutante *rfgum6* y el control presentaron frutos de forma oval media, mientras que la mutante *rfgum5* presentó frutos de forma oblonga, en todos los casos, el color respectivo de los frutos fue negro-rojizo, no así en los frutos de la mutante *rfgum17*, en la cual se observaron fisiopatías en un 90% de los frutos producidos por esta mutante, el 10% restante lo conformaron frutos bien desarrollados negro-rojizos pero de menor tamaño (1.22 cm longitud/1.48 cm ancho, un peso de 2.45 g y 7.46 °Bx) (Figura 17).

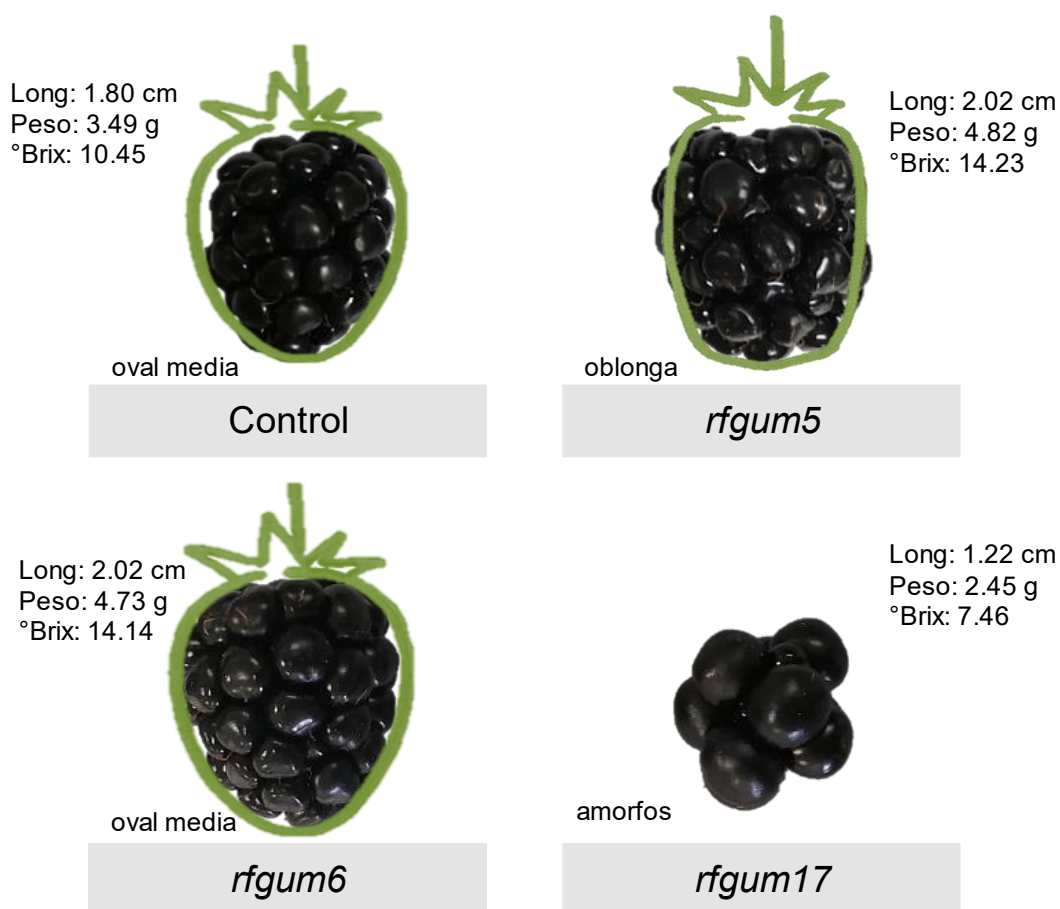


Figura 17. Descriptores de longitud (Long.), peso, forma y grados Brix (°Brix) en frutos de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy), cultivadas por 180 días en macrotúnel de las líneas mutantes *rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*, así como de las plantas control.

Los resultados de variabilidad morfoanatómica obtenidos en la presente investigación, demuestran que la radiación gamma utilizada para la selección de estas líneas mutantes, afectó significativamente en las plantas irradiadas, la incidencia de las radiaciones puede influir en la producción y/o rendimiento de frutos, ya que la altura y los cambios observados tanto en flores como en frutos marcaron la diferencia entre las plantas mutantes de zarzamora. Las plantas de la línea mutante *rfgum6* son las que presentaron un mínimo de cambios, con un crecimiento y descriptores similares a los de las plantas control. Atendiendo a los resultados obtenidos, durante la caracterización morfoanatómica de las líneas

mutantes evaluadas, se apreció cierto grado de diversidad fenotípica en cada una de ellas, lo cual resulta interesante para ser utilizados como posibles parentales en programas de mejoramiento genético de zarzamora.

Ensayos de resistencia a *B. cinerea*

Con los ensayos de resistencia realizados en hojas de plantas control y de las mutantes *rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*, cultivadas en invernadero y en campo, se observó que la resistencia a *B. cinerea*, observada durante los ensayos *in vitro* (Huerta-Olalde *et al.*, 2022) se mantuvo en las plantas de las líneas mutantes *rfgum5* y *rfgum6*, ya que no mostraron ningún síntoma de enfermedad ocasionada por el patógeno, esto comparado con las hojas de las plantas control inoculadas con esporas de *B. Cinerea* (Control+), las cuales desarrollaron necrosis desde las 48 horas posteriores a la inoculación (hpi), mostrando un índice de severidad de 6 (>60% del área foliar necrosada) a los 7 días posteriores a la inoculación (dpi), obteniendo un 100% de la lámina foliar necrosada a los 14 dpi (Figura 18).

Sin embargo, como se observó en los ensayos *in vitro*, la resistencia al hongo no se mantuvo en las plantas de la línea mutante *rfgum17*, ya que al igual que las hojas de las plantas control+ presentaron un índice de severidad de 6, con >60% del área foliar necrosada a los 7dpi.

Estos resultados confirman que las líneas mutantes *rfgum5* y *rfgum6* son resistentes a *B. cinerea*, con un índice de severidad de 1, ya que en estas líneas no se observó necrosis, la presencia de desarrollo de micelio, y, por lo tanto, tampoco de esporulación, lo que si fue observado en las hojas de las plantas control+ y de la línea mutante *rfgum17* (Figura 18, Cuadro 5).

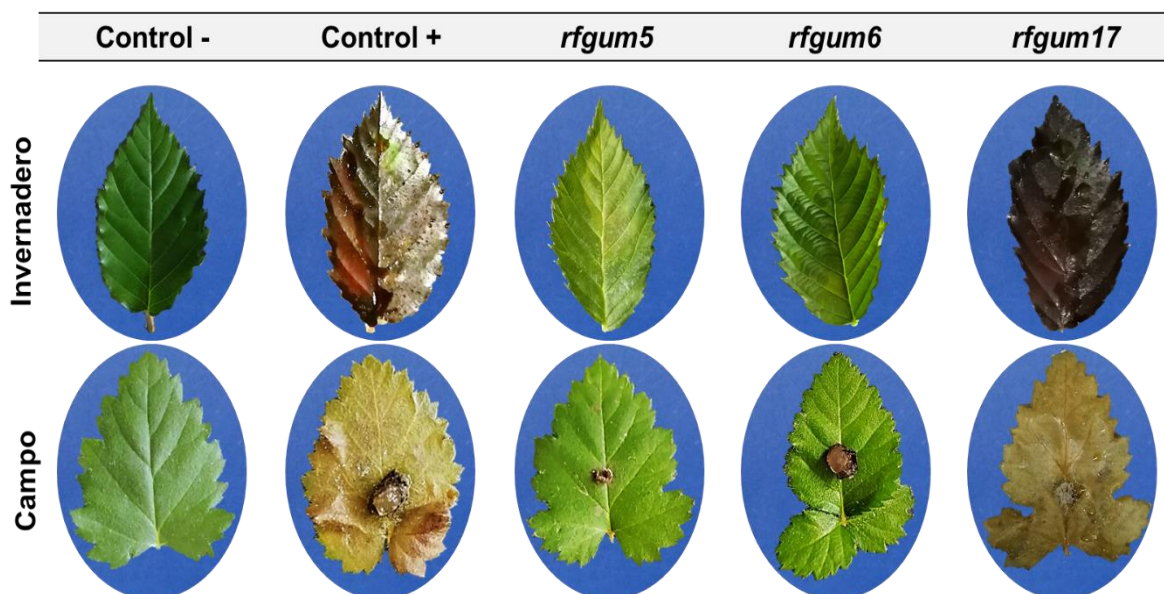


Figura 18. Evaluación del índice de severidad y necrosis en hojas cortadas de plantas de *Rubus fruticosus* 'Tupy' durante el cultivo en invernadero y campo. Control negativo (control-, hojas no inoculadas), control positivo (control+, hojas inoculadas de plantas de brotes no irradiados) y líneas mutantes (*rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*), inoculadas con *Botrytis cinerea* (1×10^3 esporas/mL) a los 14 días posteriores a la inoculación (14 dpi).

Los primeros síntomas típicos de la infección causada *B. cinerea* se observaron a los 3 dpi en hojas de plantas control+, y la infección progresó alcanzando el IS de 6 a los 7 dpi. Las hojas de las líneas mutantes *rfgum5* y *rfgum6* no exhibieron síntomas de enfermedad en ninguno de los periodos de tiempo analizados, sin embargo, las hojas de plantas de la línea mutante *rfgum17* presentaron síntomas de enfermedad a partir de los 3 dpi (Cuadro 5). Estos resultados obtenidos concuerdan con los ensayos realizados en hojas de plantas cultivadas *in vitro* (Huerta-Olalde *et al.*, 2022), por tanto, las líneas mutantes *rfgum5* y *rfgum6* mantienen la resistencia con un IS de 1, ya que estas líneas no presentaron síntomas de la enfermedad ocasionados por el patógeno. Mientras que, la línea mutante *rfgum17* al presentar un IS de 6 con 60% de hojas necróticas mantuvo su carácter de susceptible. Se observó micelio y esporulación en control+ y *rfgum17* (Cuadro 5, Figura 18).

