



**VIII SIMPOSIO INTERNACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

23- 25 de abril de 2008

RESÚMENES / ABSTRACTS

**Instituto de Biotecnología de las Plantas
Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
Santa Clara
Villa Clara
Cuba**



**VIII SIMPOSIO INTERNACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
23- 25 de abril de 2008**

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente:

Dr. Daniel Agramonte
Director
Instituto de Biotecnología de las Plantas

Secretario Organizador:

Dr. Rafael G. Kosky
Subdirector de Investigación
Instituto de Biotecnología de las Plantas

Organizador Profesional de Eventos:

Lic. Osmildo Fernández Tejera
Especialista en Información
Instituto de Biotecnología de las Plantas

COMITÉ CIENTÍFICO

Dra. Yelenys Alvarado-Capó
Dra. Marisol Freire-Seijo
Dra. Lourdes R. García
Dr. Elio Jiménez
Dr. Ramón Santos Bermúdez
Msc. José M. Machado-Rodríguez
Lic. Orelvis Portal
Lic. Aminael Sánchez

AUSPICIADORES



PATROCINADORES



Edición: Yelenys Alvarado-Capó

Diagramación: Marta Rodríguez Rodríguez

Impresión: Imprenta UCLV

Instituto de Biotecnología de las Plantas
Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Carretera a Camajuaní km 5.5
Santa Clara
Villa Clara
Cuba
CP 54 830
e.mail: simposio@ibp.co.cu
[http:// simposio.ibp.co.cu](http://simposio.ibp.co.cu)

Tabla de Contenido

Programa / *Programme*

Conferencias / *Lectures* 1

Talleres / *Workshops*

1. Plantas Leñosas/ *Forest and fruit plants* 3

2. Biofábricas / *Commercial plant propagation Lab.* 13

3. Plátanos y bananos / *Bananas and plantain* 19

4. Metabolitos secundarios de plantas / *Plant secondary metabolites* 29

5. Interacción planta patógeno/ *Plant pathogen interaction* 37

Póster / *Posters*

1. Cultivo de Células y tejidos / *Plant cell and Tissue culture* 45

2. Mejora genética / *Plant Breeding* 53

3. Técnicas moleculares aplicadas a plantas / *Molecular techniques applied to plants* 55

4. Propagación masiva / *Plant mass propagation* 59

5. Transformación genética / *Genetic transformation* 69

Índice de autores / *Authors index* 74

VIII SIMPOSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
PROGRAMA / PROGRAMME
22 – 25 de abril de 2008

Martes 22 / Tuesday 22nd

02:00 - 06:00 p.m. **ACREDITACIÓN / REGISTRATION**

Lugar: Aula 2

Miércoles 23 / Wednesday 23rd

08:00 - 09:00 am **ACREDITACIÓN / REGISTRATION**

Lugar: Aula 2

09:00 - 10:30 am **INAUGURACIÓN / OPENING**

Lugar: Teatro

Conferencia Inaugural / Opening plenary lecture. Carlos Borroto. (CIGB. Cuba). Impacto de la biotecnología agropecuaria en Cuba. Realidades, perspectivas y retos.

10:30 - 11:00 am **RECESO / COFFEE BREAK**

11:00 - 11:45 am

Lugar: Teatro

CONFERENCIA / PLENARY LECTURE. Geert Angenon. (VUB. Bélgica). Tools for germline specific DNA modifications.

11:45- 01:00 pm

SESION DE POSTER / POSTERS SESSION

Póster Taller Plantas Leñosas / Posters Forest and fruit plants workshop

Póster Taller Biofábricas / Posters Commercial plant propagation lab. workshop

Propagación Masiva de Plantas / Plant mass propagation

- Javier Sánchez Velasco *et al.* (Centro de Bioplantas. Cuba). Propagación *in vitro* de tres variedades de callas (*Zantedeschia* sp). en diferentes formas de cultivo.

- Grecia Montalvo *et al.* (Empresa Nacional para la protección de la Flora y la Fauna. Cuba). Propagación *in vitro* de *Pilosocereus* sp. (un cactus en peligro crítico de extinción). Comportamiento en condiciones de campo.

- Rayza M. González Rodríguez *et al.* (Centro de Bioplantas. Cuba). Aplicación de un biopreparado a base de *Azotobacter chroococcum* en la fase de aclimatización de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr).

- Ma. Margarita Hernández *et al.* (INCA. Cuba). Empleo de una mezcla de oligogalacturónidos en la micropropagación de especies vegetales.

- Lorenzo Suárez Guerra *et al.* (INCA. Cuba). Efecto del Pectimorf®, mezcla de Oligogalacturónidos (GP 7- 16), en la propagación *in vitro* de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), var. CMC- 40.

- Nilca Albany *et al.* (Universidad del Zulia. Venezuela). Uso de medios de cultivos líquidos en la propagación *in vitro* de Zábila (*Aloe barbadensis* Mill.).

- Jorge Vilchez *et al.* (Universidad del Zulia. Venezuela). Determinación del tiempo y frecuencia de inmersión en la multiplicación *in vitro* de *Xanthosoma sagittifolium* L. Schott en sistemas de inmersión temporal.

- C. Aragón *et al.* Centro de Bioplantas. Cuba. Estrés oxidativo y patrones de respuesta molecular de las plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) micropropagadas en medio de cultivo semisólido (SS) y en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT)

- Cynthia Sánchez-García *et al.* (IBP. UCLV. Cuba). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cymbopogon nardus* frente a microorganismos fitopatógenos del cultivo *in vitro* de plantas contaminantes.

- Odalys Rivera *et al.* (ETICA. Cuba). Micropropagación del Lirio Antorcha (*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm.).
- Carlos Reyes *et al.* (ETICA. Cuba). Efecto de la solución enraizadora MACNI en el desarrollo de las raíces en plantas cultivadas *in vitro* de plátano FHIA-18 en fase de aclimatización.
- Arletys Santos *et al.* (INIVIT. Cuba). Multiplicación en Sistema de Inmersión Temporal del clon de malanga 'Viequera' (*Xanthosoma* spp.).
- Milagros Basail Pérez *et al.* (INIVIT. Cuba). Multiplicación en Sistema de Inmersión Temporal del clon de Boniato INIVITB2-2005.
- Enidia Téllez *et al.* (Centro de Desarrollo de la Montaña. Cuba). Micropropagación de malanga *Xanthosoma violaceum*.
- José E. González. *et al.* (INIVIT. Cuba). Modelación del proceso de inactivación de las nucleoproteínas con el uso de la corriente eléctrica.
- Françoise Romaine y Joseph Mabanza (CERAG, Congo). Importancia del cultivo *in vitro* en la conservación de los cultivos de *Manihot sculenta* Crantz. en el Congo

Técnicas Moleculares aplicadas a plantas / Molecular techniques applied to plants

- Yoel Beovides *et al.* (INIVIT. Cuba). Desarrollo de marcadores moleculares ligados a contenido de materia seca en yuca (*Manihot esculenta* Crantz).
- Juliette Valdés-Infante Herrero *et al.* (Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Cuba). Marcadores moleculares para el estudio del banco de germoplasma de guayabo (*Psidium guajava* L.) en Cuba.
- Daniel Cabezas Montero *et al.* (Universidad Agraria de la Habana. Cuba). Determinación de genes que responden a la elongación del tallo del arroz (*Oryza sativa* L.) mediante aplicaciones de Giberelinas usando el microarreglo ADNc.
- Diego Martínez R. *et al.* (Universidad de Antioquia. Colombia). Caracterización genómica de *Stevia rebaudiana* Bertoni. cultivada en el departamento de Antioquia (Colombia).
- Maruchi Alonso *et al.* (Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Cuba). Variabilidad molecular de una población de cocoteros verdes en la región de Baracoa.

Mejora Genética de Plantas / Plant Breeding

- Leyanes Díaz y José Carlos Lorenzo (Centro de Bioplasmas. Cuba). Bioensayo para la diferenciación rápida y no destructiva de patrones de cítrico susceptibles y resistentes/tolerantes a la sequía.

01:00- 02:00 pm

ALMUERZO / LUNCH

02:00- 04:30 pm

TALLERES / WORKSHOPS

Lugar: Teatro

TALLER PLANTAS LEÑOSAS/ FOREST AND FRUIT PLANTS WORKSHOP.
Moderador/ Chairman: Raúl Barbón.

Presentaciones Orales / Oral presentations

- Luis Valledor (Universidad de Oviedo. España). Perfiles de expresión diferencial de proteínas asociados a la maduración de acículas de *Pinus radiata* D. Don.: mapa 2-DE e identificación de proteínas mediante LC/MS/MS y búsquedas tolerantes a sustitución.
- Mónica Meijón (Universidad de Oviedo. España). Optimización del desarrollo vegetativo y floral en azalea. Análisis molecular y nuclear de la aplicación de daminocida.

- María Inés Dávila (UNAN-León. Nicaragua). Propagación vegetativa de dos especies forestales en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UNAN-León.
- Elisa Quijala (IBP. UCLV. Cuba) Efecto de diferentes explantes, la frecuencia de inmersión y la concentración de 6-BAP en la multiplicación de brotes de *Tectona grandis* L. en sistemas de inmersión temporal.
- Marisol Freire-Seijo (IBP. UCLV. Cuba). Empleo de la biotecnología en la propagación *in vitro* de especies de bambú.
- Manuel de Feria (IBP. UCLV. Cuba). Formación de callos en medio de cultivo líquido a partir de segmentos de tallos de plantas *in vitro* y establecimiento de suspensiones celulares de *Pinus caribaea* var. *caribaea*.
- Iván Borroto (UCLV. Cuba). Embriogénesis somática de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq en medios de cultivo semisólidos.

Sesión de póster / Posters session

- Yudith García-Ramírez *et.al.* (IBP. UCLV. Cuba). Formación de callos a partir de semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees.
- Jorge Gallardo-Colina *et al.* (IBP. UCLV. Cuba). Confección de un banco de plantas donantes a partir de riendas de plantas adultas para el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia*.
- Marcos Daquinta *et.al.* (Centro de Bioplant. Cuba) Propagación *in vitro* de *Bambusa bambos* en diferentes formas de cultivo.
- Janet Igarza Castro *et al.* (Lab. Biotecnología vegetal Holguín. Cuba). Empleo de reguladores de crecimiento para la propagación de *Guadua angustifolia* por vía tradicional.
- Mayra Acosta-Suárez *et al.* (IBP. UCLV. Cuba). Micobiota epifítica y contaminantes fúngicos del establecimiento *in vitro* de especies de bambúes.
- Raúl Barbón *et al.* (IBP. UCLV. Cuba). Embriogénesis somática indirecta en *Eucalyptus urograndis*.
- F. Jiménez-Terry *et al.* (IBP. UCLV. Cuba). Establecimiento y Multiplicación *in vitro* de *Cedrela odorata* L.

Lugar: Aula 1

TALLER BIOFÁBRICAS/ COMMERCIAL PLANT PROPAGATION LAB. WORKSHOP. Moderador/ Chairman: Miguel Suárez-Castellá.

Presentaciones Orales / Oral presentations

- Pedro Orellana (IBP. UCLV. Cuba). Propagación *in vitro* de especies vegetales: problemas, impactos y perspectivas.
- Malachy Dottin (UNEP Advisor, Granada). The impact of agro-biotech in Latin America and Caribbean region.
- Adilson Córrea (Biofábrica Canavialis S.A. Brasil). Biofábrica y los problemas dentro de una producción masiva.
- Mileidy Pons-Corona (IBP. Cuba). Propagación masiva vía embriogénesis somática en medio de cultivo semisólido del cultivar de banano Grande naine (*Musa* spp. AAA).

- Manuel Cabrera (INIVIT. Cuba). Formación de microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal como alternativa para la propagación.
- Eduardo Morillo y Denisse Peña (INIAP, Ecuador) Desarrollo de la biotecnología agrícola en el Ecuador: el caso del INIAP.

Sesión de póster / Posters session

- Pablo Machado (ETICA. Cuba). Montaje y puesta en marcha de Sistemas Avanzados de Micropropagación en Caña de Azúcar en la Biofábrica Gobernador Miguel Arraes, Brasil
- Aydiloide Bernal *et al.* (ETICA. Cuba). Transferencia de Tecnología y puesta en marcha de los Sistemas de Inmersión Temporal en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos BIOLAB, Tecnología Vegetal LTDA de Brasil.
- Joseph Mabanza y Françoise Romaine (CERAG, Congo) Importancia de la micropropagación en el suministro en material vegetal para los campesinos.
- Claudia Beatriz Sorol y Miguel Suárez-Castellá (Universidad Nacional de Misiones, Argentina). Las Buenas Prácticas en la estrategia de elaboración de los PNO de la biofábrica del PTMi
- Pedro Orellana *et al.* (IBP. UCLV. Cuba). Métodos y elementos básicos para la planificación de la producción *in vitro* en biofábricas.
- Silvio de Jesús Martínez Medina (Universidad de Cienfuegos, Cuba). Empleo de medios de cultivo multiplicación – enraizamiento en la micropropagación de plátanos y bananos.

04:30- 07:30 pm

COCTEL DE BIENVENIDA / WELCOME COCKTAIL

Jueves 24 / Thursday 24th

08:45- 09:30 am

Lugar: Teatro

CONFERENCIA / PLENARY LECTURE Eva Vranová (Institute of Plant Sciences, Suiza) Systems approaches to understand regulation of the isoprenoid pathway and its integration into the cellular gene network.

9:30- 10:00 am

RECESO / COFFEE BREAK

10:00- 10:45 am

Lugar: Teatro

CONFERENCIA / PLENARY LECTURE Claudio Stasolla (Univ. of Manitoba, Canadá). Regulation of *in vitro* embryogenesis: improving embryo quality.

10:45- 01:00 pm

SESION DE POSTER / POSTERS SESSION

Póster Taller de Plátanos y Bananos / Posters Bananas and plantain workshop

Póster Taller Metabolitos Secundarios de Plantas / Posters Plant Secondary metabolites workshop

Póster Taller Interacción Planta-Patógeno / Posters Plant-pathogen interaction workshop

Cultivo de células y tejidos / Plant cell and tissue culture

- Misterbino Borges García *et al.* (Universidad de Granma, Cuba). Evaluación de la adición de diferentes concentraciones de carbón activado en el medio de multiplicación *in vitro* del ñame

- Maylin Pérez Bernal *et al.* (CIGB-SS, Cuba). Organogénesis indirecta a partir de meristemos apicales de la variedad de arroz Reforma.
- Yanelis Castilla Valdés *et al.* (INCA, Cuba). Empleo de un análogo de brasinoesteroide como sustituto de la citoquinina en el cultivo de meristemos del clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.)
- Mario A. Kryvenki *et al.* (INTA, Argentina). Avances de la embriogénesis somática en la yerba dulce (*Stevia rebaudiana* Bert.) a partir de hojas de plantas *in vitro* y de botones florales inmaduros.
- R. Collado *et al.* (IBP. UCLV. Cuba). Formación de embriones somáticos en *Phaseolus vulgaris* cv. CIAP 7247
- Diego Martínez *et al.* (Universidad de Antioquia. Colombia). Efecto del tipo de luz sobre la organogénesis inducida en hojas de *Stevia rebaudiana* Bert.
- Lourdes García-Rodríguez *et al.* (IBP. UCLV. Cuba). Regeneración de plantas vía organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* L.
- Laisyn Posada-Pérez *et al.* (IBP. UCLV. Cuba). Regeneración de plantas vía embriogénesis somática en papaya (*Carica papaya* L.) variedad Maradol rojo.
- Nidia Araiza Lizarde *et al.* (Universidad Politécnica de Sinaloa, México) Evaluación de la germinación de Chiltepin (*Capsicum frutescens*) en condiciones *in vitro*.
- Marcos E. Martínez-Montero *et al.* (Centro de Bioplantitas, Cuba). Almacenamiento *in vitro* de los recursos fitogenéticos mediante la criopreservación.
- Karen Alvarado *et al.* (Centro de Desarrollo de la Montaña, Cuba). Efecto de la concentración de sacarosa en la germinación de embriones cigóticos en cuatro cultivares de cocotero indio.
- Adalia Taquechel *et al.* (Centro de Desarrollo de la Montaña, Cuba). Alternativa para la desinfección de embriones cigóticos de cocotero a establecer *in vitro*.
- Javier Pérez *et al.* (Universidad de La Habana, Cuba). Monoésteres y anhídridos de análogos de brasinoesteroides para conjugar a Quitosana: sistemas de liberación controlada de promotores del crecimiento vegetal.
- Aymé Rayas *et al.* (INIVIT, Cuba). Efecto del manitol en la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata*.
- Loexis Rodríguez *et al.* (Centro de Desarrollo de la Montaña, Cuba). Determinación de los medios de cultivo para la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de Orquídeas silvestre.

Transformación genética / Plant genetic transformation

- Lourdes Yabor *et al.* (Centro de Bioplantitas, Cuba). Proteomic analysis of transgenics pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr. plants
- Irene Alvarez *et al.* (CIGB-Camagüey, Cuba). Molecular evidences confirming *cry3a* transgene integration and expression in transformed sweet potato plants resistant to weevil attack.
- Irene Alvarez *et al.* (CIGB-Camagüey, Cuba). La unión de la δ -endotoxina Cry 3A de *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis* a vesículas de membrana de borde en cepillo del tracto medio intestinal de *Cylas formicarius elegantulus* (C.f.e) pueden estar relacionadas con la actividad insecticida de plantas transgénicas de Boniato (*Ipomoea batatas*).
- Bárbara Valle Yanes *et al.* (Centro de Bioplantitas, Cuba). Efecto de la aplicación del herbicida FINALE[®] en plantas transgénicas de piña portadoras del gen *bar*, en condiciones de campo.
- I. Bermúdez-Carabaloso *et al.* (IBP. UCLV. Cuba). Empleo de los agentes selectivos Geneticina G-418 e Higromicina B para la transformación genética en *Phaseolus vulgaris* variedad CIAP 72-47.

- J M Machado-Rodríguez *et al.* (IBP. UCLV. Cuba). Particularidades en el cierre de experimento en campo del plátano y banano transgénicos.
- Maylin Cruz *et al.* (Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Cuba). Protocolo para el enraizamiento y aclimatización de plantas transgénicas de papaya variedad Maradol Roja.

01:00-02:00 pm

ALMUERZO / LUNCH

02:00- 05: 30 pm

TALLERES / WORKSHOPS

Lugar Aula 1

TALLER METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS / PLANT SECONDARY METABOLITES

Moderador / Chairman: Elio Jiménez.

Presentaciones Orales / Oral presentations

- Danny Geelen (Universidad de Gent. Bélgica) Hairy root cultures from *Maesa lanceolata*.
- Andre Gerth (BioPlanta GmbH. Alemania) The production of plant secondary metabolites using bioreactors
- Diego Martínez (Universidad de Antioquia. Colombia). Propagación *in vitro* de *Renalmia alpinia* (Rottb.), planta con actividad Antiofídica
- Reinaldo Trujillo (Centro de Bioplasmas. Cuba). Producción de Antraquinonas en callos de *Morinda royoc* L. y *Morinda citrifolia* L.
- Marta Hernández (Centro de Bioplasmas. Cuba) Análisis proteómicos por electroforesis bidimensional de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultivadas *in vitro*.
- Naivy Pérez-Alonso (IBP. UCLV. Cuba). Regeneración de plantas vía embriogénesis somática y estudio de agentes selectivos para la transformación genética de *Digitalis purpurea* L.

Sesión de póster / Posters session

- Janetsy Borroto *et al.* (Centro de Bioplasmas. Cuba) Producción de antraquinonas de cultivo de callos de *Morinda royoc* L.
- Maribel Rivas *et al.* (Centro de Bioplasmas. Cuba) Establecimiento de una suspensión celular de *morinda citrifolia* L. para la obtención de antraquinona.
- Alina Capote *et al.* (IBP. Cuba) Determinación de la concentración mínima inhibitoria de higromicina B, kanamicina y geneticina en brotes y callos embriogénicos de *Digitalis purpurea* L.
- Zenaida Occequera *et al.* (ETICA. Cuba) Regeneración vía embriogénesis somática en *Digitalis purpurea* L. a partir de explantes foliares.
- Mayelin Mora *et al.* (Centro de Bioplasmas. Cuba) Caracterización cinética y molecular de una nueva cisteína proteasa aislada de tallos de *Hohenbergia penduliflora* Mez.
- Martha Hernández *et al.* (Centro de Bioplasmas. Cuba). Análisis del proteoma de plantas de la familia *Bromeliaceae* por electroforesis 2D.

Lugar: Teatro

TALLER PLÁTANOS Y BANANOS / BANANAS AND PLANTAIN WORKSHOP

Moderador/ Chairman: Rafael G. Kosky.

