UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

División de Estudios de Posgrado

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

OBTENCIÓN DE PLANTAS MUTANTES POR RADIACIÓN GAMMA DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) TOLERANTES A *Botrytis cinerea*

T E S I S

Que como requisito para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

BIÓL. ANA MARIA HUERTA OLALDE

Director de Tesis:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS
RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Co-Director de Tesis:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS
RODOLFO LÓPEZ GÓMEZ

Morelia, Michoacán, México; Marzo 2017

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Biotecnología Vegetal y Fisiología Molecular de Plantas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, bajo la dirección del Dr. Rafael Salgado Garciglia y del Dr. Rodolfo López Gómez.

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DRA. LILIANA MÁRQUEZ BENAVIDES
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Obtención de plantas mutantes por radiación gamma de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) Tolerantes a *Botrytis cinerea*" presentado por la Biol. Ana Maria Huerta Olalde, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
Morelia, Michoacán, a 07 de marzo de 2017

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Rafael Salgado Garciglia
Director de Tesis

Dr. Rodolfo López Gómez
Co director

Dra. Martha Elena Pedraza Santos

Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores

Dr. Pedro Damián Loeza Lara

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 mí alma mater la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), a la Facultad de Químico Farmacobiología, al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, a los Laboratorios de Biotecnología Vegetal y Fisiología Molecular de Plantas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por todo el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Mi eterna gratitud y sincero agradecimiento al Dr. Rafael Salgado Garciglia por toda su confianza, apoyo y paciencia durante el desarrollo de esta investigación. También a la Biol. Alejandra Hernández García que junto con el Dr. Rafael siempre tuvieron toda la disposición y buena voluntad al momento de requerir de su ayuda.

A mi co-asesor el D.C. Rodolfo López Gómez por su apoyo, orientación, disponibilidad y paciencia.

Además, agradezco a los profesores integrantes de la mesa sinodal: Dra. Martha Elena Pedraza Santos, Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores y al Dr. Pedro Damián Loeza Lara, gracias por sus consejos y buena disposición al ser partícipes en este trabajo.

Agradezco a Dios 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 a su esfuerzo durante todos estos años de estudio hoy termino esta etapa; de igual manera agradezco a mis abuelos: Adelaida, Feliciano y Susana✞ 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.

A mis compañeros del laboratorio: Juan Carlos, Denisse, Mitsy y Rafa Ayala. Muy especialmente quiero agradecer a tres personas que estuvieron conmigo en los momentos más difíciles que afronté al realizar este trabajo: Yoshira López Antonio, que se ha convertido en una gran amiga y con quien además de pasar malos ratos, pasé momentos llenos de logros, a Salvador Miguel Castillo Figueroa quien además de ser mi compañero de laboratorio me brindo su amistad incondicional, y a Pedro Becerra Romero a quien le tocó la parte más complicada, aguantar mis días difíciles y quien pese a eso me alentaba a seguir adelante, a los tres muchas gracias por su apoyo estar en mí vida.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	***i***
ÍNDICE DE FIGURAS	***ii***
RESUMEN	***iv***
ABSTRATC	***v***
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	**1**
2. ANTECEDENTES	**4**
2.1. ZARZAMORA *(Rubus fruticosus* L.*)*	**4**
2.1.1. Características botánicas de la zarzamora	**4**
2.1.2. Cultivo y producción de zarzamora	**5**
2.1.3. Plagas y enfermedades de zarzamora	**6**
2.1.3.1. *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.	**8**
2.2. MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS	**10**
2.2.1. Mejoramiento vegetal *in vitro*	**11**
2.3. MUTAGENESIS *in vitro*	**12**
2.3.1. Radiación ionizante gamma	**14**
2.4. SELECCIÓN *in vitro* DE PLANTAS TOLERANTES A HONGOS	**15**
2.5. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS	**16**
2.5.1. Mecanismos de defensa en plantas tolerantes a hongos	**19**
3. JUSTIFICACIÓN	**21**
4. HIPÓTESIS	**22**
5. OBJETIVOS	**23**
5.1. Objetivo general	**23**
5.2. Objetivos específicos	**23**
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	**24**
7. RESULTADOS	**25**

7.1. MICROPROPAGACIÓN DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) POR EL CULTIVO *in vitro* DE YEMAS APICALES Y AXILARES DE PLANTAS ADULTAS **25**

7.2. ESTABLECIMIENTO DE LA CURVA DE RADIOSENSIBILIDAD A RAYOS GAMMA EN BROTES DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) Y SELECCIÓN DE LA DL_{50} **37**

7.3. BIOENSAYOS DE TOLERANCIA *in vitro* EN PLANTAS MUTANTES DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) SELECCIONADAS CON FILTRADO ESTÉRIL DE *Botrytis cinerea* **50**

8. DISCUSIÓN GENERAL **66**

9. CONCLUCIONES GENERALES **71**

10. PERSPECTIVAS **72**

11. LITERATURA CITADA GENERAL **73**

12. ANEXO I **80**

ÍNDICE DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1.	Ejemplo de plantas mutantes con resistencia a hongos seleccionadas mediantes radiación gamma.	15
Cuadro 2.	Ejemplo de plantas tolerantes a hongos seleccionadas mediante el uso de filtrados de cultivos de hongos.	16
Cuadro 3.	Respuesta en porcentajes de contaminación, necrosis y supervivencia de explantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) durante la fase del establecimiento *in vitro* (28 días de cultivo).	30
Cuadro 4.	Número y longitud de brotes de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi en yemas apicales cultivadas en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.06 mg/L de AIB.	32
Cuadro 5.	Porcentajes de mortalidad de los brotes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) sometidos a las diferentes dosis de radiación gamma Co_{60} a los 28 días después de la irradiación.	42
Cuadro 6.	Número y longitud de brotes de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi en plantas no irradiadas e irradiadas con la DL_{50} cultivadas en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.06 mg/L de AIB, a los 28 días de cultivo.	44
Cuadro 7.	Porcentajes de mortalidad de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) sometidas a las diferentes concentraciones del filtrado estéril de *Botrytis cinerea* a los 28 días de cultivo (n=10).	56
Cuadro 8.	Volúmenes de cada componente de la reacción de PCR (Erlich, 1989).	85
Cuadro 9.	Oligonucleótidos diseñados para los genes relacionados a la resistencia a *Botrytis cinerea*.	87

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Planta de zarzamora *(Rubus fruticosus* L.)*:* Partes de la planta y partes del fruto. Tomada de: https://www.pinterest.com/pin/562035228472475410/.	4
Figura 2.	Síntomas de infección. A) Abundante esporulación en hojas por *Sphaerotheca macularis*. B) Malformación de frutos por *Parenospora sparsa.* C) Frutos momificados por *Botrytis cinerea.* Tomadas de: Revollar- Alviter, 2011.	7
Figura 3.	Ciclo de vida y de infección de *Botrytis cinerea* (Tomado de Agrios, 1988).	9
Figura 4.	Esquema del modelo gene por gene en el mecanismo de defensa de las plantas (Flor, 1971).	18
Figura 5.	Respuesta del desarrollo de brote inicial en yemas apicales y axilares de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi durante la fase de establecimiento *in vitro*, al inicio (A) y a los 28 días del cultivo (B), y en las diferentes etapas de la micropropagación en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.06 mg/L de AIB: C) Desarrollo del brote a los 7 días; D) Brotación múltiple (13 brotes/explante); E) Brote micropropagado en medio para formación de raíces; y F) Plántula a los 60 días del cultivo.	31
Figura 6.	Plantas micropropagadas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) durante las diferentes etapas del cultivo *ex vitro*: A) Cultivo inicial en condiciones de aclimatación; B) Planta aclimatada a los 30 días del trasplante; C) Planta aclimatada a los 90 días del trasplante; D) Plantas bajo cultivo en condiciones de invernadero (>90 días).	33
Figura 7.	Curva de radiosensibilidad del porcentaje de mortalidad de brotes *in vitro* de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) irradiados con rayos gamma Co_{60}, para la determinación de la DL_{50} a los 28 días del cultivo en MSB.	42
Figura 8.	Brotes de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi irradiados con rayos gamma: A) Sin cambios; B) Cloróticos; y C) Necróticos.	43
Figura 9.	Brotes de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi irradiados con rayos gamma: A) Formación de callo; B y C) cambios en la coloración de las hojas; y D y E) Formación de raíces en la parte aérea.	46
Figura 10.	Plantas de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi no tratadas, cultivadas en MS con filtrado estéril de *B. cinerea*: A) Sin cambios; B) Necrosis parcial en borde las hojas; C) Necrosis generalizada en hojas y tallo; y D) Planta muerta con necrosis total.	56
Figura 11.	Hojas de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi de líneas mutantes irradiadas con rayos gamma, seleccionadas en la CL_{50} del filtrado estéril de *Botrytis cinerea*, inoculadas con $1x10^3$ esporas/mL a los tres días del cultivo: A) Hoja de planta control con inóculo; B) Hoja de línea RFGUM22 susceptible con inóculo; C) Hoja de línea tolerante RFGUM16 con inóculo.	59

Figura 12.	Hojas de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi de líneas mutantes irradiadas con rayos gamma, seleccionadas en la CL_{50} del filtrado estéril de *Botrytis cinerea*, inoculadas con $1x10^3$ esporas/mL a los 5 días del cultivo: A) Hoja de planta control sin inóculo; B) Hoja de planta control con inóculo; C) Hoja de línea RFGUM5 con inóculo; D) Hoja de línea RFGUM16 con inóculo; E) Hoja de línea RFGUM17 con inóculo y F) Hoja de línea RFGUM18 con inóculo.	59
Figura 13.	Plántulas de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi mutantes irradiadas con rayos gamma, sometidas a pruebas de tolerancia con inoculación de esporas de *Botrytis cinerea* (10 días de cultivo): A) Planta no irradiada sin inóculo; B) Planta no irradiada con inóculo; C) Línea mutante RFGUM5 tolerante a *B. cinerea* con inóculo; y D) Línea mutante RFGUM22 susceptible a *B. cinerea* con inóculo.	61
Figura 14.	Ácidos nucleicos extraídos de hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) de plantas no tratadas y mutantes, visualizados en gel de agarosa al 1.2 %. La cantidad de muestra aplicada en cada carril fue de 6µL (3µL de buffer de carga Orange 6X y 3µL de ADN y ARN respectivamente). Carril 1A: Marcador molecular de 1Kb, 2, 3, 4 y 5A: ADN de planta no tratada; 1, 2, 3 y 4B: ARN de planta mutante.	85
Figura 15.	Síntesis de cADN extraído de hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), visualizados en gel de agarosa al 1.2 %. La cantidad de muestra aplicada en cada carril fue de 6µL (3µL de buffer de carga Orange 6X y 3µl de cADN).	86
Figura 16.	cADN extraído de hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), visualizados en gel de agarosa al 1.2 %. La cantidad de muestra aplicada en cada carril fue de 6µL (3µL de buffer de carga Orange 6X y 3µL de cADN). Carril 1: cADN de hoja de planta no tratada; 2: cADN de hoja de planta mutante línea RFGUM5 tolerante a *Botrytis cinerea* y 3: cADN de hoja de planta mutante RFGUM22 susceptible a *B. cinerea*.	87
Figura 17.	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % de productos de PCR de la amplificación con oligonucleótidos para el gen *PR5*. La cantidad de muestra aplicada en cada carril fue de 6µL (3µL de buffer de carga Orange 6X y 3µL de muestra). Carril 1: MM 50 pb; 2: control negativo; 3: planta no tratada; 4: planta mutante línea RFGUM5 tolerante a *Botrytis cinerea* y 5: planta mutante RFGUM22 susceptible a *B. cinerea*.	88
Figura 18.	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % de productos de PCR de la amplificación con oligonucleótidos para el gen *CHS*. La cantidad de muestra aplicada en cada carril fue de 6µL (3µL de buffer de carga Orange 6X y 3µL de muestra). Carril 1: MM 1 Kb; 2: control negativo; 3: planta no tratada; 4: planta mutante línea RFGUM5 tolerante a *Botrytis cinerea* y 5: planta mutante RFGUM22 susceptible a *B. cinerea*.	89

RESUMEN

Una alternativa para evitar o bien disminuir el uso de fungicidas sintéticos para el control del hongo *Botrytis cinerea*, agente causal de la podredumbre gris en el cultivo de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), es la selección *in vitro* de líneas mutantes tolerantes a hongos, utilizando el filtrado de hongo estéril como agente de selección. Con este objetivo, se estableció el sistema de micropropagación de zarzamora para obtener mutantes por irradiación gamma de brotes, realizando la selección de plántulas tolerantes en medio de cultivo con filtrado estéril de *B. cinerea* y confirmando la tolerancia a este hongo en bioensayos *in vitro.* Los cultivos *in vitro* de *R. fruticosus* Cv. Tupi se establecieron de yemas apicales y axilares de plantas adultas cultivadas en invernadero en medio Murashige y Skoog (MS) con 1.0 mg/L de benciladenina (BA) y 0.05 mg/L de ácido naftalenacético (ANA), 30 g/L de sacarosa, pH 5.7, 8 g/L de agar y 500 mg/L de ampicilina, siguiendo un método efectivo de asepsia, obteniendo un 70% de supervivencia de los explantes. Posteriormente, yemas apicales de brotes iniciales obtenidos a los 28 días de cultivo, se cultivaron en medio inductor de brotes MSB con 1.0 mg/L de BA y 0.06 mg/L de ácido indolbutírico (AIB), logrando una producción de 13 brotes/explante, de 2 cm de longitud, a los 28 días de cultivo. El enraizado de éstos ocurrió en el mismo medio de cultivo, generando plántulas a los 60 días del cultivo de hasta 4 cm de altura. Todos los cultivos *in vitro* fueron incubados en condiciones de cuarto de cultivo (25 °C, 16 h luz fotoperiodo, 132 $\mu mol/m^2s$). Las plántulas micropropagadas fueron exitosamente aclimatadas bajo condiciones de invernadero durante 30 días, al cultivarse en turba:agrolita (1:1), presentando un 100% de supervivencia y un crecimiento promedio de 7.8 cm de longitud. A los 90 días de cultivo, las plantas alcanzaron una longitud de hasta 16 cm y presentaron un 90% de supervivencia. La obtención de mutantes de *R. fruticosus* Cv. Tupi se realizó con la irradiación de brotes micropropagados, aplicando cinco dosis de radiación gamma Co_{60} (0, 15, 30,45 y 60 Gy), los que fueron cultivados en medio MSB. Con estas dosis se obtuvo la DL_{50}, observando que la mortalidad fue dependiente de la dosis, estableciendo una DL_{50} de 30.82 Gy. A esta dosis, se irradiaron 200 brotes, de los cuales 92 sobrevivieron, mostrando variaciones en el crecimiento, en la disminución del número y longitud de los brotes, con formación de callo y de raíces en la parte aérea de algunos brotes. Los brotes mutantes que no mostraron estos cambios, fueron subcultivados en medio MSB por 60 días para su micropropagación y obtener plántulas, las que fueron utilizadas para la selección en filtrado estéril de *B. cinerea.* Previa esta selección, se determinó la CL_{50} por el cultivo de plántulas no irradiadas en seis concentraciones (0, 2, 4, 6, 8 y 10 g/L), encontrando que el 50% de mortalidad se obtuvo con 4 g/L a los 28 días del cultivo, considerándola como la CL_{50}. En esta concentración fueron cultivadas plántulas micropropagadas de los brotes mutantes, seleccionando 32 líneas consideradas como mutantes tolerantes, las cuales fueron sometidas a pruebas de tolerancia en hojas y plantas *in vitro,* inoculando $1x10^3$ esporas/mL de *B. cinerea.* Se seleccionaron cinco líneas (RFGUM5, RFGUM6, RFGUM16, RFGUM17 y RFGUM18), consideradas como mutantes tolerantes a *B. cinerea* por presentar la ausencia o un mínimo de los síntomas de la enfermedad.

Palabras clave: micropropagación, mutantes, rayos gamma, tolerancia.

ABSTRACT

An alternative to avoid or reduce the use of synthetic fungicides for the control of the fungus *Botrytis cinerea*, causal agent of gray mold in blackberry (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), is the *in vitro* selection of mutant lines showing enhanced tolerance, using sterile fungus filtrate as a selection agent. With this objective, the blackberry micropropagation system was established to obtain plant mutants by gamma irradiation of shoots, making the selection of tolerant plantlets in culture medium with sterile *B. cinerea* filtrate and confirming the fungus-tolerance with *in vitro* bioassays. The *in vitro* cultures of *R. fruticosus* Cv. Tupi were established of apical and axillary buds of adult plants cultured in greenhouse in the Murashige and Skoog (MS) medium with 1.0 mg/L of benzyladenine (BA) and 0.05 mg/L of naphtalenacetic acid (NAA), 30 g/L of sucrose, pH 5.7, 8 g/L of agar and 500 mg/L of ampicillin, following an effective aseptic method, obtaining a 70% survival of the explants. Subsequently, apical buds of initial shoots obtained 30 days of culture, were cultivated in MSB (shoot induction medium) with 1.0 mg/L of BA and 0.06 mg/L of indolebutyric acid (IBA), obtaining 13 shoot/explant, of 2 cm of length, at 28 days of culture. The rooting shoots occurred in the same culture medium, generating plantlets of 4 cm in height within 60 days of culture. All *in vitro* cultures were incubated in culture room conditions (25 °C, 16 h photoperiod light, 132 $\mu mol/m^2s$). The micropropagated plantlets were successfully acclimatized under greenhouse conditions for 30 days, using peat moss:perlite (1:1) as substrate, presenting a 100% survival and growth average 7.8 cm in length. At 90 days of greenhouse culture, the plants reached up to 16 cm long and had a 90% survival. The mutant plants obtained of *R. fruticosus* Cv. Tupi was carried out with the irradiation of micropropagated shoots, by applying five doses of gamma radiation Co_{60} (0, 15, 30, 45 and 60 Gy), which were cultured in MSB medium. With these doses, the LD_{50} was obtained, noting that the mortality was dependent of the dose, establishing a LD_{50} of 30.82 Gy. At this dose, 200 shoots were irradiated, of which 92 survived, showing variations in growth, the decrease in the number and length of shoots, with formation of callus and roots in the aerial part some of them. Mutant shoots that did not show these changes, were subcultured on MSB medium for 60 days for micropropagation and obtain plantlets which were used for selection in sterile *B. cinerea* filtrate. Previous this selection, the LC_{50} was determined by the plantlets not irradiated culture in six concentrations (0, 2, 4, 6, 8 and 10 g/L), finding that the 50% of mortality was obtained with 4 g/L at 28 days of culture, considering it as the LC_{50}. Micropropagated plantlets of irradiated shoots were cultivated in this concentration, selecting 32 lines considered tolerant mutants, which were subjected to *in vitro* tolerance assays (leaves and plantlets), with $1x10^3$ spores/mL of *B. cinerea* inoculation. We selected five lines (RFGUM5, RFGUM6, RFGUM16, RFGUM17 and RFGUM18), considered as mutant tolerant to *B. cinerea* by present the absence or minimal symptoms of the disease.

Keywords: Micropropagation, mutants, gamma rays, tolerance.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En México, las "berries" o frutillas, grupo al que pertenece la zarzamora (*Rubus fruticosus*), son un producto agrícola que ha registrado un incremento sostenido en su cultivo, en los últimos 10 años la venta al extranjero de los llamados "frutos rojos" creció 90 por ciento y la superficie cultivada un 20 por ciento en las hectáreas cultivadas (Periódico La Razón http://www.razon.com.mx/spip.php?article302485). Dentro de los estados productores de zarzamora más destacados de México, se encuentra Michoacán, que en años recientes ha tenido un gran aumento de la superficie cultivada por la demanda de fruta en países de Norteamérica. El Estado de Michoacán produce más del 90 por ciento del total a nivel nacional durante los meses de Octubre a Junio, periodo de mayor producción de esta fruta.

En México se han utilizado variedades comerciales 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 actualmente más del 90% de la producción de zarzamora se basa en el cultivar Tupi, originada en Brasil (SAGARPA, 2006). Este cultivar es producto del cruzamiento de los cultivares Uruguay y Comanche, es una planta de porte erecto que produce grandes frutas de coloración uniforme y sabor equilibrado por su acidez y contenido de azúcar, el fruto es firme con semillas pequeñas, epidermis y cutícula resistente, y aroma atractivo, características que la hacen recomendable para el consumo en fresco (Dos Santos y Raseira, 1988). Sin embargo, el fruto además de ser altamente perecedero presenta una elevada susceptibilidad al ataque de microorganismos especialmente de hongos (Chaves y Wang, 2004; Hanhineva, 2008).

Una de las principales enfermedades que se presenta en el cultivo de zarzamora, tanto en planta en campo como en los frutos cosechados, es la ocasionada por el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, capaz de afectar cualquier tejido de la planta (hojas, flores, frutos y tallos) en cualquier estado de desarrollo, causando la enfermedad conocida como podredumbre gris, manifestándose con manchas de color grisáceo de donde surge una masa polvosa constituida por las esporas y micelio del hongo. Si se presentan las condiciones adecuadas para su crecimiento, este hongo afecta la producción en un 95% en solo 48 horas, por lo que su

control preventivo es primordial o durante las fases tempranas de la infección (Chaves y Wang, 2004). Esta enfermedad se desarrolla en cultivos con una alta humedad ambiental y bajas temperatura (Phillips *et al*., 1987), su control generalmente se ha basado en el uso de fungicidas químicos sintéticos, la aplicación excesiva e inadecuada de éstos, no solo ha originado cepas más resistentes sino que ha ocasionado una serie de efectos adversos para el ecosistema y la salud del hombre (Ghorbani *et al*., 2004).

Debido a la alta aceptación de la zarzamora mexicana y al creciente nivel de exportación, las normas mundiales demandan fruta sana, higiénica y sin la presencia de compuestos químicos, por lo que es necesario la búsqueda de alternativas para lograrlo, como la resistencia genética al hongo (Singh *et al*., 2007). En los últimos años, las técnicas *in vitro* de plantas como el cultivo de tejidos vegetales, combinado con la mutación inducida, especialmente mediante radiaciones, son una herramienta de la biotecnología moderna, la cual surge en los años 80´s importante para los programas de mejoramiento de plantas, con el propósito de introducir nuevas características en plantas seleccionadas, multiplicar las selecciones élite o plantas con características únicas y desarrollar cultivares adecuados en un tiempo mínimo (Taji *et al*., 2002).

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 comercial (Pérez-Ponce, 1998) y la propagación acelerada de los nuevos mutantes obtenidos, especialmente en el caso de cultivos que, como en la zarzamora, su propagación es vegetativa y responden satisfactoriamente al cultivo de tejidos. Estas técnicas han demostrado ser un método rápido para producir variaciones genéticas, dando como resultado la selección de genotipos tolerantes tanto a factores bióticos como abióticos, produciendo plantas tolerantes a sequía, salinidad, bajas y altas temperaturas y principalmente con tolerancia a patógenos como bacterias y hongos (Lestari, 2012).

La inducción de mutantes por medio de radiación ionizante gamma es ampliamente propuesta para el mejoramiento de plantas (Lu *et al*., 2007), ya que estas producen mutaciones que permiten ampliar la variabilidad genética y facilitan la selección de plantas con características

mejoradas (Cervantes *et al*., 1996). Las mutaciones inducidas con radiación gamma ha sido el método utilizado con mayor frecuencia en el desarrollo de variedades de mutantes y se han aplicado en diferentes plantas con éxito tanto en tejidos u órganos reproductivos (semillas y embriones cigóticos) como vegetativos (meristemos, yemas, callos y células somáticas) en cultivos *in vitro* (Jain, 2001). Con esta herramienta biotecnológica se han seleccionado plantas de soya con tolerancia a *Colletotrichum acutatum* (Lenné, 1992), plátano con tolerancia a *Fusarium oxysporum* (Herrera-Isla *et al*., 1999) o a *Mycosphaerella fijiensis* (García *et al*., 2000) y más recientemente, plantas de crisantemo resistentes a *Septoria obesa* (Kumar *et al*., 2012).

La selección masiva y rápida de mutantes tolerantes a hongos se ha realizado por el cultivo de somaclones o mutantes sometidos a un proceso con el que se ejerza una presión de selección, para ello, se han utilizado diversos agentes que pueden incluir las células mismas del hongo patógeno, filtrados estériles de cultivo de hongo o sustancias purificadas que tengan una función esencial en el proceso patogénico (Patiño-Torres, 2010). Con este método de selección, en los que la sensibilidad de la planta a las paredes celulares del hongo, al filtrado estéril total y a ciertas toxinas producidas por el mismo, se pone a prueba la susceptibilidad de la planta intacta al patógeno, presentándose como un requisito para la selección exitosa de plantas tolerantes a hongos (Patiño-Torres *et al*., 2007). Este proceso de selección *in vitro* ofrece la selección de mutantes de una manera masiva, práctica y rápida (Borras *et al*., 2001), con el que se han seleccionado plantas mutantes con tolerancia a *Fusarium* spp*, Septoria apiicola, Colletotrichum acutatum* y a *Botrytis cinerea* (Patiño-Torres *et al*., 2007; Patiño-Torres, 2010).