Cuadro 5. Índice de severidad (IS), porcentaje de necrosis y presencia de micelio y esporulación en hojas desprendidas de plantas control (Control- y control+) y plantas de las líneas mutantes (rfgum5, rfgum6, and rfgum17) inoculadas con *Botrytis cinerea* a los 3, 7 y 14 días post-inoculación (dpi).

Línea	dpi	SI	Necrosis (%)	Micelio/esporulación
Control ⁻ (no inoculadas)	3	1	0	-
	7	1	0	-
	14	1	0	-
Control ⁺ (inoculadas)	3	3	30	+
	7	6	60	+
	14	6	100	+
rfgum5	3	1	0	-
	7	1	0	-
	14	1	0	-
rfgum6	3	1	0	-
	7	1	0	-
	14	1	0	-
rfgum17	3	1	10	+
	7	4	40	+
	14	6	60	+

En plantas de valor agronómico irradiadas en cultivos *in vitro*, se confirmó la selección de genotipos con resistencia a hongos, la cual se mantuvo estable al realizar las pruebas de resistencia tanto al cultivarse en condiciones de invernadero como en campo. En plantas mutantes de cardamomo (*Elettaria cardamomum*), crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) y palma (*Phoenix dactylifera*), se confirmó la resistencia a los hongos, *Fusarium oxysporum* y *Septoria obesa*, aún en su progenie (Zuñiga *et al.*, 2010; Jain, 2012; Kumar *et al.*, 2012). En la presente investigación, es necesario realizar pruebas de patogenicidad con al menos dos

generaciones más de plantas de zarzamora Cv. Tupy (*rfgum6*), cultivadas por un ciclo completo en campo para asegurar la estabilidad de la resistencia.

Los resultados presentados en esta investigación muestran que la combinación de la mutagénesis por radiación gamma y la biotecnología, utilizando la selección de mutantes resistentes a *B. cinerea* en condiciones *in vitro*, es un ejemplo para la generación de genotipos de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupy), que muestren resistencia a este hongo, ya que al menos una de las líneas mutantes, la *rfgum6*, presentó estabilidad de la resistencia durante su cultivo en campo.

CONCLUSIONES

Por el efecto de la radiación gamma en los brotes cultivados *in vitro* de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy), se confirmó la presencia de cambios en algunos de los descriptores morfoanatómicos, principalmente en las plantas de las líneas mutantes *rfgum5* y *rfgum17*, respecto a las de la planta control (no irradiada).

Las plantas de la línea mutante *rfgum6* presentó el menor número de cambios morfoanatómicos, mostrando un óptimo desarrollo y crecimiento, en comparación al presentado por las plantas de las líneas mutantes *rfgum5* y *rfgum17*, además de presentar la mayor similitud con las plantas control (no irradiadas), con la mayor producción de frutos, con un mayor peso y mayor contenido de azúcares (°Bx).

Las plantas mutantes de la línea *rfgum6* mantuvieron la resistencia a *B. cinerea* tanto durante el cultivo en invernadero como en campo. Aunque esta resistencia también fue observada en las plantas mutantes de la línea *rfgum5*, estas presentaron un mayor número de cambios morfoanatómicos.

REFERENCIAS

- Álvarez HF, Cuartas MH, Aristizábal LM (2000) Crecimiento y desarrollo del plátano 'Domingo Harton' (*Musa* AAB, Simmonds) sometido a radiación con Co₆₀. *Fitotecnica* 35:1-4 <https://www.musalit.org/seeMore.php?id=9351>
- Ángeles-Espino A, Valencia-Botín AJ, Virgen-Calleros G, Ramírez-Serrano C, Paredes-Gutiérrez L, Hurtado De la Peña S (2013) Determinación de la dosis letal (DL₅₀) con Co₆₀ en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul. *Revista Fitotecnica Mexicana* 36(4):381-386 http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000400003&lng=es&tlng=es.
- Begum T, Dasgupta T (2014) Induced genetic variability, heritability and genetic advance in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Sabao Journal of Breeding and Genetics* 46(1):21-33 ISSN 1029-7073
- Caro-Melgarejo DP, Estupinán-Rincón SY, Rache-Cardenal LY, Pacheco-Maldonado JC (2012) Efecto de rayos gamma sobre yemas vegetativas de *Physalis peruviana* L. *Acta Agronomica* 61(4):305-314 doi: 305-314 2323-0118 0120-2812
- Castillo-Martínez CR, De la Cruz-Torrez E, Carrillo-Castañeda G, Avendaño-Arrazate CH (2015) Inducción de mutaciones en crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) usando radiación gamma y etil metano sulfonato. *Agroproductividad* 8(2):60-64 <http://132.248.9.34/hevila/Agroproductividad/2015/vol8/no2/9.pdf>
- Corrales-Lerma R, Avendaño-Arrazate CH, Morales-Nieto CR, Santellano-Estrada E, Villarreal-Guerrero F, Melgoza-Castillo A, Álvarez-Holguín A, Gómez-Simuta Y (2019) Radiación gamma para inducción de mutagénesis en pasto rosado [*Melinis repens* (Willd.) Zizka]. *Acta Universitaria* 29:1-10 <http://doi.org/10.15174.au.2019.1847>
- De Carvalho T, Thomsen MR, Clark JR (2010) Commercial fresh blackberry shipping market growth and price trends in the United States. *Small Fruit News* 10(2):8-10
- Estrada-Basaldúa, JA, Pedraza-Santos ME, De la Cruz-Torres E, Martínez-Palacios A, Sáenz-Romero C, Morales-García JL (2011) Efecto de rayos gamma Co₆₀ en nardo (*Polianthes tuberosa* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:445-458 http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200709342011000900004&lng=es&tlng=es

7.2. Cap. 2. Caracterización de la diversidad morfoanatómica y ensayos de resistencia en plantas
mutantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) resistentes a *Botrytis cinerea*.

- Gómez E, Aguilar MT, Mamani N, Mamani H.R, Guzmán B (2017) Evaluación morfológica de las generaciones M1 y M2 de *Triticum aestivum* L. (Trigo) provenientes de semilla irradiada con Co₆₀ y su efecto sobre la absorción de nutrientes y minerales. *Revista Boliviana de Química* 34(1):1-8 http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602017000100001&lng=es&tlng=es
- Hapsari L, Trimanto T, Isnaini Y, Widiarsih S (2021) Morphological characterization and gamma irradiation effect on plant growth of *Curcuma heyneana* Val & Zijp. *AIP Conference Proceedings* 2353, 030012 <https://doi.org/10.1063/5.0052680>
- Hernández-Villarreal AE (2013) Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Revista Bio Ciencias* 2(3):113-118. ISSN: 2007-3380. <http://revistabiociencias.uan.edu.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/view/41/39>
- Huerta-Olalde AM, Hernández-García A, López-Gómez R, Fernández-Pavía S, Zavala-Páramo MG, Salgado-Garciglia R (2022) *In vitro* selection of blackberry (*Rubus fruticosus* 'Tupy') plants resistant to *Botrytis cinerea* using gamma ray-irradiated shoot tips. *Plant Biotechnology*, 37:1-7 https://www.jstage.jst.go.jp/article/plantbiotechnology/39/2/39_22.0312b/article
- Jambhulkar SJ (2007) Mutagenesis: Generation and Evaluation of Induced Mutations. 417-434. En: Surinder Kumar Gupta (eds.). *Advances in Botanical Research: Rapeseed Breeding*, 45. Stratford Books, United Kingdom
- Kim JH, Ryu TH, Lee SS, Lee S, Chung BY (2019) Ionizing radiation manifesting DNA damage response in plants: An overview of DNA damage signaling and repair mechanisms in plants. *Plant Science: an international journal of experimental plant biology* 278:44-53 <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.10.013>
- Kumar G, Gupta P (2007) Mutagenic efficiency of lower doses of gamma rays in black cumin (*Nigella sativa* L.). *Cytologia* 72(4):435-440 <https://doi.org/10.1508/cytologia.72.435>
- Lagoda PJL (2012) Effects of radiation on living cells and plants. In *Plant mutations and Biotechnology* (Q. Y. Shu, B. P. Forster and H. Nakagawa, eds). Joint FAO/IAEA Division of nuclear Techniques in Food and Agriculture International Atomic Energy Agency, Vienna, 123-134 <http://dx.doi.org/10.1079/9781780640853.0123>
- Li Y, Chen L, Zhan X, Liu L, Feng F, Guo Z, Wang D, Chen H (2022) Biological effects of gamma-ray radiation on tulip (*Tulipa gesneriana* L.). *PeerJ* 10:e12792 <https://doi.org/10.7717/peerj.12792>
-

7.2. Cap. 2. Caracterización de la diversidad morfoanatómica y ensayos de resistencia en plantas
mutantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) resistentes a *Botrytis cinerea*.