Presentaciones Orales / Oral presentations

- Jorge Sandoval (CORBANA. Costa Rica) Estabilidad genética de plantas de *Musa* obtenidas mediante organogénesis y embriogénesis somática.
- Alvaro Segura (Universidad de Costa Rica. Costa Rica) Análisis del crecimiento, particionamiento de materia seca y fenología de tres cultivares Cavendish AAA en la primera generación de plantas provenientes de cultivo *in vitro*.
- D. Mbeguie-a-Mbeguie (CIRAD-FLHOR. Guadalupe) Cloning and characterization of ripening-related cDNAs from banana fruit: functional genomic tools for molecular mechanism studies of fruit-quality elaboration.
- Jorge López (INIVIT. Cuba) Nueva metodología de embriogénesis somática para cultivares de plátano vianda (grupo AAB) y su escalado en biofábricas.
- Leyanis García –Águila (IBP. UCLV. Cuba) Propagación de FHIA 21 por embriogénesis somática.
- Maritza Reyes (IBP. UCLV. Cuba) Empleo del Glufosinato de Amonio en la selección de plantas transformadas de banano cv. Grande naine (*Musa* spp. AAA).
- Borys Chong (IBP. UCLV. Cuba) Induction of *Agrobacterium tumefaciens* with spermidine and its effect on the transformation frequency on banana cv. Grande naine (*Musa* AAA)
- Michel Leiva-Mora (IBP. UCLV. Cuba) Componentes de la resistencia para evaluar la respuesta a la Sigatoka negra en genotipos de *Musa* inoculados artificialmente.

Sesión de póster / Posters session

- Zoe Sarría *et al.* (IBP. UCLV. Cuba) Embriogénesis somática en plátano cv. FHIA-21 (*Musa* AAAB) en medios de cultivo líquido.
- Miladys León-Quintana *et al.* (IBP. UCLV. Cuba) Evaluación morfológica, agronómica y molecular mediante AFLP en plantas del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' regeneradas por embriogénesis somática.
- Mayra Jiménez Vázquez *et al.* (ETICA. Cuba) Crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas del cultivar de plátano CEMSA ³/₄.
- María Isabel Román *et al.* (INIVIT. Cuba) Análisis de la variabilidad genética en somaclones de plátanos *Musa* spp.
- Leneidy Pérez Pelea *et al.* (Fac. Biología Univ. Habana. Cuba) Establecimiento de una metodología para la determinación del índice mitótico en los clones de plátano Calcutta-4 y Bluggoe (*Musa* spp.).
- Luis Alberto Delgado Fernández *et al.* (FAME. Cuba) Estudio preliminar del comportamiento de vitroplantas de *Musa* sp. (clon FHIA 18) en las condiciones edafoclimáticas de Topes de Collantes.
- Yvo Hernández G. *et al.* (UNESUR. Venezuela) Niveles endógenos de giberelinas y elementos minerales durante la transición floral en plátano (*Musa* AAB) cv. Hartón.

Viernes 25 / Friday 25th

08:45- 09:30 am

Lugar: Teatro

CONFERENCIA / PLENARY LECTURE Mónica Hofte. (Univ. Gent, Bélgica). Mechanisms involved in induced systemic resistance in rice.

9:30-10:00 am

RECESO / COFFEE BREAK

10:00- 01:00 pm

TALLER / WORKSHOP

Lugar: Aula 1.

TALLER INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO / PLANT – PATHOGEN INTERACTIONS WORKSHOP

Moderadora/ Chairman Yelenys Alvarado-Capó.

Presentaciones Orales / Oral presentations

- Karen Lemmens (K.U. Leuven, Bélgica). Motif detection to study subfunctionalization
- Orlando Coto ((Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Cuba). Avances recientes en la identificación y caracterización de especies de *Phytophthora* que afectan árboles frutales: Estado del trabajo en Cuba.
- Miladys Mendoza-Rodríguez (IBP. UCLV. Cuba) Identificación de secuencias que se expresan diferencialmente en la interacción no compatible *Musa acuminata* - *Mycosphaerella fijiensis* Morelet
- Novisel Veitía (IBP. UCLV. Cuba) Obtención y empleo de filtrados del cultivo de *Alternaria solani* Sor. para la selección *in vitro* de genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.) resistentes al tizón temprano.
- María I. Oloriz (IBP. UCLV. Cuba) Expression of two NAC family transcription factors during incompatible interaction *Puccinia melanocephala* H & P. Syd – *Saccharum* spp.
- Leidy Cortegaza (INICA. Cuba) Influencia del mecanismo de defensa en caña de azúcar utilizando *Gluconoacetobacter diazotrophicus* contra la bacteria patógena *Xanthomonas albilineans*.
- Arturo Carabalí (CIAT. Colombia) *Manihot flabellifolia* Pohl fuente silvestre de Resistencia a la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Hemiptera: *Aleyrodidae*)

Sesión de Póster / Posters session

- Mileidy Cruz-Martín (IBP. UCLV. Cuba) Actividad antifúngica de metabolitos bacterianos frente a *Mycosphaerella fijiensis*.
- Bárbara Ocaña (IBP. UCLV. Cuba) Aislamiento y caracterización del gen que codifica para la enzima Isocitrato liasa de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.
- Nayanci Portal González (Univ. Ciego de Ávila. Cuba) Actividad fitotóxica y proteínas microbianas en filtrados de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (raza 1 y raza 2).
- Dariel Cabrera (UCLV. Cuba) *Papaya Ringspot Virus* (PRSV-P): Aspectos biológicos y epidemiológicos.

01:00- 02:00 pm

CEREMONIA DE CLAUSURA / CLOSING CEREMONY

02:00 pm

COCTEL DE DESPEDIDA / FAREWELL COCKTAIL

04:00 pm

DEPARTURE TO HAVANA CITY (FOREIGN PARTICIPANTS)

CONFERENCIA

Tools for germline specific DNA modifications

Geert Angenon*, Frédéric Van Ex, Dimitri Verweire. *Autor para correspondencia.

Laboratory of Plant Genetics, Institute for Molecular Biology and Biotechnology, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussels, Belgium.

We have characterized a range of promoters which are preferentially or specifically active in meiotic or meristematic cells as well as plants containing the Cre/loxP site specific recombination system under control of such promoters. Promoter sequences were isolated from *Arabidopsis thaliana* genes with activity profiles that cover a broad spectrum of developmental stages: stem cell identity genes (*CLAVATA3*), flower meristem identity genes (*LEAFY*, *APETALA1*), floral organ identity genes (*AGAMOUS*), cadastral genes (*SUPERMAN*) and meiosis specific genes (*SOLO DANCERS*; *SWITCH*; *MALE MEIOCYTE DEATH1*). The promoters were assayed through fusion with either the *gus* reporter gene or with the *cre* recombinase gene, followed by monitoring excision of loxP flanked DNA sequences. The results show that the *CLAVATA3*, *LEAFY*, *APETALA1*, *SUPERMAN* and *SOLO DANCERS* promoters are suitable for conditional *cre* expression. These promoters and/or promoter-Cre constructs can be used in a variety of applications, e.g. to activate or inactivate transgenes at a biologically defined moment, to enhance or reduce recombination and/or repair mechanisms during plant reproductive development, to excise transgene sequences during reproductive development etc. One specific application we developed is the genetically programmed auto-excision system for removal of marker genes or other unwanted DNA sequences. With this system marker genes are efficiently removed in either the male germline or in both the male and the female germline, allowing to obtain marker free transgenic progeny plants.

Systems approaches to understand regulation of the isoprenoid pathway and its integration into the cellular gene network

Eva Vranová¹*, Diana Coman¹, Gilles Beck¹, Marta Closa², Anja Wille³, Albert Ferrer², Wilhelm Gruissem¹.

*Autor para correspondencia.

¹Institute of Plant Sciences, Universitaetstrasse 2, ETH Zurich, 8 092 Zurich, Switzerland. e-mail: evranova@ethz.ch

²Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, 08,028 Barcelona, Spain.

³Reverse Engineering Group, ETH Zurich, 8 092 Zurich, Switzerland.

Plant isoprenoids represent the largest group of biologically active metabolites with at least 30 000 chemical compounds. Plant isoprenoids have essential functions in physiological and biochemical processes (e.g., photosynthesis, respiration, membrane fluidity, pathogen defense, key plant hormones -cytokinin, brassinolides, gibberellic acid, abscisic acid; protein prenylation). Many plant isoprenoids also have substantial commercial, pharmacological and agricultural value (e.g., essential oils, anticancer drug taxol, antimalarial drug artemisinin, polymers in rubber, antibiotics, carotenoid and tocopherol antioxidants, herbivore repellents). Understanding the regulation of the plant isoprenoid biosynthetic pathway and its integration into the cellular gene network is therefore of high scientific and commercial interest. In our laboratory, we are using systems approaches to understand the isoprenoid pathway regulation as well as pathway integration into the cellular gene network. To this end, using variety of publicly available genome-wide gene expression data sets, we modeled the isoprenoid pathway network using sparse Gaussian graphical modeling. This analysis revealed some novel unexpected dependencies between the genes in the pathway. Another approach that we are undertaking is the molecular analysis of responses upon systematic perturbation of the isoprenoid pathway using *Arabidopsis* loss-of-function mutants. Many enzymes of the isoprenoid pathway are encoded by isozymes and one aspect that we try to understand is analysis of their function in plants. Duplicated genes for metabolic reactions may have a gene dosage function, can mediate differential spatial and temporal allocation of metabolites or they can be associated with distinct metabolic fluxes. We are exploring function of metabolic isozymes using farnesyl diphosphate synthase (FPS) and geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) enzymes as an example. So far we could demonstrate both overlapping as well as specialized functions for the studied isozymes.

Regulation of *in vitro* embryogenesis: improving embryo quality

Claudio Stasolla

Dept. Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, MB, 3RT-2N2, Canada. e-mail: stasolla@ms.umanitoba.ca

The production of embryos in culture has been primarily achieved through somatic embryogenesis and androgenesis. Despite continued efforts to improve culture conditions, embryos produced *in vitro*

often fail to regenerate vigorous plants. This is mainly due to structural abnormalities observed during late embryogeny, when poorly organized apical meristems form and fail to reactivate at germination. Our work has revealed that the developmental pathway of embryos in culture can be manipulated through alterations of the cellular redox status, with an oxidized environment favoring proper development and a reduced environment promoting post-embryonic growth. The effects of an imposed glutathione oxidized environment during embryogenesis was investigated in both white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos and microspore-derived embryos of canola (*Brassica napus*) using cDNA microarray techniques. Our results demonstrated that in both systems the oxidized glutathione environment activates several metabolic pathways and induces the expression of key genes involved in apical meristem formation and maintenance. Some of these genes in *Brassica* including *ZWILLE*, *SHOOTMERISTEMLESS*, and *ARGONAUTE 1*, have been shown to control stem cell identity in *Arabidopsis*. In both spruce and canola post-embryonic growth is favored by the imposition of a reduced ascorbate environment which induces apical meristem reactivation by stimulating cell proliferation in deteriorated meristems. Experiments on pyrimidine nucleotide biosynthesis have also confirmed the involvement of a reduced environment on promoting nucleotide and nucleic acid synthesis in the meristematic cells of germinating embryos. These studies provide valuable information for the optimization of culture conditions which has the potential to improve propagation methods.

Mechanisms involved in induced systemic resistance in rice

David De Vleeschauwer, Parissa Taheri Monica Höfte*
*Autor para correspondencia.

Lab. Phytopathology, Dept. Crop Protection, Gent University,
Coupure Links 653, B-9000 Gent, Belgium.
e-mail: monica.hofte@ugent.be

The fungal diseases rice blast (caused by *Magnaporthe oryzae*), sheath blight (caused by *Rhizoctonia solani*), and brown spot (caused by *Bipolaris oryzae*) are among the major constraints on high productivity of rice, which is the world's most important staple food. There is a lot of interest to develop rice lines with durable broad-spectrum

resistance to these three pathogens. This may be obtained by resistance breeding or by inducing the resistance response of the plant by appropriate stimulation. Little is known, however, about the molecular mechanisms underlying basic and induced resistance in rice. In our laboratory we are using various metabolites and plant activators that are known to induce resistance to study signal transduction pathways involved in induced systemic resistance (ISR) in rice. In general we can state that metabolites and plant activators that act through the salicylic acid-dependent signal transduction pathway and/or induce hydrogen peroxide production enhance resistance to rice blast, but increase susceptibility to sheath blight and brown spot. We have shown this in detail for the bacterial metabolite pyocyanin. Riboflavin or vitamin B₂ is an effective plant defense activator against different fungal, bacterial, and viral pathogens in *Arabidopsis* and tobacco. Low concentrations of riboflavin or vitamin B₂ were very effective in inducing resistance to rice sheath blight. Suppression of disease progress was linked with lignin formation at the infection sites. A correlation was found between induction of resistance by riboflavin and upregulation of a cationic peroxidase (PO-C1) gene involved in lignin production. Several lines of evidence suggest an involvement of the jasmonate-dependent signal transduction pathway in riboflavin-induced resistance against *R. solani*. It has been shown before that riboflavin is also effective in inducing resistance to rice blast. Intriguingly, riboflavin treatment resulted in an increased susceptibility to the brown spot fungus *Bipolaris oryzae* indicating that the jasmonate pathway is not effective against this fungus. The plant hormone abscisic acid (ABA) plays an important role in plant-pathogen interactions. Treatment of rice plants with ABA increased susceptibility to rice blast, had no effect on *R. solani*, but resulted in significantly enhanced resistance to *Bipolaris oryzae*. Stimulation of ethylene production by etephon application, however, resulted in increased susceptibility to *B. oryzae*. We have evidence that ABA-induced suppression of the ethylene response is involved in ISR to *B. oryzae*. In line with this observation, we found that a transgenic rice line with a reduced ethylene response became more resistant to *B. oryzae*. Our results clearly show that rice requires distinct signal transduction pathways to defend itself to its three major fungal pathogens. This knowledge has to be taken into account when designing strategies to develop broad-spectrum disease resistance in rice.

TALLER DE LEÑOSAS

Perfiles de expresión diferencial de proteínas asociadas a la maduración de acículas de *Pinus radiata* D. Don.: mapa 2-DE e identificación de proteínas mediante LC/MS/MS y búsquedas tolerantes a sustitución

Valledor, L.^{1*}, Castillejo, M.A.², Lenz, C.³, Rodríguez, R.¹, Cañal, M.J.¹, Jorrín, J.². *Autor para correspondencia.

¹Grupo de investigación *EPIPHYSAGE*, Área de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo, Oviedo, España.

²Grupo de investigación de Proteómica Vegetal-Bioquímica Vegetal y Agrícola, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba, Córdoba, España.

³Applied Biosystems Deutschland, Darmstadt, Alemania. Dpto. BOS, Fisiología Vegetal. c/ Catedrático Rodrigo Uria s/n, E-33071, Oviedo, España. e-mail: valledor@uniovi.es

Pinus radiata es una de las especies forestales de mayor importancia económica, con una producción mundial cercana a los 400 millones de m³ de madera por año. En la actualidad la selección de nuevos individuos élite para su incorporación a los programas de mejora está asistida con el empleo de marcadores moleculares relacionados con crecimiento, productividad y respuestas a factores ambientales. En este trabajo, empleando una aproximación proteómica, se presenta un mapa de referencia 2-DE de acículas fisiológicamente maduras, así como el estudio de la expresión diferencial de proteínas asociadas a la maduración. Se examinaron 857 proteínas correspondientes a dos estados diferentes de desarrollo, 1 y 13 meses de edad. Tras estimación de los valores perdidos, normalización y transformación de los datos, se determinaron 279 proteínas cuya expresión es diferencial. Los distintos grupos de expresión fueron reconocidos mediante un agrupamiento jerárquico de dos vías y análisis de componentes principales. La identificación de proteínas a partir de espectros LC/MS/MS se realizó empleando un nuevo algoritmo tolerante a sustituciones en la primera etapa de búsqueda. Empleando este sistema se consiguieron identificar 173 de 225 manchas, incluyendo algunos en las que comigraron más de una proteína. Las proteínas se clasificaron en 13 ó 16 grupos basándose en el correspondiente componente celular o proceso biológico en el que están implicados. El estudio exhaustivo de las funciones asociadas a cada *cluster* ha permitido obtener una imagen de la coordinación de los distintos procesos celulares en cada etapa de desarrollo. El mapa de referencia 2-DE establecido representa una base técnica y estadística para el análisis de genotipos o proteínas diferencialmente expresadas, siendo, así mismo, la

mayor contribución al estudio del proteoma de las acículas del género *Pinus*.

Differential protein profiles associated to needle maturation in *Pinus radiata* D. Don.: 2-DE map and protein identification by LC/MS/MS and substitution-tolerant database searching

Pinus radiata is one of the most economically important forest tree species, with worldwide production of around 400 million m³ of wood per year. Current selection of elite trees in conservation and breeding programmes requires the use of molecular markers related to growth, productivity and responses to environmental factors. Using a proteomic approach we present a 2-DE protein reference map of physiological mature *P. radiata* needles, as a base of ulterior differential expression proteomic studies. Here, we also present a proteomic study of needle development. We examined 857 proteins in two different needle developmental stages, one and thirteen months old. After the estimation of missing values, normalization and transformation of the data, 279 differentially expressed proteins were. Principal component analysis and hierarchical clustering analysis allowed the recognition of four main differential expressed protein groups. For protein identification, the LC/MS/MS data was analyzed using a novel algorithm that tolerates amino acid substitution in the first-pass search. 173 out of the 225 protein spots were confidently identified, with comigrating proteins detected in several spots. Proteins were classified into 13 or 16 groups based on corresponding cellular component or biological process categories, respectively. Comprehensive investigation of the functions associated with clusters resulted in a consistent picture of the developmental coordination of cellular processes in each developmental stage. The established 2-DE reference map will provide a strong statistical basis for analyzing genotypes or differentially expressed proteins, constituting also the major *Pinus* needle proteome work contribution up to date.

Improvement of vegetative and flowering development in *Azalea*. Nuclear and molecular analysis of daminozide application

Mónica Meijón^{1*}, Roberto Rodríguez¹, M^a Jesús Cañal¹, Isabel Feito². *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Fisiología Vegetal, Dpto. B.O.S., Facultad de Biología, Universidad de Oviedo, C/ Cat. Rodrigo Uria s/n, E-33071, Oviedo, Spain.

²SERIDA, Servicio Regional de Investigación Desarrollo Agroalimentario, Finca 'La Mata', Apdo 13, E-33 820 Grado, Asturias, Spain.

Azalea japonica is a small sector of the large genus *Rhododendron* L. (*Ericaceae*) which contains approximately 1 000 described species and thousands of commercial hybrids. The problems for the ornamental industry to produce compact and well branched azaleas have been the subject of extensive evaluation, however, each species and even each cultivar requires a specific protocol. The main objective of this work is to find alternatives that will improve the production of azalea by means of plant growth regulators application reducing labour costs, as well as to examine the nuclear and molecular possible effects of its application on plant development. Various growth regulators (daminozide, paclobutrazol and chlormequat chloride) and a chemical pinching agent (fatty acids) were applied for this purpose. Using image analysis as a quantitative method, it has been possible to assess the effectiveness of the different treatments applied to reduce shoot extension, a more objective and rapid manner than by classic biometry. Daminozide and paclobutrazol treatments are the best option to control vegetative development and to promote the flowering of azalea japonica in a cold and humid zone such as Asturias, however daminozide treatment induces floral deformation production in one of the tested cultivars (Blaauw's Pink), although the analysis realized by means of flow cytometry and molecular techniques as Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), allow us to conclude and validate that this chemical does not change ploidy nor causes genetic damage.

Optimización del desarrollo vegetativo y floral en *Azalea*. Análisis molecular y nuclear de la aplicación de daminocida

Las Azaleas japónicas forman a un pequeño grupo de plantas pertenecientes al género *Rhododendron* sp., el cual contiene aproximadamente 1 000 especies descritas y cientos de híbridos comerciales. La problemática de la industria ornamental para producir plantas compactas y bien ramificadas ha sido objeto de extensa evaluación, sin embargo, cada especie e incluso cada cultivar requiere un protocolo específico. El objetivo principal de este trabajo fue encontrar alternativas de cultivo mediante la aplicación de reguladores del crecimiento que mejoren la producción de azalea minimizando los costes, además de examinar los posibles efectos secundarios de su aplicación sobre el desarrollo de las plantas. Diversos reguladores del crecimiento (daminocida, paclobutrazol y cloruro de clomecuat) y un podador químico (alcoholes grasos) fueron aplicados con esta finalidad. Mediante el empleo de técnicas de análisis de imagen como método análisis cuantitativo ha sido posible evaluar, de un modo más

objetivo y rápido que la biometría clásica, la efectividad de los diferentes compuestos aplicados para reducir el crecimiento de tallo. Los tratamientos con daminocida y paclobutrazol son la mejor opción para contener el desarrollo vegetativo y promover la floración de azalea japónica en una zona húmeda y fría tal como Asturias, sin embargo, la daminocida conduce a deformación floral en uno de cultivares testados (Blaauw's Pink), aunque los análisis realizados a través de citometría de flujo y técnicas moleculares como *Amplified Fragments Length Polymorphism* (AFLP), permiten concluir y validar que dicho tratamiento no origina ploidias ni causa daño genético.