La inducción de mutaciones en tejidos cultivados *in vitro*, ofrece la posibilidad de intensificar la variabilidad genética en zarzamora, lo cual permitiría mejorar sus características agronómicas, tales como la tolerancia a hongos, en específico a *B. cinerea.* Es por ello, que el objetivo de la presente investigación fue obtener plantas mutantes irradiadas con rayos gamma de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupi) que mostraran tolerancia a *B. cinerea*, mediante un proceso de selección *in vitro,* utilizando como agente de selección medios de cultivo con filtrado estéril de *B. cinerea*.

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). Sus flores con 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. Tienden a ser de coloración rojiza al principio y finalmente negro brillante intenso cuando madura (Rzedowski *et al*., 2005; Sánchez-García, 2009).

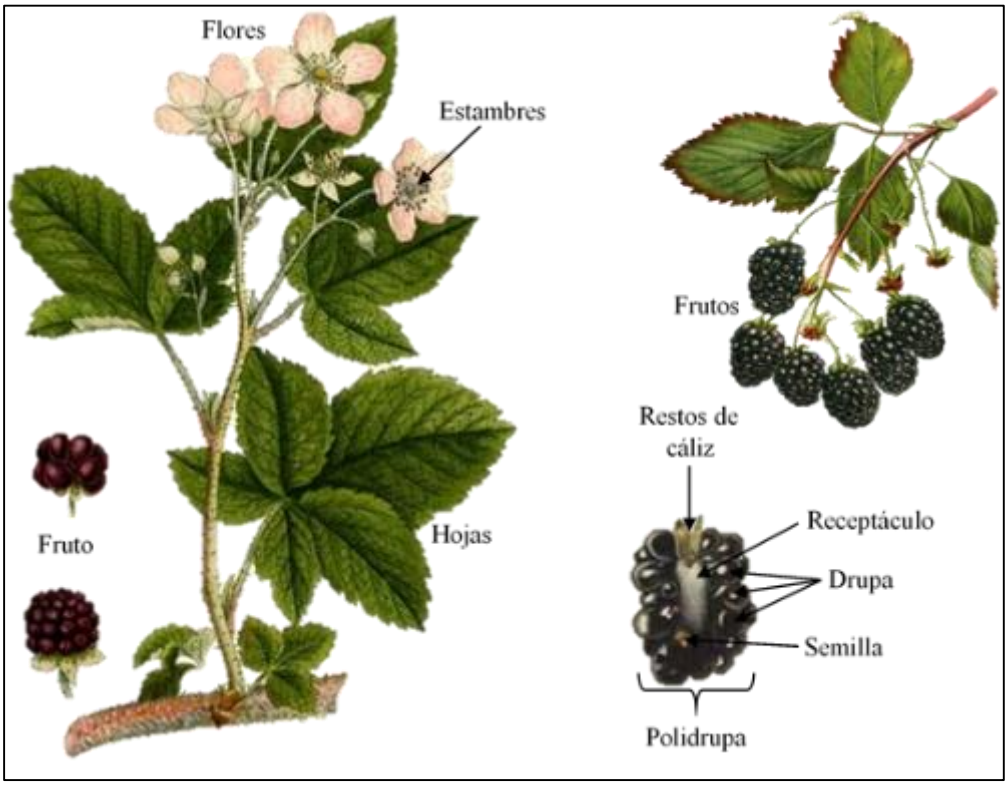


Figura 1. Planta de zarzamora *(Rubus fruticosus*): Partes de la planta y partes del fruto. Tomada de: https://www.pinterest.com/pin/562035228472475410/

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 por ciento 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).

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, debido a que tiene una rentabilidad elevada y un buen posicionamiento en el mercado mundial. 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, 2006).

En la década de los 70´s, en México, la Dirección General de Unidades de Riego para el Desarrollo Rural, perteneciente a la Secretaría de Recursos Hidráulicos, reportó la existencia de 48 ha de zarzamora principalmente en los estados de Michoacán, Oaxaca, Estado de México y Tamaulipas, en 1990, INEGI reportó cerca de 90 ha y 5 años después alrededor de 650 ha con una preponderancia en Michoacán.

La superficie dedicada al cultivo de zarzamora se ha disparado en México en los últimos años alcanzando de 1995 a 2006 un incremento medio anual del 40 por ciento, al pasar de 7,965 a 42,658 ton durante este periodo. En el año 2006 la SAGARPA estimó una producción nacional de 42,496.51 ton de zarzamora de las cuales Michoacán contribuyó con la cantidad significativa de 40,841.13 lo que equivale al 93.43 por ciento de la producción de todo el país. Desde inicios del cultivo, Michoacán ha tenido una participación superior al 90 por ciento del total de la producción nacional (SAGARPA, 2008), 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, 2008).

La producción mundial de zarzamora es alrededor de 65,000 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 Tupi, originada en Brasil. Este cultivar destacó del resto dado que presenta una mayor vida de anaquel, lo cual permite su transporte en camiones refrigerados, reduciendo los costos de comercialización, su producción se estimó para el 2010 en 11,000 ton/ha, con un rendimiento promedio de 5 mil cajas de 2.2 Kg, generando en el país más de 160 mil empleos directos (SAGARPA, 2016).

2.1.3. Plagas y enfermedades de zarzamora

Las plagas y patógenos constituyen uno de los riesgos más grandes en la producción de zarzamora, ya que las pérdidas económicas impactan tanto en el rendimiento del fruto, como en los costos por la compra de insumos químicos para el control de dichos agentes. Una de las principales plagas son los trips (*Frankliniella spp*), insectos que cubren un gran número de las flores, no causan daño a la fruta, pero permanecen en los drupéolos, disminuyendo la calidad del fruto. Otra plaga de gran importancia para este cultivo es la araña roja (*Tetranichus urticae*) también conocida como araña de dos puntos, ésta se alimenta de la savia de las hojas tornándolas amarillas y arrugadas, en fuertes infestaciones puede provocar

la defoliación y secamiento de las ramas, cuando no se controla en las hojas infestan los frutos y son detectados en los puntos de control de calidad antes de su exportación (INFOAGRO, 2002).

Por su parte, las enfermedades fungosas son las más importantes, ya que causan enormes pérdidas, lo que eleva el costo de su cultivo por el uso de fungicidas químicos (INFOAGRO, 2002). Entre las enfermedades ocasionadas por hongos, se encuentra la cenicilla o mildiú polvoriento causado por *Sphaerotheca macularis*, ésta se hace presente por decoloraciones de las hojas en el haz y en el envés se presentan las masas de esporas generalmente blancas que después se tornan grises (Figura 2A); también el mildiú causado por *Peronospora sparsa*, para la cual el cultivar Tupi 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 hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, la cual 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).

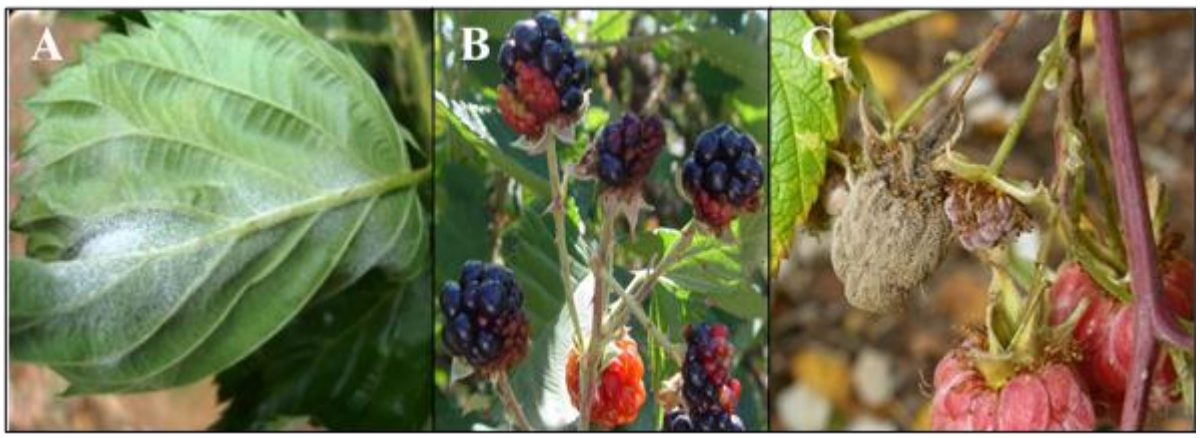


Figura 2. Síntomas de infección de hongos en zarzamora: A) Abundante esporulación en hojas, por *Sphaerotheca macularis*; B) Malformación de frutos por *Peronospora sparsa*; C) Frutos momificados por *Botrytis cinerea.* Tomadas de Revollar- Alviter, 2011.

2.1.4. *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.

Botrytis cinerea Pers.:Fr causa la enfermedad denominada moho o podredumbre gris, es la forma imperfecta o 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 designe a los hongos por el estado sexual o teleomorfo, en este caso, el estado anamorfo o forma asexual *B. cinerea*, es la más aceptada mundialmente por micólogos y fitopatológos. El nombre del género *Botrytis* se deriva del griego por el tipo de organización de las esporas, formando estructuras similares a racimos, es por eso que en griego *botrys* que significa *grupos de uvas*, por el tipo de organización de sus esporas, mientras que el nombre de la especie *cinerea* deriva del latín que significa *cenizas*, las *uvas*, se refiere al racimo de las esporas del hongo en los conidióforos y las *cenizas* se refieren al color grisáceo de las esporas acumuladas (INFOAGRO, 2002).

B. cinerea es un hongo necrotrófico, capaz de infectar alrededor de 200 especies vegetales, puede presentarse desde nivel de plántula, afectando también las flores, las puntas de las hojas y frutos, aprovechándose generalmente cuando hay heridas. *B. cinerea* no es un hongo que afecta solamente zarzamora, éste ataca a las demás frutillas como frambuesa, arándano y fresa. Se caracteriza por las abundantes conidias (esporas asexuales), las cuales tiene forma oval en el extremo de conidióforos grises ramificados. El hongo produce además esclerocios como formas de resistencia en cultivos viejos. Pasa el invierno en forma de esclerocio o como micelio intacto, ambas formas germinan en primavera para producir conidióforos. Las conidias se dispersan por el viento y la lluvia, las cuales causan nuevas infecciones (Figura 3) (Phillips *et al*., 1987).

B. cinerea daña el fruto produciendo un ablandamiento y cuando es muy severo se cubre completamente con vello gris (Figura 2C). Su desarrollo se ve favorecido con la alta humedad y bajas temperaturas, también puede penetrar en el fruto sin necesidad de heridas y durante la cosecha, los frutos sanos pueden ser contaminados con esporas provenientes de otros infestados. 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).

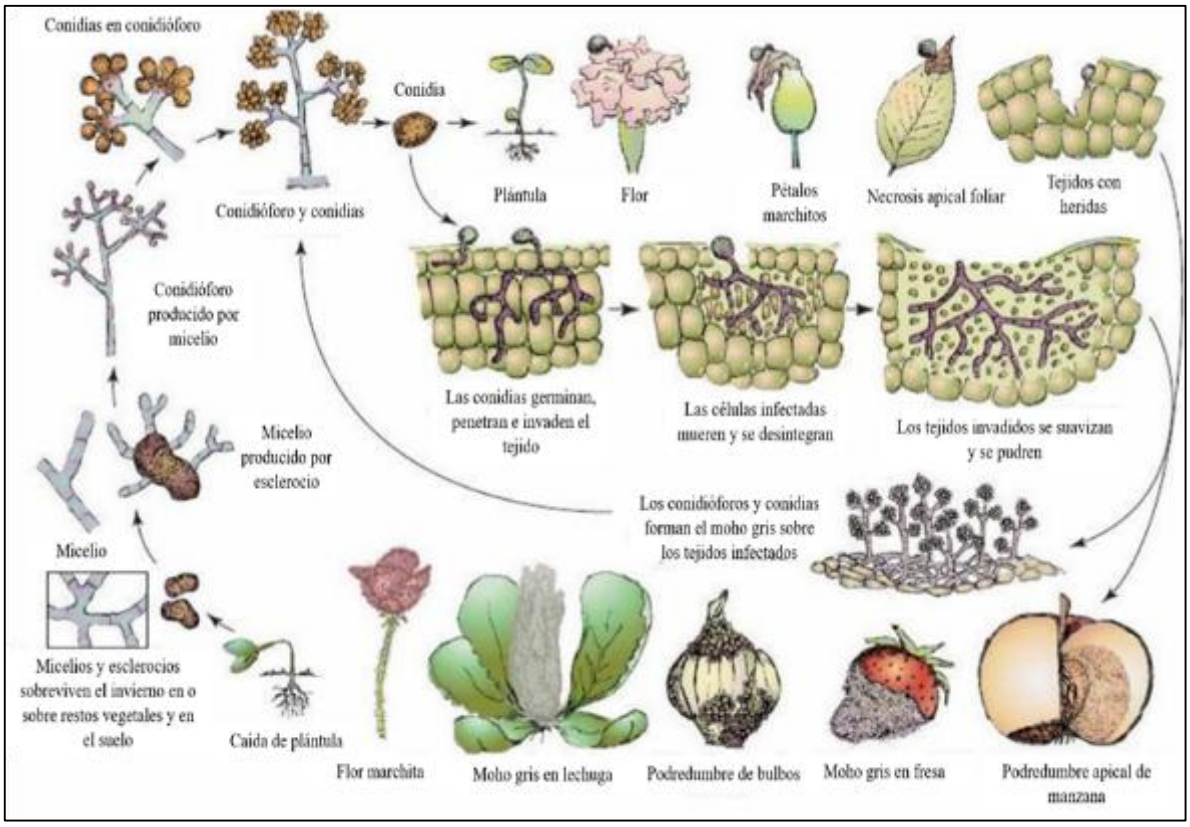


Figura 3. Ciclo de vida y de infección de *Botrytis cinerea* (Tomado de Agrios, 1988).

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, 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 hospedante, destacando enzimas hidrolíticas que degradan las envueltas celulares como celulasas, xilanasas, poligalacturonasas, etc. (Schumacher y Tudzynski, 2012). La lesión en el hospedante 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).

Aunque para el control de *B. cinerea* se han utilizado diversas estrategias, el uso de fungicidas es el método más común utilizado en todo el mundo, principalmente en nuestro país. Debido al descontrol de sus aplicaciones, actualmente hay cepas resistentes a estos fungicidas (Leroux, 2004); además de que provocan contaminación ambiental (Torres del Castillo, 2001); y elevan los costos de producción (Rosslenbroich y Stuebler, 2000). Estas desventajas del uso y aplicación de los fungicidas sintéticos 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.

2.2. MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Con el mejoramiento genético de plantas mediante diferentes técnicas, se ha conseguido la selección y generación de cultivares e híbridos, con fines de mejorar las características de los cultivos y aumentar la producción en la agricultura.

Aunque los métodos de mejoramiento genético de los cultivos parecen ser nuevos, los registros históricos demuestran que en el pasado el mejoramiento de las plantas se practicó cuando el hombre aprendió a seleccionar las mejores especies para las cosechas. Esta técnica inició con la domesticación bajo condiciones controladas y seleccionando aquellas que proporcionaran una mejor fuente de alimentos. Este mejoramiento fue fortuito y lento, hasta el reconocimiento de las leyes de Mendel a principios del siglo XX (Gutiérrez *et al*., 2003).

Actualmente, existen varios métodos de mejoramiento genético de los cultivos: en las especies con autofecundación, en las variedades de polinización cruzada y en plantas de propagación asexual. Destacan los métodos de selección e hibridación, con las que se

seleccionan plantas únicas o bien se combinan mediante la polinización cruzada artificial, para obtener nuevos cultivares e híbridos, respectivamente (Agrios, 2007).

Uno de los propósitos del mejoramiento genético vegetal es incorporar resistencia a enfermedades y a plagas, o a condiciones adversas del ambiente, así como mejorar sabor, color, forma y tamaño de los órganos de importancia antropocéntrica. Sin embargo, en ocasiones es difícil obtener plantas mejoradas por este medio y hay que recurrir a métodos alternativos para producir variantes genéticas útiles (Pierik, 1990; Jain, 2010).

2.2.1. Mejoramiento vegetal *in vitro*

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).

La ingeniería genética de plantas, es uno de los métodos más recientes, el cual implica la introducción de genes extraños o foráneos en una célula o tejido con el uso de virus como vectores de transformación como los geminivirus y bacterias como *Agrobacterium*, el cual lleva integrado el o los genes de interés. Se trata entonces de un vehículo óptimo para operaciones de ingeniería genética. A la fecha, existe un amplio número de especies de interés agronómico transformadas genéticamente con múltiples aplicaciones y muchas de ellas ya se tienen como cultivos agrícolas. Por ejemplo, los cultivos de maíz, soya y algodón transgénico resistentes a insectos ocupaban 50 millones de hectáreas en el 2001 (Vega y Rivera, 2001).

Las técnicas de ingeniería genética se utilizan en combinación con métodos de mejoramiento clásico, ya que un sistema de proliferación y regeneración de brotes *in vitro* eficiente, puede acelerar el desarrollo de nuevos genotipos. La capacidad de regenerar plantas es crucial para

la exitosa aplicación de los métodos *in vitro* (Cao y Hammerschlag., 2000). Para todas las técnicas de transformación 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 cambio 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). Otra aplicación es la producción de plásticos biodegradables mediante plantas en las que se les han introducido genes codificadores del poli-b-hidroxibutirato. Por último, 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, muchos expertos y organizaciones se oponen a la comercialización de productos transgénicos, principalmente por los daños al medio ambiente y a la salud que estos pueden causar, entre ellos: el incremento de sustancias tóxicas en el ambiente, perdida de la biodiversidad, resistencia de los insectos y hierbas indeseadas ante medicamentos desarrollados para su contención, así como daños irreversibles e imprevisibles a plantas y animales tratados (Padauye- Ruiz *et al.*, 2000).

Sin embargo, los métodos de selección de mutantes también representan una alternativa muy 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 (Lestari, 2012).

2.3. 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 (Pérez-Ponce, 1998).
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/OIEA contiene más de 2,300 variedades distribuidas oficialmente (Ahloowalia *et al*., 2004).

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, 2000).

Desde los inicios de la técnica, se prefiere inducir mutagénesis en tejidos vegetativos más que en semillas, ya que con éstas 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. Lo único que hace esta herramienta es reorganizar su identidad genética para mejorar las características de la planta. Además, esta técnica no deja radiación residual en la planta (Novak y Brunner, 1992). 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 en 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, siendo exitosa en especies como plátano, jitomate, papa, caña de azúcar, arroz, etc. (Bermúdez *et al.* 1999).

2.3.1. 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 2,250 cultivares directamente de mutantes o derivadas a partir de sus cruzamientos (Pérez-Ponce, 1998) (Cuadro 1).

En las plantas propagadas vegetativamente, muchas mutantes se obtuvieron a partir de la irradiación de meristemos, yemas, tallos, hojas individuales y semillas. La inducción de mutaciones con radiación gamma ha sido el método utilizado con mayor frecuencia en el desarrollo de mutantes. 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

sinergísticos en el aumento del rendimiento, calidad del cultivo, rotación del cultivo y aceptación del consumidor (Ahloowalia *et al*., 2004).

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

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

2.4. SELECCIÓN *in vitro* DE PLANTAS TOLERANTES 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 sintomatología en las plantas (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 y col. (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. Asimismo, Bhagwat (2006), utilizando explantes de plantas de bananos cultivadas *in vitro* (*Musa* spp., AAA Grupo Highgate), obtuvo 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) reportaros 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 de cultivos de hongos.

ESPECIE VEGETAL	FUENTE DEL FILTRADO	REFERENCIA
ALFALFA (*Medicago sativa*)	*Fusarium oxysporum*	Hartman *et al*., 1984
APIO (*Apium graveolens*)	*Septoria apiicola*	Evenor y Pressman, 1994
TRIGO (*Triticum sativum*)	*Fusarium sp*	Ahmed *et al*., 1996
UVA (*Vitis vinifera*)	*Fusarium oxysporum* *Botrytis cinerea*	Jayasankar *et al*., 1999 Faniza *et al*., 1995
CARDAMOMO (*Elettaria cardamomum*)	*Fusarium oxysporum*	Zúñiga *et al*., 2010
TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*)	*Colletotrichum acutatum*	Patiño-Torres *et al*., 2007
FRESA (*Fragaria x ananassa* Cv. Tioga)	*Botrytis cinerea* *Fusarium oxysporum*	Cruz-Nieves, 2014

2.5. 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 (Morrissey y Osbourn, 1999; Nimchuk *et al*., 2003).

Entre las defensas constitutivas están las paredes celulares (que son una barrera física) y algunos metabolitos, como son las saponinas, los glicósidos cianogénicos y los ácidos hidroxámicos cíclicos, los cuales representan una barrera química, Por el contrario, en las defensas inducidas, los compuestos químicos que actúan como barreras son sintetizados como respuesta al ataque de patógenos o al estrés abiótico y su actuación está restringida a las células que rodean la zona afectada (Thatcher *et al*., 2005; Wiermer *et al*., 2005).

Para activar sus respuestas de defensa rápidamente, la planta dispone de un sistema de inmunidad innata específico que consiste en el reconocimiento de las señales propias y las generadas por un patógeno. Más aún, la planta es capaz de discriminar las señales emitidas por agentes patógenos de las generadas por organismos benéficos. La respuesta de la planta implica modificar el metabolismo de las células vegetales involucradas en la reacción de defensa, desencadenando la inducción de una cascada de respuestas de defensa cuyo cometido es alertar al resto de los órganos vegetales de la existencia de peligro y, de este modo, preparar sus estructuras para ofrecer una respuesta sistémica generalizada, 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 (Escobar, 2010) (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 rápido y localizado de una o varias células de la planta huésped en respuesta a una invasión (Ryals *et al*., 1996), 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).

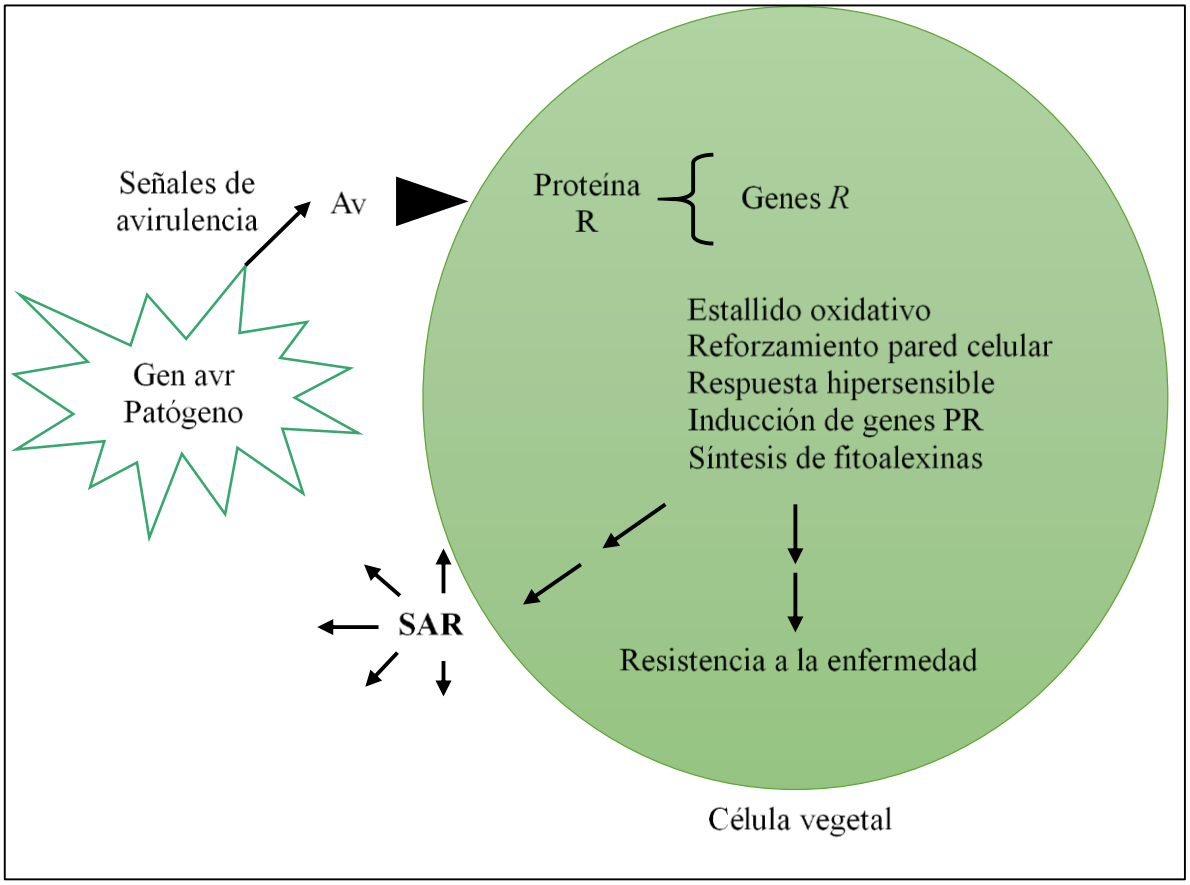


Figura 4. Esquema del modelo gene por gene en el mecanismo de defensa de las plantas (Flor, 1971).