- Little JB (2006) Cellular radiation effects and the bystander response. *Mutation Research* 597(1-2):113–118 <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.12.001>
- Mamani N, Mamani HR, Gómez E, Aguilar MT, Guzmán B (2017) Evaluación morfológica de las generaciones M1 y M2 de *Triticum aestivum* L. (Trigo) provenientes de semilla irradiada con Co₆₀ y su efecto sobre la absorción de nutrientes y minerales. *Revista Boliviana de Química* 34(1):1-8 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426351311001>
- Martínez-Valdivieso D, Gómez P, Vicente-Dólera N, Rubira F, Moya M, Del Río Celestino M (2012) Obtención y caracterización de mutantes morfológicos en calabacín (*Cucurbita pepo* spp. pepo). *Actas de Horticultura* 60. [http://www.sech.info/ACTAS/Acta%20n%C2%BA%2060.%20XIII%20Congreso%20Nacional%20de%20Ciencias%20Hort%C3%ADcolas/Mejora%20Gen%C3%A9tica%20Vegetal/Obtenci%C3%B3n%20y%20caracterizaci%C3%B3n%20de%20mutantes%20morfol%C3%B3gicos%20en%20calabac%C3%ADn%20\(Cucurbita%20pepo%20spp.%20pepo\).pdf](http://www.sech.info/ACTAS/Acta%20n%C2%BA%2060.%20XIII%20Congreso%20Nacional%20de%20Ciencias%20Hort%C3%ADcolas/Mejora%20Gen%C3%A9tica%20Vegetal/Obtenci%C3%B3n%20y%20caracterizaci%C3%B3n%20de%20mutantes%20morfol%C3%B3gicos%20en%20calabac%C3%ADn%20(Cucurbita%20pepo%20spp.%20pepo).pdf).
- Otahola-Gómez V, Aray M, Antoima Y (2001) Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemos (*Dendranthema grandiflora* (Ram.) Tzvelev) mediante radiaciones gamma. *Revista Científica UDO Agrícola* 1(1):56-63 https://www.researchgate.net/publication/28141043_Induccion_de_mutantes_para_el_color_de_la_flor_en_crisantemos_Dendranthema_grandiflora_Ram_Tzvelev_medianteradiaciones_gamma
- Pallavi B, Nivas SK, D'Souza L, Ganapathi TR, Hegde S (2017) Gamma rays induced variations in seed germination, growth and phenotypic characteristics of *Zinnia elegans* var. Dreamland. *Advances in Horticultural Science* 31(4):267–274 <https://www.jstor.org/stable/26525405>
- Rebollar-Alviter A (2011) Manejo del mildiú y el moho gris de la zarzamora en Michoacán. 1ª. Ed., Universidad Autónoma Chapingo, 1ª. Ed.34 https://www.researchgate.net/publication/237064956_Manejo_del_Mildiu_y_el_Moho_gris_de_la_Zarzamora
- Rubio J, Montes C, Castro Á, Álvarez C, Olmedo B, Muñoz M, Tapia E, Reyes F, Ortega M, Sánchez E, Miccono M, Dalla Costa L, Martinelli L, Malnoy M, Prieto H (2015) Genetically engineered Thompson Seedless grapevine plants designed for fungal tolerance: selection and characterization of the best performing individuals in a field trial. *Transgenic Research* 24:43–60 <https://doi.org/10.1007/s11248-014-9811-2>
- Rzedowski GC. de, J. Rzedowski (2005). Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. (Edición digital: INECOL 2010)

7.2. Cap. 2. Caracterización de la diversidad morfoanatómica y ensayos de resistencia en plantas
mutantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) resistentes a *Botrytis cinerea*.

Sawangmee W, Taychasinpitak T, Jompuk P, Kikuchi S (2011) Effects of gamma-ray irradiation in plant morphology of interspecific hybrids between *Torenia fournieri* and *Torenia baillonii*. *Kasetsart J. Nature Science* 45:803-810 <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/anres/article/view/245363>

Shao X, Wang H, Xu F, Cheng S (2013) Effects and possible mechanisms of tea tree oil vapor treatment on the main disease in postharvest strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 77:94-101 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925521412002645?via%3Dihub>

SIAP (2019) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.

Singh R, Sharma RR, Goyal RK (2007) Interactive effects of planting time and mulching of Chandler strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae* 111:344-351 [10.1016/j.scienta.2006.11.002](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.11.002)

Xin Z, Wang ML, Barkley NA, Burow G, Franks C, Pederson G, Burke J (2008) Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population. *BMC Plant Biology* 8:103 <https://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-8-103>

8. DISCUSIÓN GENERAL

Uno de los principales logros del mejoramiento genético, es la mejora de la resistencia a patógenos, una de las técnicas biotecnológicas más efectivas para lograr este objetivo es el uso de técnicas mutagénicas, las cuales inducen cambios heredables en la constitución genética de una célula mediante la alteración de su ácido desoxirribonucleico (ADN) (Ortiz y Swennen, 2014). Específicamente, la inducción de mutaciones con rayos gamma en tejidos vegetativos *in vitro*, ha permitido la selección de especies de interés agrícola resistentes a diversos hongos fitopatógenos (Chen *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Saraswathi *et al.*, 2016).

El mejoramiento *in vitro* por este procedimiento, requiere de las técnicas de cultivos *in vitro* de plantas, con las que pueden utilizarse diferentes sistemas como el cultivo de protoplastos, células en suspensión, callos y explantes (segmentos de plantas), a partir de los cuales, se establecen los sistemas de regeneración (Predieri y Zimmerman, 2001). Establecer un protocolo efectivo de micropropagación es necesario para conseguir la generación de líneas mutantes y a partir de estas, regenerar y propagar masivamente plantas mutantes con características específicas, en particular, aquellas con resistencia a hongos fitopatógenos (Jain, 2010).

Otra herramienta que involucra el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para la selección de plantas mutantes resistentes a hongos, es el empleo de filtrados estériles del hongo contra el cual se seleccionará la resistencia de las plantas (Patiño-Torres *et al.*, 2007). Este método utilizado para la selección ha sido empleado con éxito para la obtención de plantas resistentes a hongos de importancia comercial (Mahlanza *et al.* 2013; Gupta y Acharya, 2018). Ejemplo de esto, es la obtención de plantas mutantes de tomate de árbol (*Solanum betacea*), de diferentes cultivares de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) (Sowik *et al.*, 2008) y de cardamomo (*Elettaria cardamomum*) (Zúñiga *et al.*, 2010), resistentes a hongos

como *Colletotrichum acutatum*, *Verticillium dahliae* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente.

Debido a la importancia de generar genotipos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) resistentes a *Botrytis cinerea*, uno de los agentes patógenos que causan enormes pérdidas en la producción de frutos en este cultivo, tanto en campo como poscosecha (Rebollar-Alviter, 2011), en la presente investigación se irradiaron brotes regenerados *in vitro* de zarzamora Cv. Tupy con rayos gamma, se seleccionaron plántulas micropropagadas provenientes de brotes irradiados en filtrado estéril de *B. cinerea*, para mediante bioensayos *in vitro*, probar la resistencia en aquellas líneas mutantes seleccionadas. Posteriormente las líneas mutantes seleccionadas como resistentes fueron caracterizadas agromorfológicamente bajo condiciones de invernadero y campo.

8.1. OBTENCIÓN DE MUTANTES DE *R. fruticosus* CV. TUPY

Con el establecimiento *in vitro* de yemas axilares y apicales de plantas de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupy), se logró la multiplicación de brotes y la regeneración de plántulas a partir de éstos, consiguiendo su micropropagación hasta el cultivo de plántulas en invernadero. El éxito de la multiplicación de brotes y la micropropagación de plántulas de zarzamora Cv. Tupy, fue esencial para la obtención de plantas mutantes, ya que, al irradiar brotes con rayos gamma, los sobrevivientes pudieron llevarse a la formación de plántulas, consideradas éstas como líneas mutantes.

La combinación del cultivo de tejidos vegetales con el método de mutagénesis inducida, son la mejor opción para obtener plantas mutantes en relativo corto tiempo y con efectividad. El cultivo *in vitro* de plantas ha sido utilizado para la selección de diversas especies vegetales mutantes resistentes no solo a hongos, sino también a otras características tales como salinidad, altas y bajas temperaturas y sequía, o

bien para producir modificaciones en la producción y/o calidad de los frutos (Patiño-Torres, 2010; Salgado-Garciglia, 2013).

Los brotes obtenidos a partir su establecimiento *in vitro* fueron utilizados para la generación de mutantes, sometiéndolos a radiación gamma, con el objetivo de seleccionar mutantes resistentes a *B. cinerea*. Se estableció como la DL₅₀, la intensidad de 30.8 Gy, con esta dosis se seleccionaron 96 diferentes plántulas regeneradas de brotes irradiados, las cuales presentaron características de crecimiento y desarrollo similar al de las plántulas no irradiadas (Sección 7.1).

La DL₅₀ fue determinante para obtener un 50% de brotes supervivientes, los que potencialmente tuvieron cambios a nivel genético por lo que son considerados mutantes, ya que la radiación absorbida provoca cambios en el ADN y origina mutaciones, mismas que causan alteraciones fenotípicas y/o genotípicas en las plántulas (García-Velasco *et al.*, 2021). Estas mutaciones causadas por las radiaciones gamma ocurren al azar en el genoma de la planta, aunque algunas de ellas pueden dar lugar a la aparición de características interesantes que no pueden encontrarse en la naturaleza o que se han perdido durante la evolución (Amri-Tiliouine *et al.*, 2018).).

8.2. SELECCIÓN DE MUTANTES EN FILTRADO ESTÉRIL DE *B. cinerea*

Los resultados obtenidos con el cultivo de plántulas de zarzamora Cv. Tupy regeneradas de brotes con radiación gamma, en el medio de cultivo con la CL₅₀ del filtrado estéril de *B. cinerea* (4.6 g/L) (Sección 7.1), son comparables con lo reportado por Borrás *et al.* (2001) quienes determinaron que existe una relación entre el crecimiento sobre el filtrado de hongo y la resistencia observada en bioensayos *in vitro*.

De las 96 líneas mutantes crecidas en la CL₅₀ del filtrado estéril de *B. cinerea*, se obtuvieron diez líneas que mostraron un porcentaje de supervivencia >50% (*rfgum2*,

rfgum5, *rfgum6*, *rfgum9*, *rfgum14*, *rfgum17*, *rfgum24*, *rfgum27*, *rfgum28*, y *rfgum32*), observando en ellas un óptimo crecimiento comparado al de las plantas control (no irradiadas) y con la ausencia o un mínimo de síntomas de la enfermedad. Aunque no hay evidencias de los mecanismos exactos que ejerce el filtrado estéril de *B. cinerea* sobre las plantas mutantes para ser seleccionadas como resistentes. Patiño *et al.* (2007) demostraron que los filtrados estériles se utilizan durante la selección de genotipos resistentes, debido a que contienen un arsenal de compuestos fitotóxicos como el “botrydial” y sus derivados, así como el ácido oxálico.

La producción *in vitro* de fitotoxinas en medios de cultivos ha sido reportada para diferentes especies de hongos (Van den Bulk, 1991; Abang *et al.*, 2009) y la importancia de los extractos fúngicos de sus cultivos está siendo ampliamente estudiada, ya que se ha demostrado que en estos se encuentran diferentes compuestos que producen síntomas en las plantas (Jayasankar *et al.*, 1999).