Propagación vegetativa de dos especies forestales en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UNAN-León

María Inés Dávila

UNAN León. Nicaragua. Teatro Municipal 10 varas al Sur. León Nicaragua. e-mail: maidavila2000@yahoo.es

En Nicaragua el área forestal está representada por 5.5 millones de ha. de bosque la cual se ha venido reduciendo por el avance de la frontera agrícola, la explotación irracional e incendios forestales causando deforestación y pérdida de la biodiversidad. Ante esta situación se han realizado esfuerzos que contribuyan a mejorar la situación ambiental y la autosostenibilidad del sector forestal. La UNAN - León está desarrollando un protocolo de multiplicación *in vitro* de *Tectona grandis* (Teca), especie introducida de gran demanda para la exportación y *Pachira quinata* (Pochote), especie nativa del bosque seco de Nicaragua cuya madera es muy apreciada en el mercado nacional. La micropropagación se realiza utilizando explantes provenientes de plántulas germinadas *in vitro* en un medio de cultivo MS libre de reguladores de crecimiento. Se evalúan diferentes medios de cultivo para de proliferación, siendo los que contienen 0.75 mg.l⁻¹ 6-BAP, 0.1 mg.l⁻¹ de AIA y 0.0375 de 6-BAP, 0.05 mg.l⁻¹ de AIA los que mostraron las mejores tasas de multiplicación. Para el caso de Pochote los mejores resultados se han obtenido utilizando material germinado *in vitro* de tres meses de edad, medio de cultivo MS con las sales al 50% y en oscuridad una semana al inicio de los cultivos. De los medios de cultivo evaluados el que muestra mayor porcentaje de sobrevivencia de los explantes y se induce a la organogénesis es cuando se utiliza un medio de cultivo MS que contiene 0.045 mg.l⁻¹ 6-BAP y 0.30 mg.l⁻¹ de AIA.

Efecto de diferentes explantes, frecuencia de inmersión y concentraciones de 6-BAP en la multiplicación de brotes de *Tectona grandis* L. en sistemas de inmersión temporal

Elisa Quijano*, Raúl Barbón, Maité Chávez, Manuel de Fera, Alfonso Pérez, Rafael Padrón, Miladys León Quintana, Mariana La O, Marta Pérez, Felipe Jiménez-Terry, Daniel Agramonte.
*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara. Villa Clara. Cuba CP 54 830.
e-mail: elisa@ibp.co.cu

Se describe un procedimiento para la propagación clonal de árboles adultos de *Tectona grandis* L. en sistemas de inmersión temporal (SIT). Los explantes establecidos fueron seccionados y multiplicados durante dos subcultivos, con una frecuencia de 28 días, en un medio de cultivo semisólido MS complementado con 1.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP. Para la multiplicación de los brotes en los SIT, se estudiaron diferentes parámetros como el tipo de explante (ápices, segmentos nodales), la frecuencia de inmersión (cada 12, 8 y 6 h) y la concentración de 6-BAP (0.5 mg.l⁻¹, 1.0 mg.l⁻¹, 1.5 mg.l⁻¹) en el medio de cultivo. Se estudió en la fase de aclimatización el desarrollo de las plantas procedentes de los SIT cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de 6-BAP, así como la influencia durante esta fase de la eliminación del callo basal, que se desarrolla en las plantas cultivadas *in vitro*. Se desarrolló un protocolo vía organogénesis para la propagación *in vitro* de la teca empleando sistemas de inmersión temporal. Se determinó que con el uso de ápices como explante, tres inmersiones diarias y concentraciones de 6-BAP de 1.0 y 1.5 mg.l⁻¹, se obtiene el mayor número de brotes por planta. Con el empleo de sistemas de inmersión temporal y concentraciones de 6-BAP de 0.0 y 0.5 mg.l⁻¹ en el último subcultivo *in vitro*, se alcanzó la mejor respuesta de las plantas de teca durante la fase de aclimatización. Se demostró que para la formación de un buen sistema radicular, antes de efectuar la siembra de las plantas de teca, se debe eliminar el callo basal que se produce como resultado del cultivo *in vitro*.

Effect of different explants, immersion frequency and 6-BAP concentration in the shoots multiplication of *Tectona grandis* L. in temporary immersion systems

A procedure for the clonal propagation of *Tectona grandis* L. trees in temporary immersion systems (TIS) of 1L capacity is described. To establish this procedure, we used *in vitro* shoots obtained from established semisolid culture media as starting materials. The explants *in vitro* established were

cutting during two subculture with 28 days frequency in MS semisolid culture medium supplemented with 1.5 mg.l⁻¹ of 6-BAP. For shoots multiplication in TIS, different parameters like the explants type (apexes, nodal segments), the immersion frequency (each 12, 8 and 6 h) and the 6-BAP (0.5 mg.l⁻¹, 1.0 mg.l⁻¹, 1.5 mg.l⁻¹) concentration in the culture medium were studied. During acclimatization a development of plants from the SIT cultivated in different concentrations of 6-BAP were studied, the influence of the elimination of the basal callus developed in the *in vitro* plants in the acclimatization was also studied. A protocol for *in vitro* propagation of teak via organogenesis using temporary immersion systems was developed. It was determined that using apexes for the inoculation of TIS, an immersion frequency every 8 hours and 1.0 and 1.5 mg.l⁻¹ of 6-BAP concentrations in the culture medium, the biggest number of shoots and nodal segments by plant were obtained. With the employment 0.0 and 0.5 mg.l⁻¹ concentrations of 6-BAP in temporary immersion systems the best develop in teak plants was reached during the acclimatization phase. It was demonstrated that it is necessary to eliminate the basal callus develop during *in vitro* culture for the very well formation of root of teak plants during the acclimatization phase.

Empleo de la biotecnología en la propagación *in vitro* de especies de bambú

M. Freire-Sejio*, Y. García-Ramírez, M. Tejada, J. Gallardo-Colina, L. Fajardo Rosabal, M. Cruz-Martín, C. Sánchez-García, Y. Alvarado-Capó, M. Acosta-Suárez, B. Roque, M. Leiva-Mora.
*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830.
e-mail: marisolf@ibp.co.cu

La propagación *in vitro* permite clonar plantas libres de patógenos, uniformes y en espacios reducidos, ofrece facilidades de transportación y disponibilidad de plantas durante todo el año. Cuba cuenta desde la década de los 90 con una red de más de 15 laboratorios de cultivo de tejidos llamados Biofábricas que posibilitan la propagación comercial de cualquier especie vegetal. Para la propagación *in vitro* de las especies de bambú se han descrito varias dificultades entre las que se pueden citar como las más importantes: la contaminación microbiana endógena y la necrosis de los explantes. Las mismas han limitado la posibilidad de emplear de manera eficiente y repetible los protocolos de propagación *in vitro* desarrollados hasta el momento. Con el objetivo de establecer un protocolo para la propagación de

Guadua angustifolia Kunth, *Bambusa vulgaris* var. *vittata* A. & C. Riviere y *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees se emplearon como explantes iniciales yemas axilares de plantas rejuvenecidas en casa de cultivo. Los mejores resultados se obtuvieron en las especies *Bambusa vulgaris* var. *vittata* A. & C. Riviere y *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees. Además, fueron identificados por primera vez los contaminantes de alta frecuencia de aparición en una población de plantas en casa de cultivo e *in vitro* además de la presencia de polifenoles tanto en yemas axilares muertas establecidas *in vitro* como en el medio de cultivo. Las plantas llevadas a casa de cultivo fueron capaces de emitir entre cuatro y siete nuevos hijos con altos porcentajes de supervivencia durante los deshijes. Las plantas producidas en el laboratorio y aclimatizadas son entregadas a los campesinos quienes se encargan de realizar los deshijes a nivel de vivero. Estos resultados demuestran la posibilidad de emplear estrategias de trabajo de desarrollo local en las que se permita el acceso de los campesinos a los productos de alta tecnología.

Formación de callos en medio de cultivo líquido a partir de segmentos de tallos de plantas *in vitro* y establecimiento de suspensiones celulares de *Pinus caribaea* var. *caribaea*

Manuel de Feria*, Maité Chávez, Raúl Barbón, Mariana La O, Marta Pérez, Felipe Jiménez-Terry, Elisa Quiala, Raúl Collado, Daniel Agramonte. *Autor para la correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5 ½, CP 54 830, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
e-mail: mdeferia@ibp.co.cu

En pino, la embriogénesis somática ha sido muy estudiada. Regularmente para la formación de callos se han utilizado embriones cigóticos inmaduros y maduros. Sin embargo, algunos autores han descrito dificultades tanto en esta fase, como en la maduración, germinación y conversión de los embriones somáticos, debido fundamentalmente a la influencia del genotipo, la composición del medio de cultivo y al difícil control del desarrollo uniforme de todas las semillas en un lote de conos. Excepto resultados recientes, descritos en el 2007, la formación de callos en pino siempre ha tenido lugar en medio de cultivo semisólido. La presente investigación tuvo como objetivos lograr a partir de segmentos de tallos de plantas *in vitro* la formación de callos de *Pinus caribaea* var. *caribaea* en medio de cultivo líquido y el establecimiento de suspensiones celulares. Para la formación de los callos se estudió el efecto de tres concentraciones de 2,4-D (1.0, 2.0, 3.0 mg.l⁻¹) y no se renovó el medio de cultivo durante seis semanas. Para establecer las suspensiones celulares

se evaluaron cinco densidades de inoculación y se renovó con una frecuencia semanal el 100.0% del medio de cultivo. Los resultados mostraron que independientemente de la concentración de 2,4-D, todos los segmentos de tallos formaron callo y la mejor relación masa seca/masa fresca se obtuvo a las seis semanas de cultivo en el tratamiento con 1.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D. Al establecer suspensiones celulares, la mejor respuesta se logró con una densidad de inoculación de 25 gramos de masa fresca por litro después de 21 días de cultivo. Esta investigación describe por primera vez en pino, la formación de callos en medio de cultivo líquido a partir de segmentos de tallos de plantas *in vitro* y podría resultar entre otras, una alternativa para multiplicar híbridos comerciales cuyos progenitores ya no existen.

Callus formation in liquid culture medium from stem segments of *in vitro* plants and establishment cell suspensions of *Pinus caribaea* var. *caribaea*

In pine, the somatic embryogenesis has been very studied, regularly for the callus formation immature and mature zygotic embryos have been used. However, some authors have described difficulties so much in this phase, like in the maturation, germination and conversion of the somatic embryos. Results that in many pine species it has been bound to the influence of the genotype, culture medium composition and to the difficult control of the uniform development of all seeds in a batch of cones. Except recent results described in the 2007, the callus formation in pine has always taken place in semi-solid culture medium. The present research had as objectives to achieve from stem segments of *in vitro* plants the callus formation of *Pinus caribaea* var. *caribaea* in liquid culture medium and the establishment of cell suspensions. For callus formation the effect of three concentrations of 2,4-D was studied (1.0, 2.0, 3.0 mg.l⁻¹) and the culture medium was not renewed during six weeks. To establish cell suspensions five inoculation densities were evaluated and it renovated with a weekly frequency 100.0% of culture medium. The results showed that independently of the concentration of 2,4-D, all the stem segments formed callus and the best relationship dry weight/fresh weight was obtained to the six weeks of culture in the treatment with 1.0 mg.l⁻¹ of 2,4-D. When establishing cell suspensions, the best response was achieved with an inoculation density of 25 grams of fresh weight per liter after 21 days of culture. This research describes for the first time in pine, the callus formation in liquid culture medium from stem segments of *in vitro* plants and it could be among others, an alternative to multiply hybrid commercials whose progenitors no longer exist.

Embriogénesis somática de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq en medios de cultivo semisólidos

Iván Borroto¹, Raúl Barbón², Marta Pérez², Mariana La O². *Autor para correspondencia.

¹Jardín Botánico. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

²Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.
e-mail: raulb@ibp.co.cu

La caoba cubana ha sido objeto de la explotación irracional lo que ha ocasionado que en la actualidad la especie casi no se comercialice y haya sido incluida en el apéndice II de CITES como especie amenazada. Debido a la creciente demanda de productos forestales se hace cada vez más necesario el establecimiento y desarrollo de métodos de propagación más eficientes y dinámicos. La presente investigación se realizó con el objetivo de establecer la embriogénesis somática en *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. en medio de cultivo semisólido para lo cual se utilizaron como material vegetal inicial secciones cotiledonales. Los resultados demostraron que el mayor porcentaje de formación de callo (95.30%) a partir de secciones cotiledonales se logró al emplearse una concentración de 6.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D combinado con 1.0 mg.l⁻¹ de Kinetina en el medio de cultivo. En la formación y diferenciación de embriones somáticos el mejor resultado se logró con una concentración de 4.0 mg.l⁻¹; con la cual se obtuvieron los mayores porcentajes (55.0% y 92.0%) de ESAF y ESBF, el mayor número (36.7%) de embriones somáticos por callo y embriones en etapa globular, torpedo y cotiledonal. Se demostró la necesidad de una fase de maduración para incrementar el porcentaje de germinación de los embriones somáticos con 4.0% y 6.0% de sorbitol. Los mayores porcentajes de germinación completa (72.0% y 82.8%) y parcial (54.0% y 60.0%) se lograron en un medio de cultivo con 0.25 mg.l⁻¹ de 6-BAP, con embriones somáticos madurados en medio de cultivo con una concentración de 4.0% y 6.0% de sorbitol.

Formación de callos a partir de semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees

Yudith García-Ramírez¹, Marisol Freire-Sejio, Marisol Tejeda, Maritza Reyes, Jorge Gallardo-Colina.
*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.
e-mail: yudith@ibp.co.cu

La propagación *in vitro* del *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees se hace necesaria por el potencial que este tipo de planta posee para la fabricación de muebles, construcción de vallas y edificios, para la industria papelera, fabricación de instrumentos agrícolas y musicales, confección de medicamentos, para suministrar sus hojas como forraje ganadero y para la reforestación. Por eso desarrollar protocolos de propagación vía organogénesis y embriogénesis somática sería una alternativa eficiente para propagar esta especie ya que se adapta bien a las condiciones de Cuba. El cultivo de tejidos ofrece un medio rápido y confiable para su propagación mediante el empleo de callos formados a partir de semillas como material vegetal inicial. Con el objetivo de formar callos *in vitro* a partir de semillas de *D. strictus* se determinó el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D (2,4-ácido diclorofenoxacético) (1.0 mg.l⁻¹, 2.0 mg.l⁻¹ y 4.0 mg.l⁻¹) y Kinetina (0.5 mg.l⁻¹ y 1.0 mg.l⁻¹). Se evaluó la formación de callos en cada tratamiento y la calidad de los mismos. Los resultados demostraron que el tratamiento donde se empleó 2,4-D y kinetina a una concentración de 1.0mg.l⁻¹ se obtuvo el porcentaje más alto de formación de callos *in vitro* (78.0%) a partir de semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees.

Calli formation of *Dendrocalamus strictus* from seeds

The *in vitro* propagation of *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees is needed by the potential that this type of plant has for the manufacture of furniture, construction of fences and buildings, for the paper industry, manufacturing of agricultural and musical instruments, making drugs, to provide their leaves as fodder for livestock and reforestation. So to develop protocols spread via organogenesis and somatic embryogenesis would be an efficient

alternative to propagate this species and are well suited to the conditions of Cuba. The tissue culture offers a fast and reliable for its spread through the use of tripe formed from plant material as initial seed. In order to form calluses *in vitro* from seeds of *D. Strictus* measured the effect of different concentrations of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) (1.0 mg.l⁻¹ and 2.0 mg.l⁻¹ 4.0 mg.l⁻¹) and Kinetina (0.5 mg.l⁻¹ and 1.0 mg.l⁻¹). The results showed that the treatment which was used 2, 4-D and kinetina a concentration 1.0mg.l⁻¹ was the highest percentage of callus formation *in vitro* (78.0%) from seed *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees.

Confección de un banco de plantas donantes a partir de riendas de plantas adultas para el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia*

Jorge Gallardo-Colina*¹, Marisol Freire-Seijo¹, Julio León Cabrera², Yudith García-Ramírez¹, Marisol Tejada¹, Zaida Pérez¹, Milagros González¹, Alfonso Pérez¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de Las plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail: gallardo@ibp.co.cu

²Jardín Botánico de Cienfuegos. Calle real, # 136, Pepito Tey, Cienfuegos, Cuba.

Guadua angustifolia es una planta de origen centroamericano y presenta una gran importancia desde el punto de vista económico y social. La propagación por estacas para esta especie en Cuba no se ha podido desarrollar, debido a los bajos coeficientes de brotación y supervivencia de los brotes al emplear para la propagación estacas a partir de riendas de plantas adultas. El objetivo consistió en confeccionar un banco de plantas a partir de estacas de riendas de plantas adultas para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Guadua angustifolia*. Se evaluó la influencia del diámetro de las estacas en la brotación de las yemas y su relación con el crecimiento de las yemas brotadas. Se estudió la influencia de la inmersión de las estacas en una solución enraizadora y una solución con fungicida antes de la plantación, en la brotación de las yemas y control de microorganismos contaminantes, respectivamente. Se logró en un

53.2% la brotación de las yemas de *Guadua angustifolia*, al emplear para la propagación estacas con diámetro mayor de un centímetro. Además, al emplear estacas entre 2.3 - 3 cm de diámetro, se obtuvieron las yemas de mayor tamaño y diámetro de la base. Con la inmersión de los explantes en una solución con reguladores del crecimiento, se disminuyó significativamente la brotación de las yemas, aunque la supervivencia de los brotes obtenidos fue estadísticamente mayor. Con la inmersión de los explantes en una solución compuesta por fungicidas durante 12 horas antes de la plantación de las estacas, se logró controlar la infección por microorganismos y elevar a 88% los valores de brotación de las estacas. Se logró un 42% de supervivencia de los brotes, con lo cual se constituyó un banco de germoplasma con 500 plantas.

Confection a nursery from lateral bough of adult plants for *in vitro* establishment of *Guadua angustifolia*

Guadua angustifolia is original from Centro America and has a great economical and social importance. The propagation by stake in this specie do not has been developed in Cuba, due to lower sprout coefficient and explants survival when this propagation away is used. The main objective was to confection a nursery from stake derived of lateral bough of old plants for *in vitro* establishment of nodal segment. The effect of stakes diameter in sprout buds and the growth of buds were evaluated. Immersion of stake in both, rooting and fungicide solution, for sprout buds and control of contaminants microorganism, respectively were studied. The highest percentage (53.2%) of buds sprout was achieved, when stakes with a centimetre of diameter for propagation were used. Beside, to employed stake with 2.3 – 3 cm in diameter the biggest buds in diameter and size were obtained. Lower sprout buds was obtained, when explants were immersing in a solution with growth regulator, though buds survival was statistically superior. The control of microorganism contaminant was possible, to the immersing 12 hour the explants in fungicide solution. Beside, 88% of sprouting and 42% of buds survival were achieving, and were possible to confection a nursery with 500 plants.

Propagación *in vitro* de *Bambusa bambos* en diferentes formas de cultivo

Marcos Daquinta*, Mariela Cid, Yarianne Lezcano.
*Autor para correspondencia.

Laboratorio de Células y Tejidos. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Avila. Carretera a Morón km 9.
CP 69 450. Cuba. e-mail: mdaquinta@bioplants.cu

Los bambúes son de vital importancia para los programas de construcción y de fabricación de muebles, entre otras aplicaciones. La *Bambusa bambos* es un bambú originario de la India con ciertas características particulares, lo cual es de interés para los programas de reforestación. Las vías de propagación vegetativas son limitadas, aún más cuando se desea introducir la especie a la producción. El objetivo del presente trabajo fue lograr la propagación *in vitro* de plantas a partir de segmentos nodales obtenidos de ramas plagiotrópicas de plantas adultas de *Bambusa bambos* para el establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro*. Se realizó la desinfección con bicloruro de mercurio al 0.2% durante 10 minutos. Los brotes obtenidos a partir de segmentos nodales en el medio de cultivo Murashige y Skoog con 0.25 mg.l⁻¹ 6-BAP y 0.25 mg.l⁻¹ ANA, se subcultivaron en el propio medio de cultivo enriquecido con 50 mg.l⁻¹ ácido cítrico y 25 mg.l⁻¹ de cisteína. Se logró la multiplicación de brotes de *Bambusa bambos* en medio de cultivo líquido en agitación y el enraizamiento de los agregados de tres brotes en medio de cultivo MS enriquecido con 2 mg.l⁻¹ de ANA.

In vitro propagation of *Bambusa bambos* in different culture forms

Bamboo are very important for construction programmes and furniture, among other applications. *Bambusa bambos* is a bamboo from India with particular characteristics, attractive for reforestation. The ways of vegetative propagation are limited, when we wish to introduce this specie at production scale. The aim of the present work was to achieve an *in vitro* propagation protocol from nodals segments taken from plagiotropic branches of *Bambusa bambos* mature plants. Desinfection was made with mercury dichloride 0.2% during 10 minutes. Shoots were obtained from nodals segments growing in Murashige and Skoog culture medium supplemented with 0.25 mg.l⁻¹ 6-BAP and 0.25 mg.l⁻¹ NAA, and then subcultured in the same medium supplemented with 50 mg.l⁻¹ citric acid and 25 mg.l⁻¹ cystein. Shoots multiplication of *Bambusa bambos* were made in liquid culture medium in shaker and rooting of shoots cluster were carried out in MS culture medium supplemented with 2 mg.l⁻¹ NAA.

Empleo de reguladores de crecimiento para la propagación de *Guadua angustifolia* por vía tradicional

Janet Igarza Castro^{1*}, Luís E. Rodríguez de Francisco¹, Yania Martínez Ondaro¹, Leonardo Acosta Pompa¹, Rubiel Alvarez Rojas¹, Evelio Torres Peralta². *Autor para correspondencia.