Si las plantas sobreviven al ataque inicial del patógeno, éstas pueden protegerse contra ataques posteriores, 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. La secuencia de eventos que permiten la RSA comienza localmente; es decir, en las células adyacentes a la respuesta hipersensitiva se

observa el engrosamiento de las paredes celulares por incorporación de proteínas estructurales o lignina, deposición de calosa y la inducción de la síntesis de fitoalexinas (Camarena-Gutiérrez y De la Torre-Almarráz, 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 PR, las enzimas β-1,3 glucanasas, endohidrolasas, quitinasas, inhibidores de enzimas como la taumantina, inhibidores de amilasa y proteinasas. 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 y Klessig, 1996).

2.5.1. Mecanismos de defensa en plantas tolerantes a hongos

La tolerancia en plantas a 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 tolerantes a hongos, ciertos mecanismos se han elucidado. 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 tolerantes de tomate de árbol (*Solanum betacea* cav. Sendta) mediante filtrado crudo de *Colletotricum acutatum* determinaron que la fitotoxicidad se debe en parte a la presencia en los filtrados de enzimas tipo pectinasas.

La resistencia que poseen algunas plantas a patógenos productores de fitotoxinas, puede estar asociada a su falta de sensibilidad hacia éstas o a la capacidad de desplegar mecanismos que permiten su degradación o inactivación. *C. acutatum* produce en cultivo líquido, enzimas tipo pectinasas (Fernando *et al*., 2001; Patiño-Torres *et al*., 2007) y ácido indolacético (Robinson, *et al*., 1998; Chung *et al*., 2003), sustancias que están posiblemente implicadas en su interacción patogénica con varias especies vegetales.

Con el avance en las técnicas de biología molecular, genes de quitinasa de diferentes especies se han usado para inducir tolerancia a patógenos fúngicos (Asao *et al.*, 1997; Terakawa *et al.*, 1997).

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los problemas importantes para asegurar altos rendimientos en la producción de zarzamora en México, es el control de la susceptibilidad que esta planta tiene a las enfermedades causadas por hongos, principalmente la ocasionada por *B. cinerea*. Debido a que el control de este hongo, se realiza principalmente con aplicaciones irracionales de fungicidas sintéticos, se ha generado resistencia en este patógeno, además que son considerados contaminantes del ambiente y pueden afectar la salud humana.

En la búsqueda de alternativas para el mejoramiento genético de zarzamora con fines de seleccionar plantas tolerantes a *B. cinerea,* la biotecnología moderna ofrece como herramienta la inducción de mutagénesis por rayos gamma y mediante la selección *in vitro* en filtrados estériles del hongo, para conseguir mutantes que muestren tolerancia a *B. cinerea.*

4. HIPÓTESIS

La exposición de brotes de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupi) a radiación gamma produce plantas mutantes tolerantes a *B. cinenea.*

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener plantas mutantes de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupi) por radiación gamma, tolerantes a *B. cinerea*.

5.2. Objetivos específicos

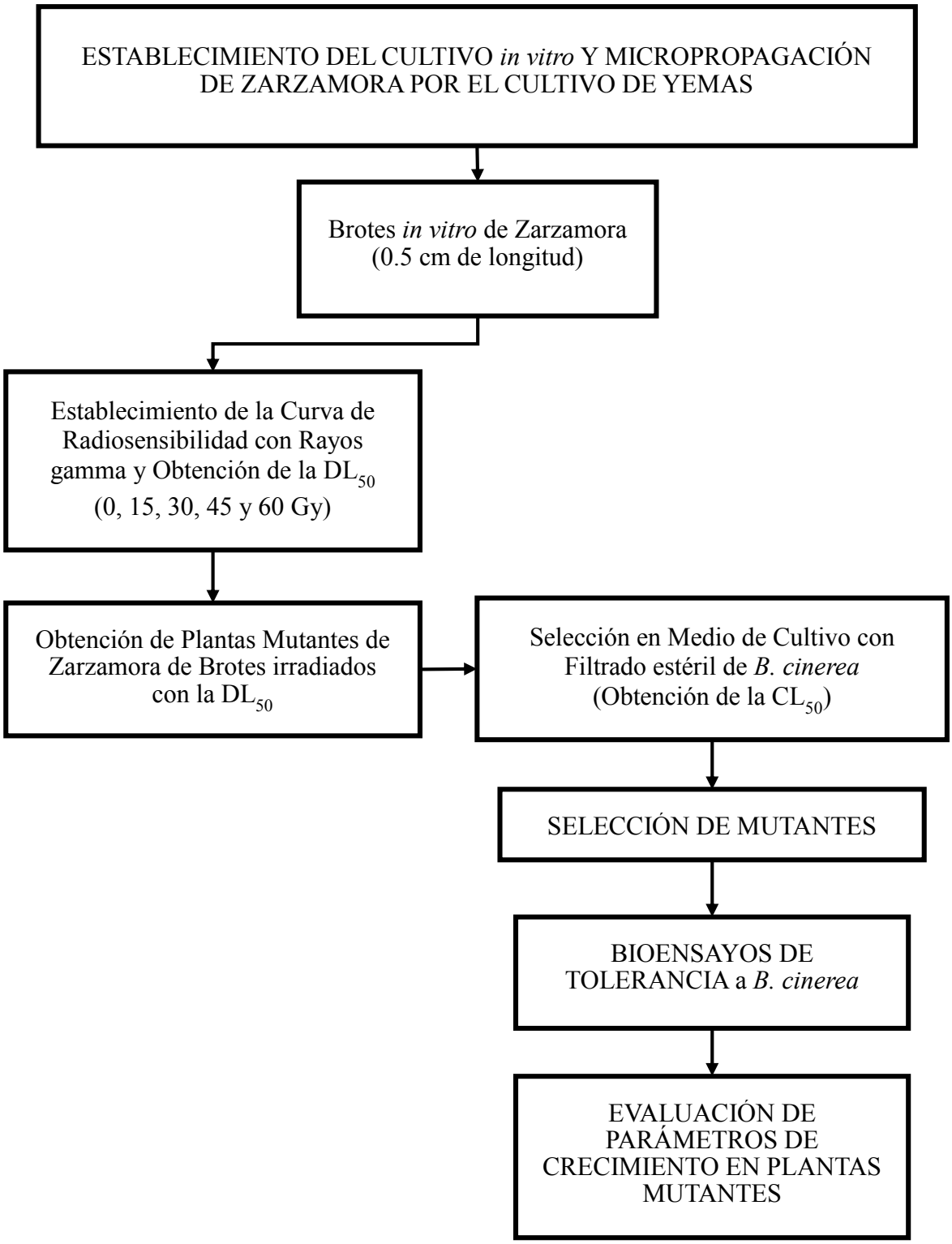
1. Establecer el sistema de micropropagación a partir de yemas de plantas adultas de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupi) para la obtención y propagación de las mutantes.

2. Determinar la DL_{50} de rayos gamma mediante una curva de radiosensibilidad en brotes de zarzamora *in vitro* (*R. fruticosus* Cv. Tupi).

3. Determinar la CL_{50} del filtrado estéril de *B. cinerea* para seleccionar plantas mutantes de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupi), irradiadas con la DL_{50} de rayos gamma.

4. Evaluar la tolerancia a *B. cinerea* de plantas mutantes seleccionadas en la CL_{50} del filtrado estéril de *B. cinerea.*

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. RESULTADOS

7.1. MICROPROPAGACIÓN DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) POR EL CULTIVO *in vitro* DE YEMAS APICALES Y AXILARES DE PLANTAS ADULTAS.

RESUMEN

Para obtener la micropropagación de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), se establecieron cultivos *in vitro* de yemas apicales y axilares de plantas adultas cultivadas en invernadero, siguiendo un método efectivo de asepsia consistente en someter los explantes a una solución de hipoclorito de sodio comercial al 20% (6% cloro activo) por 5 min, en detergente (Hyclin) al 10% con 5 g/L del fungicida comercial tecto 60 (Tiabendazol) por 5 min y de nuevo a una solución con hipoclorito de sodio comercial al 20% adicionada con 5 g/L de Tecto 60, por 20 min. Los explantes fueron lavados con agua estéril en campana de flujo laminar previo al cultivo *in vitro* en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) con 1.0 mg/L de benciladenina (BA) y 0.05 mg/L de ácido naftalenacético (ANA), 30 g/L de sacarosa, pH 5.7, 8 g/L de agar y 500 mg/L de ampicilina. Los explantes fueron incubados en condiciones de cuarto de cultivo (25 °C, 16 h luz fotoperiodo, 132 $\mu mol/m^2s$). Bajo estas condiciones de asepsia y de cultivo, se logró el cultivo *in vitro* de zarzamora con un 70% de explantes sobrevivientes, obteniendo 20% de contaminación y 23.3% de oxidación de explantes, a los 28 días del cultivo. A este tiempo se observó el desarrollo de brote inicial, del que se obtuvieron yemas apicales para su cultivo en MS con 1.0 mg/L de benciladenina (BA) y 0.06 mg/L de ácido indolbutírico. A los 28 días se presentó una producción de 13 brotes/explante, de 2 cm de longitud, los que fueron enraizados en el mismo medio de cultivo, generando plántulas a los 60 días del cultivo de hasta 4 cm de altura con un promedio de 8 hojas y 3 raíces de 3.5 cm de longitud. Para conseguir su cultivo en invernadero, las plántulas micropropagadas de 60 días de cultivo *in vitro* fueron trasplantadas a suelo (turba:agrolita, 1:1) y aclimatadas bajo condiciones de invernadero durante 30 días, tiempo en el que mostraron un 100% de supervivencia y un crecimiento promedio de 7.8 cm de longitud. A los 90 días de cultivo, las plantas alcanzaron una longitud de hasta 16 cm y presentaron un 90% de supervivencia. Estos resultados demuestran un sistema exitoso de micropropagación de zarzamora Cv. Tupi.

Palabras clave: brotación, enraizado, establecimiento *in vitro*, propagación.

ABSTRACT

To obtain the micropropagation of blackberry (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), apical and axillary buds of plants adult cultivated in greenhouse were established in *in vitro* cultures, following an effective aseptic method consistent in treat the explants to a solution of 20% of hypochlorite of sodium commercial (6% chlorine active) by 5 min, in 10% detergent (Hyclin)

with 5 g/L of the fungicide commercial Tecto 60 (thiabendazole) by 5 min and again to a solution with 20% commercial sodium hypochlorite added with 5 g/L of tecto 60 for 20 min. Explants were washed with sterile water in laminar air flow chamber prior to the *in vitro* culture in the culture medium Murashige and Skoog (MS) with 1.0 mg/L benzyladenine (BA) and 0.05 mg/L naphtalenacetic acid (NAA), 30 g/L sucrose, pH 5.7, 8 g/L agar and 500 mg/L of ampicillin. Explants were incubated in culture room conditions (25 °C, 16 h light, 132 $\mu mol/m^2s$). Under these aseptic and culture conditions, was achieved *in vitro* culture of blackberry with 70% of surviving explants, obtaining 20% of contamination and 23.3% from oxidation of explants at 30 days of culture. To this time was observed the development of initial shoot, of which are obtained apical buds for its culture in MS with 1.0 mg/L of benzyladenine (BA) and 0.06 mg/L of acid indole butyric. At 28 days was presented a production of 13 shoots/explant, of 2 cm in length, which were rooted in the same culture medium, generating plantlets within 60 days of the culture of up to 4 cm high with an average of 8 leaves and 3 roots of 3.5 cm in length. To get culture of the blackberry plants in greenhouse, micropropagated plantlets of 60 days of *in vitro* culture were transplanted to soil (peat-moss:perlite, 1:1) and acclimatized under greenhouse conditions for 30 days, time that showed a 100% survival and growth average of 7.8 cm in length. At 90 days of greenhouse culture, the plants reached a length of up to 16 cm and presented a 90% survival. These results demonstrate a successful system of micropropagation of blackberry Cv. Tupi.

Keywords: shooting, rooting, *in vitro* establishment, propagation.

INTRODUCCIÓN

La zarzamora (*Rubus fruticosus*) es una especie de la familia Rosaceae, que se caracteriza por producir frutos pequeños, redondos o ligeramente alargados, rojizos al principio y finalmente negros brillante cuando maduran (Sánchez, 2009). La producción de zarzamora en México ha tenido un importante crecimiento en los últimos 15 años, ya que ha pasado de una superficie de cerca de 1,200 Ha en el año 2000 a una superficie diez veces mayor en el año 2014, de la que el 96% es de riego. En consecuencia el volumen se ha incrementado de 14 mil a 153 mil ton en ese periodo (SIAP-SAGARPA, 2015).

El valor generado por esta fruta es de cerca de 5,000 mdp anuales, gracias a la demanda tanto nacional como internacional. El 95% del volumen y 98% del valor generado por la producción de zarzamora corresponde a Michoacán, en tanto que Jalisco participa con el 4% del volumen y 1% del valor, además de otros diez estados que producen el restante 1% (SIAP-SAGARPA, 2015).

La propagación de zarzamora se realiza principalmente de forma vegetativa por multiplicación de hijuelos; sin embargo, en vista de la demanda masiva de material sano, se ha generado un interés por el uso de las técnicas de cultivo de tejidos para su propagación, proceso denominado micropropagación (Mendel, 1989). Con la micropropagación se reproducen cientos de clones de una misma especie y tiene un gran potencial comercial debido a la velocidad con la que se realiza la propagación, aunado a esto, las plántulas obtenidas, son de alta calidad y se encuentran libres de enfermedades (Kyte y Kleyn, 1996; Ahmed *et al*., 2001). La capacidad regenerativa *in vitro* para la multiplicación de brotes y formación de plantas, está dada por la totipotencialidad de la célula vegetal y la participación de los reguladores de crecimiento, auxinas y citocininas (Tisserat, 1991).

El procedimiento para establecer un sistema de micropropagación consiste en tomar los explantes apropiados de una planta madre y propiciar su crecimiento en un medio con los nutrientes necesarios para su desarrollo, en condiciones de humedad, temperatura e iluminación controladas. Entre las aplicaciones de establecer protocolos de micropropagación, está la propagación masiva de plantas de interés comercial y de aquellas que estén en peligro de extinción. Pero además, es esencial para la obtención de plantas mejoradas genéticamente, ya sea por transgénesis o para la selección de mutantes y variantes. Mediante estas técnicas se han obtenido plantas tolerantes a salinidad, sequía y a diversos patógenos como insectos, virus, hongos y bacterias (Villalobos-Arámbula, 1990; Pérez-Molphe *et al*., 1999; Gutiérrez *et al*., 2003).

En particular, se han reportado diversos procedimientos para la micropropagación de zarzamora, González *et al.* (2000) obtuvieron la formación de brotes en yemas de zarzamora Cv. Smooth stem cultivadas en medio de Murashige y Skoog (1962) con 1.0 mg/L de benciladenina y 0.06 mg/L de ácido indolbutírico.

El objetivo de la presente investigación es establecer el sistema de micropropagación de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupi) a partir de yemas apicales y axilares de plantas adultas, con fines de realizar su mejoramiento genético por la selección de mutantes irradiadas con rayos gamma, con base en lo reportado por González *et al*. (2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Las plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) para el establecimiento y estudios de regeneración *in vitro*, fueron donadas por la empresa exportadora de frutillas EXIFRUT. Las plantas de zarzamora se mantuvieron bajo cultivo en invernadero.

Establecimiento in vitro

El establecimiento se realizó a partir de la siembra de yemas apicales y axilares de plantas adultas de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupi), utilizando un método efectivo de asepsia que constó en lo siguiente: los explantes fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 20% (6% cloro activo) por 5 min en movimiento continuo; posteriormente fueron inmersos por 5 min en detergente (Hyclin) al 10% con 5 g/L del fungicida comercial Tecto 60 (Tiabendazol) y de nuevo se sometieron a una solución con hipoclorito de sodio comercial al 20% adicionada con 5 g/L de Tecto 60, por 20 min; finalmente se realizaron tres lavados con agua estéril en campana de flujo laminar para establecer los cultivos *in vitro* de yemas apicales y axilares (López-Antonio, 2013).

En cajas Petri, se realizaron cortes de secciones dañadas de cada explante y se cultivaron las partes sanas de las yemas apicales y axilares en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) con 1.0 mg/L de benciladenina (BA), 0.05 mg/L de ácido naftalenacético (ANA), 30 g/L de sacarosa, pH 5.7, 8 g/L de Agar y 500 mg/L de Ampicilina (medio de establecimiento), concentraciones previamente establecidas como óptimas para la formación de brote inicial en fresa (Tapia-Rodríguez, 2008). Los explantes sembrados se mantuvieron en cuarto de cultivo (25 °C, 16 h luz fotoperiodo, 132 $\mu mol/m^2s$). A los 7, 14 y 28 días se evaluaron las variables porcentaje de contaminación, oxidación o necrosis y supervivencia, en un total de 25 explantes.

Micropropagación

Los brotes regenerados (1 cm) de cada yema fueron cultivados en MS 1.0 mg/L de benciladenina (BA), 0.06 mg/L de ácido indol butírico (AIB), 30 g/L de sacarosa, pH 5.7 y

8 g/L de Agar (medio de brotación), según lo reportado por González *et al*. (2000). Se evaluó el número de brotes por explante y la longitud de los mismos en un total de 25 brotes.
Los brotes micropropagados fueron cultivados en medio de brotación para la inducción de raíces y formación de plántulas, sin adición de auxina.

Trasplante y aclimatación

Las plántulas obtenidas fueron cultivadas en forma individual en una mezcla de turba (peat moss) y agrolita (1:1, v/v) bajo condiciones de cámara húmeda (100% humedad relativa, HR). Fueron cubiertas con plástico transparente por 30 días y paulatinamente se redujo la HR hasta alcanzar un 70%. Posteriormente las plantas aclimatadas fueron cultivadas en macetas de mayor tamaño y mantenidas bajo condiciones de invernadero, con riego cada tres días. Se determinó el porcentaje de supervivencia y crecimiento (cm, altura) a los 90 días de cultivo en invernadero, de un total de 25 plantas.

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 $n=25$ (programa estadístico JMP 8). Para realizar la prueba de ANOVA, los datos en porcentajes se transformaron con la fórmula siguiente (Steel y Torrie, 1980), donde X es el valor en porcentaje a transformar:

$$\sqrt{X + 0.5}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento *in vitro*

Durante la fase del establecimiento *in vitro* de yemas, tanto apicales como axilares de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupi), se comprobó que el método de asepsia utilizado fue efectivo para el cultivo *in vitro*, ya que presentaron bajos porcentajes tanto de contaminación como de oxidación (necrosis), con un 6.66% y 23.3%, respectivamente, desde los 8 días del cultivo. A este tiempo se tenía un 80% de supervivencia (Cuadro 3).

A los 14 días de cultivo, se incrementó la contaminación, mayormente por bacterias y en menor medida por hongos, alcanzando el 20% de explantes contaminados, este porcentaje se mantuvo hasta los 28 días del cultivo. El porcentaje de explantes con necrosis se mantuvo en 23.33% durante el periodo del establecimiento *in vitro*, sin embargo, el porcentaje de supervivencia disminuyó hasta un 70% (Cuadro 3).

Cuadro 3. Respuesta en porcentajes de contaminación, necrosis y supervivencia de explantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) durante la fase del establecimiento *in vitro* (28 días de cultivo).

Días	Contaminación (%)	Necrosis (%)	Supervivencia (%)
7	6.66 ± 0.54^{a}	23.33 ± 1.98^{a}	80 ± 9.22^{a}
14	20 ± 1.86^{b}	23.33 ± 1.98^{a}	70 ± 6.44^{a}
28	20 ± 2.11^{b}	23.33 ± 1.98^{a}	70 ± 6.44^{a}

Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey $p<0.05$, $n=25$).

Una vez establecido el método de asepsia se procedió a la siembra de hasta 100 explantes, tanto yemas apicales como axilares de zarzamora, que se mantuvieron en cuarto de cultivo hasta la obtención del brote inicial, el cual se presentó a los 7 días de cultivo con una longitud de 0.3 cm (Figura 5A). Los brotes en desarrollo permanecieron por 28 días en condiciones de cuarto de cultivo, los que fueron utilizados como fuente de yemas para lograr la multiplicación de éstos y conseguir la micropropagación de zarzamora. Un factor importante que influye en la pérdida de explantes, es la presencia y crecimiento de microorganismos que no son eliminados por los agentes de la asepsia. De acuerdo a lo reportado por Cassells (1991), los contaminantes en el cultivo de tejidos pueden causar grandes pérdidas en los procesos de propagación *in vitro*, por lo que la prioridad es su eliminación desde la fase de establecimiento, que generalmente se controla con el uso de sustancias desinfectantes como el hipoclorito de sodio, alcohol etílico, adicionados con antibióticos o fungicidas.

La oxidación de un explante se inicia en el momento en que éste es retirado de la planta, debido al estrés que sufre por el corte y se agudiza cuando es sometido al proceso de

desinfección, el cual tiene efectos abrasivos sobre las células (Jones-Castro, 2006). La oxidación de los explantes conlleva a la necrosis de éstos y generalmente a su muerte. Este efecto se ha reportado para diversas especies vegetales, sobre todo cuando se emplean concentraciones o tiempos de exposición elevados de los agentes desinfectantes, por lo que necesario establecer un método eficiente que elimine la microbiota contaminante pero que los porcentajes de supervivencia no se vean afectados (Alvarado, 1998; Hernández y González, 2010).

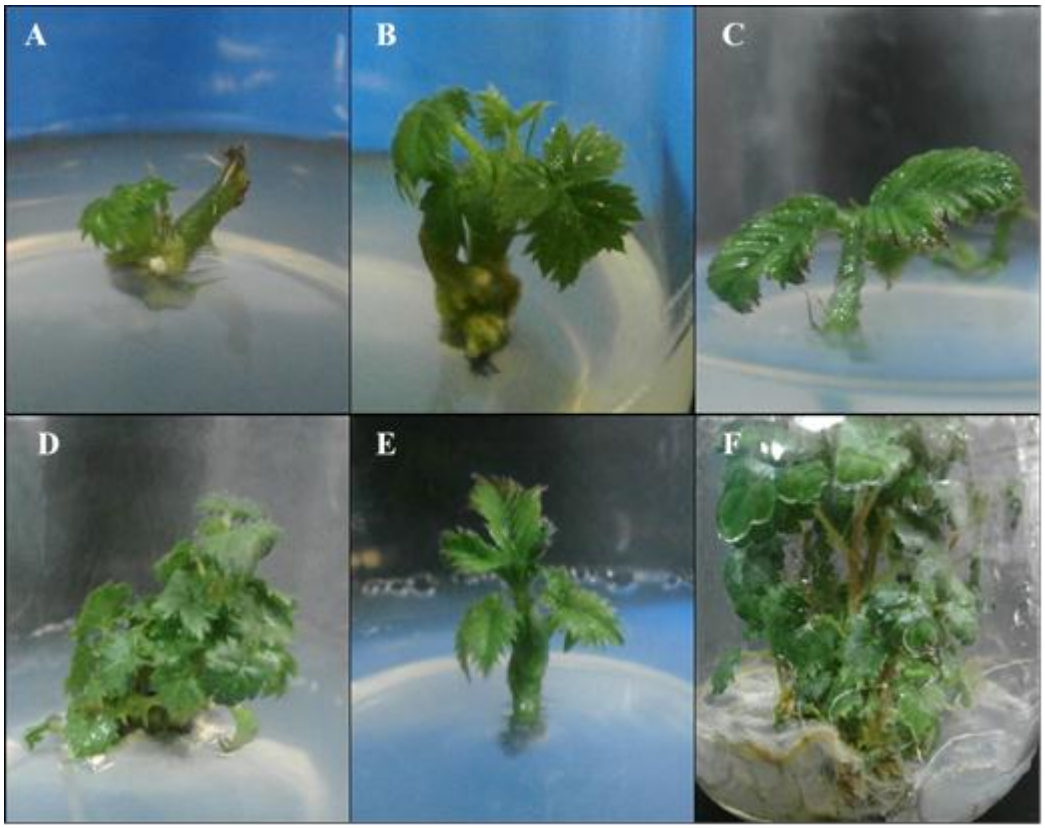


Figura 5. Respuesta del desarrollo de brote inicial en yemas apicales y axilares de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi durante la fase de establecimiento *in vitro*, al inicio (A) y a los 28 días del cultivo (B), y en las diferentes etapas de la micropropagación en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.06 mg/L de AIB: C) Desarrollo del brote a los 7 días; D) Brotación múltiple (13 brotes/explante); E) Brote micropropagado en medio para formación de raíces; y F) Plántula a los 60 días del cultivo.

Los porcentajes de contaminación y de necrosis presentados en esta investigación, durante el establecimiento *in vitro* de yemas apicales y axilares de zarzamora Cv. Tupi, pueden ser considerados en un nivel aceptable, ya que el porcentaje de supervivencia es relativamente

alto (70%). En el establecimiento *in vitro* de diversas plantas, similares resultados se han reportado como en muicle (*Justicia spicigera*) (López-Antonio, 2013) y michay rojo (*Berberidopsis corallina*) (Uribe *et al*., 2008).

Los brotes desarrollados en los explantes cultivados *in vitro,* mostraron un crecimiento de hasta 3.5 cm, presentado un par de hojas, a los 28 días de cultivo (Figura 5B). Éstos fueron utilizados para el establecimiento de la micropropagación de zarzamora Cv. Tupi.