El empleo de fitotoxinas de patógenos como agentes de selección *in vitro* es una de las técnicas que se utiliza para obtener variantes somaclonales o mutantes resistentes a una enfermedad, teniendo como premisa fundamental que la resistencia debe manifestarse a nivel *in vitro* (García *et al.*, 2004). Además de las fitotoxinas como el botrydial y la fusarina, se sabe que algunas enzimas de los filtrados estériles de hongos (amilasa, celulasa y proteinasa), pueden actuar sobre los componentes estructurales de la pared celular de los vegetales o iniciando respuesta de defensa, respectivamente (Theerthagiri *et al.*, 2008). Las fitotoxinas tienen dos propiedades importantes, son activas a muy bajas concentraciones y son móviles dentro de la planta y por lo tanto pueden actuar a distancia del sitio de infección (Švânová *et al.*, 2005).

8.3. SELECCIÓN DE PLANTAS DE *R. fruticosus* CV. TUPY RESISTENTES A *B. cinerea*

Mediante los bioensayos *in vitro* de resistencia a *B. cinerea* realizados con hojas y plántulas provenientes de brotes irradiados con rayos gamma, y seleccionadas

como resistentes al filtrado estéril de *B. cinerea*, los resultados mostraron que al inocular esporas en hojas o plántulas control, en éstas se observó una rápida infección (desde los tres días) ya que se manifestaron los síntomas de la enfermedad como necrosis en el sitio de la inoculación, necrosis en los bordes de hojas y partes del tallo en plántulas, así como la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio (Sección 7.1). Sin embargo, la respuesta de resistencia a *B. cinerea* en al menos tres líneas mutantes fue directamente relacionada con lo observado en el proceso de la selección con el filtrado estéril del hongo, resultando signos de resistencia al ataque del patógeno, al realizarse bioensayos *in vitro* tanto en hoja como en plántula. Las líneas mutantes *rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17* fueron seleccionadas como resistentes a *B. cinerea*, éstas mostraron un crecimiento similar a las plantas no irradiadas y ausencia o un mínimo de síntomas de la enfermedad.

Lo anterior se ha reportado para diferentes plantas de interés agronómico, un ejemplo de ello es la selección de plantas mutantes de banano, obtenidas con radiación gamma, que en bioensayos de evaluación temprana *in vitro* mostraron resistencia a la enfermedad Sigatoka negra de la que el agente causal es el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Cuando estos fueron inoculados en campo con el patógeno se confirmó la resistencia (García *et al.*, 2004). Con los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación hacia la obtención de plantas de zarzamora Cv. Tupy resistentes a *B. cinerea*, las líneas mutantes *rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17* fueron sometidas a evaluación en cultivo en invernadero y campo, con la finalidad de confirmar la resistencia y descartar cambios morfoanatómicos no deseables.

8.4. CARACTERIZACIÓN MORFOANATÓMICA DE PLANTAS DE *R. fruticosus* CV. TUPY RESISTENTES A *B. cinerea*

La caracterización morfoanatómica de especies es la determinación de un conjunto de caracteres mediante el uso de descriptores definidos que permiten diferenciar las nuevas características, algunas de ellas pueden ser altamente heredables, fácilmente observables y expresables en la misma forma en cualquier ambiente

(Hernández-Villareal *et al.*, 2012). Las comparaciones morfoanatómicas o verificaciones de identidad deberán ser con plantas de la misma línea y durante el crecimiento y desarrollo, deben recibir los mismos tratamientos, para anular algún efecto medio ambiental. Es decir, todas crecen y se desarrollan bajo las mismas condiciones para ser caracterizadas. Por lo tanto, la caracterización es el primer paso en el mejoramiento de los cultivos y programas de conservación.

La caracterización morfoanatómica en invernadero y en campo de las plantas mutantes de zarzamora Cv. Tupy resistentes a *B. cinerea* se realizó en las tres líneas mutantes seleccionadas previamente (*rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*). Los resultados obtenidos durante el establecimiento en invernadero mostraron que, si hubo cambios significativos entre cada una de las líneas mutantes con respecto al control, sobre todo durante el crecimiento rápido de las plantas. Las plantas de la línea mutante *rfgum17* presentaron la mayor altura (31.14 cm) y el mayor número de hojas/planta (35.1), seguidas de las plantas de la línea mutante *rfgum6* con 26.43 cm de altura y 28.19 hojas/planta, y presentándose la menor altura y número de hojas en las plantas de la línea mutante *rfgum5* (20.84 cm, 21.12 hojas/planta) y en las plantas control (13.21 cm, 15.04 hojas/planta) (Sección 7.2).

La disminución de la altura de las plantas sometidas a radiación gamma, es uno de los efectos ocasionados por la incidencia de la radiación y ha sido reportada por diversos autores en diferentes especies vegetales, tales como crisantemo (*Dendrathera grandiflora*) (Castillo-Martínez *et al.*, 2015), comino negro (*Nigella sativa*), (Kumar y Gupta, 2007), tomatillo (*Physalis peruviana*) (Estrada-Basaldúa *et al.*, 2011), banano Cv. 'Dominico Hartón' (AAB) (Álvarez *et al.*, 2000) y *Agave tequilana* var. Azul (Ángeles-Espino 2013). Siendo este uno de los caracteres altamente evaluados y de mayor importancia en el mejoramiento de especies vegetales. Los resultados obtenidos durante el establecimiento de las plantas en macro túnel, confirmaron las diferencias que existen entre cada una de las líneas mutantes y el control, particularmente en las líneas mutantes *rfgum17* y *rfgum5*, que presentaron la mayor y menor altura, respecto a las plantas control, tanto durante el

cultivo en invernadero como en campo, mientras que en la mutante *rfgum6* se observó que el crecimiento fue similar al presentado por las plantas control, indicativo de que las plantas de estas líneas, no mostraron cambios significativos debido a la radiación gamma en cuanto a la variable evaluada.

8.5. VARIABILIDAD DE LOS CAMBIOS MORFOANATÓMICOS EN PLANTAS CULTIVADAS EN MACROTÚNEL

La evaluación de los descriptores morfoanatómicos evaluados durante la etapa de latencia invernal y crecimiento rápido y antes de la floración, mostraron que las plantas de las mutantes *rfgum6* y *rfgum17* no mostraron diferencias en variables como tipo de crecimiento, color y brillo de hojas, tamaño de estípulas, número y tamaño de espinas, forma de la rama latente y margen de los folíolos, respecto a las plantas control, mientras que la línea mutante *rfgum5*, presentó el mayor número de cambios morfoanatómicos.

En lo que respecta a las características de la flor, las plantas control presentaron el menor número de flores por racimo (7) y las flores de menor tamaño (5.8 cm), las cuales estaban compuestas por 5 pétalos, en contraste con las flores de las plantas de la línea mutante *rfgum17*, que presentaron el mayor número de flores por racimo (13) y de mayor tamaño (8.4 cm) compuestas por 13 pétalos. En tanto que la mutante *rfgum6* produjo flores con una mayor similitud al control.

En la etapa de fructificación, los frutos obtenidos revelaron que las plantas de las mutantes *rfgum5* y *rfgum6* exhibieron la mayor producción de estos, presentando los frutos de mayor tamaño 2.02 cm de long. /1.77 cm ancho, con un peso de 4.82 g y 2.02 cm long. /1.66 cm ancho con un peso 4.63 g, respectivamente. Estos valores son superiores a los obtenidos de los frutos de las plantas control (1.80 cm long. por 1.61 cm ancho con un peso de 3.49 g). En cuanto a la forma del fruto, la mutante *rfgum6* y el control presentaron frutos de forma oval media, mientras que la mutante *rfgum5* presentó frutos de forma oblonga, en todos los casos, el color respectivo de los frutos fue negro-rojizo, no así en los frutos de la mutante *rfgum17*,

en la cual se observaron fisiopatías en un 90% de los frutos producidos por esta mutante, el 10% restante lo conformaron frutos bien desarrollados negro-rojizos pero de menor tamaño (1.22 cm long./1.48 cm ancho con un peso de 2.45 g).

8.6. ENSAYOS DE RESISTENCIA A *B. cinerea*

Los ejemplares con mutaciones presentan características mejoradas y una de estas características es la resistencia a enfermedades (Corrales *et al.*, 2019). Se realizaron ensayos de resistencia a *B. cinerea*, en cada una de las líneas mutantes una vez establecidas en invernadero y en campo, con la finalidad de confirmar la resistencia observada durante los ensayos realizados *in vitro*. Los resultados obtenidos confirmaron la resistencia al hongo en al menos 2 líneas mutantes, las líneas mutantes *rfgum5* y *rfgum6* mantuvieron la resistencia al patógeno ya que estas no presentaron síntomas de la enfermedad en ninguna de las evaluaciones realizadas, sin embargo, la línea mutante *rfgum17* no mantuvieron la resistencia, ya que al igual que las hojas de las plantas control presentaron >60% del área foliar necrosada a los 7dpi. Estos resultados confirman la efectividad del filtrado estéril del hongo como un agente de selección exitoso para los programas de selección de especies vegetales resistentes a patógenos.

La gran diversidad de materiales genéticos encontrados durante esta investigación nos permite hacer una correcta discriminación a nivel morfoanatómico de los materiales estudiados. La respuesta de la resistencia de las mutantes obtenidas, nos permiten tener un acercamiento sobre los posibles mecanismos implicados en la resistencia adquirida.

Si bien este es el primer reporte en el que se estudia la interacción de zarzamora con *B. cinerea*, se han descrito modelos en otras especies vegetales pertenecientes al grupo de los llamados frutos rojos, tales como uva y fresa, en donde se ha demostrado que la resistencia adquirida en fenotipos mutantes obtenidos por diferentes metodologías parece estar relacionada con las barreras mecánicas,

como la cutícula y el contenido de cera (Rubio *et al.*, 2014), así como la activación de vías metabólicas mediadas por la activación de hormonas vegetales como jasmonato y etileno (Verhagen *et al.*, 2011), factores de transcripción (TF), biosíntesis de camalexina y la deposición de callosa (Denancé *et al.*, 2013).