¹Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Holguín. e-mail: janet@cbv.holguin.inf.cu

²Banco de Germoplasma de Bambú. ANAP. Holguín.

El bambú es una de las especies más versátiles del mundo vegetal por ser un recurso renovable de alta capacidad regenerativa, rápido desarrollo y una fácil adaptación a diferentes condiciones climáticas. Esta es una de las razones por las cuales es de fácil aprovechamiento en pocos años, puede sustituir a la madera, al acero y también contribuir a la protección del medio ambiente mediante la reforestación. En Cuba, la explotación del bambú con fines beneficiosos para el hombre y sin poner en peligro ninguna de las especies, se ha venido desarrollando mediante algunos trabajos encaminados a propagar masivamente ya sea por vía biotecnológica o tradicional. Por tal motivo el Laboratorio de Biotecnología de Holguín desarrolló una metodología para obtener mayor número de plantas en un menor tiempo teniendo en cuenta la fase de la Luna. Se emplearon segmentos de caña de bambú especie *Guadua angustifolia* y las ramas laterales de estas, se seccionaron teniendo en cuenta la parte basal, media y apical. Las mismas fueron colocadas en solución de ANA y AIB de (10 mg.l⁻¹) durante 12 y 24 horas. Luego fueron sembradas en sustrato mezclando humus de lombriz, zeolita y arena de río. A los cinco días comenzaron a emitir de 3-6 brotes, siendo los mejores resultados para los segmentos de la parte media y apical con la concentración de 10 mg.l⁻¹ con 24 horas en la solución. Para las ramas jóvenes los mejores resultados fueron obtenidos con la misma concentración pero con 12 horas en la solución. A los 21 días los brotes fueron separados y sembrados independiente formado una planta completa.

Embriogénesis somática indirecta en *Eucalyptus urograndis*

Raúl Barbón^{*}, Odalys Gutiérrez, Raúl Collado, Marta Pérez, Mayelin Rodríguez, Felipe Jiménez-Terry, Mariana La O, Elisa Quiala. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuani. km 5 ½, Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830
e-mail: raulb@ibp.co.cu

La embriogénesis somática se perfila como una vía para la propagación de genotipos selectos en programas propagación y mejora genética forestal. Se estudió la capacidad de inducir la formación y diferenciación de embriones somáticos en la especie híbrida *Eucalyptus urograndis* con la finalidad de aplicarla en programas de mejoramiento genético. Como explantes iniciales se emplearon secciones de cotiledonales e hipocotilos de embriones cigóticos (F₁) pregerminados de *Eucalyptus urograndis*. Para el desarrollo de la embriogénesis somática indirecta se evaluaron combinaciones de 2,4-D (0.5 - 2.0 mg.l⁻¹) y 6-BAP (1.0 mg.l⁻¹) para la fase de formación de callo y para la diferenciación de embriones somáticos se evaluaron diferentes concentraciones de 6-BAP (0.5 - 2.0 mg.l⁻¹). En la octava semana de cultivo, un alto porcentaje de los explantes presentaron formación de callo en las secciones cotiledonales e hipocotilos con las cuatro combinaciones de 2,4-D con 6-BAP estudiadas con diferencias entre los tratamientos. Los mayores valores del número de explantes con callo se presentaron en los tratamientos con 1.0 - 1.5 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP. En los explantes colocados en el medio de cultivo para la formación y diferenciación de los embriones somáticos, a partir de los 40 días de cultivo se observó la presencia de estructuras embriogénicas sobre los callos cultivados con 1.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y a los 50 días de cultivo se observó la presencia de embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo. El mayor número de callos con ESAF y ESBF se presentaron en los tratamientos con 1.0 y 1.5 mg.l⁻¹ de 2,4-D con 1.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP, los mismos manifestaron diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Los resultados demuestran que la adición de 6-BAP al medio de cultivo incrementa significativamente la formación de embriones somáticos en los callos originados a partir de secciones de cotiledones en *Eucalyptus urograndis*.

Establecimiento y Multiplicación *in vitro* de *Cedrela odorata* L.

F. Jiménez-Terry*, R. Barbón-Rodríguez, D. Agramonte, M. La O-Cárdenas, M. Pérez, R. Collado, M. Acosta-Suárez, Y. Alvarado-Capó. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba CP 54 830. e-mail: felipe@ibp.co.cu

Cedrela odorata es una planta maderable de elevada demanda de posturas. Es una de las especies forestales denominada recalcitrante para la propagación, principalmente por la contaminación microbiana en la fase de establecimiento y los bajos coeficientes de multiplicación *in vitro*. El presente

trabajo tuvo como objetivo, evaluar el efecto de la aplicación de fungicidas y la desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) sobre la contaminación y la brotación de los segmentos nodales de *Cedrela odorata* L. en la fase de establecimiento *in vitro* y la influencia de los reguladores de los reguladores del crecimiento sobre el coeficiente de multiplicación durante cuatro subcultivos en la fase de multiplicación. Se utilizaron plantas revigorizadas mediante podas sucesivas de las cuales una parte recibieron aplicaciones de fungicidas. Se colectaron segmentos nodales de brotes jóvenes, los cuales fueron desinfectados con NaClO (1.0, 1.5, 2.0%) durante 10, 15 y 20 minutos. Los mismos fueron establecidos en medio de cultivo compuesto por las sales MS, 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol, 10 ml de Vitaminas MS, 3.0% de sacarosa, y diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (0.25, 0.5, 1.0 mg.l⁻¹) y de ácido naftalenacético (ANA) (0.25 y 0.5 mg.l⁻¹). Se estudiaron diferentes concentraciones de 6-BAP (1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg.l⁻¹) combinado con 0.0 y 0.1 mg.l⁻¹ ANA para la multiplicación de brotes establecidos. La contaminación *in vitro* de los segmentos nodales fue menor con la aplicación previa de fungicidas a las plantas en casa de cultivo y la brotación durante el establecimiento *in vitro* fue de un 32%. El mayor coeficiente de multiplicación en la fase de multiplicación (2.16) se alcanzó a los 40 días en el medio de cultivo con 2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 0.1 mg.l⁻¹ de ANA. Se logró el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de cedro a partir de plantas revigorizadas en casa de cultivo.

Micobiota epifítica y contaminantes fúngicos del establecimiento *in vitro* de especies de bambúes

Mayra Acosta-Suárez*, Yelenys Alvarado-Capó, Mileidy Cruz-Martín, Berkis Roque, Cynthia Sánchez-García, Michel Leiva-Mora, Marisol Freire-Seijo, Yudith García-Ramírez, Zaida Pérez, Robin Triana, Blanca Pérez, Teresa Salabarría, Marisol Tejeda, Milagros González, Ortelio Hurtado. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 1/2. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830 e-mail: mayra@ibp.co.cu

Los Bambúes son utilizados en la construcción de viviendas, muebles, artículos decorativos y de artesanía. Las vías de propagación tradicional, resultan limitadas, debido a que la regeneración natural ocurre estacionalmente por medio de semillas y de manera asexual por rizomas, por eso, se hace necesaria la regeneración y multiplicación de plantas *in vitro* como una alternativa a la propagación vegetativa. La presencia de contaminantes fúngicos es uno de los aspectos que puede limitar el

establecimiento de explantes de Bambúes. Conocer el microorganismo contaminante permite trazar estrategias de control más adecuadas. Este trabajo tuvo como objetivos: Identificar la micobiota epifítica de plantas donadoras de especies bambúes e identificar los hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro* y la frecuencia de aparición de los mismos. Para la determinación de la micobiota epifítica se utilizó el método de la cámara húmeda y se realizaron preparaciones directas al microscopio óptico del crecimiento fúngico. Los hongos filamentosos de la fase de establecimiento se aislaron a placas de Petri con medio de cultivo micológico, se caracterizaron y se hicieron preparaciones directas al microscopio óptico para su identificación. Se determinó la frecuencia de

aparición de los géneros identificados. Se comprobó que las plantas donadoras de Bambúes poseían una micobiota epifítica diversa integrada por los géneros de hongos filamentosos: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Nigrospora* y *Fusarium*. Los géneros *Humicola* y *Bipolaris* se identificaron en fase de establecimiento, mientras que *Cladosporium*, *Curvularia*, *Nigrospora* y *Fusarium* aparecieron en plantas donadoras y en el establecimiento, demostrándose con esto, que el explante inicial fue una de las fuentes de contaminación. En las especies *D. asper*, *D. strictus*, *Guadua angustifolia* y *Gigantochloa atter* el género *Nigrospora* fue el de mayor frecuencia de aparición, mientras que en *Bambusa vulgaris* el hongo filamentosos de mayor frecuencia de aparición fue *Fusarium*.

TALLER BIOFÁBRICAS

Propagación *in vitro* de especies vegetales: problemas, impactos y perspectivas

Pedro Orellana.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní. km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba.
e-mail: orellana@ibp.co.cu

La propagación masiva de plantas se ha convertido en una de las aplicaciones de mayor impacto de la Biotecnología agrícola, a nivel mundial. En 1993 la producción mundial de plantas *in vitro* alcanzó 663 millones, mientras que para 1997 se acercó los 800 millones. Durante 1990-1994 la industria de la micropropagación declinó en Europa, debido principalmente al desplazamiento de la producción hacia los países en desarrollo, sin embargo, por el requerimiento de alta calidad y número de plantas en Europa, la demanda se incrementó. Desde 1995 la producción se incrementó en un 14% en los países asiáticos, a causa de la entrada de China en el mercado, mientras que el incremento en Sur y Centro América se debió a la creación de varias biofábricas en Cuba. Hoy el mercado anual de plantas *in vitro* se estima en más de mil millones. Desde la creación en la década del 70 de las primeras instalaciones para la producción de plantas *in vitro*, hasta la fecha, se han sucedido cambios en las estrategias tanto en lo referido a las características de diseño y construcción de estas, como en su ubicación geográfica y tecnologías de propagación *in vitro*. Los grandes laboratorios (más de 10 millones de plantas/año) en su mayoría fueron cerrados por colapso económico y se crearon laboratorios con capacidad entre uno y cinco millones de plantas, pero con una diversificación y selectividad en la cantidad de especies y clones que producen. Se diseñaron con un menor grado de sofisticación de sus instalaciones, con uso de la luz solar como fuente de iluminación, y sobre todo se ubican en países donde el costo de mano de obra es inferior. Adicionalmente tecnologías como el uso de sistemas que incluyen la inmersión temporal (SIT), empleo de medios de cultivo en estado líquido y perfeccionamiento en los procedimientos de manejo y control de la contaminación microbiana, han propiciado la reducción de costos, uno de los problemas de mayor efecto negativo en la producción y comercialización de plantas en los primeros 30 años del uso de este sistema de propagación.

The impact of agro-biotech in Latin America and Caribbean region

Malachy Dottin.

UNEP Advisor On Biosafety and Biotechnology.

Three of the 12 global centers of origin for crops of major socioeconomic importance are found in Latin America and Caribbean countries LAC. Although representing only 7-percent of the earth's surface, the region contains a large amount of the planet's biodiversity. These resources are concentrated primarily in 18 countries, 9 of which are in the American hemisphere. The wealth of biodiversity in LAC has been universally recognized and it is of great strategic value for reducing the region's agricultural production deficit. Sustainable use of these resources requires an institutional capacity that will enable the countries to conserve, manage and use this resource appropriately. Recent studies by the World Bank estimate that more than 70-percent of the nearly 500 million inhabitants of the region live in urban zones and daily dispose of over 250 000 tons of waste. Less than 55-percent of this garbage is treated, which in turn contaminates surrounding water bodies. Almost one-third of the population lives in levels of absolute poverty, and more than 40 million indigenous people are excluded from the development process. These populations do not have access to basic public services such as education, health, and social assistance. From this perspective, the region is significantly challenged to find a suitable economic development plan that will also foster social equilibrium as well as the sustainable use of this region's biodiversity. The concept of sustainable agricultural development is based on the conviction that it is possible to increase agricultural production without unnecessarily depleting the world's finite natural resources. If yields per hectare cannot be increased significantly over current levels, then more wilderness areas – which are only marginally suitable for agriculture but are rich in biodiversity – will be utilized for food production. Modern biotechnology provides both opportunities and challenges, provided LAC countries increase the capacity of their national research systems. Biotechnology has the potential to support national efforts towards food security, increase exports and achieve sustainable development in the region. The countries of the region require appropriate infrastructures that permit them to acquire, absorb, develop and efficiently manage biotechnologies. The creation of enabling conditions must be addressed to obtain the potential benefits of these

new technologies and to minimize any possible adverse effects on the environment, on human health or on agricultural productive systems. The first step to be taken by a government wishing to create a suitable environment to benefit from the potential of biotechnology, improve agricultural productivity and mitigate concerns about potential adverse effects is to implement its regulatory framework to ensure the safe use of biotechnology products in an opportune and effective manner. This presentation is intended to outline the wealth of biodiversity in LAC and to present an overview of the current biosafety regulations in the region.

Montaje y puesta en marcha de los Sistemas Avanzados de Micropropagación en Caña de Azúcar en la Biofábrica Gobernador Miguel Arraes, Brasil

Pablo Machado^{1*}, Leidy Cortegaza², Aydiloide Bernal¹.
*Autor para correspondencia.

¹Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara - Cienfuegos - Sancti Spiritus (ETICA). Autopista Nacional km. 246. Ranchuelo. Villa Clara. e-mail: biofabrica@vc.minaz.cu

²Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Jovellanos.

El trabajo se desarrolló en la Biofábrica Gobernador Miguel Arraes, Centro de Tecnologías Estratégicas del Nordeste, Pernambuco, Brasil, en el período del 30 de mayo del 2006 hasta el 26 junio del 2007. El trabajo de esta biofábrica estaba basado en la utilización de tecnología convencional de cultivo de tejidos, la cual es muy costosa y de baja productividad, por lo que los costos de producción eran muy elevados, además debido al alto consumo de energía eléctrica y la baja productividad de sus operarias encarecía el costo final del producto y su calidad no satisfacía las necesidades demandadas. Se implementó y puso en funcionamiento la Tecnología de Inmersión Temporal para la propagación *in vitro* de caña de azúcar, realizándose el levantamiento de las necesidades para su instalación, en una cámara de crecimiento con una capacidad para siete estantes de 144 pares de sistemas de 5 litros cada uno, un total de 1008 pares. Se elaboraron las normas y procedimientos de todas las áreas de la Biofábrica. Se establecieron los modelos para el registro y control de las actividades diarias, anexando cambios tecnológicos y estructurales en todas las áreas, lo que indica la tecnología de micropropagación utilizada adaptándose a la cubana. Además, quedó concluida la capacitación del personal. Para la producción de la cámara de crecimiento a plena capacidad se requieren de 35 280 explantes cada 45 días (densidad

de inóculo 10 explantes por litro), lo que permite la producción de 1 000 000 mudas de caña de azúcar mensualmente, y un aumento de los ingresos y las utilidades.

Assembly and march setting of the Advanced Sugarcane micropropagation Systems in the Tissue Culture Plant Laboratory Governor Miguel Arraes, Brasil

The work was carried out in the Tissue Culture Plant Laboratory Governador Miguel Arraes, Center of Strategic Technologies of the Northeast, Pernambuco, Brazil, in the period of May 30th, 2006 to the June 26th, 2007. The work of this laboratory was based on the use of conventional technology of tissue culture, which is very expensive and of low productivity, so that, the production costs were very high, due to the high electric power consumption and the low productivity of their working women, furthermore the quality of the final product did not either satisfy the demanded necessities. It was implemented and put into operation the Technology of Temporary Immersion for the *in vitro* propagation of sugarcane. A study of the necessities for the installation of the system was carried out. They were a chamber with a capacity for 7 shelves of 144 pairs of systems of 5 liters each, a total of 1 008 pairs. The norms and procedures of all the areas of the Tissue Culture Plant Laboratory were elaborated. The models for the records and control of the daily activities were settled down, annexing technological and structural changes in all the areas, including the technology of micropropagation used adapting it to the Cuban ending with the training of the personnel. For the production of the growth chamber at full capacity it is required 35 280 explants every 45 days (density of inocule 10 explants per liter), allowing the production of 1 000 000 plantlets of sugarcane, increasing the ingresses and the utilities.

Propagación masiva vía embriogénesis somática en medio de cultivo semisólido del cultivar de banano Grande naine (*Musa* spp. AAA)

Mileidy Pons-Corona*, Borys Chong, Maritza Reyes, Rafael G. Kosky, Elizabeth Peralta, Yudith Sánchez, Osmany Jacomino, Marlon Mesa, Zaida Pérez, Robin Triana, Miguel Suárez-Castellá. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní. km 5 ½, Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.
e-mail: mileidyipc@ibp.co.cu

La propagación *in vitro* del cultivar Grande naine (*Musa* spp. AAA) se realiza en la Biofábrica del Instituto de Biotecnología de las Plantas a través del

cultivo de yemas axilares; sin embargo el uso de la embriogénesis somática constituye una vía alternativa. En este trabajo se presentan los primeros resultados alcanzados a nivel de planta piloto de esta tecnología. A partir del empleo de suspensiones celulares embriogénicas de 6 meses de cultivo se realizó la formación, maduración y germinación de los embriones somáticos en medio de cultivo semisólido. Se logró la obtención de 40 000 plantas *in vitro* a partir de la germinación de los embriones con un porcentaje de germinación del 90.8% en los primeros subcultivos de germinación. El porcentaje de contaminación fue inferior a lo obtenido durante los subcultivos respecto al manejo realizado vía organogénesis. Se alcanzó un 99% de conversión con un índice de hijos por planta mayor que la propagación vía organogénesis en fase de aclimatización.

Formación de microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal como alternativa para la propagación

Manuel Cabrera Jova^{1*}, Rafael G. Kosky², Ania Robaina Jiménez¹, Yadenys Torres Nuñez¹, Jorge López Torres¹, Víctor Medero Vega¹, Milagros Basail Pérez¹, Arletys Santos Pino¹ y Aymé Rayas Cabrera¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP. 53 000, Villa Clara, Cuba. e-mail: mcabrera@inivit.co.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830.

La formación de microtubérculos como alternativa para la propagación de plantas tiene un gran potencial para la producción de semillas, programas de mejoramiento genético y conservación de germoplasma. El presente trabajo se realizó con el objetivo de elaborar una metodología para la formación de microtubérculos en el clon de ñame 'Pacala Duclos' (*Dioscorea alata* L.) con el empleo del Sistema de Inmersión Temporal que permita, utilizar los microtubérculos para obtener minitubérculos en condiciones de umbráculos y plantar los microtubérculos y minitubérculos directamente en campo de manera que puedan ser utilizados como una alternativa para la propagación en esta especie. Se demostró que es posible la formación de microtubérculos de ñame en sistema de inmersión temporal. Se alcanzó la mejor respuesta en la formación de los microtubérculos al emplear un tiempo de inmersión de 10 minutos cada seis horas, una densidad de 50 segmentos nodales por frasco de cultivo así como un volumen de 60 mL de medio de cultivo por

segmento nodal. El desarrollo de los microtubérculos se favoreció con dos renovaciones de medio de cultivo. Otros resultados alcanzados en este trabajo, revelaron que la mejor repuesta en la obtención de minitubérculos en umbráculos para plantar directo en campo se logró con los microtubérculos que presentaron una masa fresca superior a 3.0 gMF, debido a que estos pueden ser plantados en el umbráculo desde el mes de marzo hasta agosto. Las plantas procedentes de los microtubérculos y minitubérculos no presentaron cambios morfológicos durante los dos ciclos de cultivo en campo y en el segundo ciclo mostraron una respuesta agronómica superior a las plantas procedentes de la propagación convencional. Los resultados del presente trabajo demostraron que es posible emplear los microtubérculos formados en el SIT como una alternativa para la propagación en esta especie.

Formation of yam microtubers from clone 'Pacala Duclos' (*Dioscorea alata* L.) in a temporary immersion system as an alternative for propagation

The formation of microtubers as an alternative for plant propagation has a great potential for seed production, genetic improvement programs and germplasm conservation. This work was carried out in order to establish a protocol for microtuber formation with yam clone 'Pacala Duclos' (*Dioscorea alata* L.) in a Temporary Immersion System that permits to use microtubers to obtain minitubers in protected conditions. Microtubers and minitubers were directly planted in field, so as to use them as an alternative to propagate this species. The possibility of microtuber formation in yam in a temporary immersion system was shown. The best response in the microtuber formation was observed at the immersion time of 10 minutes each six hours, a 50 nodal segment density per culture flask, as well as, 60 ml volume of culture medium per nodal segment. Microtuber formation was favoured by two culture medium renewals. Other results from this research, showed that the best answer to obtain minitubers in protected area for direct field plantation was achieved with microtubers showing a fresh weight higher than 3.0 gMF, because plantation may take place in protected areas from March to August. Plants coming from microtubers and minitubers did not show morphologic changes during two growing cycles in field conditions and in the second cycle, these plants showed a better agronomic response than plants from conventional propagation. As results showed, microtubers developed in Temporary Immersion Systems may be used as an alternative to propagate this species.

Transferencia de Tecnología y puesta en marcha de los Sistemas de Inmersión Temporal en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos BIOLAB, Tecnología Vegetal LTDA de Brasil

Aydiloide Bernal¹, Pablo Machado¹, Leidy Cortegaza².

*Autor para correspondencia.