Micropropagación de zarzamora

Para conseguir la micropropagación de *R. fruticosus* Cv. Tupi, yemas apicales de los brotes desarrollados durante la fase del establecimiento *in vitro,* fueron cultivadas en el medio MS según lo reportado por Gonzalez *et al*. (2000). Cada 7 días se registró el número y tamaño de los brotes por explante. A los 7 días se observó solamente el desarrollo del brote cultivado (Figura 5C), sin embargo, desde los 14 días se observó la proliferación de brotes, con un aumento de éstos a los 21 y 28 días, hasta la producción de 13 brotes/explante (Figura 5D). El tamaño de los brotes también incrementó, de 0.3 hasta los 2 cm de longitud a los 28 días del cultivo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número y longitud de brotes de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi en yemas apicales cultivadas en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.06 mg/L de AIB.

Días	Número de brotes/explante	Longitud (cm)
7	1 ± 0.33^{a}	0.3 ± 0.031^{a}
14	5 ± 0.66^{b}	0.6 ± 0.054^{b}
21	8 ± 1.11^{c}	1.2 ± 0.111^{c}
28	13 ± 1.91^{d}	2.0 ± 0.219^{d}

Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey $p<0.05$, $n=25$).

Para el enraizado de éstos, los brotes fueron separados del explante y cultivados en MS de brotación (Figura 5E), debido a que durante los estudios se observó la aparición de raíces en los brotes cultivados. Los brotes micropropagados de zarzamora Cv. Tupi formaron el mayor

número de raíces a los 60 días del cultivo, generando plántulas de hasta 4 cm de altura con un promedio de 8 hojas y 3 raíces de 3.5 cm de longitud (Figura 5F).

La etapa de multiplicación *in vitro* tiene como función principal inducir la formación de brotes y el incremento en el número de éstos a partir de un explante (Hartmann y Kester, 1999). El cultivo de yemas apicales de zarzamora Cv. Tupi en el medio de multiplicación de brotes reportado por González *et al*. (2000) permitió la brotación múltiple con un óptimo número de brotes (13 brotes/explante), una respuesta mayor al conseguido por ellos. Orellana (1998) señala que la combinación balanceada entre auxinas y citocininas, es un factor determinante en la multiplicación de brotes.

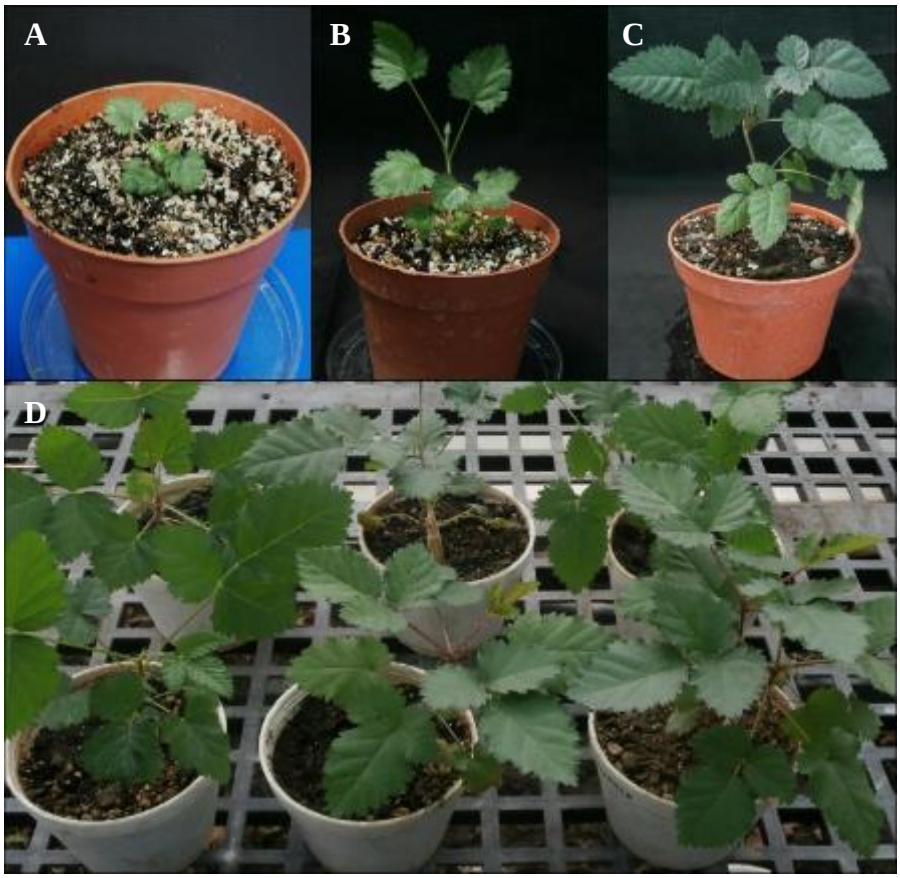


Figura 6. Plantas micropropagadas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) durante las diferentes etapas del cultivo *ex vitro*: A) Cultivo inicial en condiciones de aclimatación; B) Planta aclimatada a los 30 días del trasplante; C) Planta aclimatada a los 90 días del trasplante; D) Plantas bajo cultivo en condiciones de invernadero (>90 días).

Los brotes regenerados con este sistema de multiplicación, fueron utilizados para la obtención de mutantes irradiados con rayos gamma, los que se llevaron a su multiplicación y formación de plántulas en las condiciones y medio de cultivo establecidos.

Plántulas de 60 días de cultivo *in vitro* fueron trasplantadas a suelo (Figura 6A) y aclimatadas bajo condiciones de invernadero durante 30 días (Figura 6B), tiempo en el que mostraron un 100% de supervivencia y un crecimiento promedio de 7.8 cm de longitud, con tres pares de hojas. A los 90 días de cultivo, las plantas alcanzaron una longitud de hasta 16 cm y presentaron un 90% de supervivencia (Figura 6C), estas plantas mostraron la formación de tres ramas a partir del tallo principal. Estos resultados demuestran que con el sistema de micropropagación establecido para zarzamora Cv. Tupi, es posible producir un óptimo número de plantas, las que se comportan de manera óptima bajo condiciones de invernadero, como se observan en la figura 6D.

CONCLUSIONES

Se estableció de manera óptima el cultivo *in vitro* de yemas apicales y axilares de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), consiguiendo un 70% de supervivencia. La micropropagación fue obtenida por la multiplicación de brotes (13 brotes/explantes) en yemas axilares provenientes del brote inicial cultivadas en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.06 mg/L de AIB, a los 28 días del cultivo. La formación de plántulas se obtuvo en el mismo medio de cultivo de brotación, las que fueron exitosamente aclimatadas y cultivadas en invernadero con un 90% de supervivencia y óptimo crecimiento.

REFERENCIAS

Ahmed, Z., Akhter F., Haque S., Banu H., Rahman M. y Faruquzzaman M. 2001. Novel micropropagation system. OnLine Journal of Biology Sciences, 1(11):1106-1111.

Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En propagación y mejora genética de plantas por biotecnología (Pérez J.N., Ed. Instituto de Biotecnología de las Plantas), Cuba. 81-104.

Cassells, A.C. 1991. Problems in tissue culture: culture contamination. In: Micropropagation (Debergh P. y Zimmerman R.H., Eds.). Dordrecht, The Netherland. Kluwer Academic Publishers, 31-45.

González, M., López M., Valdéz A. y Ordás R. 2000. Micropropagation of three berry fruits species using nodal segments from field grown plants. Annals of Applied Biology, 137:73-78.

Gutiérrez, A., Santacruz F., Cabrera J.L. y Rodríguez B. 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. e-Gnosis, 1:1-19.

Hartmann, H. y Kester D. 1999. Propagación de plantas: Principios y prácticas. 7ª ed. México D.F. Compañía Editorial Continental S.A. 760.

Hernández, Y. y González M. 2010. Efectos de la contaminación bacteriana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultivos Tropicales, 31(4):1-9.

Jones-Castro, F. 2006. Establecimiento *in vitro* y micropropagación de Frambuesa (*Rubus ideaus* L.) utilizando medio semisólido y medio líquido en RITA®. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago. 59.

Kyte, L. y Kleyn J. 1996. Plants from test tubes: An introduction to Micropropagation. Tercera Edición. Editorial Timber Press EUA. 240.

López-Antonio, Y. 2013. Micropropagación de muicle (*Justicia spicigera* Schlecht. *et* Schltdl.: Acanthaceae) por cultivo de yemas apicales y axilares. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, UMSNH. 58.

Mendel, F. 1989. Propagación y plantación de Frambueso y Espárragos. Universidad Austral de Chile. Valida, Chile. 33.

Murashige, T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-497.

Orellana, P. 1998. Introducción a la propagación masiva. In: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología (Pérez J.N., Ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba. 125-132.

Pérez-Molphe, B.E., Ramírez R., Núñez H.G. y Ochoa N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. 179.

Sánchez-García, P. 2009. Nutrición de zarzamora. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. 37.

SIAP-SAGARPA. 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México. Zarzamora. http://www.siap.gob.mx/zarzamora/.

Tapia-Rodríguez, A. 2008. Determinación del efecto antifúngico de los extractos de las plantas *Achillea millefolium, Artemisia mexicana, Heterotheca inuloides* y *Eryngium carlinae* sobre hongos patógenos de fresa (*Fragaria* x *ananassa* Duch. Cv. Aromas). Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, UMSNH. 58.

Tisserat, B. 1991. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: Plant cell culture (Dixon R.A., Ed.). IRL Press, Oxford, 79-105.

Uribe, M.E., Delaveau C., Garcés M. y Escobar R. 2008. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. Bosque, 29(1):58-64.

Villalobos-Arámbula, A.V. 1990. Historia del cultivo de tejidos. In: Fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales (Rossell C.H. y Villalobos A.V.M., Eds.). FAO, 105:3-7.

7.2. ESTABLECIMIENTO DE LA CURVA DE RADIOSENSIBILIDAD A RAYOS GAMMA EN BROTES DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) Y SELECCIÓN DE LA DL_{50}.

RESUMEN

Con el propósito de establecer la curva de radiosensibilidad a rayos gamma para la obtención de mutantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), los brotes procedentes de plantas *in vitro* fueron irradiados empleando una fuente de radiación gamma $Co_{60,}$ aplicando cinco dosis de radiación (0, 15, 30,45 y 60 Gy). Los brotes fueron cultivados en medio MSB, MS con 1.0 mg/L de benciladenina (BA) y 0.06 mg/L de ácido indolbutírico (AIB), 30 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar (pH 5.7), en condiciones de cuarto de cultivo (25 °C, 16 h luz fotoperiodo, 132 $\mu mol/m^2s$). Para obtener la dosis letal media (DL_{50}), se cuantificó el porcentaje de mortalidad de los explantes a los 28 días del cultivo, obteniendo un 100% de mortalidad con la dosis de 60 Gy, observando que la mortalidad fue dependiente de la dosis, encontrando una DL_{50} calculada de 30.82 Gy. A esta dosis, fueron irradiados 200 brotes que fueron cultivados por 28 días *in vitro* para seleccionar los sobrevivientes. A este tiempo, se observaron variaciones en el crecimiento de los brotes regenerados, como la disminución del número y longitud de los brotes; así como la formación de callo y de raíces en la parte aérea de algunas plántulas. Los brotes con un mínimo de variación en el crecimiento y características fenotípicas, fueron subcultivados en medio MSB por 60 días para su brotación múltiple, para posteriormente cultivarlos de forma individual en MS con 0.05 mg/L de BA y conseguir la regeneración de plántulas, las cuales serán sometidas a las pruebas de tolerancia *in vitro* a *B. cinerea.*

Palabras clave: mejoramiento genético, mortalidad, mutagénesis, selección *in vitro.*

ABSTRACT

In order to establish the radiosensitivity curve to gamma rays to obtain mutants of blackberry (*Rubus fruticosus* CV. Tupi), shoots from *in vitro* plants were irradiated using a Co_{60} gamma radiation source, by applying five doses of radiation (0, 15, 30,45 and 60 Gy). The shoots were cultured on MSB medium, MS medium with 1.0 mg/L benzyladenine (BA) and 0.06 mg/L indolebutyric acid (IBA), 30 g/L sucrose and 8 g/L agar (pH 5.7), in room culture conditions (25 °C, 16 h light photoperiod, 132 $\mu mol/m^2s$). The percentage of mortality at 28 days was quantified to obtain the median lethal dose (LD_{50}), obtaining a 100% mortality with a dose of 60 Gy, noting that mortality was dose-dependent, finding a calculated LD_{50} of 30.82 Gy. At this dose, were irradiated 200 shoots that were *in vitro* grown for 28 days to select the survival shoots. At this time, variations in the growth of regenerated shoots, as the decrease in the number and length of the shoots were observed; as well as the formation of callus and roots in the aerial part of some plantlets. Shoots with a minimum of variation in growth and phenotypic characteristics, were subcultured on medium MSB for 60 days for multiple

shooting, then cultivate them individually in MS with 0.05 mg/L BA and achieve the regeneration of plantlets, which will be subjected to *in vitro* tests of tolerance to *B. cinerea.*

Keywords: Genetic improvement, mortality, mutagenesis, *in vitro* selection.

INTRODUCCIÓN

La importancia socioeconómica del cultivo de zarzamora *(Rubus fruticosus* Cv. Tupi) en México, sobre todo en el estado de Michoacán se deriva del beneficio entre productores, comercializadores, industrializadores y consumidores. Los huertos de zarzamora generan empleo al demandar mano de obra para realizar podas, riegos, fertilización, cuidado fitosanitario, la colecta, la selección, el empaque y la comercialización (SIAP-SAGARPA, 2015). Sin embargo, un inconveniente en la producción de zarzamora son las enfermedades causadas por hongos, siendo la más importante y devastadora la conocida como "podredumbre gris", que es causada por el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (Rebollar-Alviter, 2011). La mayor parte de las estrategias de control utilizadas hasta el momento se han basado en el empleo de agentes químicos. Sin embargo, la utilización de fungicidas es cada vez menos recomendable y más restringida debido a los problemas de contaminación ambiental que de su aplicación se derivan y por la frecuente aparición de cepas del patógeno resistentes a los fungicidas utilizados, es por ello que una de las alternativas para controlar la enfermedad es la obtención de genotipos tolerantes a *B. cinerea*, haciendo uso de herramientas biotecnológicas (Singh *et al*., 2007).

Las técnicas *in vitro* son una herramienta de la biotecnología moderna, importante para los programas de mejoramiento de plantas, con el propósito de introducir nuevas características en plantas seleccionadas, multiplicar las selecciones élite y desarrollar cultivares adecuados en un tiempo mínimo (Taji *et al*., 2002). Mediante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se han realizado diversos métodos para conseguir plantas mejoradas, la transformación genética, la selección de variantes y la inducción de mutantes, son ejemplos de ellos (Jain, 2010).

En los últimos años, la mutagénesis inducida es una herramienta importante en el mejoramiento genético de los cultivos, es una técnica ampliamente utilizada para generar variación genética y nuevas variedades de las plantas cultivadas, además de que está libre de las restricciones y regulaciones impuestas a los organismos genéticamente modificados (Waugh *et al*., 2006; Shu y Lagoda, 2007; Parry *et al*., 2009).

Para la obtención de mutantes pueden utilizarse diferentes materiales vegetales, tales como protoplastos, células en suspensión, callos y explantes (segmentos de plantas), a partir de los cuales se establecen los sistemas de regeneración de plantas (Predieri y Zimmerman, 2001). En los años recientes se prefiere inducir mutagénesis en tejidos vegetativos más que en semillas, ya que con éstas últimas no hay homogeneidad en la obtención de mutantes, por la producción de quimeras. Existen varios métodos de mutagénesis, clasificados en 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 (Pacheco-Gómez *et al*., 2000).

La utilización de radiaciones gamma como una alternativa para obtener variación genética por la vía de mutaciones inducidas, es una técnica empleada hoy en día con bastante frecuencia en el mejoramiento genético de plantas y ha permitido la obtención de genotipos superiores en corto tiempo. 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). Para las especies de reproducción asexual como la zarzamora, la inducción de mutaciones mediante la exposición de tejido somático a radiación ionizante puede provocar cambios en el material genético de las células y así obtener plantas mutantes (Robles, 1986).

En la inducción de mutantes, la determinación de la radiosensibilidad de los tejidos se logra exponiendo el material a un rango de intensidades de radiaciones y seleccionando aquellas dosis que permitan observar efectos visibles de la radiación, pero manteniendo una supervivencia en los tejidos (Tulmann-Neto, 1997). Los individuos mutantes presentan

cambios negativos en una frecuencia creciente conforme aumenta la dosis de radiación, por lo que es importante determinar la dosis letal media (DL_{50}), que corresponde a la cantidad de radiación absorbida con la cual sobrevive el 50% de la población que ha sido expuesta, proporción que se considera como el rango donde se favorece la aparición de mutaciones útiles en los programas de mejoramiento genético (Morela *et al*., 2002).

Con el objetivo de obtener plantas mutantes de zarzamora (Cv. Tupi), en la presente investigación se irradiaron brotes micropropagados (ver Sección 7.1) con rayos gamma, determinando la DL_{50} en los tejidos irradiados y la curva de radiosensibilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Brotes de zarzamora.- Se utilizaron brotes de 8 a 10 mm de longitud, vigorosos y sin síntomas de enfermedades, obtenidos por la regeneración *in vitro* en yemas apicales de plántulas micropropagadas (ver Sección 7.1). Los brotes fueron obtenidos de explantes cultivados en MS con 1.0 mg/L de Benciladenina (BA) y 0.06 mg/L de ácido indolbutírico (AIB), 30 g/L de sacarosa, 8 g/l de agar y pH 5.7 (medio de brotación, MSB), en condiciones de cuarto de cultivo (25°C, 16 h luz fotoperiodo, 132 $\mu mol/m^2s$).

Irradiación con rayos gamma Co_{60}

En el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) (Toluca, Edo. de México), se utilizó un irradiador Gammacell Modelo GO-220 ® (Ontario, Canadá) para aplicar cinco dosis de irradiación: 0 (testigo), 15, 30, 45 y 60 Gy con rayos gamma de Co_{60}. La irradiación se llevó a cabo a los 28 días después de la formación *in vitro* de los brotes.

Inicialmente se irradiaron un total de 15 brotes por tratamiento, cultivados en MSB, sometiendo 5 brotes/caja Petri a las diferentes dosis de irradiación. A las 24 horas de la irradiación, los brotes fueron transferidos al medio MSB para evitar la desnaturalización de sus componentes producida por el efecto de las radiaciones y cultivados en condiciones de cuarto de cultivo por 28 días, tiempo al que se evaluó el porcentaje de mortalidad para obtener

la DL_{50} (Pabón-Calderón, 2011). Con la DL_{50} seleccionada se irradiaron 200 brotes para la obtención de un mayor número de mutantes.

Descripción fenotípica de las plantas irradiadas

La descripción fenotípica de la población se evaluó a los 28 días después de la inducción, en donde fueron evaluados 92 explantes irradiados además del control.

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=25 (programa estadístico JMP 8). Para realizar la prueba de ANOVA, los datos en porcentajes se transformaron con la fórmula siguiente (Steel y Torrie, 1980), donde X es el valor en porcentaje a transformar:

$$\sqrt{X + 0.5}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los 28 días del cultivo en MSB, de los brotes irradiados de zarzamora Cv. Tupi, con las diferentes dosis de rayos gamma (0, 15, 30, 45 y 60 Gy), se obtuvo la DL_{50} mediante la curva de radiosensibilidad, con los datos reportados en el Cuadro 5. En éste se muestran los porcentajes de mortalidad de los brotes por cada dosis de radiación, observando un incremento gradual de la mortalidad, dependiente de la dosis. El mayor porcentaje de mortalidad (100%) se obtuvo en el tratamiento con 60 Gy, a una dosis mayor de 30 Gy se obtuvo el 66.66% de mortalidad, por lo que un 50% de mortalidad correspondería a una dosis entre 30 y 45 Gy.

La DL_{50} calculada fue de 30.82 Gy, indicativo que a esta dosis de radiación gamma se produce el 50% de mortalidad del número de brotes expuestos. Este valor fue calculado con la ecuación de la curva de radiosensibilidad, la que mostró un óptimo coeficiente de regresión (R^2=0.9563) (Figura 7).

Cuadro 5. Porcentajes de mortalidad de los brotes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) sometidos a las diferentes dosis de radiación gamma Co_{60} a los 28 días después de la irradiación.

No. Trat.	Dosis de radiación (Gy)	Mortalidad (%)
1	0	0^{a}
2	15	33.33^{b}
3	30	40.00^{c}
4	45	66.66^{d}
5	60	100^{e}

Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey $p<0.05$, $n=25$).

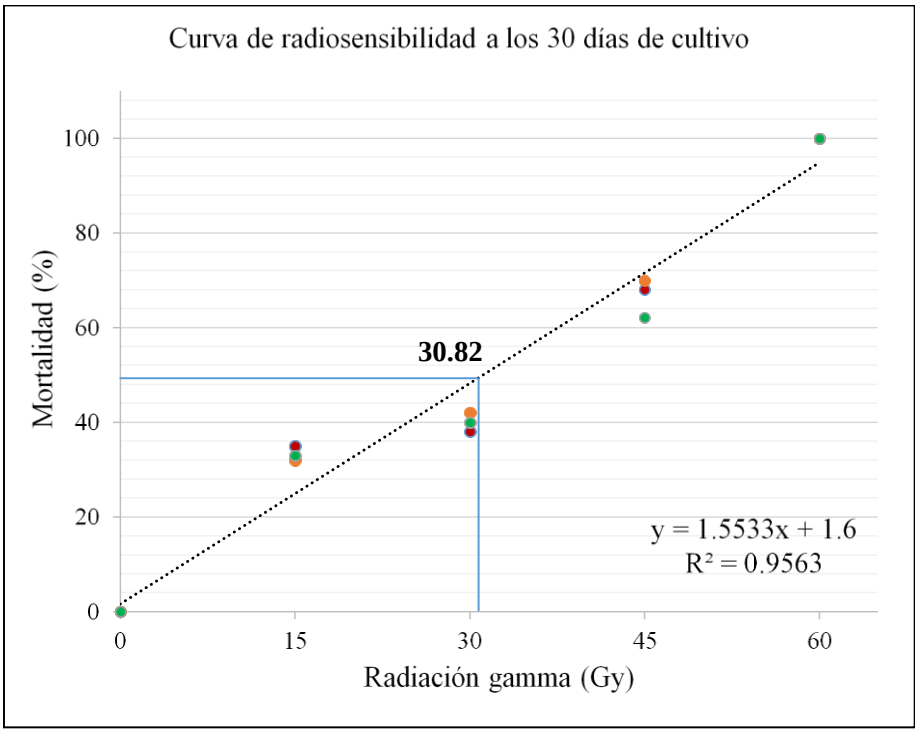


Figura 7. Curva de radiosensibilidad del porcentaje de mortalidad de brotes *in vitro* de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) irradiados con rayos gamma Co_{60}, para la determinación de la DL_{50} a los 28 días del cultivo en MSB.

Durante el cultivo de los brotes irradiados, algunos de los sobrevivientes presentaron lesiones asociadas a la irradiación como clorosis y necrosis de manera parcial, principalmente aquellos que fueron tratados con las dosis más altas. En la figura 8 se muestran brotes irradiados, con características similares a brotes no irradiados (Figura 8A), así como brotes cloróticos (Figura 8B) y necróticos (Figura 8C), estos últimos generalmente culminaron en brotes muertos.

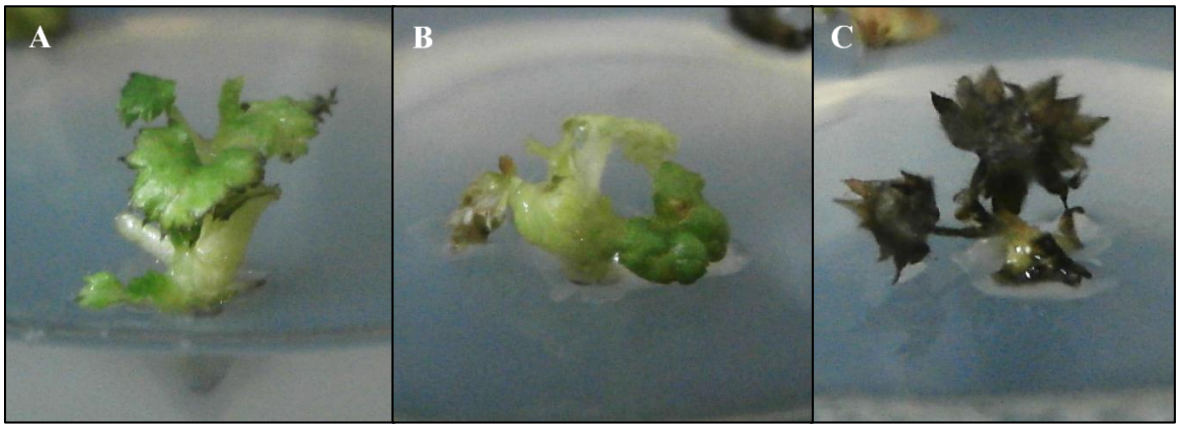


Figura 8. Brotes de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi irradiados con rayos gamma: A) Sin cambios; B) Cloróticos; y C) Necróticos.

Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con lo reportado en diversas investigaciones, en las que la DL_{50} es menor a los 40 Gy. García-Rodríguez *et al*. (2000) reportaron que la DL_{50} para brotes de plátano cultivar Gran Enano se obtuvo en una radiación de 25 Gy, mientras que en radiaciones superiores a los 40 Gy, hubo una mortalidad del 82%. Zamir (2003) reporta una DL_{50} de 45 Gy en brotes de *Psidium guayaba,* y Ángeles-Espino, (2013) reportó en plántulas de *Agave tequilana* una DL_{50} menor de 25 Gy.

Con la dosis de radiación seleccionada en esta investigación, se procedió al tratamiento de 200 brotes de zarzamora Cv. Tupi, para la inducción de mutagénesis de forma masiva, con el objetivo de evaluar la respuesta de éstas en bioensayos de tolerancia a *Botrytis cinerea*. Los brotes sobrevivientes fueron primeramente cultivados en MSB por 60 días para la micropropagación de líneas mutantes y regeneración de plántulas. Éstas fueron consideradas

mutantes por presentar un crecimiento similar a las plántulas no tratadas, las que no mostraron lesiones asociadas a la irradiación por rayos gamma.

Descripción fenotípica de plantas irradiadas con la DL_{50}

Una considerable variación fenotípica fue observada en los brotes regenerados después del tratamiento mutagénico. En el cuadro 6 puede observarse que tanto el número de brotes como la longitud de los mismos disminuyeron de manera significativa en las plantas irradiadas en comparación con las plantas provenientes de brotes no irradiados (control).

Cuadro 6. Número y longitud de brotes de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi en plantas no irradiadas e irradiadas con la DL_{50} cultivadas en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.06 mg/L de AIB, a los 28 días de cultivo.

	Número de brotes/explante	**Longitud (cm)**
Control	13 ± 1.91^{a}	2 ± 0.219^{a}
Irradiadas	1.6 ± 0.36^{b}	1.3 ± 0.122^{b}

Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey $p<0.05$, $n=25$).

Se ha reportado durante muchos años que la exposición de especies vegetales a la radiación gamma, produce alteraciones capaces de generar mutantes. Muchas de estas alteraciones confieren características únicas a los individuos expuestos, algunas de las cuales pueden ser fatales, pero se ha reportado también que podrían ser beneficiosas. La exposición a la radiación en brotes de zarzamora contribuyó a la muerte de algunos (Figura 8C).

La disminución en la producción de fitohormonas endógenas en plantas sometidas a radiación es un fenómeno observado en plantas irradiadas (Gordon, 1957), dando como efecto secundario la disminución del número y tamaño de brotes, raíces y en una reducción en el crecimiento general de la planta. También se ha evidenciado la formación de estructuras como callos, aparición de pigmentación y el desarrollo de hojas con malformaciones, lo cual

es congruente con lo expuesto en la presente investigación, donde se puede observar desde los primeros días post irradiación, que ésta afectó la supervivencia de los brotes, así como la producción y longitud de los mismos, en comparación con lo observado en plantas control (Cuadro 6).

Resultados similares fueron reportados para la regeneración *in vitro* de brotes adventicios en secciones internodales de clavel (*Dianthus gratianopolitanus*), donde el desarrollo de brotes se redujo de 1.1 a 0.1 brotes por explante (Jerzy y Zalewska, 2000); en plantas de comino negro (*Nigella sativa*), la altura de las plantas disminuyó de 54.86 ±0.45 a 36.84 ±0.29 cm (Kumar y Gupta, 2007) y en plantas regeneradas de yemas irradiadas de tomatillo (*Physalis peruviana*), se observó la disminución de la altura de las plantas de 2.2 a 1.8 cm (Estrada-Basaldua *et al*., 2011).

Álvarez *et al*. (2000) al irradiar yemas múltiples de banana del cultivar 'Dominico Hartón' (AAB) a una dosis de 25 Gy, obtuvieron 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%). Orellana *et al.* (2008) obtuvieron cinco mutantes a partir del plátano cultivar 'FHIA 21' (AAAB) al irradiar yemas múltiples cultivadas *in vitro* a una dosis de 25 Gy.

Además de la disminución de la longitud y el número de brotes, las plantas tratadas presentaron diferentes respuestas fenotípicas asociadas a la radiación, como la formación de callos (Figura 9A), cambios en la coloración de las hojas (Figura 9B y C) y la formación de raíces en la parte aérea de la planta (Figura 9D y E).

La variación en la coloración de las plántulas ha sido reportada en varios estudios de inducción de mutaciones, entre ellos se destacan las investigaciones en el cultivo de plátano (García-Rodríguez *et al*., 2000). Novak y Brunner (1990) cuando trató brotes del cultivar Gran Enano con radiación gama obtuvo variación en los cambios de coloración de la planta.

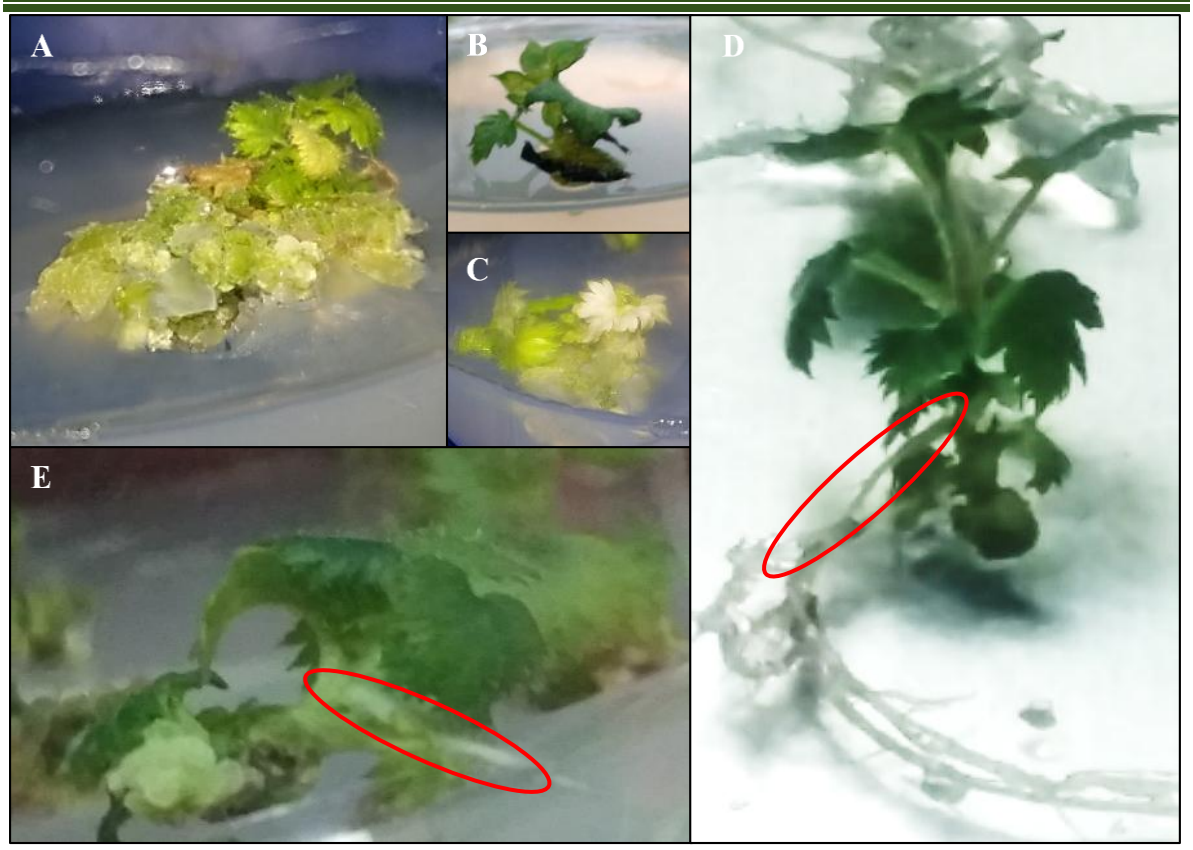


Figura 9. Brotes de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi irradiados con rayos gamma: A) Formación de callo; B y C) cambios en la coloración de las hojas; y D y E) Formación de raíces en la parte aérea.

En la actualidad se sabe que los mecanismos de iniciación de un callo se presentan como respuesta de las plantas a heridas, estas respuestas activan productos específicos de situaciones de estrés. Una de las reacciones del tejido como consecuencia de la exposición a la radiación, es la conocida reacción de estrés, donde el tejido es capaz de liberar fitohormonas que demanda una respuesta de adaptación ante la radiación (Medina-Araujo y Reyes-Torres, 2002; McSteen y Zhao, 2008).

En el presente estudio, las deformaciones observadas en las plantas que se desarrollaron a partir de los brotes irradiados, sugieren el desarrollo de quimeras que indican que la radiación gamma sí afectó la variación genética de plántulas de zarzamora. De los 200 brotes irradiados con la DL_{50}, solo 92 fueron considerados óptimos por presentar un desarrollo similar al

control, éstos fueron micropropagados y utilizados posteriormente en pruebas de tolerancia contra *B. cinerea*, consideradas como líneas mutantes.

CONCLUSIONES

Se obtuvo la curva de radiosensibilidad a rayos gamma en brotes de zarzamora *in vitro* (*R. fruticosus* Cv. Tupi), estableciéndose la intensidad de 30.82 Gy como la DL_{50}. Con ésta se seleccionaron 92 diferentes plántulas regeneradas de brotes irradiados, por presentar características de crecimiento y desarrollo similar al de las plántulas no irradiadas.

REFERENCIAS

Álvarez, H.F., Cuartas M.H., y Aristizábal L.M. 2000. Crecimiento y desarrollo del plátano 'Dominico Harton' (Musa AAB, Simmonds) sometido a radiación con Co_{60}. Resumen de investigación. Manizales. Colombia. Fitotecnia, 35:1-4.

Ángeles-Espino, A., Valencia-Botín A.J., Virgen-Calleros G., Ramírez-Serrano C., Paredes-Gutiérrez L. y Hurtado-De la Peña S. 2013. Determinación de la dosis letal (DL_{50}) con Co_{60} en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul. Revista Fitotecnia Mexicana, 36(4):381-386.

Estrada-Basaldua, J.A., Pedraza-Santos M.E., De la Cruz-Torres E., Martínez-Palacios A., Sáenz-Romero C. y Morales-García J.L. 2011. Efecto de rayos gamma Co_{60} en nardo (*Polianthes tuberosa* L.). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 3:445-458.

García-Rodríguez, L., Bermúdez-Caraballoso I., Orellana-Pérez P., Veitía-Rodríguez N., García-Rodríguez L., Clavero-García J. y 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.

Gordon, S. 1957. The effects of Ionizing on Plants: Biochemical and Physiological Aspects. Chicago Journal, l:3-14.

Jain, S.M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica, 118:153-166.

Jerzy, M. y Zalewska M. 2000. Effect of X and gamma rays on *in vitro* adventitious bud production of pot carnation (*Dianthus gratianopolitanus* Vill.). Revista Chapingo, Serie Horticultura, 6(1):49-52.

Kumar, G. y Gupta P. 2007. Mutagenic efficiency of lower doses of gamma rays in black cumin (*Nigella sativa* L.). Cytologia, 72(4):435-440.

McSteen, P. y Zhao Y. 2008. Plant hormones and signaling: common themes and new developments. Development Cell, 14(4):467-73

Medina-Araujo, S.M. y Reyes-Torres P.J. 2002. Radiaciones ionizantes y efectos sobre la materia. Revista Ciencia e Ingeniería Neogranadina, 12:31-39.

Morela, F., Ventura G.S. C., Díaz E. y Castro L. 2002. Efecto de la radiación Gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos. Agronomía Tropical, 52:311-323.

Novak, F., y Brunner H. 1992. Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. International Atomic Energy Agency bulletin, 4:25-33.

Orellana, P. 2008. Mejoramiento de clones de plátanos y bananos con el empleo de las mutaciones *in vitro* y la selección clonal. Informe técnico final del proyecto nacional 015000064. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. 4-8.

Pabón-Calderon, L.A. 2011. Inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma de (*Passiflor edulis* Sim var. *Edulis*). Tesis de Mestría. Universidad Nacional de Colombia. 105.

Pacheco-Gómez, M., López-Meza J.E. y 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, 3:15-19.

Parry, M.A.J., Madgwick P.J., Bayon C., Tearall K., Hernández L.A., Baudo M., Rakszegi M., Hamada W., Al-Yassin A., Ouabbou H., Labhilili M. y Phillips A.L. 2009. Mutation discovery for crop improvement. Journal Experimental Botany, 60(10):2817-2825.

Predieri, S. y Zimmerman R.H. 2001. Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma rays and field selection for productivity and fruit traits. Euphytica, 3:217-227.

Rebollar-Alviter, A. 2011. Manejo del mildiú y el moho gris de la zarzamora en Michoacán. 1ª. Ed., Universidad Autónoma Chapingo, 1ª. Ed. 34.

Robles, S.R. 1986. Genética elemental y fitomejoramiento práctico. 1ª ed. Ed. Limusa Wiley, 475.

Shu, Q.Y. y Lagoda P.J.L. 2007. Mutation techniques for gene discovery and crop improvement. Molecular Plant Breeding, 5:193-195.

SIAP-SAGARPA. 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México. Zarzamora. http://www.siap.gob.mx/zarzamora/

Singh, R., Sharma R.R. y Goyal R.K. 2007. Interactive effects of planting time and mulching of Chandler strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.). Scientia Horticulturae, 111:334-351.

Steel, R.G.D. y Torrie J.H. 1980. Principles and procedures of statistics: A biomedical approach (2nd Ed.). McGraw-Hill Book Co., New York. 622.

Taji, T., Ohsumi C., Iuchi S., Seki M., Kasuga M., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 29:417-426.

Tulmann-Neto, A. 1997. Utilización de radiaciones gamma en el mejoramiento de plantas autógamas. En Curso Mutaciones Inducidas en el mejoramiento de plantas. AIEA-UDO, Núcleo Monagas.

Waugh, R., Leader D.J., McCallum N. y Caldwell D. 2006. Harvesting the potential of induced biological diversity. Trends in Plant Science, 11(2):71-79.

Zamir, G., Khattak S., Mohammad T., Shah S.A., Khan A.J. y Ali N. 2003. *In vitro* mutagenesis in guava (*Psidium guajava* L.). Pakistan Journal of Botany, 35(5):825-828.

7.3. BIOENSAYOS DE TOLERANCIA *in vitro* EN PLANTAS MUTANTES DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) SELECCIONADAS CON FILTRADO ESTÉRIL DE *Botrytis cinerea.*

RESUMEN

Una alternativa para evitar o bien disminuir el uso de fungicidas sintéticos para el control de del hongo *Botrytis cinerea*, agente causal de la podredumbre gris en el cultivo de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), es la selección *in vitro* de líneas mutantes tolerantes a hongos, utilizando el filtrado de hongo estéril como agente de selección. Con este objetivo, se determinó la CL_{50} de filtrado estéril de *B. cinerea*, por el cultivo de plántulas no irradiadas por 28 días en seis concentraciones (0, 2, 4, 6, 8 y 10 g/L), determinando los porcentajes de mortalidad. El filtrado de hongo consistió en una suspensión obtenida por pesar micelio con esporas (peso fresco) de *B. cinerea* en un volumen conocido de agua, que una vez que se esterilizó y filtró, una alícuota correspondiente a cada concentración de micelio (peso fresco) fue adicionada al medio de cultivo MS. A los 28 días del cultivo, se observó un 100% de mortalidad de los explantes en 6, 8 y 10 g/L del filtrado estéril de *B. cinerea* y un 50% de mortalidad con 4 g/L, considerándola como la CL_{50}. Plántulas micropropagadas a partir de los brotes irradiados, que mostraron un óptimo crecimiento, fueron sometidas a la selección en medio MSB con 4 g/L de filtrado estéril de *B. cinerea*, seleccionando 32 líneas consideradas como mutantes tolerantes por presentar una supervivencia mayor al 50%, las cuales fueron sometidas a pruebas de tolerancia *in vitro* con bioensayos de infección con esporas ($1x10^3$ esporas/mL) de *B. cinerea* en hojas y planta *in vitro*. Con esta metodología se seleccionaron 5 líneas RFGUM5, RFGUM6, RFGUM16, RFGUM17 y RFGUM18 consideradas como mutantes tolerantes a *B. cinerea*.

Palabras clave: brotes, hongo, mutagénesis, selección *in vitro.*

ABSTRACT

An alternative to avoid or reduce the use of synthetic fungicides for the control of the fungus *Botrytis cinerea* causal agent of the mold gray on the blackberry plants, is the *in vitro* selection lines of tolerant or resistant to fungi, using sterile fungus filtrate as selecting agent. With this objective, was determined the LC_{50} of sterile *B. cinerea* filtrate, by the cultivation of micropropagated plantlets not irradiated by 28 days in six concentrations (0, 2, 4, 6, 8 and 10 g/L), determining the percentages of mortality. Fungus filtrate consisted of a suspension obtained by weighing mycelium with spores (fresh weight) of *B. cinerea* in a known volume of water, which once was it sterilized and filtered, an aliquot part corresponding to each concentration of mycelium (fresh weight) was added to the culture medium MS. At 28 days of cultivation, it was observed 100% mortality in 6, 8 and 10 g/L of sterile *B. cinerea* filtrate and 50% mortality with 4 g/L, considering it as the LC_{50}. Micropropagated plantlets from irradiated shoots, that showed an optimal growth, were subject to the selection on MSB medium with 4 g/L of sterile *B. cinerea* filtrate, selecting 32 lines considered as tolerant mutants by present a survival greater to the 50%, which were subject to *in vitro* tests of

tolerance in leaves and plantlets, infecting with $1X10^3$ spores/mL of *B. cinerea*. Using this methodologies, five lines were selected RFGUM5, RFGUM6, RFGUM16, RFGUM17 y RFGUM18 and considerate tolerant mutants to *B. cinerea*.

Keywords: shoots, fungus, mutagenesis, *in vitro* selection.

INTRODUCCIÓN

B. cinerea es el agente causal de la enfermedad de la podredumbre o moho gris, generando pérdidas de hasta el 100% en casos extremos en diversas plantas de importancia agronómica. En zarzamora (*Rubus* spp), *B. cinerea* puede atacar en cualquier estadio de desarrollo del cultivo, así como infectar cualquier órgano de la planta, incluyendo flores, frutos, hojas, brotes y tallos (Rebollar-Alviter, 2011). Las infecciones generalmente provienen de esporas producidas en residuos de tallos viejos, hojas caídas y frutos momificados, donde el hongo sobrevive como esclerocio (estructuras fungosas de supervivencia). Las esporas se dispersan por el viento y se depositan en las partes florales y frutos. Si la superficie de éstos es húmeda y las condiciones son favorables para la germinación de la espora, el hongo puede ocasionar lesiones necróticas en los pétalos e infectar las partes florales permaneciendo latente en frutos verdes. Aunque los frutos verdes son poco susceptibles a la infección, la falta de síntomas en ellos no indica que no hayan sido infectados durante la floración. Estas infecciones se manifiestan después de la cosecha a manera de masas de esporas con micelio de color gris que cubren los frutos. En condiciones de campo pocas veces se va a observar la esporulación típica de este hongo en frutos, como ocurre en otras frutillas (Benito-Pescador, 2010).

Este hongo es, sin duda, una de las especies económicamente más importantes, por lo cual, la determinación de patogenicidad es fundamental en la identificación de materiales con tolerancia al mismo. Se utilizan varios parámetros para cuantificar los niveles de enfermedad en estudios epidemiológicos y de severidad. Síntomas visuales de necrosis o decoloración de los tejidos son evaluados en una escala de gravedad (Ribichich *et al.*, 2001), ya sea en un solo punto en el tiempo o varias fechas. La evaluación de la patogenicidad es un aspecto fundamental en este tipo de estudio. Los bioensayos de patogenicidad *in vitro* resultan ser

entonces una herramienta efectiva ya que arrojan resultados rápidos y en el caso de cultivos como zarzamora llega a ser un procedimiento efectivo (Agrios, 2007).

Debido a que el control con el uso de fungicidas químicos, de la enfermedad ocasionada por *B. cinerea* en frutos de zarzamora, tanto en campo como en poscosecha, es ineficiente y presenta como inconveniente la contaminación ambiental y efectos nocivos para la salud humana, la búsqueda de resistencia natural es una alternativa para obtener genotipos tolerantes a este patógeno (Singh *et al*., 2007). Mediante herramientas biotecnológicas como la selección *in vitro*, se han obtenido líneas mutantes tolerantes o resistentes a hongos, utilizando filtrados de hongo estéril como agente de selección (Patiño-Torres *et al*., 2007). El empleo de fitotoxinas para la obtención de material resistente a enfermedades a través de procesos de selección *in vitro*, es una técnica ampliamente utilizada desde hace ya varias décadas, con resultados exitosos en diversas plantas tolerantes a hongos de importancia comercial (Daub, 1986; Švânová y Lebeda, 2005).

Estudios en los que se utilizaron filtrados de hongo que contenían pectinasas (Orlando *et al.*, 1997) o metabolitos secundarios (Jayasankar *et al*., 1999) producidos por *Rhizoctonia fragarie* o *C. gloeosporioides*, respectivamente, han demostrado el éxito de la selección *in vitro* para obtener plantas tolerantes a hongos. *B. cinerea* produce diferentes sustancias que al parecer están implicadas en mayor o menor grado en el proceso de la patogénesis y en la manifestación de los síntomas de la enfermedad (Poveda-Parra, 2006).

El objetivo del presente estudio fue seleccionar plantas mutantes previamente irradiadas con rayos gamma (ver Sección 7.2), estableciendo la CL_{50} del filtrado estéril de *B. cinerea*, evaluando la tolerancia de 92 líneas mutantes, realizando la caracterización del crecimiento y variaciones fenotípicas, así como las pruebas de tolerancia en bioensayos *in vitro* con hoja y planta completa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Plántulas de zarzamora irradiadas.- Se utilizaron 92 líneas mutantes de plántulas de zarzamora *in vitro*, micropropagadas a partir de brotes irradiados con 30.82 Gy, que mostraron características de crecimiento similar a las plantas no irradiadas y sin presentar síntomas de la enfermedad ocasionados por *B. cinerea* (ver Sección 7.2).

Botrytis cinerea.- La cepa utilizada para el presente trabajo pertenece al cepario del laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo, donado por el Dr. Eduardo Valencia Cantero. La cepa se mantuvo en un medio de cultivo PDA (papa dextrosa-agar) en cámara de crecimiento (24 °C, 16 h luz fotoperiodo con 200 $\mu mol/m^2s$ y 60% de humedad). Las transferencias a medio fresco se realizaron cada 21 días. La suspensión de esporas se obtuvo a los 21 días de cultivado el hongo, obteniendo las esporas por adicionar agua destilada sobre el micelio y agitando suavemente para remover la mayor cantidad de esporas. Éstas se recolectaron en tubos Eppendorf y se almacenaron en refrigeración a 4 °C. La cuantificación de esporas se realizó en cámara de Neubauer, con el protocolo y cálculos ya establecidos para este método, preparando una solución de $1x10^3$ esporas/mL.

Obtención del filtrado estéril del hongo

El filtrado estéril se obtuvo a partir de la cepa de *B. cinerea* incubada durante 30 días en medio PDA en condiciones de cámara de crecimiento. Este filtrado se obtuvo por el raspado de micelio (con esporas) mediante una espátula estéril, del que se preparó una solución concentrada con 10g de micelio por L de agua. Esta solución fue esterilizada en autoclave por 30 min para posteriormente someterla a filtración para eliminar residuos sólidos. Previo su adición a los medios de cultivo, se realizó una prueba de esterilidad, inoculando 50µL en medio PDA por 5 días, asegurando la inocuidad del filtrado estéril. A partir del filtrado, se prepararon seis tratamientos con diferentes concentraciones (0, 2, 4, 6, 8 y 10 g/L) en medio MS con 0.05 mg/L de BA, óptimo para el crecimiento de plántulas de zarzamora. Con estos tratamientos se evaluó el porcentaje de mortalidad a los 28 días después del cultivo.

Determinación de la CL_{50} de filtrado estéril de <u>B. cinerea</u>

Para realizar la selección de líneas mutantes de zarzamora tolerantes a *B. cinerea*, primeramente se obtuvo la CL_{50} del filtrado estéril de *B. cinerea*, mediante la siembra de plántulas de zarzamora Cv. Tupi no irradiadas, en MS con 0.05 mg/L de BA con 0, 2, 4, 6, 8 y 10 g/L del filtrado estéril. A los 28 días del cultivo, se determinaron los porcentajes de mortalidad para cada concentración (n=10).

Selección de plantas de zarzamora tolerantes en filtrado estéril de <u>B. cinerea</u>

La selección de líneas mutantes de plántulas de zarzamora se realizó con la siembra directa en el medio MS con la CL_{50} del filtrado estéril de *B. cinerea*. Las plántulas que mostraron un mínimo o ausencia de los síntomas causados por el efecto del filtrado estéril de *B. cinerea* se denominaron líneas mutantes tolerantes, nombrándolas con el código RFGUM#, cuyo código se estableció por las iniciales de *<u>R</u>ubus, <u>f</u>ruticosus*, <u>G</u>amma, <u>U</u>niversidad, <u>M</u>ichoacana. Las líneas mutantes tolerantes fueron micropropagadas para producir plántulas a usarse en las pruebas de tolerancia a *B. cinenea* en bioensayos *in vitro* en hoja y plántula.