Se ha observado que, durante la infección, *B. cinerea* penetra en la cutícula de la hoja huésped al secretar enzimas líticas y fitotoxinas en la planta huésped (van Kan, 2006). En consecuencia, las plantas acumulan especies reactivas de oxígeno (ROS) en la membrana plasmática de las células huésped para desencadenar un estallido oxidativo que conduce a la muerte celular (Tenberge *et al.*, 2002). *Botrytis cinerea* rompe las células epidérmicas secretando numerosas enzimas que degradan la pared celular (CWDE) tales como, pectinasas, celulasas, hemicelulasas, proteasas y lacasas (Nafisi *et al.*, 2014). También secreta una diversidad de metabolitos fitotóxicos no específicos, que contribuyen a la muerte celular, entre ellos, el más conocido es el sesquiterpeno botrydial y sus derivados (Colmenares *et al.*, 2002), así como el ácido botcínico y sus derivados de botcinina (Tani *et al.*, 2006). El botrydial se produce durante la infección de la planta e induce clorosis y colapso celular (Deighton *et al.*, 2001), mientras que el ácido botcínico y sus derivados, inducen clorosis y necrosis (Cutler *et al.*, 1996).

Por su parte, las plantas tienen varias estrategias de defensa contra la infección por *B. cinerea*. Los patrones moleculares asociados a microbios derivados de patógenos (MAMP) y los patrones moleculares asociados a daños en el huésped (DAMP) activan la señalización inmunitaria protectora en las plantas (Newman *et al.*, 2013). Los receptores de reconocimiento de patrones innatos (PRR) de las plantas se unen a los MAMP/DAMPs patógenos y sirven como señales de alerta temprana en el sistema inmunitario. Tras la infección con *B. cinerea*, la quitina (un MAMP) es reconocida por los receptores de la membrana plasmática del huésped, que transducen una señal a cascadas dependientes y/o independientes de MAPK (Miya *et al.*, 2007; Faulkner *et al.*, 2013). Además, MPK4 activa WRKY33 (TF) y

fosforila el complejo MPK4-WRKY33-MKS1, regulando positivamente los genes implicados en la biosíntesis de camalexina.

Las MAPK son importantes para activar genes inducibles por oligogalacturónidos (OG), los que son liberados por la pared celular de la planta después de la infección por *B. cinerea*, funcionan como DAMP y contribuyen a la defensa de la planta contra este patógeno (Ferrari *et al.*, 2013). Por su parte, las proteínas inhibidoras de la poligalacturonasa (PGIP) también limitan las actividades de las endopoligalacturonasas (endo-PG) (De Lorenzo *et al.*, 2011). Se ha observado en plantas transgénicas de arabidopsis, fresa y uva que sobreexpresan genes que codifican PGIP, mostraron una reducción en los síntomas de la enfermedad a *B. cinerea*.

En los últimos años se han realizado análisis genómicos, datos transcripcionales y análisis de redes proteína-proteína para el análisis comparativo de las respuestas de defensa de las plantas ante el ataque de *B. cinerea* (Sham *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2016). Las tecnologías ómicas modernas proporcionan herramientas poderosas para predecir factores genéticos, funciones de genes y evolución, así como interacciones entre ambos organismos (Morrel *et al.*, 2011).

9. CONCLUSIONES GENERALES

La resistencia a *B. cinerea* en plantas de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupy), se logró por el método de radiación gamma en ápices de brotes cultivados *in vitro*, utilizando el filtrado de cultivo estéril de *B. cinerea*, con el que se seleccionaron tres líneas mutantes (*rfgum5*, *rfgum6* y *rfgum17*)..

Las plantas mutantes de las líneas *rfgum5* y *rfgum17*, presentaron el mayor número de cambios morfoanatómicos respecto a las plantas no irradiadas y a las plantas mutantes de la línea *rfgum6*.

Las plantas de la línea mutante *rfgum6* son resistentes a *B. cinerea* y estas no mostraron cambios morfoanatómicos, de crecimiento y desarrollo, y en la producción de frutos, así como en la calidad de estos.

10. PERSPECTIVAS

Debido a que las pruebas de resistencia a *B. cinerea* se realizaron en el primer ciclo de crecimiento, desarrollo y producción de frutos de las plantas de zarzamora (*rfgum6*), en el cultivo en campo, es necesario realizar estos ensayos al menos por dos ciclos de cultivo más. El resultado de esto, permitirá iniciar los trámites para el registro de esta línea mutante de zarzamora.

Por otra parte, es importante realizar la caracterización molecular de estas mutantes, lo que permitirá conocer los posibles mecanismos responsables de la resistencia adquirida, así como identificar los principales genes involucrados como respuesta de defensa en la interacción planta-patógeno.

11. LITERATURA CITADA GENERAL

- Abang MM, Abraham WR, Asiedu R, Hoffmann P, Wolf G, Winter S (2009) Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.). *Mycological research* 113(Pt 1):130-140 <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.09.004>
- Abbey JA, Percival D, Abbey L, Asiedu SK, Prithiviraj B, Schilder A (2019) Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*) – prospects and challenges. *Biocontrol Science and Technology* 29(3):207-228 [10.1080/09583157.2018.1548574](https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1548574)
- Agrios GN (1988) Plant Pathology. Third edition. Academia Press, Inc. Estados Unidos de America 75
- Ahloowalia B, Maluszynski M, Nichterlein K (2004) Global impact of mutation derived varieties. *Euphytica* 135:187-204 <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000014914.85465.4>
- Ahmed Z, Akhter F, Haque S, Banu H, Rahman M, Faruquzzaman M (2001) Novel Micropropagation System. *OnLine Journal of Biology Sciences* 1(11):1106-1111 <http://www.ansinet.org/fulltext/jbs/jbs1111106-1111.pdf>
- Al-Safadi B, Ayyoubi Z, Jawdat D (2000) The effect of the irradiation on potato microtuber production *in vitro*. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 61:183-187 <https://doi.org/10.1023/A:1006477224536>
- Amri-Tiliouine W, Laouar M, Abdelguerfi A, Jankowicz-Cieslak J, Jankuloski L, Till BJ (2018) Genetic variability induced by gamma rays and preliminary results of low-cost TILLING on M2 generation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Frontiers in Plant Science* 871:1-15 <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01568>
- Ángeles-Espino A, Valencia-Botín AJ, Virgen-Calleros G, Ramírez-Serrano C, Paredes-Gutiérrez L, Hurtado De la Peña S (2013) Determinación de la dosis letal (DL₅₀) con Co₆₀ en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36(4):381-386 http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000400003&lng=es&tlng=es
- Asao H, Nishizawa Y, Arai S, Sato T, Hirai M, Yoshida K, Shinmyo A, Hibi T, 1997. Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca humuli* in transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. *Plant Biotechnology* 14:145-149 https://www.jstage.jst.go.jp/article/plantbiotechnology1997/14/3/14_3_145/pdf-char/ja

- Azofeifa G, Boudard F, Morena M, Cristol J, Pérez AM, Vaillant F, Michel A (2013) Antioxidant and anti-inflammatory in vitro activities of phenolic compounds from tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(24):5798-5804 <https://doi.org/10.1021/jf400781m>
- Barakat MN, El-Sammak H (2011) *In vitro* mutagenesis, plant regeneration and characterization of mutants via rapd analysis in Baby's breath *Gypsophila paniculata* L. *Australian Journal of Crop Science* 5(2):214-222 (PDF) *In vitro* Mutagenesis, Plant Regeneration and Characterization of Mutants Via RAPD Analysis in Baby's Breath'*Gypsophila paniculata* L.' (researchgate.net)
- Barraza PH, Vázquez-Valdivia V (2004). Zarzamora, su cultivo y producción en el trópico mexicano. INIFAP, México. Sitio Web: <https://es.scribd.com/document/132821205/Folleto-Tecnico-2-Zarzamora-Su-Cultivo-y-Produccion-en-El-Tr>
- Bernal-Parra LM (2013) Mejoramiento Genético Vegetal. Bogotá. Contenido didáctico del curso Mejoramiento Genético Vegetal 203025
- Beyaz R, Yildiz M (2017) The use of gamma irradiation in plant mutation breeding. In: Snježana J (ed) *Plant Engineering*. IntechOpen, London, pp 33-46
- Birch PRJ, Avrova AO, Duncan JM, Lyon GD, Toth RL (1999) Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 356– 361 <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.1999.12.4.356>
- Boddy L (2016) Pathogens of autotrophs. The fungi (3rd ed.). London: *Academic Press*, 245-292 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00008-6>
- Camarena-Gutiérrez G, Torre Almaraz R De La (2008) Fitoplasmas: síntomas y características moleculares. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente* 14(2): 81-87 http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-40182008000200002&lng=es&tlng=es.
- Castillo-Martínez CR, De la Cruz-Torrez E, Carrillo-Castañeda G, Avendaño-Arrazate CH (2015) Inducción de mutaciones en crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) usando radiación gamma y etil metano sulfonato. *Agroproductividad* 8(2):60-64 <http://132.248.9.34/hevila/Agroproductividad/2015/vol8/no2/9.pdf>
- Çelik Ö, Atak Ç (2017). Applications of ionizing radiation in mutation breeding. In: Maghraby AM (ed) *New Insights on Gamma Rays*. IntechOpen, London, pp 111-132