¹Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara – Cienfuegos – Sancti Spiritus (ETICA). Autopista Nacional km. 246. Ranchuelo. Villa Clara.
e-mail: biofabrica@vc.minaz.cu

²Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Jovellanos.

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos BIOLAB, Tecnología Vegetal LTDA de Brasil, del 30 de mayo del 2006 hasta el 23 marzo del 2007. El trabajo de este laboratorio estaba basado en la utilización de tecnología convencional de cultivo de tejidos, la cual es muy costosa y de baja productividad, por lo que los costos de producción eran muy elevados, debido al alto consumo de energía eléctrica y la baja productividad de sus operarias, además la calidad del producto final no satisfacía las necesidades demandadas y los problemas en el establecimiento del banano provocaban pérdidas elevadas. Esto fue solucionado con la implementación y puesta en marcha de los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). Adicionalmente se hicieron otros cambios tecnológicos como: se sustituyó la esterilización física por la química tanto para el trabajo en cabina de flujo laminar como para la elaboración de los medios de cultivo. Se establecieron dos nuevas variedades de banano utilizando la metodología del INICA. Se corrigieron problemas de manejo *in vitro* del banano, caña de azúcar y piña, se logró mejorar la calidad y comportamiento de los explantes, lo cual trajo consigo un aumento del coeficiente de multiplicación y por tanto un incremento del volumen de material vegetal en las cámaras de crecimiento. Se modificó la forma de preparación de las soluciones madre (stock) para lograr mayor rapidez en la elaboración de los medios de cultivo y se revisaron los medios de cultivo para cada una de las especies que se propagan en el laboratorio a las cuales se le hicieron modificaciones para su simplificación.

Technology Transference and march setting of Temporary Immersion Systems in the Tissue Culture Laboratory of BIOLAB, Vegetable Technology LTDA of Brazil

The work was carried out in the Tissue Culture Laboratory BIOLAB, Vegetable Technology LTDA

of Brazil, from May 30th, 2006 to the 23rd of March 2007. The work of this laboratory was based on the use of conventional technology of tissue culture, which is very expensive and of low productivity, so that, the production costs were very high, due to the high electric power consumption and the low productivity of their working women, furthermore the quality of the final product did not either satisfy the demanded necessities and the problems in the banana establishment caused high losses. With the implementation and march setting of Temporary Immersion Systems (TIS) was solved this problem. Additionally, other technological changes were made as: the physical sterilization was substituted by the chemical one for working either in the laminar flows hood or for the elaboration of the culture medium. Two new banana varieties were implanted using the methodology of the INICA. Handling problems were corrected *in vitro* of the banana, sugarcane and pineapple, improving the quality and behavior of the explants, which brought about an increase of the multiplication coefficient and therefore an increment of the material in the growth chambers. It was modified the form of preparation of the Stock solutions to achieve higher speed in the elaboration of the culture medium and every culture media for each crop that was propagated in the laboratory were checked and they were modified for their simplification.

Importancia de la micropropagación en el suministro en material vegetal para los campesinos

Joseph Mabanza*, Françoise Romaine Itabo, Jean Claude Mambou. *Autor para correspondencia.

Centre de Recherches sur l'Amélioration Génétique des Plantes (CERAG). BP 2 499. e-mail: jmabanza2002@yahoo.fr

La multiplicación *in vitro* de especies agrícolas fue desarrollada en CERAG principalmente en la yuca, el plátano, la malanga y los cítricos. La aparición de la enfermedad llamada Mosaico africano de la yuca, una enfermedad viral muy destructiva se produjo un decrecimiento de los rendimientos. La micropropagación de la yuca ha sido solicitada para abastecer a los campesinos de material vegetal de plantación sana. Con el cultivo de meristemas de la yuca tratado por termoterapia y la multiplicación rápida *in vitro* de plantas obtenidas, muchas vitroplantas fueron producidas. Esta técnica ha permitido aumentar los rendimientos de 15 t/ha a 25 t/ha en los campos. Los operadores agrícolas esperan aplicar a gran escala estas técnicas sobre otros cultivos agrícolas de importancia alimenticia.

Las Buenas Prácticas en la estrategia de elaboración de los PNO de la biofábrica del PTMi

Claudia Beatriz Sorol^{1*}, Miguel Suárez-Castellá².
*Autor para correspondencia.

¹Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552. 3300. Posadas. Misiones. Argentina. csorol@fceqyn.unam.edu.ar

²Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara. Villa Clara. Cuba CP 54 830.
e-mail: miguel@ibp.co.cu

Desde fines de 2006 en Misiones se dispone de la primer biofábrica en Argentina, como resultado de un proceso de transferencia tecnológica del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de Cuba. Esta moderna instalación posee una capacidad productiva de cinco millones de plantas *in vitro* por año. Debido a que la producción de plantas *in vitro* exige procesos y operaciones de trabajo estrechamente relacionadas entre sí que garanticen el cumplimiento de cada fase tecnológica fue necesario elaborar e implementar Procedimientos Normalizados de las Operaciones (PNO) acordes a sus condiciones, tecnologías, instalaciones y políticas empresariales. Sin embargo, la bibliografía solo aportó al plano teórico pues no registra el modo de diseñar los PNO. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar las Buenas Prácticas que debían ser consideradas para la producción de vitroplantas en el contexto de un sistema metodológico creado para la elaboración de los PNO de la biofábrica del PTMi. El estudio se inició con la caracterización de las tecnologías de propagación y el análisis de las instalaciones y las áreas productivas; luego se establecieron las formas de división de trabajo y se definieron las operaciones. En consecuencia y considerando el ajuste de los contenidos a las condiciones y exigencias de la biofábrica se seleccionaron recomendaciones entre las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y las Buenas Prácticas para Plantaciones Forestales (BPF). Las mismas se incorporaron en los detalles correspondientes a los PNO propuestos razón por la cual los PNO de la biofábrica del PTMi constituyen una expresión de las Buenas Prácticas seleccionadas.

Elementos básicos para la planificación de la producción de plantas *in vitro* en biofábricas

Pedro Orellana*, Miguel Suárez-Castellá, Robin Triana, Zoe Sarría, Mileidy Pons- Corona, Miladys León-Quintana, Milagros González, Zaida Pérez.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní. km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. orellana@ibp.co.cu

La biotecnología aplicada a la agricultura está orientada a la producción de semillas de alta calidad genética y sanitaria mediante las tecnologías de micropropagación. Las técnicas de cultivo de tejidos tienen un vasto potencial para estos fines. En Cuba se ha desarrollado un amplio programa de biotecnología para la micropropagación de varias especies de plantas y para ello se crearon 16 biofábricas distribuidas por todo el país. El actual escenario del comercio internacional de plantas *in vitro* ha presentado problemas generados por sus altos precios, deficiencias en la calidad y el no cumplimiento de las entregas de las plantas *in vitro* en los plazos acordados. Por ello, la producción de plantas *in vitro* en Biofábricas, exige de procesos y operaciones de trabajo estrechamente relacionadas entre sí, entre ellos, la aplicación de métodos de planificación de la producción que permitan definir con anticipación los requerimientos humanos y materiales para su realización. Existe una gran cantidad información bibliográfica sobre planificación de la producción, sin embargo, no se registra la aplicación de estos sistemas a los procesos de producción de plantas *in vitro* en Biofábricas, ya que estos temas forman parte del *Know how* tecnológico de las mismas. Se exponen los principales métodos para la planificación de la producción *in vitro* en las biofábricas, teniendo en cuenta la experiencia lograda en las biofábricas cubanas y en otros países del área latinoamericana, con la finalidad indicar los elementos y variables indispensable a considerar para la planificación de la producción, los tipos de planificación a considerar, así como las responsabilidades en su diseño y desarrollo en cada caso. Se muestra, mediante ejemplos, la programación detallada por fase y proceso de la producción *in vitro* para una biofábrica, la cual sirve como referencia para realizar una adecuada planificación de todo el proceso productivo en cada una de las diferentes áreas de trabajo.

Empleo de medios de cultivo multiplicación – enraizamiento en la micropropagación de plátanos y bananos

Silvio de Jesús Martínez Medina.

Universidad de Cienfuegos 'Carlos Rafael Rodríguez'. Carretera Rodas Cuatro Caminos, Reparto: Pastorita, Cienfuegos, Cuba.
e-mail: iconcepcion@ucf.edu.cu

La aplicación de la micropropagación a escala industrial ha incrementado los volúmenes de plantas hacia las áreas de producción, sin embargo presenta algunas deficiencias que incrementan los costos del proceso. Este estudio se realizó con el objetivo de eliminar o disminuir la fase de enraizamiento por lo profusa que resulta en las biofábricas. Se emplearon

en el estudio el clon Grande naine (AAA) y los cultivares híbridos FHIA – 18 (AAAB) y FHIA – 21 (AAAB). Los coeficientes de multiplicación durante el último subcultivo fueron superiores a 2.8; empleando como medio de cultivo en estado semisólido, que contenía las sales propuestas por Murashige – Skoog (MS), con 3 mg.l⁻¹ de 6-BAP, 0.65 mg.l⁻¹ de AIA, con un corte longitudinal al microcormo, sin decapitar los brotes. A los 21 días del subcultivo se le añadieron 10 ml de un medio de cultivo enraizamiento en estado líquido que contenía el 70% de las sales MS, con 2 mg.l⁻¹ de AIA, 0.2 mg.l⁻¹ de AG₃ y 4% de sacarosa. A los 10 días de estar bajo la acción de este último medio de cultivo, las vitroplantas se encontraban en condiciones óptimas de pasar a la fase de aclimatización. Se lograron porcentajes de supervivencia superiores al 90%. Con esta modificación en la tecnología se aumenta la productividad en un 50%, se hace menos profusa la fase III, disminuyen en 50% los gastos por consumo de agar y reactivos químicos y aumenta en un 50% la capacidad de incubación.

Desarrollo de la biotecnología agrícola en el Ecuador: el caso del INIAP

Eduardo Morillo y Denisse Peña.

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP. Departamento Nacional de Biotecnología. EESC y EECH. Ecuador. e-mail. www.iniap-ecuador.gov.ec

Los objetivos del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) se orientan a mejorar la producción y productividad de los rubros que componen la canasta básica y de exportación, fortaleciendo los programas y proyectos de investigación, transferencia de tecnología y capacitación. En este contexto, el reto actual del INIAP es el de incorporar métodos modernos como las biotecnologías, que permitan cumplir con mayor eficiencia y actualización los objetivos de la institución. El fortalecimiento de los laboratorios del Departamento Nacional de Biotecnología es fundamental para cumplir con este reto y contribuye a la consolidación institucional en esta área. En el

Ecuador, como en otros países de la región, el desarrollo de la agrobiotecnología está en aumento. La Biotecnología está empezando a tomar fuerza, proyectos que involucran procesos biotecnológicos están siendo desarrollados tanto en el sector público como en el privado. En el área agrícola se observa un incremento del uso de biotecnologías en el país. Varias empresas privadas utilizan herramientas biotecnológicas (flores, banano por ejemplo). Este interés también se ve reflejado en el INIAP, donde biotecnologías como la de cultivo de tejidos han contribuido en varios ámbitos a la misión del banco de germoplasma. En la última década se implementa un laboratorio de Biología Molecular, y se da inicio a la utilización de marcadores moleculares en estudios de caracterización de germoplasma e identificación genética de variedades comerciales. Se evidencia entonces un interés creciente de mejoradores y patólogos por beneficiarse de las biotecnologías, particularmente del uso de técnicas moleculares. En el 2007 el INIAP crea un Departamento Nacional de Biotecnología que concentra actualmente tres laboratorios del instituto. El objetivo principal de este departamento es de orientar, racionalizar, planificar y coordinar actividades relacionadas con la utilización de biotecnologías. Fondos del estado a través de un proyecto de fortalecimiento y prestación de servicios apoyan a la consolidación de este nuevo departamento e incluyen actividades y equipamiento de los laboratorios EESC y EECH. La unidad de la Estación Experimental Chuquipata se encuentra participando en este proyecto mediante la producción *in vitro* de plantas y el diagnóstico molecular de enfermedades de interés económico. Además, ejecuta el proyecto 'Innovación tecnológica del sector florícola en el Austro mediante la utilización de la biotecnología' cuyo principal objetivo es el incluir el uso de herramientas biotecnológicas dentro de los procesos productivos de las empresas florícolas asociadas, quienes han mostrado su interés. Este proyecto contempla dos fases principales, la primera la de propagación *in vitro* de plantas y la segunda consiste en generar información para la implementación de procesos que permitan obtener nuevas variedades.

TALLER DE PLÁTANOS Y BANANOS

Estabilidad genética de plantas de *Musa* obtenidas mediante organogénesis y embriogénesis somática

Jorge A. Sandoval^{1*}, María E. Aguilar², Miguel González¹.

*Autor para correspondencia.

¹Centro de Investigaciones CORBANA, Apdo. 390-7210, Guápiles, Costa Rica.

²Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. CATIE, Apdo. 7170, Turrialba. e-mail: jsandoval@corbana.co.cr; aguilar@catie.ac.cr

La variación somaclonal es aquella que se observa en el material vegetal luego de ser expuesto a cualquier metodología de cultivo *in vitro*. La naturaleza de dicha variación puede ser de origen genético o epigenético. Los cambios que se determinan en el material pueden ser: a) cambios heredables y estables, b) cambios heredables e inestables y c) cambios no heredables y transitorios. En *Musa* la variación más común son los variantes de estatura, de follaje y de conformación del racimo. Las causas de esta variación son inestabilidad cromosómica y, anomalías en las rutas de biosíntesis de reguladores tipo giberelina. Los porcentajes de variación pueden variar desde un 1% hasta un 70%. Algunos trabajos publicados indican porcentajes inclusive mayores a un 70%. Producto de la investigación, la variación generada mediante organogénesis es controlada mediante estrategias de manejo *in vitro* y en el invernadero. Poco se conoce sobre la variación en plantas obtenidas a partir de la embriogénesis somática. Observaciones llevadas a cabo en Costa Rica por la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), indican que hay influencia del genoma en la frecuencia de la variación a partir de plantas regeneradas de suspensiones celulares. El genoma AAA es más inestable que los genomas AA, AAB y ABB. Asimismo se determinó que la variación en las plantas obtenidas por embriogénesis no es más frecuente ni diferente tipológicamente a la ya conocida para la organogénesis.

Genetic stability in *Musa* plants obtained through organogenesis and somatic embryogenesis

Somaclonal variation is that observed in plant material after exposure to any *in vitro* culture methodology. The nature of such variation can be genetic or epigenetic. The changes observed in the material can be: a) hereditary and stable, b) hereditary and unstable, and c) non-hereditary and transitory. In *Musa*, the most common variations are height plant,

foliage and bunch conformation. The causes of such variation are chromosomal instability and anomalies in the biosynthesis pathways of the gibberelin type regulators. The percentages variation range are in 1% to 70%. Some published papers show percentages inclusive more high than 70%. As a result of research studies, organogenesis variation is controlled through *in vitro* and greenhouse management strategies. Little is known regarding variation in plants obtained through somatic embryogenesis. Observations conducted in Costa Rica by National Banana Corporation (CORBANA), indicate that there is genome influence in the variation frequency of plants regenerated from cell suspensions. AAA genome is more unstable than AA, AAB and ABB genomes. Likewise, it was determined that variation in plants obtained through somatic embryogenesis is neither greater nor typologically different from that known for organogenesis.

Análisis de crecimiento, particionamiento de materia seca y fenología de los cultivares Grande naine, Valery y Williams en la primera generación de plantas provenientes de cultivo *in vitro*

Henry Valle², Alvaro Segura^{1*}, Werner Rodríguez¹, Miguel González². *Autor para correspondencia.

1/ Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica, Apdo 2060, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica. e-mail: alvaro.segura@bayercropscience.com

2/ Dirección de Investigaciones, CORBANA S.A., Apdo. 390-7210, Guápiles, Costa Rica.

El análisis de crecimiento es una herramienta que permite determinar en forma indirecta la eficiencia fotosintética de una planta toda vez que estudia la relación que existe entre el área foliar respecto a la biomasa total y la proporción relativa de energía que invierte en la producción de las diferentes secciones de la planta. El particionamiento de la biomasa posibilita la identificación de los reservorios energéticos que las plantas utilizan como fuente de energía para sostener su crecimiento y producción, información que permite establecer adicionalmente prácticas de manejo que maximicen el índice de cosecha del cultivo, esto es la cantidad de biomasa acumulada en la sección comestible de un determinado cultivo, en el caso del banano el peso del racimo. La presente investigación se efectuó con el objetivo de realizar un estudio comparativo del análisis de crecimiento y el patrón de acumulación

de biomasa de los cultivares Grande Naine, Valery y Williams. Igualmente determinar el efecto de la emisión de hojas sobre la diferenciación del punto de crecimiento de vitroplantas en primera generación de los tres principales cultivares del subgrupo Cavendish utilizados en Costa Rica. La emisión de hojas y de la inflorescencia ocurre a partir de un meristemo que se localiza en la interfase del cormo con el pseudotallo. En las primeras fases del desarrollo fenológico de la planta el meristemo es vegetativo y está comprometido en la producción de hojas, sin embargo, una vez que la planta ha emitido un número determinado de hojas ocurre un cambio morfológico y funcional de este punto de crecimiento hasta transformarse en un meristemo floral. Este cambio en el meristemo es gradual y puede ser detectado a través de cortes histológicos en el cormo, pero no a través de un indicador morfológico externo conocido que indique con claridad el momento de la transición. El experimento se desarrolló en el Centro de Investigaciones Agrícolas ubicado en la Rita de Guápiles, utilizando vitroplantas de los cultivares Grande Naine, Williams y Valery. En una primera fase plantas uniformes de cada cultivar fueron sembradas en bolsas plásticas que contenían 30 kg de suelo, posteriormente cada dos semanas fueron extraídas plantas a las cuales se les determinó el área foliar y la biomasa de cada sección de las plantas. En la segunda fase, las plantas fueron sembradas en el campo bajo un diseño irrestricto al azar, en sistema de lomillos con un arreglo de triángulo equilátero y una población de 1 700 plantas.ha⁻¹. Para estudiar la producción y particionamiento de la biomasa, se retiraron del campo tres plantas cada dos semanas para extraer y cuantificar la materia seca acumulada en raíces, cormo, pseudotallo, hijos, hojas y racimo desde la siembra hasta la cosecha. Se calculó la tasas de crecimiento relativo (TCR), la tasa de asimilación neta (TAN), la razón área foliar (RAF) para cada clon y la producción relativa de acumulación de biomasa por sección. Al momento de la siembra y con una frecuencia bisemanal hasta la cosecha se extrajeron del suelo tres plantas de cada cultivar y una vez seccionadas en sus partes se realizó un corte longitudinal del cormo. A efecto de identificar la apariencia visual del meristemo se tomaron secciones longitudinales de 2 cm de espesor las cuales fueron examinadas un estereoscopio convencional. A partir del momento del traslado de las vitroplantas al vivero (estado cuatro) y con una frecuencia bisemanal hasta la disección de las plantas se realizaron mediciones de la altura, circunferencia del pseudotallo y número de hojas emitidas. Se utilizó un diseño de bloques completos al zar con tres tratamientos, para luego realizar análisis de varianza y de regresión a través de

Systat® 9. No se encontraron diferencias en la tasas de crecimiento relativo, asimilación neta y razón de área foliar entre clones. Por otro lado se encontró que la proporción relativa de biomasa invertida en la producción de las diferentes secciones de las plantas fue similar en todos los clones. El análisis de particionamiento de biomasa mostró que la mayor proporción de biomasa se acumula en las hojas y en el pseudotallo. A partir de la floración se observó una fuerte caída en la biomasa almacenada en las hojas y en el pseudotallo y un aumento proporcional en el racimo y el hijo de sucesión. La biomasa en el cormo y en las raíces fue relativamente constante en las diferentes etapas. No se encontraron diferencias entre cultivares en el número promedio de hojas emitidas ($P > 0.9900$) y retenidas ($P > 0.685$) en ninguna de las evaluaciones realizadas. Se encontró un modelo de ajuste cuadrático en la regresión entre el tiempo después de la siembra respecto al número de hojas emitidas, con un coeficiente de determinación de 0.98 ($P < 0.0010$). A partir de la siembra y antes de los 105 días solamente se detectó el meristemo en su forma vegetativa (domo); sin embargo entre los 105 y 115 días cuando se habían emitido en promedio entre 30 y 33 hojas totales, se pudo observar claramente el meristemo en su estado piramidal con las primeras manos basales diferenciadas. A los 174 días y con un promedio total de 43 hojas emitidas ocurrió la floración. En el tiempo transcurrido entre la diferenciación del meristemo floral (115 días) hasta la floración (174 días) el desplazamiento de la inflorescencia en el interior del pseudotallo se ajustó a un modelo cuadrático ($r^2 = 0.95$, $P < 0.0001$) en el que la tasa de elongación del raquiz fue de 12.7 cm por día. Los cultivares en estudio mostraron una eficiencia fotosintética similar y una misma tendencia en la producción y particionamiento de la biomasa en las diferentes secciones de la planta. En las primeras diez a doce semanas después de la siembra fue cuando las plantas alcanzaron su máxima proporción, constituyéndose en el período crítico, después de este y una vez que las plantas tienen constituidos sus otros órganos de reserva, las plantas utilizan otras fuentes, además de las hojas, para abastecer sus necesidades de energía. A partir de la floración el pseudotallo se convierte en un reservorio importante para cubrir las necesidades del hijo de sucesión y racimo en crecimiento, órgano que en conjunto con las hojas, se constituyen en las principales reservas de la planta en cada uno de los cultivares evaluado. A pesar de haberse observado diferencias en la altura y conformación general de las plantas entre cultivares, la duración y transición del meristemo vegetativo a floral fue similar entre materiales indicando esto la misma característica genética de los materiales. El tiempo transcurrido

entre el momento de la diferenciación floral y la floración es de sesenta día, período que de darse buenas condiciones internas (nutrición y sanidad de la planta) y externas (clima), se podría esperar una maximización del potencial productivo de las plantas.