Pruebas de tolerancia a <u>B. cinerea</u>

Las pruebas de tolerancia a *B. cinerea* se realizaron mediante bioensayos *in vitro* de hojas y plántulas:

*Bioensayo <u>in vitro</u> de hoja***.-** Hojas completas de las plántulas de las diferentes líneas mutantes tolerantes, fueron inoculadas con 3 µL de una solución de $1X10^3$ esporas/mL de *B. cinerea*, y fueron cultivadas en medio agar-agua (8 g/L de agar). Éstas fueron inoculadas en el área central del haz, con una n=3 por línea mutante. Se determinaron los síntomas iniciales de la enfermedad como necrosis en el sitio de la infección o generalizada en la superficie foliar, durante 8 días de cultivo.

*Bioensayo <u>in vitro</u> en plántula***.** Se realizaron las pruebas de tolerancia en plántula cultivada *in vitro* con las diferentes líneas que fueron seleccionadas como tolerantes en el anterior bioensayo. Las plántulas de zarzamora fueron inoculadas con 5 µL de una suspensión de esporas ($1x10^3$ esporas/mL) de *B. cinerea*, sobre la parte apical de la plántula (n=3).

Posteriormente se evaluaron los síntomas de la enfermedad en el sitio de infección o en toda la planta, durante 10 días posteriores a la infección.

Determinación de parámetros de crecimiento de plantas mutantes tolerantes a B. cinerea

Se determinaron los parámetros de altura, número de hojas, número y longitud de raíces, a los 28 días de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la CL_{50} de filtrado estéril de *Botrytis cinerea*

A los 28 días del cultivo, los porcentajes de mortalidad de los explantes fueron muy contundentes en las concentraciones de 6, 8 y 10 g/L, con un 100% de mortalidad. El 50% de mortalidad se obtuvo en la concentración de 4 g/L, considerándola como la CL_{50}, las plántulas cultivadas en 2 g/L de filtrado estéril de *B. cinerea,* mostraron un 100% de supervivencia al igual que las plantas no irradiadas (Cuadro 7).

Las plantas no tratadas mostraron un óptimo crecimiento sin lesiones causadas por el efecto del filtrado estéril de *B. cinerea*, en comparación con aquellas que fueron sometidas al filtrado estéril, a excepción de las cultivadas con 2 g/L (Figura 10A). Algunas plantas presentaron lesiones como la aparición de manchas necróticas solamente en el borde de las hojas (Figura 10B) y otras con lesiones más generalizadas en hojas y tallos (Figura 10C).

En la figura 10D se observa una planta muerta por el efecto del filtrado estéril, característica evaluada para obtener los porcentajes de mortalidad. Estas lesiones son similares a los síntomas presentados por plantas infectadas por *B. cinerea.*

Cuadro 7. Porcentajes de mortalidad de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) sometidas a las diferentes concentraciones del filtrado estéril de *Botrytis cinerea* a los 28 días de cultivo (n=10).

No. Trat.	Concentración de filtrado estéril (g/L)	Mortalidad (%)
1	0	0
2	2	0
3	4	50
4	6	100
5	8	100
6	10	100

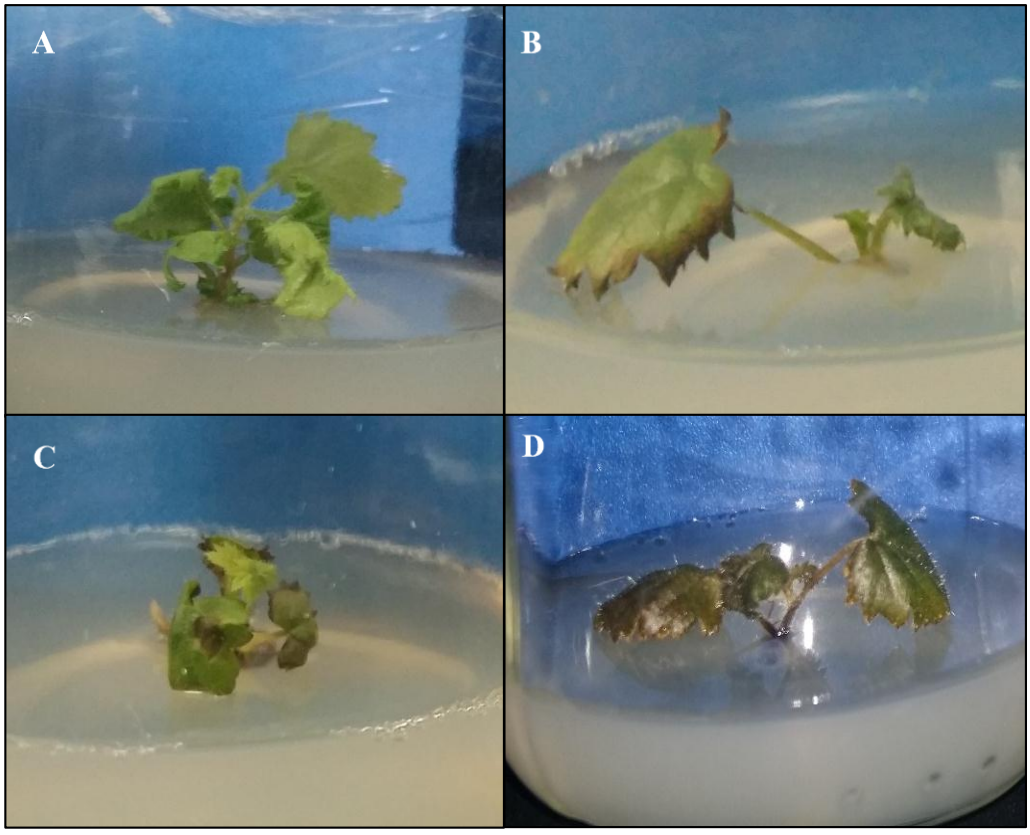


Figura 10. Plantas de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi no irradiadas, cultivadas en MS con filtrado estéril de *B. cinerea*: A) Sin cambios; B) Necrosis parcial en borde las hojas; C) Necrosis generalizada en hojas y tallo; y D) Planta muerta con necrosis total.

Algunas características como clorosis, necrosis, pudrición o muerte de los tejidos, son causadas por sustancias encontradas en los filtrados, que son las responsables de las lesiones de las plantas o de los síntomas ocasionados por hongos. Éstas son denominadas fitotoxinas, producidas por el patógeno para que ocurra la enfermedad, las que pueden ser móviles en las plantas y actúan a concentraciones relativamente bajas, pudiendo actuar a distancia desde el sitio de la infección (Lucas, 1998).

La fitotoxicidad del filtrado de *B. cinerea* se observó en la oxidación de los tejidos de las plantas sometidas a su acción, los cuales se tornaron de color pardo en los bordes de las hojas y posteriormente se necrosaron en forma generalizada. La selección de plantas tolerantes a hongos con filtrados estériles se ha reportado para diversas plantas como tomate de árbol tolerantes a *Colletotrichum acutatum* (Patiño-Torres *et al*., 2007), fresa tolerantes a *Verticillium dahliae* (Sowik *et al*., 2008) y cardamomo tolerantes a *Fusarium oxysporum* (Zúñiga *et al*., 2010). Aunque son pocas las investigaciones sobre el uso de filtrado para tolerancia a *B. cinerea,* Faniza *et al*. (1995) lograron seleccionar plantas de uva y Cruz-Nieves (2014) seleccionó plantas de fresa con tolerancia a *B. cinerea.*

Selección de líneas mutantes

Una vez establecida la CL_{50} (4g/L) del filtrado estéril del hongo, plántulas de 92 líneas mutantes fueron cultivadas por 28 días en el medio MSB conteniendo 4 g/L del filtrado estéril de hongo (CL_{50}), seleccionando aquellas que mostraron porcentajes de supervivencia por arriba del 50% y con un mínimo de síntomas de la enfermedad.

Después de este tiempo, se observó la respuesta de las plantas de zarzamora elegidas para las pruebas de tolerancia, obteniendo 32 líneas con supervivencia por arriba del 50% en el filtrado estéril de *B. cinerea.* Éstas mostraron menos del 50% de clorosis o necrosis en los tejidos. Para realizar las pruebas de tolerancia a *B. cinerea*, cada línea seleccionada fue sometida al proceso de micropropagación para contar con el suficiente número de hojas o plantas para los bioensayos. Una vez micropropagadas, las plantas fueron mantenidas en medio MSB por 45 días en ausencia de filtrado.

Los resultados en esta parte de la investigación se basan en lo reportado por Borras *et al*. (2001), quienes encontraron una correlación directa entre la concentración de filtrado estéril de *F. subglutinans* y el área necrosada de segmentos foliares de variedades susceptibles de piña, inoculados con el hongo.

Además, demostraron que la necrosis en hojas de diferentes variedades de piña tolerantes, se presentaba en una proporción mucho menor que el de las variedades susceptibles. Por ello, el seleccionar plántulas de zarzamora con un óptimo crecimiento y un mínimo de síntomas de la enfermedad bajo estas condiciones, puede ser debido a que se ha adquirido tolerancia a las fitotoxinas del hongo.

Bioensayos *in vitro* de tolerancia a *B. cinerea* en líneas mutantes de zarzamora

Bioensayo de tolerancia in vitro en hojas

Desde los tres días después de la inoculación de esporas de *B. cinerea* en hojas de plantas de zarzamora Cv. Tupi, se observaron los primeros síntomas típicos de la infección, causados por el hongo. En la figura 11 se muestran hojas inoculadas, en las que puede observarse una reacción de necrosis en la zona de inoculación en planta no irradiada (control) (Figura 11A), una necrosis generalizada en la superficie de la hoja de una planta considerada susceptible (Figura 11B) y ausencia de necrosis y síntomas de la enfermedad en una hoja de una planta considerada mutante tolerante a *B. cinerea* (Figura 11C).

En las hojas inoculadas, después de cinco días de la inoculación, se observó una mejor respuesta de la tolerancia a *B. cinerea* en las provenientes de plantas mutantes seleccionadas en el filtrado estéril del hongo. En las hojas de plantas de zarzamora sin inóculo, cultivadas *in vitro*, no se observaron síntomas de la enfermedad (Figura 12A); sin embargo, en las hojas de plantas control inoculadas se presentaron síntomas como necrosis en la totalidad del área de la hoja, además de la presencia de micelio (Figura 12B).

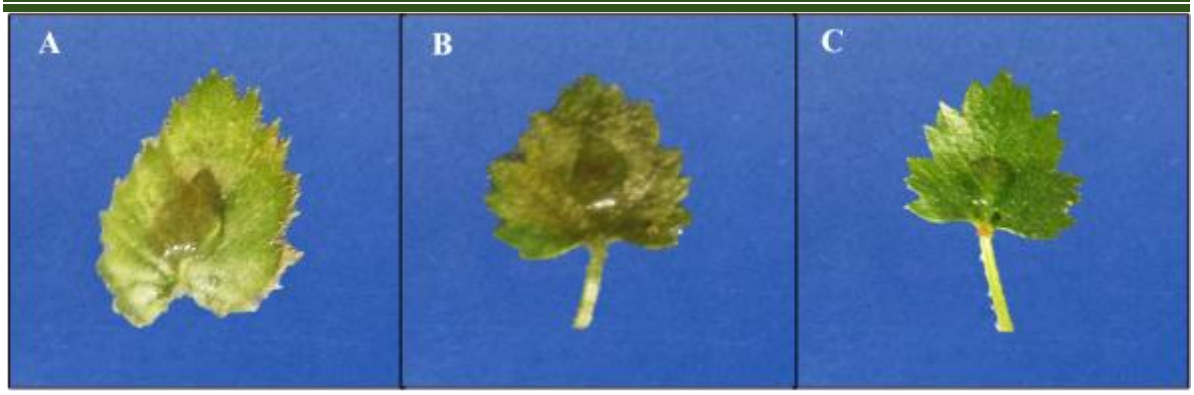


Figura 11. Hojas de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi de líneas mutantes irradiadas con rayos gamma, seleccionadas en la CL_{50} del filtrado estéril de *Botrytis cinerea*, inoculadas con $1x10^3$ esporas/mL a los tres días del cultivo: A) Hoja de planta control con inóculo; B) Hoja de línea RFGUM22 susceptible con inóculo; C) Hoja de línea tolerante RFGUM16 con inóculo.

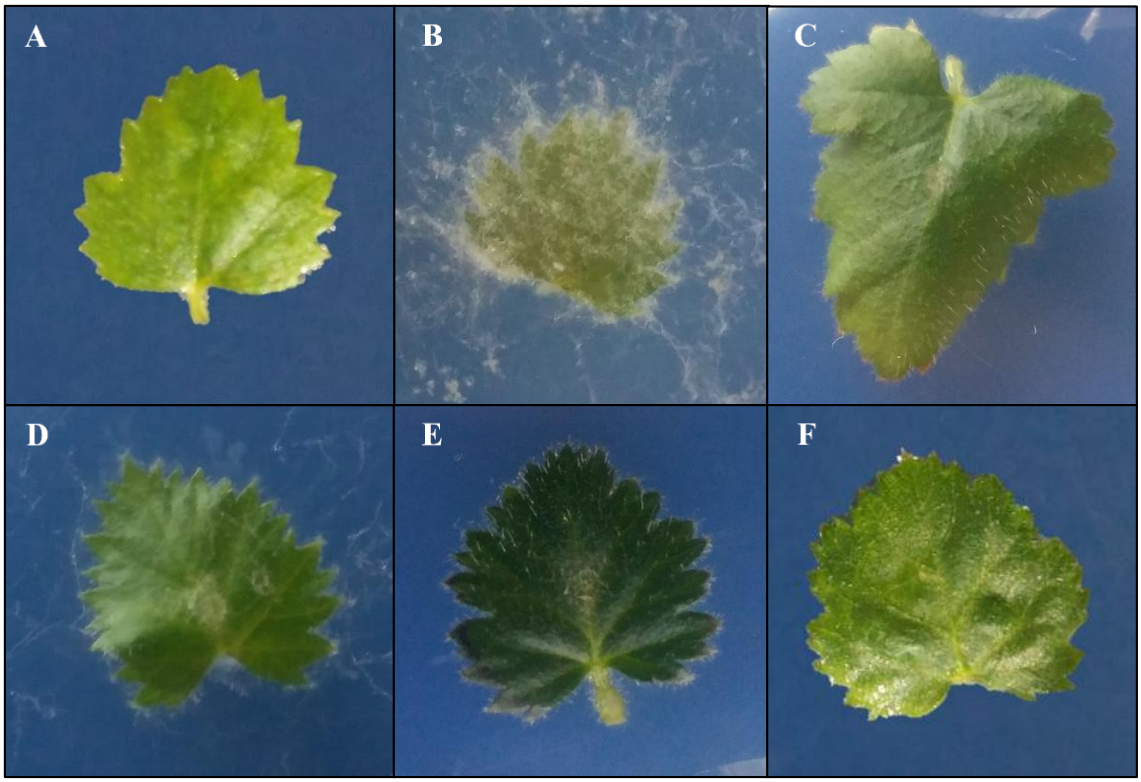


Figura 12. Hojas de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi de líneas mutantes irradiadas con rayos gamma, seleccionadas en la CL_{50} del filtrado estéril de *Botrytis cinerea*, inoculadas con $1x10^3$ esporas/mL a los 5 días del cultivo: A) Hoja de planta control sin inóculo; B) Hoja de planta control con inóculo; C) Hoja de línea RFGUM5 con inóculo; D) Hoja de línea RFGUM16 con inóculo; E) Hoja de línea RFGUM17 con inóculo y F) Hoja de línea RFGUM18 con inóculo.

El resultado más importante fue el mostrado por las hojas provenientes de algunas de las líneas mutantes seleccionadas en el filtrado estéril de *B. cinerea*, en las que pudo observarse variaciones en el nivel de tolerancia al hongo, las hojas de la línea mutante RFGUM5 presentaron reacciones de necrosis en la periferia de la hoja sin mostrar síntomas que la llevaran a la muerte (Figura 12C). En las hojas de la línea mutante RFGUM16 puede observarse el crecimiento de micelio de *B. cinerea* sin causar daño a éstas (Figura 12D). Las hojas de las líneas mutantes RFGUM17 y RFGUM18 no mostraron síntomas de enfermedad aun hasta los 10 días después de la inoculación (Figuras 12E y 12F), considerando a éstas como líneas mutantes de zarzamora tolerantes a *B. cinerea*.

Con este bioensayo, de las 32 líneas mutantes tolerantes al filtrado estéril de *B. cinerea*, 27 de ellas fueron consideradas como susceptibles al hongo debido a que los síntomas observados fueron similares al control con inóculo. Las líneas que mostraron ausencia o un mínimo de los síntomas de la enfermedad fueron la RFGUM5, RFGUM6, RFGUM16, RFGUM17 y RFGUM18, que además presentaron un óptimo crecimiento en el filtrado de *B. cinerea.* Este resultado concuerda con lo anteriormente mencionado, determinando que existe una relación entre el crecimiento sobre el filtrado de hongo y la tolerancia observada en bioensayos *in vitro* (Borras *et al*., 2001).

Bioensayo de tolerancia <u>in vitro</u> en plántulas

Los bioensayos de tolerancia a nivel de plántula fueron realizados con las cinco líneas que mostraron tolerancia en los bioensayos *in vitro* de hoja (RFGUM5, RFGUM6, RFGUM16, RFGUM17 y RFGUM18). También fue sometida al bioensayo, la línea RFGUM22 que presentó susceptibilidad al ataque del hongo, comparando los resultados con plantas control sin inóculo (Control -) y con inóculo (Control +), bajo las condiciones anteriormente descritas. En estos bioensayos, se eligieron plántulas de similar tamaño y después de ser inoculadas con *B. cinerea*, se monitorearon cada 24 horas para observar la ausencia o presencia de síntomas característicos de la enfermedad, durante 10 días.

En la figura 13 se muestra de manera representativa la respuesta presentada por una línea mutante tolerante (RFGUM5) y una susceptible (RFGUM22), comparando con plantas no irradiadas con o sin inóculo. Con esto se demuestra la tolerancia obtenida por algunas de ellas y la sensibilidad de otras. Las plantas no tratadas, sin síntomas de la enfermedad (Figura 13A), tuvieron un crecimiento óptimo, al igual que aquellas consideradas tolerantes (RFGUM5, RFGUM6, RFGUM16, RFGUM17 y RFGUM18) (Figura 13C), aunque en éstas hubo pequeñas zonas con lesión, posiblemente debido a la reacción de hipersensibilidad. Sin embargo, en la Figura 13B se muestra una planta con alta severidad de daño y en la Figura 13D, una planta representativa de las líneas sensibles, con un 100% de mortalidad.

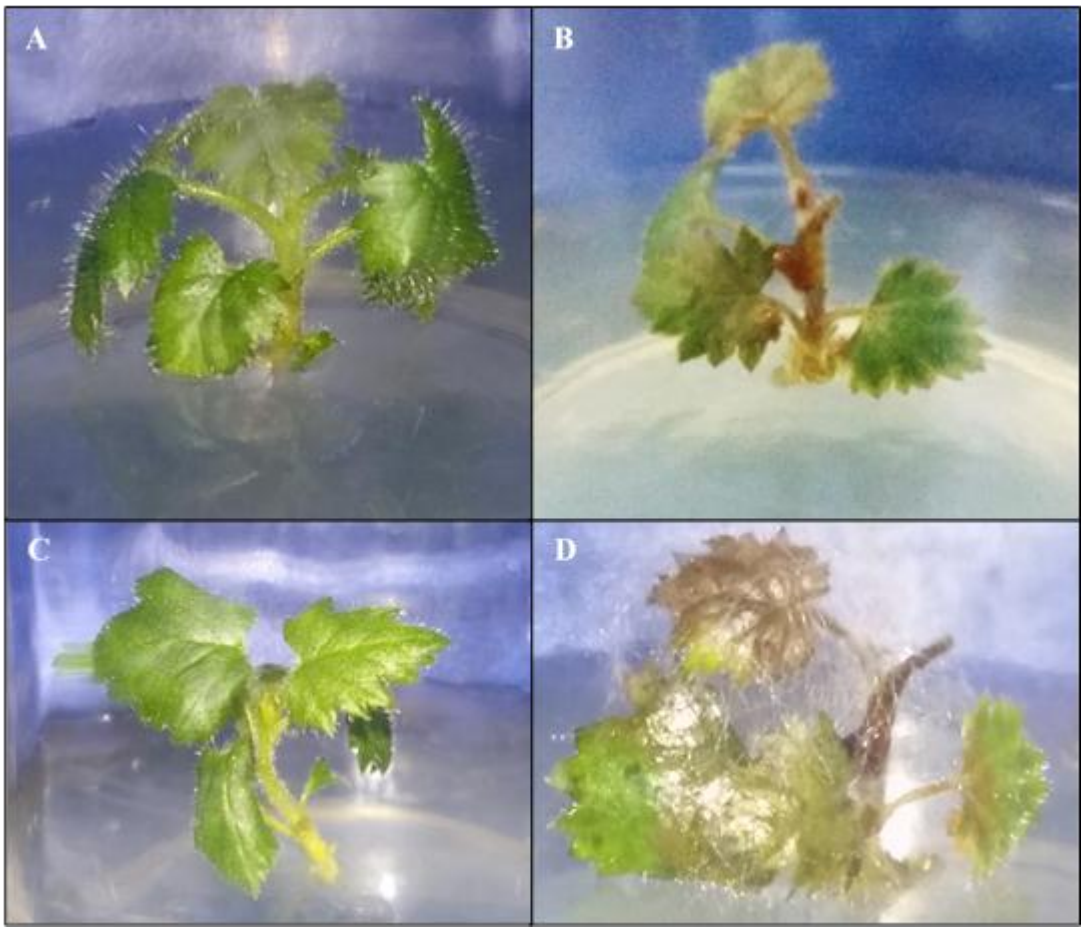


Figura 13. Plántulas de *Rubus fruticosus* Cv. Tupi mutantes irradiadas con rayos gamma, sometidas a pruebas de tolerancia con inoculación de esporas de *Botrytis cinerea* (10 días de cultivo): A) Planta no irradiada sin inóculo; B) Planta no irradiada con inóculo; C) Línea mutante RFGUM5 tolerante a *B. cinerea* con inóculo; y D) Línea mutante RFGUM22 susceptible a *B. cinerea* con inóculo.

Debido a estos resultados, es importante realizar ambos tipos de pruebas de tolerancia y en tiempos más largos de cultivo, con el fin de asegurar el nivel de tolerancia de las plántulas seleccionadas. De las 32 líneas seleccionadas en los ensayos de hoja, solo cinco de ellas se consideran potencialmente como mutantes tolerantes a *B. cinerea* por la respuesta a nivel de planta. Sin embargo, es necesario realizar otros ensayos como las pruebas de invernadero y campo, donde las plantas sean desafiadas con el hongo *B. cinerea*, bajo condiciones no controladas y durante sus diferentes etapas fenológicas.

La presión de selección de mutantes de zarzamora, utilizando el filtrado estéril de *B. cinerea*, dio como resultado la obtención de las líneas tolerantes a este hongo. Lo anterior corrobora lo realizado para otras especies vegetales como caña de azúcar, arroz, plátano, tabaco, entre otras, algunas de las cuales han podido ser probadas en campo y consideradas mutantes resistentes a diversos hongos fitopatógenos (Patiño-Torres, 2010).

A nivel molecular, la ocurrencia de variación inducida por mutagénesis está asociada a mutaciones puntuales, rearreglos y recombinaciones cromosómicas, metilación del ADN, alteración en el número de copias de segmentos de ADN y ocurrencia de elementos transponibles. La radiación gamma induce un amplio espectro de eventos físicos y químicos en el ADN y ARN de las plantas (Jain, 2001). Estos cambios suelen ser diversos pero los que están relacionados con la resistencia a hongos, pueden ser a nivel de la producción de metabolitos secundarios como las fitoalexinas, péptidos antimicrobianos como las defensinas, y a una alta actividad enzimática y expresión de genes relacionados con la defensa en plantas como quitinasas, glucanasas y otras enzimas como la fenilalanina amonioliasa y chalcona sintasa (Madriz-Ordeñana, 2002).

Determinación de parámetros de crecimiento de plantas mutantes tolerantes a B. cinerea

Diez días post inoculación, las plantas mutantes desafiadas al ataque del hongo no mostraron síntomas relacionados a la enfermedad. A este tiempo las plantas presentaron un crecimiento similar a las plantas control no irradiadas (2 cm de longitud, desarrollo de raíces primarias y no presentaron variación fenotípica en tallo y hojas). Cuando se lleva a cabo un sistema de

mejoramiento genético para seleccionar plantas con una característica específica, en particular tolerancia a hongos en las plantas mutantes, no deben de existir cambios visibles con respecto a las plantas control. Por lo tanto, se considera que éstas pueden ser utilizadas para bioensayos en invernadero y campo y ser sometidas a estudios moleculares para determinar los posibles mecanismos de tolerancia.