- Cervantes L, Báez J, Fernández R (1996) Efectos de radiación gamma en plantas de *Diantus* sp. propagadas por cultivo *in vitro*. *Revista Ciencia y Desarrollo* 2(3):46-54
- Chen YF, Chen W, Huang X, Hu X, Zhao JT, Gong Q, Li XJ, Huang XL (2014) *Fusarium* wilt-resistant lines of Brazil banana (*Musa* spp., AAA) obtained by EMS-induced mutation in a micro-cross-section cultural system. *Plant Pathology* 62(1):112-119 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02620.x>
- Clark RJ, Finn CE (2008). New Trends in Blackberry Breeding. *Acta Horticulturae* 777: 41-49
- Cole L, Dewey FM, Hawes CR (1996) Infection mechanisms of botrytis species: pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycological Research* 100:277-286 [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80154-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80154-7)
- Colmenares AJ, Aleu J, Duran-Patron R, Collado IG, Hernandez-Galan R (2002) The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology* 28:997-1005 10.1023/A:1015209817830
- Corrales-Lerma R, Avendaño-Arrazate CH, Morales-Nieto CR, Santellano-Estrada E, Villarreal-Guerrero F, Melgoza-Castillo A, Álvarez-Holguín A, Gómez-Simuta Y (2019) Radiación gamma para inducción de mutagénesis en pasto rosado [*Melinis repens* (Willd.) Zizka]. *Acta Universitaria* 29:1-10 <http://doi.org/10.15174.au.2019.1847>
- Cuevas RE, Dia VP, Yousef GG, García SP, López MJ, Paredes LO, González de Mejía E, Lila MA (2010) Inhibition of proinflammatory responses and antioxidant capacity of Mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(17): 9542-9548
- Cutler HG, Parker SR, Ross SA, Crumley FG, Schreiner PR (1996) Homobotcinolide: a biologically active natural homolog of botcinolide from *Botrytis cinerea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60:656-658 [10.1271/bbb.60.656](https://doi.org/10.1271/bbb.60.656)
- De Lorenzo G, Brutus A, Savatin DV, Sicilia F, Cervone F (2011) Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). *FEBS letters* 585(11):1521-1528 <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.043>
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Foster GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13(4):414-430 <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

- Deighton N, Muckenschnabel I, Colmenares AJ, Collado IG, Williamson B (2001) Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 57(5):689-692 [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00088-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00088-7)
- Denancé N, Sánchez-Vallet A, Goffner D, Molina A (2013) Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science* 4:155 [10.3389/fpls.2013.00155](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00155)
- Dewey FM, Grant-Downton R (2016) *Botrytis*-biology, detection and quantification. In Y. Elad & S. Fillinger (Eds.), *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Springer 17-034 [10.1007/978-3-319-23371-0_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_2)
- Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (2007) Microbial control of *Botrytis spp.* In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, pathology and control* (pp. 1-8). Dordrecht: Kluwer Academic [10.1007/978-1-4020-2626-3_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_13)
- Elmer PAG, Michailides TJ (2004) Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, pathology and control* (pp. 243-272). Dordrecht: Kluwer Academic [10.1007/978-1-4020-2626-3_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_14)
- Estrada-Basaldúa JA, Pedraza-Santos ME, De la Cruz-Torres E, Martínez-Palacios A, Sáenz-Romero C, Morales-García JL (2011) Efecto de rayos gamma Co⁶⁰ en nardo (*Polianthes tuberosa* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:445-458 http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200709342011000900004&lng=es&tlng=es
- Evenor D, Pressman E (1994) Somaclonal variation in celery and selection by coculturing toward resistance to *Septoria apiicola*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 39(3):203-210 <https://doi.org/10.1007/BF00035971>
- Fan F, Hamada MS, Li N, Li GQ, Luo CX (2017) Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from greenhouse strawberries in Hubei Province, China. *Plant Disease* 101(4):601-606 <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1227-RE>
- Fanizza G, Bisignano V, Pollastro S, Miazzi M, Faretra F (1995) Effects of polysaccharides from *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on *in vitro* culture of table and wine grapes (*Vitis vinifera*). *Vitis* 34:41-44 (PDF) [Effects of polysaccharides from Botryotinia fuckeliana \(Botrytis cinerea\) on in vitro culture of table and wine grapes \(Vitis vinifera\) \(researchgate.net\)](https://www.researchgate.net/publication/234414414)

- FAO (2018) FAO and agricultural biotechnology. ISB News report covering agricultural. Vol. Sept., 1-2. Biotechnology | FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations
- FAO/IAEA (2012) Mutant Variety Database (MVD). [https://www.iaea.org/resources/databases/mutant-varieties-database#:~:text=The%20FAO%2FIAEA%20Mutant%20Variety,and%20Agriculture%20Organization%20\(FAO\).](https://www.iaea.org/resources/databases/mutant-varieties-database#:~:text=The%20FAO%2FIAEA%20Mutant%20Variety,and%20Agriculture%20Organization%20(FAO).)
- FAOSTAT (2020) FAOSTAT Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved 02/08/2020. URL: <http://www.fao.org/faostat/es/#data> (Accessed Dec 20, 2020)
- Farquhar S, Goff NM, Shadbeh N, Samples J, Ventura S, Sanchez V, Davis S (2009) Occupational health and safety status of indigenous and Latino farmworkers in Oregon. *Journal of Agricultural Safety and Health* 15:89-102 [10.13031/2013.25417](https://doi.org/10.13031/2013.25417)
- Faulkner C, Petutschnig E, Benitez-Alfonso Y, Beck M, Robatzek S, Lipka V, Maule AJ (2013) LYM2-dependent chitin perception limits molecular flux via plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(22):9166-9170 <https://doi.org/10.1073/pnas.1203458110>
- Fernando THPS, Jayashinge CK, Wijesundera RLC (2001) Cell wall degrading enzyme secretion by *Colletotrichum acutatum*, the causative fungus of secondary leaf fall of *Hevea brasiliensis*. *Mycological Research* 105(2):195-201 <https://doi.org/10.1017/S0953756200003324>
- Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, Lorenzo GD (2013) Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science* 4:49 <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00049>
- García-Rodríguez L, Bermúdez-Caraballosa I, Orellana-Pérez P, Veitía-Rodríguez N, García-Rodríguez L, Clavero-García J, Romero-Quintana C (2000) Inducción de mutaciones por radiaciones Gamma en el cultivo *in vitro* de brotes del cultivar Gran Enano (AAA). *Biotecnología Vegetal* 1:45-50 [Inducción de mutaciones por radiaciones Gamma en el cultivo in vitro de brotes del cultivar Gran Enano \(AAA\) \(unam.mx\)](https://doi.org/10.1016/S1546-5096(00)00049-9)
- García RL, Herrera L, Clavero J, Bermúdez-Caraballosa I, Veitia N, Acosta-Suárez M (2004) Efecto del filtrado de cultivo de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet sobre yemas adventicias de cultivares de Musa spp. *Biotecnología Vegetal* 4(1) <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/296>

- García-Velasco R, Portal-González N, Santos-Bermúdez R, Rodríguez- García A, Companioni-González B (2021) Mejoramiento genético para la resistencia a marchitez por *Fusarium* en banano. *Revista mexicana de fitopatología* 39(1):122-146 <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2008-2>
- Gupta NS, Acharya K (2018) Fungal toxin as potential tool for *in vitro* selection and regeneration of resistant plants. *Asian Journal of Plant Pathology* 12:38-45
- Gupta NS, Acharya K (2018) Fungal Toxin as Potential Tool for in vitro Selection and Regeneration of Resistant Plants. *Asian Journal of Plant Pathology* 12:38-45 [10.17311/ajppaj.2018.38.45](https://doi.org/10.17311/ajppaj.2018.38.45)
- Hartman GL, McCoy TJ, Knous TR (1984) Selection of Alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Medicaginis*. *Plant Science Letters* 34(1-2):183-194 [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(84\)90141-X](https://doi.org/10.1016/0304-4211(84)90141-X)
- Heath MC (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44:321-334 <https://doi.org/10.1023/A:1026592509060>
- Henriquez MA, Daayf F (2010) Identification and cloning of differentially expressed genes involved in the interaction between potato and *Phytophthora infestans* using a subtractive hybridization and cDNA-AFLP combinational approach. *Journal of Integrative Plant Biology* 52:453-467(2) https://www.researchgate.net/publication/340293382_Rapid_detection_of_potato_late_blight_using_a_loop-mediated_isothermal_amplification_assay
- Hernández-Villarreal AE (2013) Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Revista Bio Ciencias* 2(3):113-118 ISSN:2007-3380. <http://revistabiociencias.uan.edu.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/view/41/39>
- Howell GS (2001) Sustainable grape productivity and the growth–yield relationship: A review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52:165-174 [Sustainable Grape Productivity and the Growth-Yield Relationship: A Review | American Journal of Enology and Viticulture \(ajevonline.org\)](https://ajevonline.org/content/52/3/165)
- INFOAGRO (2002) Plagas de los cultivos. España Disponible en: <http://www.tusplantas.com/jardin/jardines/>
- INTAGRI (2021) Manejo y Producción Forzada del Cultivo de Zarcamora. Recuperado el 22/12/2021 de: <https://www.intagri.com/articulos/frutillas/manejo-y-produccion-forzada-del-cultivo-de-zarcamora> - INTAGRI S.C.
- Jain M (2010) Mutagenesis in crop improvement under the climate change. *Romanian Biotechnological Letters* 15(2): 88-106