Cloning and characterization of ripening-related cDNAs from banana fruit: functional genomic tools for molecular mechanism studies of fruit-quality elaboration

D. Mbeguie-A-Mbeguie^{1*}, O. Hubert¹, M. Chillet¹, B. Fils-Lycaon², R.-M. Gómez², D. Rinaldo², F.-C. Baurens³.

*Author for correspondance.

¹CIRAD-FLHOR / UMR 1270 QUALITROP, Station de Neufchâteau, Sainte-Marie, 97 130 Capesterre-Belle-Eau, Guadeloupe, French West Indies, e-mail: mbeguie@cirad.fr, olivier.hubert@cirad.fr, chillet@cirad.fr

²UMR 1270 QUALITROP Domaine de Duclos, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies, e-mail: Bernard.Fils-Lycaon@antilles.inra.fr, Dominique.Rinaldo@antilles.inra.fr, Rose-Marie.Gomez@antilles.inra.fr

³CIRAD-AMIS /UMR PIA 1096 TA40/03 Avenue Agropolis 34098 Montpellier cedex5, France. e-mail: baurens@cirad.fr, *mbeguie@cirad.fr

It is now assumed that the quality of fruit is a complex trait in which a lot of mechanisms are involved, some of them being antagonistic. All of these mechanisms are the results the coercive action of differentially regulated genes. Understanding at molecular level of the mechanisms that control the target quality trait is an essential work beforehand to any plan of improvement of fruit quality trait using plant genetic strategies such as candidate-gene approach and or markerassisted selection. Presently we investigate at molecular level the ethylene responsiveness, and sugar and phenylpropanoïd metabolisms, three ripening aspects involved in functional, nutritional and organoleptic qualities of banana fruit. As a first part of this project, we report here the cloning and sequencing of genes that are differentially expressed during fruit ripening, as tools for functional genomic studies and putative molecular marker developments. Different molecular biology approaches have been used to isolate ripening these ripening related-genes. They include cDNA amplification (RT- and RACE-PCR) and, construction of complete and subtractive suppressive cDNA libraries (SSH). Sequencing and BLAST analysis of some of these isolated cDNA clones revealed that 205 of them presented a high homology with different genes in database. Many of the predicted proteins encoded by these genes are putatively involved in the regulation of gene expression, hormonal metabolism, hormonal-signal transduction, sugar metabolism and other ripening process. Among these 205 genes, 11 are still

unclassified since presenting homology to unknown proteins of rice or *Arabidopsis*. Finally, thirteen additional clones were putatively novel, since they failed to match with database sequences. Expressions of a few of the matching clones have been followed in relation with ethylene responsiveness of fruit. Our results show that the expression of these genes is under ethylene and development (or both) control. These cDNA clones provide us with a basis for future work that will combine physiological, genomic and genetic approaches to identify key candidate-genes involved in the expression of banana quality trait.

Nueva metodología de embriogénesis somática para cultivares de plátano vianda (grupo AAB) y su escalado en biofábricas

López*, J.¹, R. G. Kosky², N. Montano¹, D. Reinaldo¹ A. Cantero¹, R. Trujillo³, A. Rayas¹, M. Cabrera¹, A. Santos¹, H. Toledo¹, J. Ventura¹, V. Medero¹, M. Basail¹, M. Reyes², S. Rodríguez¹.

*Autor para correspondencia.

¹Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). INIVIT, Apdo 6, Sto Dgo., CP 53 000, V.C. Cuba. e-mail: jlopez@inivit.co.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

³Centro de Bioplasmas (UNICA).

El desarrollo de la embriogénesis somática, posibilita disponer de un sistema celular útil para la mejora genética y una vía alternativa para la propagación de plantas. En contraste la propagación *in vitro* a partir de yemas axilares tiene como limitantes los bajos coeficientes de multiplicación y la necesidad de realizar un elevado número de operaciones manuales. En cambio, el empleo de la embriogénesis somática, permite obtener producciones superiores en un menor período de tiempo y a un costo más bajo. El presente trabajo se realizó con el objetivo de desarrollar una metodología de embriogénesis somática en los cultivares 'Navolean' y 'CEMSA ¾' (*Musa* spp., Grupo AAB) a partir de domos meristemáticos de yemas brotadas. Adicionalmente se estudió la germinación de los embriones somáticos y la multiplicación de los mismos en una Biofábrica, en comparación con el uso del explante inicial *de scalps* de multiyemas para inducir la embriogénesis somática. Se valoró la presencia de variantes somaclonales en cada tratamiento objeto de estudio, en condiciones de campo. Se demostró que es posible la obtención de suspensiones celulares embriogénicas homogéneas a partir del explante antes mencionado y su multiplicación. Se logró la formación de embriones somáticos, su maduración e incremento de los valores de

germinación con el uso del Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA. Los embriones somáticos multiplicados en la Biofábrica a partir del explante inicial de ápices de brotes de yemas axilares, mediante la conversión de los mismos en plantas o su multiplicación mostraron la posibilidad de su escalado a laboratorios comerciales, lo cual fue corroborado por la estabilidad genética de las plantas regeneradas.

Propagación del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' por embriogénesis somática

Leyanis García-Águila*, Zoe Sarría, Miladys León-Quintana, Rafael G. Kosky, Luis Rojas, Maritza Reyes.
*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: leyanis@ibp.co.cu

El trabajo se realizó con el objetivo de desarrollar la embriogénesis somática del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB), para su utilización en la propagación masiva de este cultivar. Como material vegetal se utilizaron flores masculinas inmaduras para la inducción de callos con estructuras embriogénicas, las cuales originaron las suspensiones celulares utilizadas para la formación y diferenciación de los embriones somáticos. Se evaluó el efecto de la densidad de inóculo en el desarrollo de la embriogénesis somática en medio de cultivo líquido, así como en la morfología e histología de los embriones somáticos formados. Además se determinó *ex vitro* la respuesta de las plantas regeneradas a partir de ellos. Los resultados permitieron establecer la embriogénesis somática en medios de cultivo líquidos del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21', a partir de 1.5 ml de agregados celulares embriogénicos como densidad de inóculo inicial para la formación del mayor número de embriones somáticos. Estos a razón de 600mg en 30ml de medio de cultivo de maduración presentaron el mejor porcentaje de germinación y formación de plantas completas. Se observaron durante la formación, maduración y germinación de los embriones somáticos diferencias en la morfología y tamaño de los mismos, relacionadas con la densidad de cultivo utilizada. Las mismas también fueron corroboradas en las secciones histológicas de los embriones somáticos. En casa de cultivo las plantas regeneradas por embriogénesis somática mostraron una supervivencia similar a las propagadas por organogénesis. Solo se observaron cambios fenotípicos en 12 plantas de un total de 6 255 (0.19%), los que se localizaron en las hojas (variegadas, dobles y en forma de abanico). Las evaluaciones en campo de los caracteres

morfológicos de las plantas regeneradas de embriones somáticos mostraron correspondencia con las plantas procedentes de organogénesis y semilla asexual. Los mejores resultados en las variables agronómicas (peso del racimo, número de manos/racimo y número de frutos/mano) se obtuvieron en las plantas procedentes del cultivo *in vitro* (embriogénesis y organogénesis). Por otra parte, los marcadores moleculares AFLP no indicaron variaciones genéticas para las combinaciones de cebadores estudiadas. Teniendo en consideración los resultados se propone utilizar la embriogénesis somática en medios de cultivo líquido para la propagación masiva *in vitro* de este cultivar.

Induction of *Agrobacterium tumefaciens* with spermidine and its effect on the transformation frequency on banana cv. Grande naine (*Musa* AAA)

Borys Chong^{1*}, Serge Remy², Rafael G. Kosky¹, Maritza Reyes¹, Bárbara Ocaña¹, Geert Angenon³. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: boris@ibp.co.cu

²Laboratory of Tropical Crop Improvement Katholieke Universiteit Leuven, Kasteelpark Arenberg 13, 3001 Heverlee, Leuven, Belgium.

³Laboratory of Plant Genetics, Vrije Universiteit Brussel. Pleinlaan 2. 1050. Brussels. Belgium.

Bananas (*Musa* spp.) are an important fruit for millions of peoples as a food and economical source in the tropical and subtropical regions of the world. Molecular breeding of banana is a necessity in view of its long life cycle, poliploidy, and sterility of most edible cultivars. The most important banana cultivar for the trade market is Grande Naine (*Musa* AAA), that have not benefited from traditional plant breeding because of these major impediments. Genetic transformation offers an attractive means for introduction of agronomically important genes into these cultivars. Research in the field of transgenic improvement and functional genomics in banana is constrained by low efficiency transformation systems, and therefore an efficient transformation protocol is crucial for banana genomics and banana improvement initiatives. In this work a study of the effect of spermidine on genetic transformation was done in two different *Agrobacterium tumefaciens* based protocols, centrifuge-assisted *Agrobacterium* mediated transformation (CAAT) and six hours infection period of embryogenic banana cell with *A. tumefaciens*. Male-flower-derived embryogenic cell suspensions of Grande Naine (*Musa* AAA) were used. *Agrobacterium* strain EHA101, harbouring binary

vector pFAJ3000, which contains besides a *gusA-intron* cassette and the *neo* selectable marker gene driven by the *nos* promoter was used. The results showed a clear effect of spermidine on transient GUS expression, 4 406±194 blue spot per 50 mg of fresh weight of embryogenic cell, in the treatment with six hours infection step in ZZ medium supplemented with acetosiringone 200 µM and spermidine 100 mM. After eight weeks on selection medium, cells transformed with this treatment formed an average of 1 004±18 colonies per 50 mg of fresh weight of embryogenic cell, almost 2 fold higher than the second better treatment. The stable expression of *uidA* gene was confirmed in these colonies.

Inducción de *Agrobacterium tumefaciens* con espermidina y su efecto en la transformación genética de banano cv. Grande Naine (*Musa* AAA)

Los bananos (*Musa* spp.) son una fruta de gran importancia para millones de personas como alimento y fuente de ingresos en las regiones tropicales y subtropicales. El mejoramiento genético, apoyado en técnicas moleculares es una necesidad debido al ciclo largo de vida, poliploidía y esterilidad de los más importantes cultivares. Para el mercado internacional el cultivar más importante de bananos lo es el Grande Naine (*Musa* AAA), el cual no ha sido beneficiado por la mejora genética tradicional debido a los impedimentos antes expuestos. La transformación genética es una alternativa para la introducción de genes de interés agronómico en este cultivar. Las investigaciones en la transformación genética y la genómica funcional en bananos están limitadas por la baja eficiencia de los sistemas de transformación, herramienta crucial para estudios de genómica y/o mejoramiento genético. En este trabajo se estudió la influencia de la espermidina en la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de suspensiones celulares embriogénicas (SCE) de banano cv. Grande Naine (*Musa* AAA). Para ello se emplearon dos protocolos, uno basado en el uso de la co-centrifugación de SCE con *A. tumefaciens* y el otro basado en la infección durante seis horas a 25 rpm. Para la transformación se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* EHA101, portadora del plasmidio pFAJ3000 (con los genes *neo* y *uidA* bajo el promotor *nos*). Los resultados de la expresión transitoria del GUS mostraron un marcado efecto de la espermidina en el tratamiento con seis horas de infección, 25 rpm, 25°C y oscuridad con 4 406±194 puntos azules por cada 50 mg de SCE. Después de 8 semanas en medio selectivo de cultivo con genética 50 mg.l⁻¹ y subcultivo cada dos semanas, este mismo tratamiento mostró el mayor número de colonias (1 004±18 por cada 50 mg de SCE), casi el

doble del segundo mejor tratamiento. La expresión estable del gen *uidA* fue comprobada en estas colonias.

Empleo del Glufosinato de Amonio en la selección de plantas transformadas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* spp. AAA)

Maritza Reyes, Rafael G. Kosky*, Idalmis Bermúdez-Caraballosa, Borys Chong. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: kosky@ibp.co.cu

La presente investigación tuvo como objetivo la evaluación del glufosinato de amonio para la selección *in vitro* y en casa de cultivo de líneas transformadas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* spp. AAA), que tienen como marcador de selección el gen *bar*. Como resultado se determinó que la concentración mínima que inhibe el crecimiento en agregados celulares embriogénicos fue de 20.0 mg.l⁻¹ de glufosinato de amonio, en brotes *in vitro* 3.0 mg.l⁻¹ y en plantas en casa de cultivo 30.0 g.l⁻¹. Se demostró la no expresión del gen *bar* mediante la evaluación de la respuesta de los brotes *in vitro* y plantas en casa de cultivo de líneas de banano transformadas frente a la concentración mínima inhibitoria, previamente determinada, de glufosinato de amonio, lo cual fue confirmado por el resultado negativo del análisis molecular de reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Además, a partir del protocolo desarrollado con el empleo de fragmentos de hojas de plantas de campo cultivados *in vitro* en medio de cultivo agar-agua al 1% y 30.0 g.l⁻¹ de glufosinato de amonio se logró diferenciar las dos líneas transformadas del control no transformado, a partir de la expresión del gen *bar*. Ambas líneas fueron positivas en el análisis molecular de RCP. Estos resultados son los primeros en el desarrollo de este tipo de protocolo en plantas de banano cv. 'Grande naine'.

Use of the ammonium glufosinate in the selection of banana cv. 'Grande naine' (*Musa* spp. AAA) transformed plants

The present investigation had as objective the study of the ammonium glufosinate for the *in vitro* selection and glasshouse of transformed lines of banana cv. 'Grande naine' (*Musa* spp. AAA) that have as selection marker the gene *bar*. As a result it was determined that the minimum concentration that inhibits the growth in embryogenic cellular cluster was of 20.0 mg.l⁻¹ of ammonium glufosinate, in *in vitro* shoots 3.0 mg.l⁻¹ and in glasshouse plants at 30.0 g.l⁻¹. The non expression of the gene *bar* was demonstrated by means of the evaluation of the answer of the *in vitro* shoots and glasshouse plants in of cultivation of banana transformed

lines in front of the inhibitory, previously certain minimum concentration, of ammonium glufosinate, that which was proven through the negative result of the molecular analysis (PCR). Also starting from the protocol developed with the employment of leaves fragments from field plants *in vitro* cultivated in culture medium agar-water to 1% and 30.0 g.l⁻¹ de ammonium glufosinate, it was possible to differentiate the two transformed lines of the not transformed control, starting from the expression of the gene *bar*. Both lines were positive in the molecular analysis of PCR. These results are the first ones in the development of this protocol type in plants of banana cv. 'Grande naine'.

Componentes de la resistencia para evaluar la respuesta a la Sigatoka negra en genotipos de *Musa* inoculados artificialmente

Michel Leiva-Mora*, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Mileidy Cruz-Martín, Cynthia Sánchez-García, Berkis Roque, Rafael G. Kosky *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní. km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.
e-mail: michel@ibp.co.cu

En el presente trabajo, fueron evaluados los componentes de la resistencia a la Sigatoka negra en genotipos de *Musa* inoculados artificialmente con una suspensión de fragmentos de micelio de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (CCIBP-Pf80), para determinar cuantitativamente la respuesta de *Musa* spp. El periodo de incubación (PI), Número de lesiones necróticas (NLN), Área de la lesión (LA), Índice de infección (II), Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) y el Periodo de latencia asexual latente (PLA), fueron evaluados en hojas inoculadas artificialmente de siete genotipos de *Musa* y utilizados como componentes de la resistencia para determinar el ciclo infectivo de *M. fijiensis* en condiciones de casa de cultivo. Se observaron diferencias significativas en la respuesta de los genotipos de *Musa* spp. inoculados artificialmente a la Sigatoka negra, las cuales pudieron ser determinadas cuantitativamente mediante los componentes de la resistencia. Estos resultados pueden mejorar o facilitar la precisión y eficiencia del proceso de evaluación temprana en los programas de mejoramiento genético de plátanos y bananos para la búsqueda resistencia a la Sigatoka negra. Otros genotipos con fenotipos de la resistencia conocida en condiciones de campo (resistentes, parcialmente resistentes y susceptibles), pueden ser corroborados mediante las variables utilizadas en este trabajo con previa inoculación artificial en casa de cultivo. Además, estos resultados pueden ser de utilidad en la selección de genotipos de *Musa* resistentes, evaluación de la agresividad de aislados de *M. fijiensis*, en estudios moleculares relacionados

con la interacción planta-patógeno y con el manejo de la Sigatoka negra. Adicionalmente, se podrán suministrar información para conducir estudios futuros acerca de los mecanismos de resistencia relacionados con la resistencia en *Musa* spp. mediante el análisis del ciclo infectivo de *M. fijiensis* en condiciones controladas.

Components of resistance to assess Black Sigatoka response in artificially inoculated *Musa* genotypes

Components of resistance to Black Sigatoka disease were evaluated in artificially inoculated *Musa* genotypes with mycelial fragment suspension of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (CCIBP-Pf80), to assess quantitative response of *Musa* spp. Incubation period (IP), Lesions number (LN), Lesion area (LA), Infection index (II), AUDPC and Asexual latent period (ALP), were evaluated in leaves of seven genotypes and used as component of resistant to dissect the infective cycle of *M. fijiensis* under greenhouse condition. Significant differences among *Musa* spp. response indicated that resistance to Black Sigatoka in artificially inoculated genotypes can be evaluated by components of resistance to assess quantitatively the reaction of *Musa* spp. to BLSD. Results may improve or facilitate the efficiency and precision of early evaluation process in banana and plantain breeding programs. Further genotypes with known resistance, partial resistance and susceptible phenotypes in field condition must be confirmed in subsequent greenhouse tests to validate these results. These results may be useful for screening BLSD *Musa* resistant breeding material, evaluation of aggressiveness of *M. fijiensis* isolates, studies about molecular plant-pathogen interaction and management schemes of BLSD. Additionally, these findings have supplied information for guiding future studies about mechanisms involved in the BLSD resistance in *Musa* spp by dissecting the infection cycle of *M. fijiensis* under controlled condition.

Embriogénesis somática en plátano cv. FHIA-21 (*Musa* AAAB) en medios de cultivo líquido

Zoe Sarría*, Rafael G. Kosky, Leyanis García-Águila, Maritza Reyes, Blanca Pérez, Teresa Salabarría, Mileidy Pons-Corona, Ortelio Hurtado. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní. km 5 ½, Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830 e-mail: zoe@ibp.co.cu

El objetivo de este trabajo fue desarrollar la embriogénesis somática en el cv. FHIA-21 (*Musa* AAAB), en medios de cultivo líquido, para lo que se estudió el efecto de la densidad de inóculo en la formación, maduración y germinación de los

embriones somáticos. En la formación de los embriones somáticos se estudiaron cuatro densidades de inóculo (1.0; 2.0; 3.0 y 4.0%), se evaluó el número de embriones formados y el tamaño alcanzados por estos a los 45 días de cultivo. Para la maduración de los embriones somáticos se estudiaron las densidades de inóculo de: 200; 400; 600 y 800 mgMF de embriones, evaluándose a los 30 días de cultivo el porcentaje de embriones germinados y al tamaño alcanzado en cada densidad. En la germinación de los embriones somáticos con la utilización de las densidades de inóculo de: 15.0; 20.0; 25.0 y 30.0 mgMF de embriones, se evaluó a los 20 días el número de embriones germinados. Se obtuvo la formación de embriones somáticos en todas las densidades celulares pero la mayor cantidad de embriones somáticos se presentó en la densidad celular de 3.0% VCS, alcanzándose 523.91 embriones, el tamaño de los mismo osciló entre 20-80 μm a los 45 de cultivo. En la maduración de los embriones somáticos la mejor densidad de inóculo fue 600 mgMF de embriones somáticos lográndose un porcentaje de germinación de 47.72% a los 30 de cultivo. En la densidad de 800 mgMF se observó oxidación fenólica. Para la germinación de los embriones somáticos maduros se obtuvo el mayor número de embriones germinados cuando se utilizó la densidad de inóculo de 30 mgMF de embriones somáticos, en SIT a los 20 días de cultivo.

Evaluación morfológica, agronómica y molecular mediante AFLP de plantas del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21' regeneradas por Embriogénesis Somática

Miladys León-Quintana^{1*}, Leyanis García-Águila¹, Lourdes R. García¹, Kosky R.G¹, Pedro Orellana¹, Luis Rojas¹, Aminael Sánchez¹, Orelvis Portal¹, Luis Antonio Barranco Olivera², Jorge Pérez Pérez³ Ricardo Serrano Masquida⁴.

*Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail. miladys@ibp.co.cu

²Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIA), Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830.

³Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal y Medio Ambientes, Universidad de Granma.