CONCLUSIONES

Mediante la selección *in vitro* se obtuvieron plantas mutantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) tolerantes a *Botrytis cinerea.* La selección de plantas tolerantes al filtrado estéril de *B. cinerea* dio como resultado la obtención de líneas tolerantes, encontrando una relación directa entre la tolerancia al filtrado y la tolerancia al ataque del hongo en bioensayos *in vitro* en hoja y plántula. Las líneas mutantes RFGUM5, RFGUM6, RFGUM16, RFGUM17 y RFGUM18 resultaron tolerantes a *B. cinerea* ya que mostraron un crecimiento similar a las plantas no irradiadas y ausencia o un mínimo de síntomas de la enfermedad.

REFERENCIAS

Agrios, G.N. 1988. Plan Pathology. Third edition. Academia Press, Inc. Estados Unidos de America. 75.

Agrios, G.N. 2007. Fitopatología, LIMUSA, México. 35.

Benito, E.P., Arranz M. y Eslava A. P. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Salamanca, España. Revista Iberoamericana de Micología, 17:43-46.

Borras, O., Santos A.R., Matos A.P., Cabral R.S. y Arzola M. 2001. A First attempt to use a *Fusarium subglutinans* culture filtrate for the selection of pineapple cultivars resistant to fusariose disease. Plant Breeding, 120:435-438.

Chung, K.R., Shilts T., Erturk U., Timmer L.W. y Ueng P. 2003. Indole derivates produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. FEMS Microbiology Letters, 226:23-30.

Cruz-Nieves, K. 2014. Inducción de la variabilidad genética *in vitro* para la selección de plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Cv. Tioga) tolerantes a hongos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, UMSNH. 50.

Daub, M.E. 1986. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. Annual Review of Phytopathology, 24:159-186.

Fernando, T.H.P.S., Jayashinge C.K. y Wijesundera R.L.C. 2001. Cell wall degrading enzyme secretion by *Colletotrichum acutatum*, the causative fungus of secondary leaf fall of *Hevea brasiliensis*. Mycologycal Research, 105(2):195-201.

Jain, S.M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica, 118:153-166.

Jayasankar, S., Litz R., Cray D.J. y Moon P. 1999. Responses of embryogenic mango cultures and seedlings bioassays to a partially purified phytotoxin produced by a mango leaf isolate of *Colletotrichum gloeosporiodes* Penz. *In vitro* Cellular Developmental Biology-Plant, 35(6):475-479.

Lucas, J.A. 1998. Plant pathology and plant pathogens. Third Ed. Blackwell Science Ltd., 274.

Madriz-Ordeñana, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta patógeno. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. 63:22-32.

Orlando, R, Magro P. y Rugini E. 1997. Pectic enzymes as a selective pressure tool for *in vitro* recovery of strawberry plants with fungal disease resistance. Plant Cell Reports, 16(5):272- 276.

Patiño-Torres, C. 2010. Variación somaclonal y selección *in vitro* con toxinas como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas: Revisión. Revista de Investigación Agraria y Ambiental, 1(1):7-15.

Patiño-Torres, C., Hoyos S.R. y Afanador K.L. 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, 60:3923-3937.

Poveda-Parra, D.C. 2006. Selección de extractos fúngicos extracelulares (EFE) con potencial para el control de *Botrytis cinerea* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Pontifica Universidad Javeriana, Bogotá D.C. 114.

Rebollar-Alviter, A. 2011. Manejo del mildiú y el moho gris de la zarzamora en Michoacán. 1ª. Ed., Universidad Autónoma Chapingo, 1ª. Ed. 34.

Ribichich, K., Tioni M.F., Chan R.L. y Gonzalez D.H. 2001. Cell-type specific expression of plant cytochrome *c* mRNA in developing flowers and roots. Plant Physiology, 125**:**1603–1610.

Robinson, M., Riov J. y Sharon A. 1998. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. Aeschynomene. Applied and Environmental Microbiology, 64(12):5030–5032.

Singh, R., Sharma R.R. y Goyal R.K. 2007. Interactive effects of planting time and mulching of Chandler strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.). Scientia Horticulturae, 111:334-351.

Sowik, I., Michalczuk L. y Wójcik D. 2008. A method for *in vitro* testing strawberry susceptibility to verticillum wilt. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 16:111-121.

Švânová, L. y Lebeda A. 2005. *In vitro* selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. Journal Phytopathology, 53(1):52-64.

Taji, T., Ohsumi C., Iuchi S., Seki M., Kasuga M., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 29:417-426.

Zúñiga, D.S., Hoyos R.S. y 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.

8. DISCUSIÓN GENERAL

La selección de plantas mutantes tolerantes a hongos es uno de principales logros del mejoramiento genético obtenido con la biotecnología moderna. Una de las herramientas más efectivas para esto, es la irradiación con rayos gamma en tejidos vegetativos *in vitro*, con la que se han seleccionado especies de interés agrícola tolerantes a diversos hongos fitopatógenos (Pacheco-Gómez *et al*., 2000; Waugh *et al*., 2006; Shu y Lagoda, 2007; Parry *et al*., 2009).

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 de plantas (Predieri y Zimmerman, 2001). Establecer un protocolo efectivo de micropropagación es necesario para conseguir la generación de líneas mutantes y a partir de éstas, regenerar y propagar masivamente plantas mutantes con alguna característica específica, en particular, tolerantes a hongos fitopatógenos (Jain, 2010).

Otra herramienta que involucra el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, para la selección de plantas mutantes tolerantes a hongos, es el uso de filtrados estériles del hongo al cual se seleccionará la tolerancia de las plantas (Patiño-Torres *et al*., 2007). Este método utilizado como agente de selección ha sido utilizado con éxito para la obtención de plantas tolerantes a hongos de importancia comercial (Daub, 1986; Švânová y Lebeda, 2005). 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), tolerantes a hongos como *Colletotrichum acutatum*, *Verticillium dahliae* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente.

Debido a la importancia de generar genotipos de zarzamora (*Rubus fruticosus*) tolerantes a *Botrytis cinerea*, uno de los agentes patógenos que causan mayor 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. Tupi con

rayos gamma, se estableció el protocolo completo de micropropagación, se seleccionaron plántulas micropropagadas provenientes de brotes irradiados en filtrado estéril de *B. cinerea*, para mediante bioensayos *in vitro,* probar la tolerancia en aquellas líneas mutantes seleccionadas.

OBTENCIÓN DE MUTANTES DE *R. fruticosus* Cv. TUPI

Con el establecimiento *in vitro* de yemas axilares y apicales de plantas de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupi) mantenidas bajo cultivo en invernadero, 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. Tupi, 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 los métodos de mutagénesis, 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 mutantes tolerantes de diversas especies vegetales no solo a hongos, sino también a salinidad, a altas y bajas temperaturas y a sequía, o bien para producir modificaciones en la producción o calidad de los frutos (Novak y Brunner, 1992; Patiño-Torres, 2010; Salgado-Garciglia, 2013).

La multiplicación de brotes de zarzamora Cv. Tupi se consiguió a los 28 días del cultivo de yemas apicales y axilares en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.06 mg/L de AIB, logrando la formación de plántulas en el mismo medio de cultivo de brotación (Sección 7.1). Aunque se ha reportado la micropropagación de algunos cultivares de zarzamora, los resultados para este cultivar en el medio de multiplicación de brotes reportado por González *et al.* (2000), mostraron un mayor número de éstos (13 brotes/explante), considerando por ello, un establecimiento óptimo de micropropagación por esta vía de morfogénesis.

Los brotes obtenidos con este procedimiento fueron utilizados para la generación de mutantes, sometiéndolos a irradiación gamma, con el objetivo de seleccionar mutantes tolerantes a *B. cinerea.* Se estableció como la DL_{50}, la intensidad de 30.82 Gy, con la que se seleccionaron 92 diferentes plántulas regeneradas de brotes irradiados, por presentar características de crecimiento y desarrollo similar al de las plántulas no irradiadas (Sección 7.2).

La DL_{50} 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 radicación absorbida provoca cambios en el ADN y origina mutaciones, mismas que causan alteraciones fenotípicas y/o genotípicas en las plántulas (González *et al*., 2007).

Estas mutaciones causadas por las radiaciones gamma ocurren al azar en el genoma de la planta, aunque algunas de ellas puede dar lugar a la aparición de características interesantes que no pueden encontrase en la naturaleza o que se han perdido durante la evolución (Novak y Brunner, 1992). La necesidad de establecer un programa de mejoramiento genético en zarzamora Cv. Tupi, utilizando la alternativa de inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma fue con el fin de generar genotipos con tolerancia a *B. cinerea.*

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

Los resultados obtenidos con el cultivo de plántulas de zarzamora Cv. Tupi regeneradas de brotes con irradiación gamma, en el medio de cultivo con la CL_{50} del filtrado estéril de *B. cinerea* (4 g/L) (Sección 7.3), son comparables con lo reportado por *Borras et al.* (2001) quienes determinaron que existe una relación entre el crecimiento sobre el filtrado de hongo y la tolerancia observada en bioensayos *in vitro* (Borras *et al*., 2001).

De las 32 líneas mutantes crecidas en la CL_{50} del filtrado estéril de *B. cinerea*, se obtuvieron cinco líneas que mostraron una alta tolerancia (RFGUM5, RFGUM6, RFGUM16, RFGUM17 y RFGUM18), 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 tolerantes, en forma general puede explicarse que se deber principalmente a la liberación de fitotoxinas (Patiño *et al*., 2007), enzimas líticas (Fernando *et al*., 2001; Patiño *et al*., 2007) y otras sustancias implicadas en tolerancia (Jayasankar *et al*., 1999; Poveda-Parra, 2006).

La producción *in vitro* de fitotoxinas en medios de cultivos ha sido reportada para diferentes especies de hongos (Mathew *et al*., 2009; Van den Bulk, 1991) 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 ya sea de naturaleza proteica o compuestos de bajo peso molecular, como agentes de selección *in vitro* es una de las técnicas que se utiliza para obtener somaclonales resistentes a una enfermedad, teniendo como premisa fundamental que la resistencia debe manifestarse a nivel *in vitro* (García *et al*., 2004). Se sabe que algunas enzimas de los filtrados estériles de hongos (amilasa, celulasa y proteinasa), además de otras fitotoxinas pueden actuar sobre los componentes estructurales de la pared celular de los vegetales (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).

SELECCIÓN DE PLANTAS DE *R. fruticosus* CV. TUPI TOLERANTES A *B. cinerea*

Mediante los bioensayos *in vitro* de tolerancia a *B. cinerea* realizados con hojas y plántulas provenientes de brotes irradiados con rayos gamma, y seleccionadas como tolerantes 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 (Sección7.3).

Sin embargo, la respuesta de tolerancia a *B. cinerea* en al menos cinco líneas mutantes fue directamente relacionada con lo observado en el proceso de la selección con el filtrado estéril del hongo, resultando signos de una alta tolerancia al ataque del hongo, al realizarse bioensayos *in vitro* tanto en hoja como en plántula. Las líneas mutantes RFGUM5, RFGUM6, RFGUM16, RFGUM17 y RFGUM18 fueron seleccionadas y caracterizadas como tolerantes 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 irradiación gamma, que en bioensayos de evaluación temprana *in vitro* mostraron líneas tolerantes a la enfermedad Sigatoka negra de la que el agente causal es el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Cuando éstos fueron inoculados en campo con el patógeno se confirmó la tolerancia (García *et al*., 2004).

Con los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación hacia la obtención de plantas de zarzamora Cv. Tupi tolerantes a *B. cinerea*, éstos son prometedores por los niveles de tolerancia observados en bioensayos *in vitro* de plantas de las líneas mutantes RFGUM5, RFGUM6, RFGUM16, RFGUM17 y RFGUM18, las cuales deberán ser sometidas a evaluación en cultivo en invernadero y campo.

Dentro de la fase de evaluación de la variabilidad producida en programas de mejoramiento vegetal se encuentran las evaluaciones a nivel citogenético y molecular. A nivel citogenético se pueden observar daños como se habían mencionado, en las aberraciones cromosómicas, sin embargo los cromosomas pueden sufrir alteraciones numéricas y/o estructurales

La variabilidad genética inducida por las radiaciones gamma se presenta como alternativa que complemente las técnicas de mejoramiento tradicional llegando a encontrar genotipos que contrarresten esta problemática (Novak y Brunner, 1992). Existen varias metodologías que permiten detectar dicha variabilidad entre ellas se encuentran los marcadores moleculares, los cuales serían de buena utilidad para la selección temprana de individuos con mejores características agroeconómicas, perspectivas de esta investigación.

9. CONCLUSIONES GENERALES

La micropropagación de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) se obtuvo por la multiplicación de brotes (13 brotes/explantes) en yemas axilares y la formación de plántulas en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.06 mg/L de AIB, a los 28 días del cultivo.

Se obtuvieron 92 líneas mutantes al irradiar 200 brotes de zarzamora *in vitro* (*R. fruticosus* Cv. Tupi) con la DL_{50} de rayos gamma (30.82 Gy), las que mostraron un óptimo crecimiento y desarrollo, similar al presentado por las plántulas no irradiadas.

Mediante el cultivo de las 92 líneas mutantes en la CL_{50} (4 g/L) en el filtrado estéril de *B. cinerea*, se seleccionaron 32 líneas tolerantes, de las cuales cinco de ellas mostraron una relación directa con una alta tolerancia al hongo, tanto en ensayos *in vitro* en hoja como en plántula.

Las líneas mutantes RFGUM5, RFGUM6, RFGUM16, RFGUM17 y RFGUM18, son consideradas mutantes tolerantes a *B. cinerea,* ya que en ellas se observó la ausencia o un mínimo de síntomas de la enfermedad.

10. PERSPECTIVAS

Realizar bioensayos de tolerancia o pruebas de patogenicidad a *B. cinerea*, en plantas mutantes tolerantes de zarzamora Cv. Tupi, tanto en pruebas de invernadero como en campo.

Determinar los parámetros de crecimiento, desarrollo y rendimiento en las plantas mutantes seleccionadas como tolerantes a *B. cinerea.*

Evaluar los posibles mecanismos moleculares responsables de la tolerancia en plantas mutantes tolerantes a *B. cinerea.*

11. LITERATURA CITADA GENERAL

Ahloowalia, B., Maluszynski M. y Nichterlein K. 2004. Global impact of mutation derived varieties. Euphytica, 135:187-204.

Ahmed, Z., Akhter F., Haque S., Banu H., Rahman M. y Faruquzzaman M. 2001. Novel Micropropagation System. OnLine Journal of Biology Sciences, 1(11):1106-1111. Disponible en http://www.ansinet.org/fulltext/jbs/jbs1111106-1111.pdf.

Al-Safadi, B., Ayyoubi Z. y Jawdat D. 2000. The effect of the irradiation on patato microtuber production *in vitro*. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 61:183-187.

Asao, H., Nishizawa Y., Arai S., Sato T., Hirai M., Yoshida K., Shinmyo A. y Hibi T. 1997. Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca humuli* in transgenic strawberry espressing a rice chitinase gene. Plant Biotechnology, 14:145-149.

Bermúdez, C.I., Orellana P.P., Veitía R.N., García R.L., Clavero J.V. y Romero Q.C. 1999. Inducción de mutaciones por radiaciones gamma en cultivo *in vitro* brotes de banano cv. Gran enano (AAA). Libro de reportes cortos, Quinto Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba. 38-39.

Bernal-Parra, L.M. 2013. Mejoramiento Genético Vegetal. Bogotá. Contenido didáctico del curso Mejoramiento Genético Vegetal 203025.

Bhagwat, D. 2006. The Study on the pathogenesis and control of Banana vascular wilt. Chinese Agricultural Science Bulletin, 22(8):515-519.

Birch, P.R.J., Avrova A.O., Duncan J.M., Lyon G.D. y Toth R.L.1999. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2:356-361.

Borras, O., Santos A.R., Matos A.P., Cabral R.S. y Arzola M. 2001. A First attempt to use a *Fusarium subglutinans* culture filtrate for the selection of pineapple cultivars resistant to fusariose disease. Plant Breeding, 120:435-438.

Camarena-Gutiérrez, G. y De la Torre-Almaráz R. 2007. Resistencia Sistémica Adquirida en plantas: Estado actual. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 13(2):157-162.

Cao, X. y Hammerschlag F.A. 2000. Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry. Horticultural Science, 35:945-947.

Cervantes, L., Báez J. y 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.

Chalavi, V., Tabaeizadeh Z. y Thibodeau P. 2003. Enhanced resistance to *Verticillium dahliae* in transgenic strawberry plants expressing a *Lycopersicum chilense* chitinase gene. Journal American Society Horticultural Science, 128:747-753.

Chaves, N. y Wang A. 2004. Combate del moho gris *(Botrytis cinerea)* de la fresa mediante *Gliocladium roseum.* Agronomía Costarricense, 28:73-85.

Daub, M.E. 1986. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. Annual Review of Phytopathology, 24:159-186.

Dos Santos, A.M. y Raseira M. 1988. México Campeón Mundial en Exportación de Zarzamora. Tesis de Doctorado, México, D. F, Disponible en línea; www.dgbiblio.unam.com.

Escobar-Bravo, R. 2010. Estrategias de defensa vegetal frente a patógenos y plagas. www.encuentros.uma.es/encuentros130/estrategia.pdf.

Evenor, D. y 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.

Fanizza, G., Bisignano V., Pollastro S., Miazzi M. y 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.

FAO. 2000. FAO and agricultural biotechnology. ISB News report covering agricultural. Vol. Sept., 1-2.

Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology, 9:275-296.

García L., Herrera L., Clavero J., Bermúdez I., Veitia N. y Acosta M. 2004. Efecto del filtrado de cultivo de *Pseudocercospora fijensis* Morelet sobre yemas adventicias de cultivares de Musa spp. Biotecnología vegetal, 1:21-25.

García-Rodríguez, L., Bermúdez-Caraballoso I., Orellana-Pérez P., Veitía-Rodríguez N., García-Rodríguez L., Clavero-García J. y 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.

Ghorbani, S.A. 2004. Europe, the US and the Middle East Peace: Differences and Challenges, Middle East Studies Quarterly, Centre for Scientific Research and the Middle East Strategic Studies, 11(1).

González, G.S., Alemán M., Garriga R. y de la Fe C. 2007. Radio sensitivity to gamma rays (60Co) in shoot tips of henequen. Biotechnology Vegetal, 7:115-117.

González, M., López M., Valdéz A. y Ordas R. 2000. Mircropropagation of three Berry fruits species using nodal segments from field grown plants. Annal of Applied Biology, 137:73-78.

Gutiérrez, A., Santacruz F., Cabrera J.L. y Rodríguez B. 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. e-Gnosis, 1:1-19.

Hanhineva, K. 2008. Metabolic Engineering of Phenolic Biosynthesis Pathway and Metabolite Profiling of Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). Kuopio University Publications C. Natural and Environmental Sciences, 231. 89.

Hartman, G.L., McCoy T.J. y Knous T.R. 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.

Heath, M.C. 2000. Hypersensitive response-related death. Plant Molecular Biology 44:321–334.

Herrera-Isla, L., Bermúdez-Caraballoso I., Orellana-Pérez P., Acosta-Suárez M., Veitía-Rodríguez N., Clavero-García J., Romero-Quintana C. y Mujica R. 1999. Mejora para la resistencia al mal de Panamá en los clones de banano Manzano (AAB) y Gros 46 Michel (AAA) mediante el cultivo de tejidos y la mutagénesis *in vitro*. Centro Agrícola, 26(3):75-80.

INFOAGRO. 2002. Plagas de los cultivos. España Disponible en: http://www.tusplantas.com/jardin/jardines/.

Jain, M. 2010. Mutagenesis in crop improvement under the climate change. Romanian Biotechnological Letters, 15(2):88-106.

Jain, S.M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica, 118:153-166.

Jayasankar, S., Litz R.E., Gray D.J. y Moon, P.A. 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 Developed Biology Plant, 475-479.

Kumar, B., Kumar S. y Thakur M. 2012. *In vitro* Mutation Induccion and Selection of Chrysanthemun (*Dendranthemag grandiflorum* Tzelev) Lines with Improved Resistance to *Septoria obesa* Syd. International Journal of Plant Research, 2(4):103-107.

Lenné, J.M. 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.

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.

Lestari, E.G. 2012. Combination of somaclonal variation and mutagenesis for crop improvement. Journal AgroBiogen, 8(1):38-44.

Little, R. 1971. Mutation Breeding for Disease Resistance. Vienna International Atomic Energy Agency, 139-149.

Lu, G., Zhang X., Zou Y., Zou Q., Xiang X. y 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.

Mathew, A., Wolf-Rainer A., Robert A., Peter H., Gerhard W. y Step H. 2009. Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.). Mycological Research, 113(1):130-140.

Mendel, F. 1989. Propagación y plantación de Frambueso y Espárragos. Universidad Austral de Chile. Valida, Chile. 33.

Morrissey, J.P. y Osbourn A.E. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63(3):708.

Nimchuk, Z., Eulgem T., Holt Iii B.F. y Dangl J.L. 2003. Recognition and response in the plant immune system. Annual Review of Genetics, 37(1):579-609.

Nodarse, O., Santana I., Chinea A., Carbó L., Díaz A. y Hernández C. 1992. Obtención y selección de sub-clones 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.

Novak, F. y Brunner H. 1992. Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. International Atomic Energy Agency Bulletin, 4:25-33.

Pacheco-Gómez, M., López-Meza J.E. y 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 3:15-19.

Paduye-Ruiz, J., Ferro-Rodríguez A. y Paduye-Ruiz V. 2000. Alimentos transgénicos: La Nueva Revolución Verde. Mcgraw-Hill/Interamericana de España, S.A. 182.

Parry, M.A.J., Madgwick P.J., Bayon C., Tearall K., Hernández L.A., Baudo M., Rakszegi M., Hamada W., Al-Yassin A., Ouabbou H., Labhilili M. y Phillips A.L. 2009. Mutation discovery for crop improvement. Journal of Experimental Botany, 60(10):2817-2825.

Patiño-Torres, C. 2010. Variación somaclonal y selección *in vitro* con toxinas como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas: Revisión. Revista de Investigación Agraria y Ambiental, 1(1):7-15.

Patiño-Torres, C., Hoyos-Sanchez R. y Afanador-Kafuri L. 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, 60:3923-3937.

Pérez-Marín, J.C. 1991. Como controlar eficazmente la *Botrytis* de la vid. Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDA).

Pérez-Ponce, J. N., Jiménez G. A. y Agramante P. D. 1998. Aumento de la Eficiencia en la Micropropagación. En: Pérez Ponce, J. N (Ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas (IBP). Santa Clara, Cuba. Ediciones GEO, 1:179-191.

Phillips, D.J., Margosan D.A. y Mackey B.E. 1987. Size, nuclear number, and aggressiveness of *Botrytis cinerea* spores produced on media of varied glucose concentrations. Phyropathology, 77:1606-1608.

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 301.

Poveda-Parra, D.C. 2006. Selección de extractos fúngicos extracelulares (EFE) con potencial para el control de *Botrytis cinerea* en tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill). Tesis de Licenciatru, Facultad de Ciencias, Pontifica Universidad Javeriana, Bogotá D.C. 114.

Predieri, S. y Zimmerman R.H. 2001. Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma rays and field selection for productivity and fruit traits. Euphytica, 3:217-227.

Rebollar-Alviter, A. 2011. Manejo del mildiú y el moho gris de la zarzamora en Michoacán. 1ª. Ed., Universidad Autónoma Chapingo, 34.

Rosslenbroich, H.J. y Stuebler D. 2000. *Botrytis cinerea* history of chemical control and novel fungicides for its management. Crop Protection, 19:557-561.

Ryals, J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y. y Hunt M.D. 1996. Systemic acquired resistance. The Plant Cell, 8:1009-1819.

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. 2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www. sagarpa.gob.mx.

SAGARPA. 2008. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www. sagarpa.gob.mx.

SAGARPA. 2016. Exportaciones de berrys rebasan los mil 200 millones de dólares al año: SAGARPA. Comunicado de Prensa. Tiripetío, Mich.

Salgado-Garciglia, R. 2013. La propagación de plantas *in vitro*, un éxito biotecnológico. Morelia, Mich. México. Revista Saber Más, 2(10):21-24.

Sánchez-García, P. 2009. Nutrición de zarzamora. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.

Schumacher, J. y 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.

Sha, J. y Klessig D.F. 1996. Identification of a salicylic acid-responsive element in the promoter of the tobacco pathogenesis-related β 1,3-glucanase gene, PR-2d. Plant Journal, 10:10891101.

Sharma, A., Rathour R. y 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, 173:345–56.

Shu, Q.Y. y Lagoda P.J.L. 2007. Mutation techniques for gene discovery and crop improvement. Molecular Plant Breeding, 5:193-195.

Singh, R., Sharma R.R. y Goyal R.K. 2007. Interactive effects of planting time and mulching of Chandler strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.). Scientia Horticulturae, 111:334-351.

Sowik, I., Michalczuk L. y Wójcik D. 2008. A method for *in vitro* testing strawberry susceptibility to verticillum wilt. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 16:111-121.

Švânová, L. y Lebeda A. 2005. *In vitro* selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. Journal Phytopathology, 53(1):52-64.

Terakawa, T., Takaya N., Horiuchi H., Koike M. y Takagi M. 1997. A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. Plant Cell Report, 16:439-443.