- https://www.researchgate.net/publication/228665173_Mutagenesis_in_crop_improvement_under_the_climate_change
- Jain SM (2005) Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82(1):113-123 <https://doi.org/10.1007/s11240-004-7095-6>
- Jain SM (2012) *In vitro* mutagenesis for improving date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24:400-407
- Jayasankar S, Litz RE, Gray DJ, Moon PA (1999) Responses of Embryogenic mango cultures and seedling bioassays to a partially purified phytotoxin produce by a mango leaf of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *In Vitro Cell and Developmental Biology- Plant* 475- 479 <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0071-4>
- Jayasankar S, Litz RE, Gray DJ, Moon PA (1999) Responses of Embryogenic mango cultures and seedling bioassays to a partially purified phytotoxin produce by a mango leaf of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 35(6):475-479 [10.1007/s11627-999-0071-4](https://doi.org/10.1007/s11627-999-0071-4)
- Jiang Z, Dong X, Zhang Z (2016) Network-Based Comparative Analysis of Arabidopsis Immune Responses to *Golovinomyces orontii* and *Botrytis cinerea* Infections. *Scientific reports* 6: e19149 <https://doi.org/10.1038/srep19149>
- Kumar B, Kumar S, Thakur M (2012) *In vitro* Mutation Induction and Selection of Chrysanthemum (*Dendranthemag grandiflorum* Tzelev) Lines with Improved Resistance to *Septoria obesa* Syd. *International Journal of Plant Research* 2(4):103-107 [10.5923/j.plant.20120204.01](https://doi.org/10.5923/j.plant.20120204.01)
- Kumar B, Kumar S, Thakur M (2012) *In vitro* Mutation Induction and Selection of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Tzelev) Lines with Improved Resistance to *Septoria obesa* Syd. *International Journal of Plant Research* 2(4):103-107
- Kumar G, Gupta P (2007) Mutagenic efficiency of lower doses of gamma rays in black cumin (*Nigella sativa* L.). *Cytologia* 72(4):435-440 <https://doi.org/10.1508/cytologia.72.435>
- Lenné JM (1992) *Colletotrichum* disease in legumes. In: *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). CAB International, Wallingford, UK:237-249 [Colletotrichum diseases of legumes. \(cabi.org\)](https://cabi.org/colletotrichum-diseases-of-legumes)
- Leroux P (2004) Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. En: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Elad, Y., Williamson,

- B., Tudzynski, P. y Delen, N. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 195-222 [10.1007/978-1-4020-2626-3_12](#)
- Lestari EG (2012) Combination of somaclonal variation and mutagenesis for crop improvement. *Journal AgroBiogen* 8(1):38-44 [10.21082/jbio.v8n1.2012.p38-44](#)
- Li S, Shen L, Hu P, Liu Q, Zhu X, Qian Q, Wang K, Wang Y (2019) Developing disease-resistant thermosensitive male sterile rice by multiplex gene editing. *Journal of Integrative Plant Biology* 61:1201-1205
- Li WM, Dita M, Wub W, Hua GB, Xie JH, Geb XJ (2015) Resistance sources to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 in banana wild relatives. *Plant Pathology* 64:1061-1067 <https://doi.org/10.1111/ppa.12340>
- Lim TK (2012) *Rubus fruticosus* aggr. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants (pp. 544-554): Springer Netherlands Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants | SpringerLink
- Little R (1971) Mutation Breeding for Disease Resistance. Vienna International Atomic Energy Agency 139-149 <https://www.iaea.org/publications/3009/mutation-breeding-for-disease-resistance>
- Lu G, Zhang X, Zou Y, Zou Q, Xiang X, Cao J (2007) Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88:319-327 <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9189-9>
- Mahlanza T, Rutherford RS, Snyman SJ, Watt MP (2013) *In vitro* generation of somaclonal variant plants of sugarcane for tolerance to *Fusarium sacchari*. *Plant Cell Reports* 32:249-262 <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1359-0>
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(49):19613-19618 <https://doi.org/10.1073/pnas.0705147104>
- Moore JN, Skirvin RM (1990) Blackberry management. In Small Fruit Crop Management. New Jersey, E.U.: Eds G.J. Galleta, D.G. Himelrick. Englewood Cliffs. pp. 214-244
- Morrell P, Buckler E, Ross-Ibarra J (2012) Crop genomics: advances and applications. *Nature Reviews Genetics* 13:85-96 <https://doi.org/10.1038/nrg3097>

- Mudibu J, Nkongolo KKC, Kalonji-Mbuyi A, Kizungu RV (2012) Effect of gamma irradiation on morpho-agronomic characteristics of soybeans (*Glycine max* L.). *American Journal of Plant Sciences* 3: 331–337 [10.4236/ajps.2012.33039](https://doi.org/10.4236/ajps.2012.33039)
- Nafisi M, Stranne M, Zhang L, van Kan JA, Sakuragi Y (2014) The endo-arabinanase BcAra1 is a novel host-specific virulence factor of the necrotic fungal phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* 27(8):781-792 <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-14-0036-R>
- Newman MA, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G (2013) MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science* 4:139 <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00139>
- Nimchuk Z, Eulgem T, Holt IiiBF, Dangl JL (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics* 37(1):579-609 [10.1146/annurev.genet.37.110801.142628](https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.142628)
- Nodarse O, Santana I, China A, Carbó L, Díaz A, Hernández C (1992) Obtención y selección de subclones de caña de azúcar resistentes a la roya a partir de la variedad c127-78 mediante cultivo de tejidos. *Caña de azúcar* 10(2):61-70 [OBTENCION y SELECCION DE SUBCLONES DE CANA DE AZUCAR RESISTENTES A LA ROYA A PARTIR DE LA VARIEDAD C127- 78 MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS \(inia.gob.ve\)](http://www.inia.gob.ve/OBTENCION_y_SELECCION_DE_SUBCLONES_DE_CANA_DE_AZUCAR_RESISTENTES_A_LA_ROYA_A_PARTIR_DE_LA_VARIEDAD_C127-78_MEDIANTE_CULTIVO_DE_TEJIDOS)
- Novak F, Brunner H (1992) Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. *International Atomic Energy Agency Bulletin* 4:25-33 [Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement \(Journal Article\) | ETDEWEB \(osti.gov\)](http://www.iaea.org/publications/abstracts/19920101)
- Ortíz E, Hoyos L (2012) Description of the symptomatology associated with fusariosis and its comparison with other diseases for the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) in the Sumapaz region (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 6(1):110-116 [Description of the symptomatology associated with fusariosis and its comparison with other diseases for the purple passion fruit \(Passiflora edulis Sims.\) in the Sumapaz region \(Colombia\) | Request PDF \(researchgate.net\)](http://www.researchgate.net/publication/266111110)
- Ortiz R, Swennen R (2014) From crossbreeding to biotechnology-facilitated improvement of banana and plantain. *Biotechnology Advances* 32(1):158-169 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.010>
- Oszmianański J, Nowicka P, Teleszko M, Wojdyło A, Cebulak T, Oklejewicz K (2015) Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity in wild blackberry fruits. *International Journal of Molecular Sciences* 16:14540-14553 [10.3390/ijms160714540](https://doi.org/10.3390/ijms160714540)

- Pacheco-Gómez M, López-Meza JE, Salgado-Garciglia R (2000) Obtención de plantas mejoradas mediante la variación somaclonal y el uso de mutágenos. *Revista de divulgación de la Coordinación de Investigación Científica de la UMSNH* 3:15-9
- Paduye-Ruiz J, Ferro-Rodríguez A, Paduye-Ruiz V (2000) Alimentos transgénicos: La Nueva Revolución Verde. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A. 182 ALIMENTOS TRANSGENICOS: LA NUEVA REVOLUCION VERDE | ANTONIO FERRO RODRIGUEZ | Casa del Libro México
- Patiño-Torres C, Hoyos SR, Afanador KL (2007) Selección y regeneración *in vitro* de somaclones de tomate de árbol (*Solanum betacea* cav. Sendt) utilizando filtrados de cultivo de *Colletotrichum acutatum* con actividad pectinasa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 60(2):3923-3937 [https://www.researchgate.net/publication/237026452_SELECCION_Y_REGENERACION in vitro DE SOMACLONES DE TOMATE DE ARBOL Solanum betacea cav Sendt UTILIZANDO FILTRADOS DE CULTIVO DE Colletotrichum acutatum CON ACTIVIDAD PECTINASA.](https://www.researchgate.net/publication/237026452_SELECCION_Y_REGENERACION_in_vitro_DE_SOMACLONES_DE_TOMATE_DE_ARBOL_Solanum_betacea_cav_Sendt_UTILIZANDO_FILTRADOS_DE_CULTIVO_DE_Colletotrichum_acutatum_CON_ACTIVIDAD_PECTINASA)
- Pérez- Marín JC (1991) Como controlar eficazmente la *Botrytis* de la vid. *Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDA)* Cómo controlar eficazmente la botrytis de la vid (doczz.es)
- Phillips DJ, Margosan DA, Mackey BE (1987) Size, nuclear number, and aggressiveness of *Botrytis cinerea* spores produced on media of varied glucose concentrations. *Phytopathology*, 77:1606-1608 [Phyto77n11_1606.pdf \(apsnet.org\)](#)
- Pierik R (1990) Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 301
- Poonam T, Sharma K, Mishra SK (2006) Agro-morphological characterization of diverse germplasm of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *New Bot*, 33, 225–235 [https://www.researchgate.net/publication/304934394_Morphological characterization of lentil Lens culinaris Medik landraces from Castilla Y Leon Spain](https://www.researchgate.net/publication/304934394_Morphological_characterization_of_lentil_Lens_culinaris_Medik_landraces_from_Castilla_Y_Leon_Spain)
- Predieri S, Zimmerman RH (2001) Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma rays and field selection for productivity and fruit traits. *Euphytica* 3:217-227 <https://doi.org/10.1023/A:1026594103277>
- Predieri S, Zimmerman RH (2001) Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma-rays and field selection for productivity and fruit traits. *Euphytica* 117:217 <https://doi.org/10.1023/A:1026594103277>