⁴Finca de Referencia Nacional 'La Victoria', Bayamo, Granma.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar variaciones somaclonales en plantas regeneradas por embriogénesis somática del cv. híbrido 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) a través la evaluación

morfológica, agronómica y molecular mediante AFLP. Para ello, se evaluaron en casa de cultivo cambios fenotípicos en las plantas con regeneradas de embriones somáticos utilizando como control plantas procedentes de organogénesis. La evaluación en campo de las plantas se realizó a través de caracteres morfológicos, agronómicos y moleculares (AFLP), para ello se utilizaron como controles plantas procedentes de organogénesis y semilla asexual. Como resultado se obtuvo que el porcentaje de cambios fenotípicos en las plantas regeneradas por embriogénesis somática detectable en casa de cultivo fue menor respecto a las plantas de organogénesis. Se corroboró, que los porcentajes de variación somaclonal en las plantas regeneradas de embriones somáticos fueron bajos (0.02%) durante el ciclo de cultivo en campo. Los mejores resultados en las variables agronómicas (peso del racimo, número de manos/racimo y número de frutos/mano) se obtuvieron en las plantas procedentes del cultivo *in vitro* (embriogénesis y organogénesis). Por otra parte, los resultados con los marcadores moleculares AFLP para las combinaciones de cebadores estudiadas no indicaron variaciones genéticas. Por tanto, los resultados de este trabajo permiten validar la embriogénesis somática para la propagación masiva del cv. híbrido de plátano 'FHIA-21'.

Morphological, agronomic and molecular evaluation by AFLP in plants of the cv. hybrid of banana 'FHIA-21' regenerated by somatic embryogenesis

The present paper was carried out with the aim of determining somaclonal variations in plants of the hybrid cultivar 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) regenerated by somatic embryogenesis through morphological, agronomical and molecular evaluation using AFLP. In order to fulfil this aim, the plants showing phenotypic changes and regenerated from somatic embryos were evaluated in a greenhouse using as control plants the ones obtained from organogenesis. The evaluation of the plants in the field was carried out through the use of morphologic, agronomic and molecular characters (AFLP), so control plants obtained from organogenesis and asexual seeds were used. As a result, the percentage of phenotypic changes in plants regenerated from somatic embryogenesis was lower than those obtained from organogenesis, what was noticed in greenhouse. It was confirmed that the percentage of somaclonal variation in plants regenerated from somatic embryos was low (0.02%) during the cycle of culture in the field. The best results in the agronomic variables (weight of

bunch's, number of bananas in the bunch) were obtained in those plants cultivated *in vitro* (embryogenesis and organogenesis). On the other hand, the results with molecular markers AFLP for the combinations of studied primers did not indicated genetic variations. Therefore, the results of this paper allow us to validate the somatic embryogenesis for the *in vitro* massive propagation of the hybrid cultivar of plantain 'FHIA-21'.

Crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas del cultivar de plátano 'CEMSA 3/4'

Mayra Jiménez Vázquez^{1*}, Leyanis García-Águila².
*Autor para correspondencia.

¹Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara - Cienfuegos - Sancti Spíritus (ETICA). Autopista Nacional km. 246. Ranchuelo. Villa Clara. Cuba.
e-mail: biofabrica@vc.minaz.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

La conservación *in vitro* de suspensiones celulares embriogénicas del género *Musa* es de gran utilidad para los programas de mejora genética y la propagación masiva de plantas por vía de la embriogénesis somática. La presente investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas con el objetivo de establecer una metodología que permita la crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas obtenidas a partir de callos con estructuras embriogénicas, provenientes de domos meristemáticos de yemas axilares en el cultivar 'CEMSA 3/4'. Para ello se evaluó la influencia del precultivo con sacarosa y a baja temperatura en el proceso de crioconservación determinado por el porcentaje de vitalidad y el número de embriones somáticos formados a partir de los agregados celulares crioconservados. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el precultivo con sacarosa afecta la vitalidad de las suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas de 'CEMSA 3/4'. Se logró la recuperación de las suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas en medio de cultivo de formación de embriones sin diferencias con el control cuando se realizó el precultivo a 4°C. El mayor número de embriones germinados se logró a partir de suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas con 10% de DMSO. Las plantas obtenidas a partir de las líneas celulares embriogénicas se adaptaron a las condiciones de casa de cultivo con altos porcentajes de supervivencia, no se observaron cambios morfológicos en la población estudiada.

Análisis de la variabilidad genética en somaclones de plátanos (*Musa* spp.)

María Isabel Román^{*1}, Clara González², Xonia Xiqués², Lianet González¹, Teresa Ramírez¹, M. Hernández¹ Francisco Dueñas², B. Martínez¹, Marlyn Valdés², Alejandro Rojas², Leneidy Pérez².
*Autor para correspondencia.

¹Instituto Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

²Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 # 455, Ciudad de La Habana, Cuba. e-mail: roman@fbio.uh.cu

En el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), en Santo Domingo, Villa Clara, Cuba, se detectaron dos variantes somaclonales INIVIT-1 y el INIVIT-2, a partir del clon donante de plátanos FHIA-21. El objetivo de este trabajo fue determinar la variabilidad genética de los somaclones mediante análisis citogenéticos, genético-bioquímicos y moleculares con el marcador de ADN, ISTR (*Inverses Sequences Tagged Repeat*). En el estudio citogenético se determinó que el somaclon INIVIT-1 mantuvo la condición de tetraploide ($2n=4x=44$ cromosomas) y la variante somaclonal INIVIT-2 se observó en todas las células analizadas ($2n=3x=33$ cromosomas), lo que indica que ocurrió la pérdida de un juego cromosómico, esto da lugar a un cambio en el nivel de ploidía. Los resultados en los sistemas isoenzimáticos mostraron, que de 36 bandas analizadas, el 28.5% de ellas fueron polimórficas y estuvieron representadas en los sistemas isoenzimáticos esterasas y peroxidasas, esto ratifica su uso en la determinación de la variabilidad genética. En el análisis de conglomerados (*Cluster*) se determinó que con un 88.0% de similitud se formaron dos grupos. En el grupo I con un 98% de similitud se encuentra el clon donante con el somaclon INIVIT-1 y en el grupo II aparece independiente el INIVIT-2 por el número de bandas diferentes detectadas. Estas deferencias genéticas fueron corroboradas en el análisis molecular (ISTR), por coincidir ambos resultados. Reviste gran importancia haber caracterizado y demostrado que los somaclones son diferentes al clon donante, por lo que constituyen marcadores útiles para la detección de la variabilidad genética.

Genetic variability analysis in plantains somaclons (*Musa* spp.)

In the Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), in Santo Domingo, Villa Clara, Cuba, was detected two somaclons, INIVIT-1 and INIVIT-2, from clone of plantain FHIA-21. The aim of this work was to obtain the genetic variability of somaclons by means the cytogenetic analysis, genetic-biochemical and molecular analysis whit the

ADN marker and ISTR (Inverses Sequences Tagged Repeat). In the cytogenetic studies we obtain that the somaclon INIVIT-1 maintain the tetraploid condition. ($2n=4x=44$ chromosomes) and in the somaclonal variant INIVIT-2 we observed, in all inspected cells ($2n=3x=33$ chromosomes), that means the loss of a chromosomes pair and that situation imply a change in the level of ploidy. The results in the isozymes systems showed that 36 bands (28.5%) were polymorphic and were represented in the isozymes esterase and peroxidase systems. This result allow the possibility to use it in the determination of genetic variability. In the analysis of cluster we obtain that, whit 88.0% of similarity, were formed two group. In the group I whit a 98% of similarity we found the donor clone whit the somaclon INIVIT-1. In the group II appears independently the clone INIVIT-2 because of the number of different bands detected. These genetic differences were corroborated in the molecular analysis (ISTR). Is important the characterization and the demonstration that the two somaclons are different to the donor clone, that means, additionally, that this marker are useful in the detection of genetic variability.

Establecimiento de una metodología para la determinación de índice mitótico en los clones Calcutta-4 y Bluggoe (*Musa spp.*)

Leneidy Pérez Pelea*¹, Reinier Gesto Borroto¹, Xonia Xiqués Martín¹, María Isabel Román Gutiérrez², Jorge López Torres², Damisela Reinaldo² y Nery Montano².
*Autor para correspondencia.

¹Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Calle 25 # 455 / I y J, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana. CP 10 400.

²Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6 CP 53 000 Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

Los plátanos y bananos (*Musa spp.*) se encuentran entre los cultivos más importantes a nivel mundial, pues constituyen una fuente importante de alimentos. Las suspensiones celulares constituyen una vía de obtención de embriones somáticos, por lo que su establecimiento y caracterización es de gran importancia en el desarrollo de una metodología exitosa de embriogénesis somática para la regeneración de plantas. Se determinó el índice mitótico (IM) en suspensiones celulares de los clones Calcutta-4 y Bluggoe (*Musa spp.*), como método de evaluación del crecimiento de las suspensiones celulares. Se emplearon cuatro metodologías que diferían en la presencia o no de agentes fijadores y de la hidrólisis celular, previas a la tinción. En el clon Calcutta-4 se empleó el medio de cultivo basal MS con $1\mu\text{M}$ de Zeatina y $5\mu\text{M}$ de 2,4-D; se realizaron

conteos a los 2, 4, 7, 9, 11, 14, 21, 28, 35 y 42 días después del primer subcultivo. En el clon Bluggoe se establecieron las suspensiones en tres variantes diferentes del medio de cultivo MS y se contaron las células en división a los 2, 7, 15 y 21 días después del subcultivo inicial. En el clon Calcutta-4 se observó una mayor frecuencia de células en división entre los 11 y 21 días posteriores al primer subcultivo. Para el clon Bluggoe se determinó que el mejor medio de cultivo fue aquel que contenía Zeatina y Pectimorf® y los porcentajes más altos de células en división se encontraron entre los 7 y 15 días posteriores al subcultivo inicial. Se seleccionó la metodología que permitió visualizar mejor los cromosomas de las células en división para utilizarla posteriormente en otros clones del cultivo.

Estudio preliminar del comportamiento de vitroplantas de *Musa sp.* clon 'FHIA 18' en las condiciones edafoclimáticas de Topes de Collantes

Luis Alberto Delgado Fernández^{1*}, Ana Gertrudis Trocones Boggiano¹, Frank Cabrera Martín², Bernardo Morfa³.

*Autor para correspondencia.

¹Facultad Agropecuaria de Montaña del Escambray (FAME). Carretera a La Chispa km 1½, Topes de Collantes, Sancti Spiritus, Cuba. e-mail: luis@fame.suss.co.cu

²CPA 13 de Marzo. Santa Lucía, Cabaiguán, Sancti Spiritus, Cuba.

El plátano es considerado como un producto básico y de exportación, constituye una importante fuente de empleo e ingresos en numerosos países en desarrollo. Sin embargo, en los últimos años su rendimiento ha declinado por diversas razones, lo cual acentúa la inseguridad alimentaria en las regiones cultivadoras. Con el objetivo de evaluar el comportamiento de vitroplantas del clon FHIA 18 en las condiciones de Topes de Collantes, se establecieron cuatro parcelas de 25 plantas cada una que fueron comparadas con una de la variedad tradicional Johnson en cuanto al peso del racimo, número promedio de manos, longitud media de los dedos y número de hojas activas al momento de la cosecha. Los resultados obtenidos mostraron la superioridad del FHIA 18 sobre la variedad tradicional. El peso del racimo superó los 17 kg en el primero, y fue de 11.5 kg en este último, el número de manos por racimo osciló entre 7 y 9, en el FHIA 18, mientras que para el Johnson fue 8. La longitud de los dedos no mostró diferencias altamente significativas entre las variedades y se mantuvo entre 12 y 13 cm. Finalmente, quedó comprobada la tolerancia del FHIA 18 a la Sigatoka amarilla con un número de hojas activas al momento de la cosecha muy superior (5.4) al observado en la variedad Johnson (1.3). Se

puede plantear que es factible la utilización del clon híbrido FHIA 18 para elevar la productividad de bananos en la localidad de Topes de Collantes.

Preliminary study on the behavior of vitroplants of *Musa* sp. clon 'FHIA 18' in edaphoclimatic conditions of Topes de Collantes

The banana is considered like a basic product and of export, it constitutes an important source of use and income in numerous countries developing. Nevertheless, in the last years its yield has declined for diverse reasons, which accentuates the food insecurity in the cultivating regions. With the objective of evaluating the behavior of banana vitroplants (clone FHIA 18) in the conditions of Topes de Collantes, four plots of 25 plants each were established to be compared with one of the traditional variety Johnson in relation to the weight of the bunch, number of hands, length of the bananas and number of active leaves at the time of the harvest. The results showed the superiority of FHIA 18 to the traditional variety. The weight of the bunch surpassed the 17 kg while the traditional variety weight was 11.5 kg, the number of hands in each bunch ranged between 7 and 9, in FHIA 18, whereas for Johnson was 8. The length of the bananas did not show highly significant differences between the varieties and it ranged between 12 and 13 cm. Finally, the tolerance of FHIA 18 to the yellow Sigatoka was verified with an average number of active leaves of 5.4 at the time of the harvest in this variety; compared to Johnson (1.3). It is possible to state that the use of hybrid clone FHIA 18 is feasible as a means to elevate the productivity of banana trees in the locality of Topes de Collantes.

Niveles endógenos de giberelinas y elementos minerales durante la transición floral en plátano (*Musa* AAB) cv. Hartón

Hernández G. Yvo*¹, Villa Nemesio R.², Fournil Grace K.³, De La Cruz Julio⁴. *Autor de correspondencia.

¹Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR). Estado Zulia. Venezuela. e-mail: yvo333@hotmail.com.hotmail.com

²Laboratorio de Bioquímica y Biología molecular de Productos Naturales de plantas del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato. México. Apdo. Postal. 62936500. e-mail: nvilliranvilla@ira.cinvestav.mx

³Estudiante de Ingeniería de la Producción Agropecuaria de la UNESUR.

⁴Centro Internacional del Plátano (CIPLAT). El Chivo, Estado Zulia. Apdo. Postal 5101.

Con el propósito de determinar los niveles endógenos de giberelina y otros elementos minerales durante la transición floral en plátano *Musa* AAB cv. Hartón, se realizó un ensayo en el Centro Internacional del Plátano (CIPLAT) LN: 8°51'50"y LE: 71°35'24". Para ello se tomaron muestras foliares y de cormo que contenían la zona meristemática en plantas que estaban en 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 y 36 hojas emitidas. Una parte de las muestras de cormo fueron almacenadas en nitrógeno líquido para la determinación de ácido giberélico por HPLC y la otra parte, junto con las muestras foliares, procesadas para la determinación de elementos minerales. La transición floral en plátano Hartón pudo observarse en hoja 27, siendo el ácido giberélico encontrado la AG₃ o giberelina muy asociada con el alargamiento del tallo en plantas. Los valores más bajos en los elementos minerales, en general se encontraron entre las hojas 21 y 27, siendo Mg²⁺, Ca²⁺ y K⁺ los que mostraron alguna relación en cuanto a los contenidos de las AG₃ detectadas en cormos de estas plantas de *Musa*, pudiendo tener estos elementos un papel importante en la regulación del crecimiento del verdadero tallo durante la transición floral en plátano.

Endogenous level of gibberellins and the mineral element during the floral transition in plantain (*Musa* AAB) cv. false Horn

With the purpose of determining the endogenous levels of gibberellin and other mineral elements during the floral transition in plantain *Musa* AAB cv. False horn, was carried out a rehearsal in the International Center of the Banana (CIPLAT) LN: 8°51'50"y HIM: 71°35'24". For that samples of leaf and of corm were taken contained the area meristemática in plants that were in 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 and 36 emitted leaves. A part of the corm samples was stored in liquid nitrogen for the determination of sour giberélico for HPLC and the other part, together with the samples leaf, processed for the determination of mineral elements. The floral transition in plantain False horn could be observed in leaf 27, being the sour opposing giberélico the AG₃ or gibberellin very associated with the lengthening of the shaft in plants. The lowest values in the mineral elements, in general were among the leaves 21 and 27, being Mg²⁺, Ca²⁺ and K⁺ those that showed some relationship as for the contents of the AG₃ detected in corms of these plants of *Musa*, being able to have these elements an important paper in the regulation of the growth of the true shaft during the floral transition in banana.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS

The production of plant secondary metabolites using bioreactors

André Gerth*, Diana Claus, Dirk Wilken.

*Author for correspondence.

BioPlanta GmbH, Deutscher Platz 5, D-04103 Leipzig, Germany.
e-mail: info@bioplanta-leipzig.de

Plants have always been a suitable source for the production of pharmaceuticals. However, the quality and quantity of active substances from wild collected and field grown plants is often fluctuating and heterogeneous depending on environmental conditions. Infestation, diseases and the application of pesticides additionally decrease the quality of the plant material. *In vitro* culture of plants can overcome these problems, since the environmental conditions that affect plant metabolism can be strictly controlled. Thus, an advanced bioreactor system is a key step towards commercial production of secondary metabolites by plant biotechnology. Research in the field of plant biotechnology has been concentrated on plant genomics and natural product synthesis. Several applications have been developed as the production of roots in bioreactors and the plant propagation in temporary immersion systems. BioPlanta has developed a platform technology for the cultivation of *in vitro* shoot and organ culture. It is adaptable to the special requirements of different plant tissue cultures, such as shoots, roots, and micro-tubers. Investigations on selected plant species demonstrate that the bioreactor technology allows the reproducible production of active pharmaceutical ingredients of high quality under GMP-conditions and an efficient screening for new active components. This System is particularly suitable for manipulating plant metabolism to generate active compounds with higher value than field plants. The results so far clearly mark the potential of the developed technology for the production of custom-made, plant-derived active pharmaceutical ingredients as well as of standardised plant biomass.

Hairy root cultures from *Maesa lanceolata*

E. Lambert*, D. Geelen. *Author for correspondence.

Department of Plant Production, Ghent University, Coupure Links, 653, B-9000 Ghent, Belgium.
e-mail: danny.geelen@ugent.be

Maesa lanceolata is a medicinal shrub growing in the tropics of Africa and Asia. It produces a number of different saponins for which was shown that they exert antiviral, hemolytic, molluscicidal and anti-

angiogenic activities. To evaluate the production of saponins in *M. lanceolata* grown under *in vitro* conditions, hairy roots were established. *In vitro* culture of hairy roots is, however, labor intensive and expensive, and there is a risk of contamination and genetic changes. Because of this we are currently developing a protocol for cryopreservation of root tips. *M. lanceolata* hairy roots were induced using *Agrobacterium rhizogenes* (strain LBA) transformation on leaf discs. GFP was used as a visible marker for the screening of transgenic material. Hairy roots were placed on SH medium supplemented with 0.8% agar and were subcultured every 4 weeks. In order to evaluate the toxicity of the vitrification solution (PVS2) prior to freezing, root tips (2-3 mm) excised from 2-week old root cultures were isolated. We assessed hairy root growth after different times of PVS2 treatment. 150 roots were incubated with PVS2 solution during 0, 5, 10, 15 and 20 minutes, and subsequently washed. Another 150 roots were treated with a loading solution during 10 min and then incubated with PVS2 during 0, 5, 10, 15 and 20 minutes, and also washed. Regrowth was tested by incubating roots on solid medium. Treatment with loading solution prior PVS2 incubation had a positive effect on viability of hairy roots. An encapsulation-dehydration protocol was set up to avoid the cytotoxic effects of the vitrification solution. Encapsulated hairy roots were dehydrated for different periods and subsequently frozen in liquid nitrogen. After thawing, beads were placed on solid medium and the number of re-growing roots was counted. Regenerating roots were observed at all time points of freezing. Regenerated root cultures are currently analyzed to determine the saponin content. Next to the conservation of hairy root cultures, we are also aiming to modulate the production of saponins. A mixture of saponins is produced by *M. lanceolata* that both in composition and production capacity depends on the growth conditions. Currently we are using anti-sense strategies to modulate the growth properties of *M. lanceolata* hairy root cultures and assess the effect on saponin production.

Propagación *in vitro* de *Renealmia alpinia* (Rottb.), planta con actividad antiofidica

Juan C. Alarcón P*, Diego M. Martínez R., Juan C. Quintana C., Silvia Jiménez R., Abel Díaz C., Ivone Jiménez.

*Autor para correspondencia.

Programa de Ofidismo y Escorpionismo, Sede Investigación Universitaria (SIU), Carrera 53 No. 61-30, Laboratorio 301 Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
e-mail: jalarcon@farmacia.udea.edu.co

La *Renealmia alpinia* (matandrea o achira de monte) es una planta que por sus efectos antiedematizantes, antihemorrágicos y neutralizantes del veneno de la serpiente *Bothrops asper* (mapaná equis), se constituye en una alternativa potencial de atención primaria en accidentes ofídicos, o en una fuente de moléculas con importancia farmacéutica. A pesar de esto, no existen estudios previos encaminados a la propagación vegetativa, la desdiferenciación tisular o la producción *in vitro* de sus metabolitos. En este trabajo se evalúan en condiciones *in vitro* algunas variables como la altura, el número de brotes y raíces en la propagación de *R. alpinia*, así como la tasa de velocidad de multiplicación y la inducción de tejido indiferenciado en explantes foliares. La adición de 6-Bencilaminopurina (3 mg.l⁻¹) promueve la propagación de esta especie vegetal, con una tasa de velocidad de multiplicación (TVM) de 1.39 brotes/semana, mientras que la inducción de tejido indiferenciado se ve favorecida por la exposición de los explantes foliares a la combinación de 2,4-D (2 mg.l⁻¹) y BA (1 mg.l⁻¹). Adicionalmente, se detecta en el tejido foliar (de plantas crecidas *in vitro* y *ex vitro*) la presencia de cumarinas, metabolitos encontrados en algunas plantas con conocida actividad antiofídica, abriendo así la posibilidad de estudios encaminados a la producción y evaluación *in vitro*, de estos y otros metabolitos con potencial interés farmacéutico.