Thatcher, L.F., Anderson J.P. y Singh K.B. 2005. Plant defence responses: what have we learnt from Arabidopsis?. Functional Plant Biology, 32(1):1-19.

Theerthagiri, A., Ramanujam B., Thiruvengadam R., Gandhi K., Manikam R. y Govindasamy S. 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).

Torres del Castillo, R. 2001. Manual del Curso de Manipulador de Productos Fitosanitarios. Nivel Básico.

Van den Bulk, R. W. 1991. Aplication of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding a review. Euphytica, 56:269-285.

Van Kan, J.A.L., van't Klooster J.W., Wagemakers C.A.M., Dees D.C.T. y van der Vlugt-Bergmans C.J.B. 1997. Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. Molecular Plant-Microbe Interactions, 10:30-38.

Vega, A.J.C. y Rivera B.R. 2001. Los virus: cómplices para descifrar procesos moleculares en las plantas. Avance y Perspectiva, 20:349-355.

Wiermer, M., Feys B.J. y Parker J.E. 2005. Plant immunity: the EDS1 regulatory node. Current Opinion in Plant Biology, 8(4):383-389.

Williamson, B., Tudzynski B., Tudzynski P. y Van Kan J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology, 8:561-580.

Zúñiga, D.S., Hoyos R.S. y 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.

12.ANEXO I

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A LA RESISTENCIA A *Botrytis cinerea* EN PLANTAS MUTANTES DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) IRRADIADAS CON RAYOS GAMMA.

INTRODUCCIÓN

Las plantas responden a la infección de patógenos modulando la expresión de genes que les permiten defenderse al ataque de éstos. La respuesta a infección por hongos puede ser diversa y en el caso de la infección de zarzamora por el hongo *Botrytis cinerea*, se desconoce el mecanismo. En la última década, se ha avanzado mucho en la capacidad para comprender qué genes modulan su expresión en un determinado momento o en qué condición puede estar manifestándose. Para ello se han diseñado diferentes técnicas que permiten estudiar la expresión génica global en un determinado tejido y en un momento particular del desarrollo, posibilitando la identificación de secuencias nuevas como respuesta al estrés biótico (Dunwell *et al*., 2001).

El uso de los marcadores moleculares ha tenido un fuerte impacto en el mejoramiento genético de hortalizas. En los últimos años se ha avanzado mucho en el desarrollo de mapas genéticos y en el marcado de genes de interés agronómico. La utilización de estos marcadores en el mejoramiento constituye lo que se conoce como "Selección Asistida por Marcadores Moleculares", la cual permite incrementar la eficiencia de selección, ya que se puede realizar una selección temprana de los genotipos y de esta manera reducir el tamaño de la población de selección. Una de sus ventajas es que se selecciona el carácter en particular por un marcador molecular ligado a éste. Por supuesto, que es necesario disponer de marcadores fuertemente ligados al carácter de resistencia (Weeden *et al*., 1992).

Actualmente, uno de los marcadores más confiables son las regiones amplificadas de secuencias caracterizadas ("*Sequence Characterize Amplified* Regions", SCARs), u oligonucleótidos (*primers*) asociados a alelos específicos (ASAP). En diversas investigaciones se han desarrollado ASAP para genes que confieren tolerancia a

enfermedades, entre ellas las causadas por hongos. Estos marcadores son confiables, rápidos, ya que los productos de PCR se pueden visualizar directamente. A su vez, dos marcadores se pueden analizar en una sola reacción de PCR, llamada "reacción multiplex" (Masuelli, 1999).

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa, es una de las técnicas que ha facilitado de gran manera los estudios moleculares en todos los ámbitos científicos. Basándose en el principio básico de la replicación, permite amplificar de manera exponencial un fragmento de ADN que puede estar en baja concentración en una muestra determinada, haciendo uso de oligonucleótidos que actúan como cebadores y una enzima ADN polimerasa termoestable. Los oligonucleótidos están formados por 17-30 nucleótidos de longitud, que flanquean la secuencia de ADN que se va a amplificar. Los cebadores se hibridan con cadenas opuestas del ADN después de que haya sido desnaturalizado y se orientan de modo que la síntesis de ADN por la polimerasa se produzca en medio de los dos cebadores. Las reacciones de extensión crean dos nuevas regiones blanco de doble cadena, cada una de las cuales a su vez se pueden desnaturalizar quedando listas para un segundo ciclo de la hibridación y la extensión. El tercer ciclo produce dos moléculas de doble cadena que conforman precisamente la región que se desea amplificar. Por ciclos repetidos de desnaturalización térmica, la hibridación de los cebadores y la extensión, se produce una rápida acumulación exponencial del fragmento de ADN blanco (Primrose *et al*., 2006).

En el caso particular de zarzamora se desconoce el mecanismo de respuesta por *B. cinerea*; sin embargo, en plantas de fresa y otras especies de la familia Rosaceae, a la que pertenece la zarzamora, se ha evaluado la expresión diferencial de genes ligados a la resistencia a un hongo fitopatógeno en particular (Weeden *et al*., 1992; Masuelli, 1999) y se ha demostrado una relación directa en la sobre expresión de algunos genes de fresa con la tolerancia a *B. cinerea*, como los genes *FaPGIP* (Proteína inhibitoria de poligalacturonasa), *FaPR5-3* (gen PR5 tipo tumatina) y el gen *FaChi2-1* (gen PR3, Quitinasa I) (Mehli *et al*., 2004; Osorio *et al*., 2008; Pombo *et al*., 2011). Estos genes se proponen como candidatos para seleccionar plantas mutantes de zarzamora tolerantes a *B. cinerea* (Mehli *et al*., 2004; Osorio *et al*., 2008; Pombo *et al*., 2011). La caracterización molecular de las mutantes de *R. fruticosus* Cv. Tupi

tolerantes a *B. cinerea*, puede realizarse con el análisis de la expresión de éstos y otros genes relacionados con resistencia.

En este apartado, se muestran los avances realizados como parte inicial de la investigación para la caracterización molecular de plantas mutantes de zarzamora Cv. Tupi tolerantes a *B. cinerea* con el propósito de entender los mecanismos de estas plantas en la tolerancia al hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó como material vegetal plantas micropropagadas mutantes de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) control (no irradiadas) (Sección 7.1) y mutantes seleccionadas con tolerancia a *B. cinerea* (Sección 7.3).

Extracción de ADN total

El ADN genómico de las plantas de zarzamora (*R. fruticosus* Cv Tupi) irradiadas y no irradiadas se extrajo mediante el protocolo de Lin *et al*. (2001). Éste consistió en pulverizar 100 mg de hojas a partir de las plantas *in vitro* con nitrógeno líquido en un mortero, el polvo obtenido se transfirió a tubos Eppendorf con 60 μL de Buffer de extracción de ADN + 5 μL de 2β- mercaptoetanol, una vez homogenizada la muestra se calentó en baño de vapor a 65 °C durante 15 min. La muestra se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm a 4 °C, recuperando la fase acuosa. Al material recuperado se le adicionó 2 μL de RNAsa y se incubó a 37 °C durante 10 min, seguido de una extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (PCI) y precipitación en etanol del ADN. Se realizó una segunda centrifugación durante 10 min a 12,000 rpm a 4 °C, los sedimentos de ADN se lavaron dos veces con etanol al 70% y se disolvieron en 500 μL de Buffer TE y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Posteriormente, fue tratado con fenol cloroformo isoamílico (25:24:1) como desnaturalizadores y precipitadores de proteínas, después el ADN fue precipitado con

isopropanol. La concentración de ADN se determinó mediante la comparación con concentraciones conocidas de ADN del bacteriófago lambda (DNAλ) (30, 60 y 90ng/μL), visualizándose a través de un gel de agarosa al 0.8%. Las muestras de ADN fueron diluidas a un volumen total de 100 μL a 10 ng de concentración.

Extracción y cuantificación de ARN y Síntesis de cADN

Para la extracción del ARN, se molieron las hojas de plantas no irradiadas y de plantas mutantes de zarzamora Cv. Tupi, recolectadas con nitrógeno líquido, después fueron recolectadas en un mortero congelado. Aproximadamente 100 mg de hojas molidas fueron transferidas inmediatamente a un microtubo nuevo de 1.5 mL, previamente enfriado con nitrógeno líquido. La extracción de ARN total se realizó mediante el protocolo de López-Gómez y Gómez-Lim (1992).

Una vez obtenida la muestra, se agregó 600 μL de Buffer de lisis + 2 μL de 2 β-mercaptoetanol, homogenizada la muestra se sometió en baño de vapor a 65 °C durante 15 min, seguido de una precipitación en acetato de potasio y extracción con cloroformo frío. La muestra se centrifugo durante 10 minutos a 10,000 rpm recuperando la fase acuosa. Se realizó una segunda extracción con fenol: cloroformo: isoamílico 25:24:1, seguida de una de cloroformo: isoamílico 24:1, recuperando siempre las fases acuosas y centrifugando durante el mismo tiempo.

La muestra se precipitó durante 24 h a -20 °C. Transcurrido este tiempo la muestra se volvió a centrifugar a 13,000 rpm por 20 min. La pastilla se resuspendió en 50 μL agua destilada estéril y se almacenó a 70 °C hasta su uso. Una vez obtenido el ARN, se cuantificó por fluorometría mediante el uso del fluorómetro fabricante.

Para la síntesis del cADN a partir del ARN obtenido, este se sintetizó como lo marca el Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis, Thermo Scientific™. Primeramente se eliminó el ADN contaminante mediante la aplicación de la enzima ADNasa I a 1 μg de ARN. Una vez libre de ADN contaminante, se le agregó 1 μL de *Oligo* $(dT)_{18}$ *Primer*, 1 μL de 10 mM

dNTPs, 4 µL de *5X First Reacción Buffer*, 1 µL de *0.1 M DTT* y 1 µL de *RiboLock [Tm] Inhibidor de RNAsa (20u/ µl), 2 µl de M-MuLv Reversa Transcriptasa* y agua hasta completar un volumen de 20 µL. Los tubos se incubaron a 50 ºC durante 60 minutos, 55 ºC durante 15 minutos y 70 ºC durante 15 minutos. El cADN obtenido fue utilizado como templado para la reacción de PCR.

Electroforesis

La electroforesis se utilizó tanto para la visualización de ADN total, ARN, cADN y los productos de PCR, los fragmentos fueron amplificados en un gel de agarosa al 1.2% con una corrida de 70-80 V, la visualización de los fragmentos se logró tiñéndolos con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/mL

Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos, se buscaron las secuencias para cada uno de los genes candidatos (*FaChi*, *PR5*, *PGIP* y *CHS*) en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Para cada uno de los genes se buscaron como mínimo 5 secuencias que pertenecieran a la misma familia. Una vez obtenidas las secuencias se alinearon mediante el programa Clustal W para la búsqueda de sitios conservados y a partir de estos se diseñaron los oligonucleótidos de forma manual.

Condiciones de PCR

La PCR se ensambló con algunas modificaciones, las reacciones fueron efectuadas en el equipo v.4375786 Termociclador Veriti Applied Biosystems. Los volúmenes de reacción se detallan en el cuadro 8.

Las condiciones de PCR fueron desnaturalización inicial 94°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 30 s. y 72°C por 45 s. con una extensión final de 72°C por 7 min.

Cuadro 8. Volúmenes de cada componente de la reacción de PCR (Erlich, 1989**).**		
Componente	**Volumen (µL)**	**Concentración de reacción**
Agua Grado Molecular	4.3	-
Oligonucleótido Fw	1.5	30 pM
Oligonucleótido Rv	1.5	30 pM
Buffer	1.0	10X
cDNA	1.0	-
$MgCl_2$	0.3	25 mM
dNTP´s	0.2	2 mM
Taq Polimerasa	0.2	1 u/µL

RESULTADOS

El análisis de la integridad del ADN y ARN total extraído (100µL) a partir de hojas de plantas irradiadas y no irradiadas de hojas de zarzamora (*R. fruticosus* Cv. Tupi), se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio, en la figura 14 se muestra el resultado de la observación.

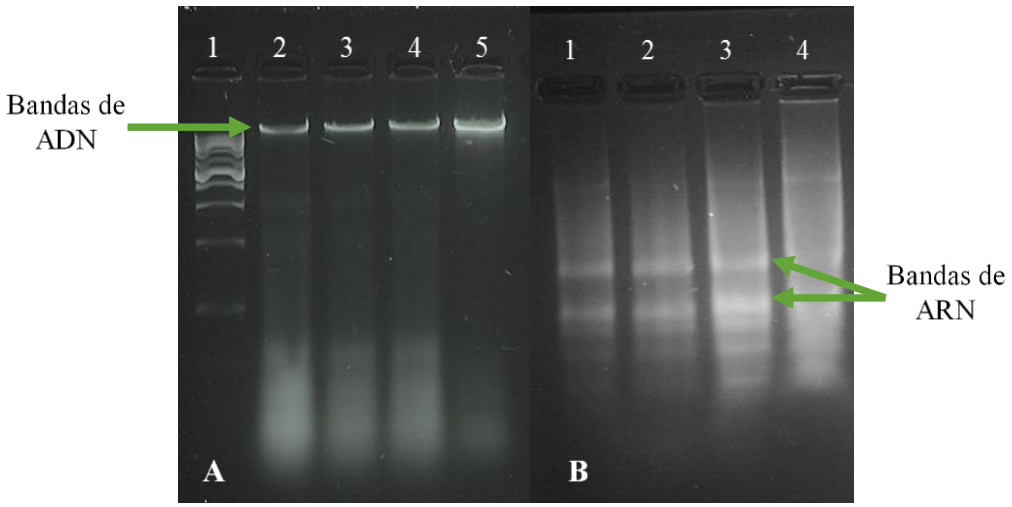


Figura 14. Ácidos nucleicos extraídos de hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) de plantas no tratadas y mutantes, visualizados en gel de agarosa al 1.2 %. La cantidad de muestra aplicada en cada carril fue de 6µL (3µL de buffer de carga Orange 6X y 3µL de ADN y ARN respectivamente). Carril 1A: Marcador

molecular de 1Kb, 2, 3, 4 y 5A: ADN de planta no tratada; 1, 2, 3 y 4B: ARN de planta mutante.

Una vez establecido el protocolo de extracción de ADN, ARN y cADN en plantas no irradiadas, se procedió a la extracción de ácidos nucleicos y síntesis de cADN de plantas control (Figura 15), mutantes tolerantes y susceptibles a *B. cinerea* (Sección 7.3) (Figura 16). Estos fueron utilizados para las pruebas de PCR.

Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos para cada uno de los genes propuestos en esta investigación, a partir con el programa bioinformático "Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit" Okonechnikov; Golosova-, Fursov; the UGENE team Bioinformatics 2012 28:1166-1167. Las características de los oligonucleótidos se detallan en el cuadro 9.

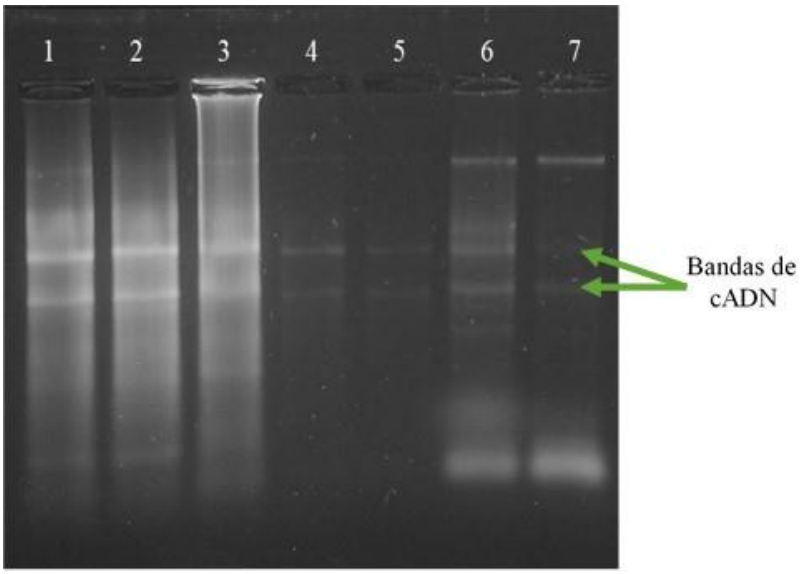


Figura 15. Síntesis de cADN extraído de hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), visualizados en gel de agarosa al 1.2 %. La cantidad de muestra aplicada en cada carril fue de 6µL (3µL de buffer de carga Orange 6X y 3µl de cADN).

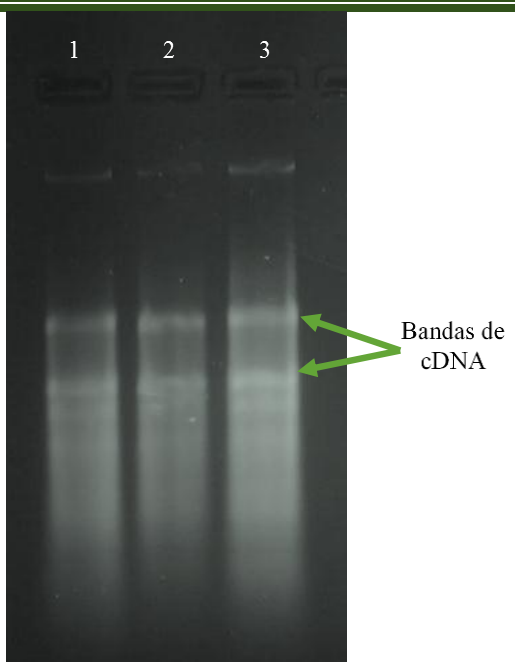


Figura 16. cADN extraído de hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), visualizados en gel de agarosa al 1.2 %. La cantidad de muestra aplicada en cada carril fue de 6µL (3µL de buffer de carga Orange 6X y 3µL de cADN). Carril 1: cADN de hoja de planta no tratada; 2: cADN de hoja de planta mutante línea RFGUM5 tolerante a *Botrytis cinerea* y 3: cADN de hoja de planta mutante RFGUM22 susceptible a *B. cinerea*.

Cuadro 9. Oligonucleótidos diseñados para los genes relacionados a la resistencia a *Botrytis cinerea*.

Gen	Sentido	Oligonucleótidos diseñados 5´-3´	Bases	Tm	GC%	Tamaño amplicón
pgip1	Fw	CAAGTYGCWGACTTGCCSTAY	21	67.6	57.1	930
	Rv	ACACAACCTGTTGTAGCTCAC	21	64.3	61.9	
pgip2	Fw	CAAGTYGCWGACTTGCCSTAY	21	71.5	42.8	633
	Rv	GCARCTTGGGAGKGGAGCACC	21	64.3	57.1	
pr5	Fw	TAYGAYGTTAGYCTTGTT	18	45.9	27.7	253
	Rv	KGGCGGYGTGCAYCAYTA	18	67.2	50	
fachi	Fw	TTTCTACACAAGGACGAY	18	59.3	38.8	324
	Rv	GGTWCTATCAACTTASCC	18	41	38.8	
fachs1	Fw	TACCCBGACTACTACTTTCG	20	56	45	1833
	Rv	ACTGTGAAGCACBACGGTCTC	21	61.2	52.3	
fachs2	Fw	GAAGAAATTCTVAAAGAGAAT	21	50.4	23.8	1659
	Rv	ACTGTGAAGCACBACGGTCTC	21	61.2	52.3	

PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Con el cADN extraído de todas las muestras (hoja planta no tratada, hoja de planta mutante RGFUM5 tolerante a *B. cinerea* y hoja de planta RFGUM22 susceptible a *B. cinerea*), se preparó una mezcla de PCR con oligonucleótidos de cada uno de los genes candidatos (*PGIP*, *Chi*, *CHS* y *PR5*). No hubo presencia de amplicones cuando se utilizaron oligonucleótidos para los genes *PGIP* y *Chi*; sin embargo, sí se observó la presencia de amplicones para los genes *PR5* y *CHS* (Figura 17 y 18, respectivamente). Para el gen *PR5* la presencia de amplicones se observó en todas las muestras evaluadas, mientras que para el gen *CHS* solo se presentó un amplicón en la muestra de planta no control (no irradiada).

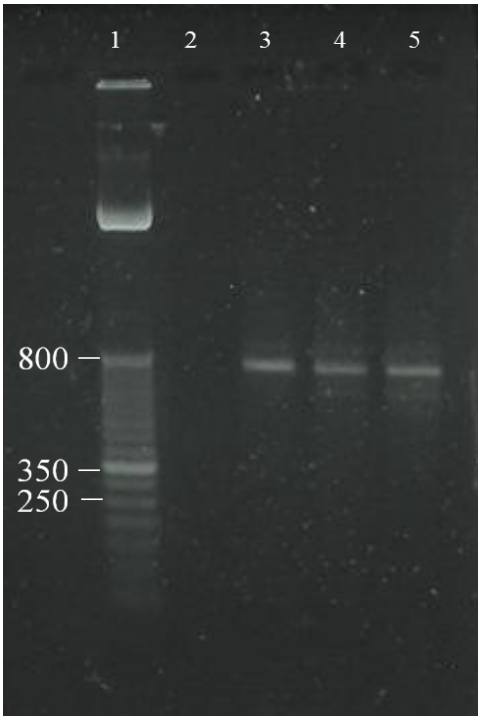


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % de productos de PCR de la amplificación con oligonucleótidos para el gen *PR5*. La cantidad de muestra aplicada en cada carril fue de 6µL (3µL de buffer de carga Orange 6X y 3µL de muestra). Carril 1: MM 50 pb; 2: control negativo; 3: planta no tratada; 4: planta mutante línea RFGUM5 tolerante a *Botrytis cinerea* y 5: planta mutante RFGUM22 susceptible a *B. cinerea*.

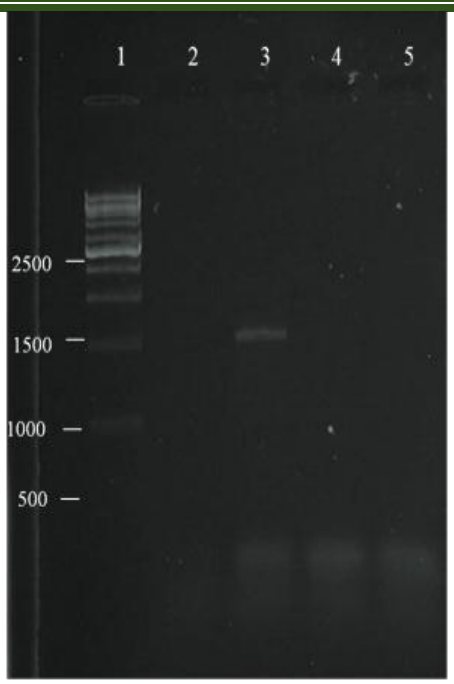


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % de productos de PCR de la amplificación con oligonucleótidos para el gen *CHS*. La cantidad de muestra aplicada en cada carril fue de 6µL (3µL de buffer de carga Orange 6X y 3µL de muestra). Carril 1: MM 1 Kb; 2: control negativo; 3: planta no tratada; 4: planta mutante línea RFGUM5 tolerante a *Botrytis cinerea* y 5: planta mutante RFGUM22 susceptible a *B. cinerea*.

Los genes *PR5* y *CHS* están presentes en zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv Tupi) que pueden ser tolerantes o susceptibles a *B. cinerea*, sin embargo, estos resultados solo son aproximaciones para la realización de futuros estudios moleculares. Se recomienda hacer una análisis exhaustivo de los genes encontrados en esta investigación, así como confirmar la expresión de los mismos, con bioensayos con inoculaciones controladas de *B. cinerea*. De igual manera, la realización de pruebas de transformación genética para sobrexpresar los genes de resistencia para determinar si confieren tolerancia a *B. cinerea* en plantas tolerantes y susceptibles a la enfermedad.

REFERENCIAS

Dunwell, J., Moya-León M. y Herrera R. 2001. Transcriptome analysis and crop improvement (a review). Biol. Res., 34:153-164.

Erlich, H.A. 1989. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. New York: Stockton Press, MacMillan Publishers Ltd., 246.

López-Gómez, R. y Gómez-Lim M.A. 1992. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. Horticultural science, 27(5):440-442.

Masuelli, W.R. 1999. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies hortícolas. Avances en Horticultura, 4(1):54-66.

Mehli, L., Schaart J.G., Kjellsen T.D., Diem H.T., Salentijn E.M.J., Schouten H.J. y Tor-Henning I. 2004. A gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) shows developmental regulation and pathogen-induced expression in strawberry. New Phytologist, 163:99-110.

Osorio, S., Castillejo C., Quesada M.A., Medina-Escobar N., Brownsey G.J. y Suau R. 2008. Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). Plant J., 54:43–55.

Pombo, M.A., Rosli H.G., Martínez G.A. y Civello P.M. 2011. UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria* x *ananassa* Duch.). Postharvest Biol. Technol., 59:94–102.

Primrose, S.B. y Twyman R.M. 2006. Principles of Gene Manipulation and Genomics. Seventh edition. Blackwell Publishing. 64 p.

Weeden, N.F., Timmerman M., Hermmat M., Kneen M.E. y Lohi M.A. 1992. Inheritance and reability of RAPD markers. In: J. Nienhuis (ed.) Proc. Symp. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding, p. 12-17 Nov. 1992, Minneapolis, Minn.