- Rahman MU, Hanif M, Wan R, Hou X, Ahmad B, Wang X (2018) Screening *Vitis* Genotypes for Responses to *Botrytis cinerea* and Evaluation of Antioxidant Enzymes, Reactive Oxygen Species and Jasmonic Acid in Resistant and Susceptible Hosts. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24(1): 5 <https://doi.org/10.3390/molecules24010005>
- Rebollar-Alviter A (2011) Manejo del mildiú y el moho gris de la zarzamora en Michoacán. 1ª. Ed., Universidad Autónoma Chapingo, 1ª. Ed.34. https://www.researchgate.net/publication/237064956_Manejo_del_Mildiu_y_el_Moho_gris_de_la_Zarzamora
- Rollano-Peñalosa OM, Mollinedo-Portugal P (2017) Análisis bioinformático de ARN-Seq con una perspectiva para Bolivia. *Revista Boliviana de Química* 34(2):50-55 [v34n2_a02.pdf \(scielo.org.bo\)](https://doi.org/10.3390/v34n2_a02.pdf)
- Rossi FR, Romero FM, Ruíz OA, Marina M, Gárriz A (2108) Phenotypic and genotypic characterization of mutant plants in polyamine metabolism genes during pathogenic interactions. *Methods Molecular Biology*, 1694:405-416 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29080183/>
- Rubio J, Montes C, Castro Á, Álvarez C, Olmedo B, Muñoz M, Tapia E, Reyes F, Ortega M, Sánchez E, Miccono M, Dalla Costa L, Martinelli L, Malnoy M, Prieto H (2015) Genetically engineered Thompson Seedless grapevine plants designed for fungal tolerance: selection and characterization of the best performing individuals in a field trial. *Transgenic Research* 24(1):43-60 <https://doi.org/10.1007/s11248-014-9811-2>
- Rupp S, Weber RW, Rieger D, Detzel P, Hahn M (2017) Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. *Frontiers in Microbiology* 7: 2075 [10.3389/fmicb.2016.02075](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02075)
- Rzedowski, G.C. de, J. Rzedowski y colaboradores (2005). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406
- SAGARPA (2016) Exportaciones de berrys rebasan los mil 200 millones de dólares al año: SAGARPA. Comunicado de Prensa. Tiripetío, Mich. www.sagarpa.gob.mx
- SAGARPA (2018) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.sagarpa.gob.mx
- Salgado-Garciglia R (2013) La propagación de plantas *in vitro*, un éxito biotecnológico. Morelia, Mich. México. *Revista Saber Más* 2(10): 21- 24. [LA](https://doi.org/10.3390/v34n2_a02.pdf)

PROPAGACIÓN DE PLANTAS IN VITRO, UN ÉXITO BIOTECNOLÓGICO (umich.mx).

- Sánchez-García P (2009) Nutrición de zarzamora. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas (9) Manual Nutricion Zarzamora | abigail camarena - Academia.edu
- Saraswathi M, Kannan G, Uma S, Thangavelu R, Backiyarani S (2016) Improvement of banana Cv. *Rasthali* (Silk, AAB) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (VCG 0124/5) through induced mutagenesis: Determination of LD₅₀ specific to mutagen, explants, toxins and *in vitro* and *in vivo* screening for *Fusarium* wilt resistance. *Indian Journal of Experimental Biology* 54:345-353 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27319054/>
- Schumacher J, Tudzynski P (2012) Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*. En: Morphogenesis and pathogenicity in fungi. Pérez-Martín, J. y Di Pietro, A. (eds.), Springer, Berlin/Heidelberg, 225-241 10.1007/978-3-642-22916-9_11
- SEDRUA (2020) Michoacán, paraíso agroalimentario. sedrua 2019 - Search (bing.com)
- Shah J, Tsui F, Klessig DF (1997) Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 69–78. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.1997.10.1.69>
- Sham A, Al-Azzawi A, Al-Ameri S, Al-Mahmoud B, Awwad F, Al-Rawashdeh A, Itratni R, AbuQamar S (2014) Transcriptome analysis reveals genes commonly induced by *Botrytis cinerea* infection, cold, drought and oxidative stresses in *Arabidopsis*. *PLoS One* 9(11):e113718 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113718>.
- Sharma A, Rathour R, Plaha P (2010) Induction of fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. pisi) resistance in garden pea using induced mutagenesis and *in vitro* selection techniques. *Euphytica* 173:345-356 <https://doi.org/10.1007/s10681-009-0099-x>
- Shu QY, Forster BP, Nakagawa H (2012) Plant Mutation Breeding and biotechnology. CABI, Wallingford UK, p 608
- SIAP (2020) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Panorama Agroalimentario 2020 (p 142). URL: <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2020/11/Atlas-Agroalimentario-2020.pdf> (Accessed Dec 20, 2020)

- Silva A, Oliveira J, Haddad F, Ferraz F, Nunnes O, Santos S, Pereira M, Freitas P (2013) Identification of passion fruit genotypes resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. *Tropical Plant Pathology* (Brasil) 38(3):236-242 [10.1590/S1982-56762013005000008](https://doi.org/10.1590/S1982-56762013005000008)
- Souza AVD, Rodríguez RJ, Gomes EP, Gomes GP, Vieites RL (2015) Bromatological characterization of blackberry fruits and jellies. *Revista Brasileira de Fruticultura* 37:13-19 [BROMATOLOGICAL CHARACTERIZATION OF BLACKBERRY FRUITS AND JELLIES \(scielo.br\)](https://doi.org/10.1590/0034-73702015000000000)
- Sowik I, Michalczyk L, Wójcik D (2008) A method for *in vitro* testing strawberry susceptibility to verticillium wilt. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 16:111-121 [Microsoft Word - full12 2008.rtf \(inhort.pl\)](https://doi.org/10.15674/JFOPR.2008.16.1.111)
- Švânová L, Lebeda A (2005) *In vitro* selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. *Journal of Phytopathology* 53(1):52-64 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00928.x>
- Tani H, Koshino H, Sakuno E, Cutler HG, Nakajima H. (2006) Botcinins E and F and botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. *Journal of Natural Products* 69, 722-725. [10.1021/np060071x](https://doi.org/10.1021/np060071x)
- Tenberge K, Beckedorf M, Hoppe B, Schouten A, Solf M, Von den Driesch M (2002) In Situ Localization of AOS in Host-Pathogen Interactions. *Microscopy and Microanalysis* 8(S02):250-251 [doi:10.1017/S1431927602100067](https://doi.org/10.1017/S1431927602100067)
- Terakawa T, Takaya N, Horiuchi H, Koike M, Takagi M (1997). A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Report*, 16: 439-443 <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01092762>
- Thatcher LF, Anderson JP, Singh K (2005) Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology* 32(1):1-19 [10.1071/FP04135](https://doi.org/10.1071/FP04135)
- Theerthagiri A, Bhaskaran R, Thiruvengadam R., Gandhi K, Rajesh M, Senthilraja G (2008) Production of cell wall degrading enzymes and toxins by *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternate* causing fruit rot of chillies. *Journal of Plant Protection Research* 48:(4) [10.2478/v10045-008-0053-2](https://doi.org/10.2478/v10045-008-0053-2)
- Tripathi P, Dubey NK, Shukla AK (2008) Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of gray mold of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:39-46 <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9435-2>

- Van den Bulk RW (1991) Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding a review. *Euphytica* 56:269-285 <https://doi.org/10.1007/BF00042373>
- van den Bulk RW (1991) Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding — a review. *Euphytica* 56:269-285 <https://doi.org/10.1007/BF00042373>
- van Kan JA (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11(5):247-253 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.005>
- Van Kan JAL, Van't Klooster JW, Wagemakers CAM, Dees DCT, Van der Vlugt-Bergmans CJB (1997) Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:30- 38 [10.1094/MPMI.1997.10.1.30](https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.1.30)
- Vega AJC, Rivera BR (2001) Los virus: cómplices para descifrar procesos moleculares en las plantas. *Avance y Perspectiva* 20:349-355 (PDF) [Los virus: cómplices para descifrar procesos moleculares en las plantas \(researchgate.net\)](https://www.researchgate.net/publication/312511111)
- Verhagen B, Trotel-Aziz P, Jeandet P, Baillieul F, Aziz A (2011) Improved resistance against *Botrytis cinerea* by grapevine-associated bacteria that induce a prime oxidative burst and phytoalexin production. *Phytopathology* 101(7):768-777 [10.1094/PHYTO-09-10-0242](https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0242)
- Walker AS, Gladieux P, Decognet V, Fermaud M, Confais J, Roudet J, Fournier E (2015) Population structure and temporal maintenance of the multi-host fungal pathogen *Botrytis* BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY 21 cinerea: causes and implications for disease management. *Environmental Microbiology* 17(4): 1261-1274 <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12563>
- Wan R, Hou X, Wang X, Qu J, Singer SD, Wang Y, Wang X (2015) Resistance evaluation of Chinese wild Vitis genotypes against *Botrytis cinerea* and different responses of resistant and susceptible hosts to the infection. *Frontiers in Plant Science* 6: 854 <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00854>
- Wiermer M, Feys B, Parker JE (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology* 8(4):383-389 <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.010>
- Williamson B, Duncan GH, Harrison JG, Harding LA, Elad Y, Zimand G (1995) Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 99:1303-1310 [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81212-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81212-4)

- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JAL (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8:561-580 [10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x)
- Yahaya SM, Fagwalawa LD, Lawan M (2015) Influence of airborne and seed inoculum in the initiation of leaf, stem, and root infection by systemic *Botrytis cinerea* in Lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Pathology and Microbiology* 6:11 [10.4172/2157-7471.1000323](https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000323)
- Yongjian Li, Li Yu (2006) The Study on the pathogenesis and control of Banana vascular wilt. *Chinese Agricultural Science Bulletin* 22(8):515-519 [The Study on the Pathogenesis and Control of Banana Vascular Wilt \(oriprobe.com\)](http://www.oriprobe.com/The_Study_on_the_Pathogenesis_and_Control_of_Banana_Vascular_Wilt.html)
- Zúñiga DS, Hoyos RS, Afanador L (2010) Seedlings of cardamom (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) evaluation by resistance *in vitro* at culture filtrates of *Fusarium oxysporum* Link. *Vitae* 17(2):155-164 (PDF) [Seedlings of cardamom \(*Elettaria cardamomum* \(L.\) Maton\) evaluation by resistance in vitro at culture filtrates of *Fusarium oxysporum* Link \(researchgate.net\)](https://www.researchgate.net/publication/262721070_Seedlings_of_cardamom_Elettaria_cardamomum_L_Maton_evaluation_by_resistance_in_vitro_at_culture_filtrates_of_Fusarium_oxysporum_Link)
- Zúñiga DS, Hoyos RS, Afanador L (2010) Seedlings of cardamom (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) evaluation by resistance *in vitro* at culture filtrates of *Fusarium oxysporum*. *Vitae* 17(2):155-164 https://www.researchgate.net/publication/262721070_Seedlings_of_cardamom_Elettaria_cardamomum_L_Maton_evaluation_by_resistance_in_vitro_at_culture_filtrates_of_Fusarium_oxysporum_Link