***In vitro* propagation of *Renealmia alpinia* (Rottb), plant against snakebite**

Renealmia alpinia (matandrea or achira de monte) it is an important plant for their neutralizing ability of both effects oedema-forming, hemorrhagic and clotting of the venom of the snake *Bothrops asper* (mapaná equis). It is a potential alternative of primary attention in ofidic accidents, or like a source of molecules with pharmaceutical importance. Despite this, there is not previous studies on this specie guided to micropropagation, tissular dedifferentiation or *in vitro* metabolites production. In this work was evaluated some variables as the height, the number of shoots and roots in the propagation of *R. alpinia* under *in vitro* conditions, as well as the rate of speed multiplication and the induction of having undifferentiated tissue in foliar explants. Addition of 6-Bencylaminopurine (3 mg.l⁻¹) promotes the propagation *in vitro*, with a rate of speed multiplication (TVM) of 1.39 shoots/week, while the induction of having undifferentiated tissue in foliar explants was favored by both 2,4-D (2 mg.l⁻¹) and BA (1 mg.l⁻¹) in combination. Additionally, was detected in foliar tissues (of grown plants *in vitro* and *ex vitro*) coumarins, its metabolites has been found in some

plants with well-known antiofídic activity, this results open possibilities of studies in order to the production and *in vitro* activity evaluation of metabolites with potential antiofídic activity or pharmaceutical interest.

Producción de antraquinonas de cultivo de callos de *Morinda royoc* L.

Janetsy Borroto^{1*}, Maribel Rivas¹, Ernesto M. González³, Janet Quiñones¹, Yemeis Quirós, Oscar Concepción², Martha Hernández¹, Reinaldo Trujillo¹. *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantitas, Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: jborroto@bioplantitas.cu

²Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Bioplantitas, Ciego de Ávila, Cuba.

³Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Las plantas medicinales son una fuente importante para la producción de medicamentos para gran parte de la población mundial. Los compuestos bioactivos, extraídos de plantas, se utilizan como aditivos para alimentos, producción de insecticidas, cosméticos, perfumes y con fines químicos. Estos compuestos pertenecen a un grupo conocido como metabolitos secundarios. Las antraquinonas son un importante grupo de productos naturales que se han aislado a partir de bacterias, hongos, líquenes y plantas superiores. Además, presentan diversas actividades biológicas: antimicrobiana, antifúngica, antimalarial, antitumoral y antimutagénica. Las plantas que pertenecen a la familia *Rubiaceae* contienen grandes cantidades de antraquinonas principalmente en sus raíces. *Morinda royoc* L. (*Rubiaceae*) conocida en Cuba como Garañón se emplea en la elaboración de un producto que tiene acción estimulante, revitalizadora, antiestrés e incrementa la libido y se emplea como suplemento dietético. Sin embargo, el cultivo en campo de esta planta es limitado debido principalmente a que la germinación de la semilla es esporádica y el crecimiento de la planta es lento. Es por ello que es esencial el desarrollo de alternativas metodológicas para producir las antraquinonas *in vitro*. En este trabajo se estableció el cultivo de callos de *Morinda royoc* L. (*Rubiaceae*) para la producción de antraquinonas. Los explantes se cultivaron en diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento (ANA y 2,4-D). La mejor concentración para el crecimiento de los callos y la producción de antraquinonas totales fue 2.32 µM de 2,4-D. Las antraquinonas se aislaron con diclorometano y se determinaron por HPLC. Se identificó el nordamnacantal como antraquinona mayoritaria producida por el cultivo de callos de *Morinda royoc* L.

Production anthraquinones by callus cultures of *Morinda royoc* L.

Medicinal plants are the most exclusive source of life saving drugs for the majority of the world population. Bioactive compounds, currently extracted from plants, are used as food additives, pigments, dyes, insecticides, cosmetics, perfumes and fine chemicals. These compounds belong to a group collectively known as secondary metabolites. Anthraquinones (AQs) are an important group of natural products occurring in bacteria, fungi, lichens and higher plants. AQs have been reported to exhibit some interesting *in vitro* biological activities: antimicrobial, antifungal, antimalarial, antitumour and antimutagenic. Plants belonging to the family *Rubiaceae* are known to contain substantial amounts of anthraquinones, especially in the roots. *Morinda royoc* L. (*Rubiaceae*), is used to make a product with stimulating, revitalizing and antistress activity that also increases the libidum. This product is used in Cuba as a diet supplement. However, field growth of such a plant is very limited because of seed germination is sporadic and the growth of the plants is slow. Therefore, the development of alternative methods to produce anthraquinones *in vitro* is essential. *Morinda royoc* L. (*Rubiaceae*) callus cultures were for the production of anthraquinones. The explants were cultured with different ranges of plant growth regulators (ANA and 2,4-D). The best range of plant growth regulators for generation of callus and total anthraquinones production (mmol) was 2,4 D (2.32 μ M). The anthraquinones were isolated from the dichloromethane and the content of anthraquinones were determined by HPLC. Nordamnacanthal was identified as a major component of anthraquinone pigments produced by callus cultures of *Morinda royoc* L.

Establecimiento de una suspensión celular de *Morinda citrifolia* L. para la obtención de antraquinona

Maribel, Rivas, Janetsy Borroto, Oscar Concepción, María A. Blanco, Martha Hernández, Troy Augustine, Yemeys Quiros Molina, Reinaldo Trujillo.

Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplasmas. UNICA. Carretera a Morón km. 9. CP 69 450. Ciego de Ávila. Cuba. e-mail: mrivas@bioplasmas.cu

El uso de las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas constituye una alternativa novedosa para la producción de biomoléculas con probada actividad biológica en la industria y la medicina. Se evaluó el efecto de la kinetina en el crecimiento celular y en la producción de antraquinonas durante la formación de callos (0, 1.5, 3, 4.5 y 6 mg.l⁻¹) y suspensiones

celulares (0, 0.4, 0.8, 1.2, y 1.6 mg.l⁻¹) a partir de explantes de hojas de vitroplantas de *M. citrifolia* L. El uso de diferentes concentraciones de kinetina no favoreció el incremento de la masa fresca de los callos y se obtuvieron valores similares de los contenidos de antraquinonas/g de masa fresca. En las suspensiones celulares la masa fresca se favoreció con el incremento de la concentración de kinetina. Los mayores valores de masa fresca se obtuvieron con 1.2 y 1.6 mg.l⁻¹ de kinetina, respectivamente. Además la citoquinina influyó de manera positiva en el incremento del contenido de antraquinonas intracelulares/g de masa fresca, sin diferencia significativa con el resto de las concentraciones empleadas. El mayor valor se obtuvo al utilizar 0.4 mg.l⁻¹ de kinetina sin diferencias significativa con el resto de los tratamientos. El cultivo de células en medio líquido a partir de callos de hojas evidenció diferencias en cuanto a las características citológicas y morfogenéticas de estas. El mismo estuvo compuesto por tres tipos de células (meristemáticas, parénquimáticas y gigantes). Las mediciones del crecimiento celular mostraron un rápido incremento en el número de células después del segundo día de realizado el primer subcultivo. El incremento en estos valores es producido fundamentalmente por el aumento del número de células meristemática. La comparación con patrones comerciales y con metabolitos similares, obtenidos a partir de otras especies, permitió identificar tres antraquinonas (Rubiadina, Morindona y Damnacantal) informadas por primera vez para esta especie.

Establishment of a cell suspension from *Morinda citrifolia* L. in to obtain anthraquinones

The technical use of plants cultivated *in vitro* constitutes of novice alternative in the production of bio molecules with tested biological activity in the industry and field of medicine. The effects of Kinetin in cell growth and in the production of anthraquinones was evaluated during the formation of callus (0, 1.5, 3, 4.5 y 6 mg.l⁻¹) and suspensions of cells (0, 0.4, 0.8, 1.2, and 1.6 mg.l⁻¹) from the explants from leaves of the plants *M. citrifolia* L. *in vitro*. The use of different concentrations of kinetin did not favor the growth of the fresh mass of callus and similar values were obtained from the contents of the anthraquinones /g of the fresh mass. In the cell suspension the fresh mass favored with the increase of the concentrations of kinetin, the highest values were obtained in these masses was 1.2 and 1.6 mg.l⁻¹ of kinetin respectively. Also the cytoquinins influenced in a positive way the increase of the content of intracellular anthraquinones /g of fresh mass, with no significant difference with the rest of the concentrations used. The highest value obtained was from utilizing 0.4 mg.l⁻¹ of the kinetin

without significant difference with the rest of the concentrations used. The cultivation of cells in liquid medium from callus of leaves is evidence of the difference in that of its characteristics cytological and morphogenetic of each of them. The same was composed of three types of cells (meristematic, parenquimas and giants). The measurements of the cell growth showed a fast increase in the number of cells after the second day of realizing the first subculture. The increase in those values is produced fundamentally by the increase of the number of meristematic cells. The comparison with commercial patterns and with similar metabolites, obtained from other species, permitted the identification of three antraquinonas (Rubiadina, Morindona, and Damnacantal) informed for the first time for these specie.

Proteomics analysis in response to *in vitro* culture of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) by two-dimensional gel electrophoresis

Pérez, A.¹, Carvajal, C.¹, Mora, M.¹, Castillejo, M.A.^{2,3}, Natalucci, C.⁴, Jorrín, J.², Hernández, M.¹.

¹Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila, CP 69 450, Cuba.

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa (C6), 14 071 Córdoba, España.

³Unidad de Proteómica, SCAI, Ed. Ramón y Cajal, Torre Este 1ª planta, Campus de Rabanales, Córdoba, España.

⁴LIPROVE, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata. La Plata. Argentina.

Plant genome encodes hundreds of proteases, but only a few plant proteinases have been totally purified and characterized. *Bromeliaceae* family plants usually contain high concentration of thiol proteases. Pineapple plants (*Ananas comosus*) contain several cysteine proteinases. In the literature, these enzymes are called bromelains. Stem bromelain, in particular, exhibits therapeutic effects: anti-inflammatory, digestive, anti-metastasis and anti-tumoral activities. In recent years, it is including in the drug group modifiers of the biological answer. Plant tissue culture techniques have provided many solutions to basics questions and practical problems in plant biology. Therefore, considerable attention has been focused on the possibility of applying efficient plant tissue culture methods to physiologically active enzymes isolation. In the present study, we found proteolytic activity in pineapple shoots cultured *in vitro*. The highest specific protease activity was recorded in shoots cultured in temporary immersion

bioreactors (TIB). Multiplication phase *in vitro* did not cause a remarkable protease production in shoots. Proteome of shoots cultured in different *in vitro* phase were compared by 2D- electrophoresis. Molecular mass of some protein spots were between 21 500-31 000 Da. This parameter was similar to those indicated for cysteine proteases from *Bromeliaceae*. RP-HPLC chromatogram and molecular mass of the major protein detected in TIB culture media showed similarity to stem bromelain.

Análisis proteómicos por electroforesis bidimensional de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultivadas *in vitro*

En el genoma de plantas existen cientos de proteasas, pero pocas de ellas han sido totalmente purificadas y caracterizadas. Las plantas de la familia *Bromeliaceae* tienen altos contenidos de cisteino proteasas. Las plantas de piña contienen varias cisteino proteasas. En la literatura estas enzimas se conocen como 'bromelinas'. La bromelina de tallo, en particular, exhibe efectos terapéuticos: antiinflamatorio, digestivo, antimetastásico y antitumoral. Hoy día está incluida entre el grupo de drogas modificadoras de las respuestas biológicas. Las técnicas de cultivo de tejidos de plantas han provisto varias soluciones a problemas básicos y prácticos en la biología de la plantas. Además, considerable atención se ha prestado a la posibilidad de aplicar eficientemente los métodos de cultivo de tejidos de plantas para el aislamiento de enzimas fisiológicamente activas. En el presente estudio se detectó actividad proteolítica en brotes de piña cultivados *in vitro*. Los mayores valores de actividad proteolítica se registraron para las extracciones de brotes cultivados en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT). En los brotes provenientes de la fase de multiplicación *in vitro* no se detectó producción de proteasas. El proteoma de los brotes cultivados *in vitro* en diferentes fases se comparó por electroforesis bidimensional. La masa molar de varias proteínas se encontró entre 21 500 y 31 000 Da. Este parámetro es similar al informado para las cisteino proteasas de la familia *Bromeliaceae*. El cromatograma RP-HPLC y la masa molar de la proteína mayoritaria encontrada en el medio de cultivo de los BIT mostró similitud con la bromelina de tallo.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de higromicina B, kanamicina y geneticina en brotes y callos embriogénicos de *Digitalis purpurea* L.

Alina Capote^{1*}, Borys Chong¹, Zenaida Occequera², Naivy Pérez, Anabel Pérez¹, Elio Jiménez¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: alina@ibp.co.cu

²Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Villa Clara, Cuba.

Digitalis purpurea L. es una planta que contiene glucósidos de interés farmacológico. La ingeniería metabólica junto con los avances biotecnológicos ha permitido obtener plantas transgénicas que tienen modificada la producción de metabolitos secundarios. Un paso necesario para el desarrollo de sistemas de transformación genética es contar con un sistema de selección de células o tejidos transformados para lo cual se debe determinar el agente selectivo a emplear y su concentración mínima inhibitoria para cada una de las fases del proceso de regeneración. Este trabajo tuvo como objetivo determinar la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos Kanamicina e Higromicina B en la fase multiplicación de brotes y de Higromicina B y Geneticina G418 en la formación de callos embriogénicos, para ser empleados en estudios posteriores de transformación genética. La concentración mínima inhibitoria del agente selectivo Higromicina B en brotes en fase de multiplicación fue de 75 mg.l⁻¹, con la cual se logró un 100% de mortalidad de los brotes, mientras que la Kanamicina, en concentraciones de 100, 150, 200, 250 y 300 mg.l⁻¹ no fue efectiva para la selección durante la fase de multiplicación de brotes. La Higromicina B en todas las concentraciones empleadas (10, 15, 20, 25 y 30 mg.l⁻¹) inhibió la formación de callos embriogénicos. La concentración mínima inhibitoria de Geneticina G418 en la etapa de formación de callos con estructuras embriogénicas a partir de explantes foliares fue de 50 mg.l⁻¹, con la cual se logró el 100% de mortalidad de los explantes.

Minimum inhibitory concentration of Hygromycin B, Kanamicin and Geneticin in shoots and embryogenic callus cultures of *Digitalis purpurea* L.

Digitalis purpurea L is a plant which contains cardiotonic glucosides of high demand by the pharmaceutical industry. Recent developments in metabolic engineering allowed the obtainment of transgenic plants with high content of secondary metabolites by altering specific metabolic pathways. A necessary step for the development of a genetic transformation protocol is a system to select transformed cells and tissues, which requires the determination of the minimum inhibitory concentration of selection agents for each stage of the regeneration protocol. This work describes the study of the minimum inhibitory

concentration of the antibiotics Hygromycin B and Kanamicin in shoot multiplication stage and Hygromycin B and Geneticin G 418 on embryogenic callus formation, which could be used in further genetic transformation studies in *D. purpurea*. Minimum inhibitory concentration of Hygromycin B in shoot multiplication stage was 75 mg.l⁻¹, where 100% shoot mortality was achieved. Kanamicin on any of the tested concentrations (100, 150, 200, 250 y 300 mg.l⁻¹) was effective for the selection of the shoots. Hygromycin at 10, 15, 20, 25 and 30 mg.l⁻¹ inhibited the formation of embryogenic callus from leaf explants. Minimum inhibitory concentration of Geneticin G 418 for embryogenic callus formation stage was 50 mg.l⁻¹, with 100 % mortality of leaf explants.

Regeneración vía embriogénesis somática en *Digitalis purpurea* L. a partir de explantes foliares

Zenaida Occequera^{2*}, Alina Capote¹, Naivy Pérez-Alonso¹, Borys Chong¹, Anabel Pérez¹, Elio Jiménez¹.
*Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuní Km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba CP 54 830. Cuba.

²Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Villa Clara, Cuba.

Digitalis purpurea L. es una de las plantas medicinales más famosas en la historia de la humanidad, conocida por sus propiedades para tratar enfermedades del corazón. Contiene metabolitos secundarios de interés farmacológico, entre los que se destacan la digitoxina y la digoxina de marcada actividad cardiotónica y de amplio uso en la medicina actual. La producción de metabolitos secundarios empleando técnicas de cultivo *in vitro* requiere de métodos eficientes para la producción de biomasa con elevados contenidos de los compuestos de interés. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo de regeneración de plantas mediante embriogénesis somática a partir de explantes foliares de *D. purpurea*. La formación de callos con estructuras embriogénicas se logró únicamente en un medio de cultivo MS con 4.5 µM de 2,4-D como único regulador del crecimiento. La regeneración de plantas completas se obtuvo al subcultivar los callos con estructuras embriogénicas a un medio MS con 4.4 µM de 6-BAP y 0.5 µM de AIA en presencia de luz. El origen embriogénico de las plantas regeneradas fue confirmado por histología. Este constituye el primer informe de regeneración de plantas por embriogénesis somática en el género *Digitalis* y en la especie *D. purpurea*.

Plant regeneration of *Digitalis purpurea* L. via somatic embryogenesis from leaf explants

Digitalis purpurea L. is one of the most outstanding medicinal plants, well known for its properties for treating cardiac disorders. *D. purpurea* contains secondary metabolites of pharmaceutical use; with digitoxin and digoxin of remarkable cardiotoxic activity been the most interesting among them. Production of plant secondary metabolites by tissue culture requires the development of efficient methods for biomass production with a high content of active compounds. The aim of this work was the establishment of a regeneration procedure via somatic embryogenesis from leaf explants in *D. purpurea*. Formation of calli with embryogenic structures was achieved in MS culture medium supplemented with 4.5 μM of 2,4-D. Plant regeneration was obtained when calli with embryogenic structures were subculture into MS culture medium supplemented with 4.4 μM 6-BAP and 0.5 μM IAA incubated in light. Embryogenic origin of regenerated plants was confirmed by histology. This is the first report on somatic embryogenesis in *Digitalis* and its species *D. purpurea*.

Kinetic and molecular characterization of a new cysteine protease isolated from *Hohenbergia penduliflora* Mez. Stems

Mayelin Mora^{1*}, Aurora Pérez¹, Carol Carvajal¹, Sebastián Trejo², M. José Torres³, M. Inés Martín³, Claudia Natulicci³, Martha Hernández¹. *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplantillas, Universidad de Ciego de Avila, Ciego de Avila, Cuba. CP 69 450. e-mail: mayelin@bioplantillas.cu

²Instituto de Biotecnología de Biomedicina (IBB). Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. España.

³LIPROVE, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata. La Plata. Argentina.

Cysteine proteases are widely distributed enzymes in animals, microorganisms and plants. These enzymes are involved in several physiological and developmental processes in plants. *Bromeliaceae* is a plant family whose members usually produce large amounts of cysteine proteases. Crude extracts of *Bromeliaceae* plants with high content of proteolytic enzymes have been used for a long time in traditional medicine. More recently, they are frequently used in food, biotechnology and pharmaceutical industries. However, the number of plant proteases isolated and characterized is still very low. To date, proteases have been studied in less than 1% of the already known plant species. In the present study, cysteine

proteases were isolated from *Hohenbergia penduliflora* Mez. stems. A new acid papain-like cysteine peptidase was purified by anion exchange chromatography using FPLC system. Kinetic and molecular characterization of the purified enzyme was made. In the titration assay, the residual enzyme activity gave a straight line that intersected the abscissa at 1.97 μM E-64, corresponding to 40% of active enzyme. Kinetic parameters (K_m , V_m , and k_{cat}) were determined for several synthetic substrates. Kinetic assays of purified enzyme were made on PFLNA ($K_m = 0.33 \text{ mM}$, $k_{cat} = 4.27 \text{ seg}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 13.22 \text{ seg}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), but no detectable activity could be found on Z-Arg-Arg-p-nitroanilide. Also, the enzyme exhibited activity on Z-Phe-Arg-pNA and Bz-Phe-Val-Arg-pNA. Molecular mass of the enzyme was 23.412 kDa (MALDI-TOF-TOF), its isoelectric point was approximately 4.5. The N-terminal sequence of isolated protease showed considerable similarity to other cysteine proteases obtained from stem of different *Bromeliaceae* species.

Caracterización cinética y molecular de una nueva cisteino proteasa aislada de tallos de *Hohenbergia penduliflora* Mez

Las cisteino proteasas son enzimas ampliamente distribuidas en animales, microorganismos y plantas. Estas enzimas están involucradas en varios procesos fisiológicos y del desarrollo de las plantas. *Bromeliaceae* es una familia de plantas cuyos miembros usualmente producen gran cantidad de cisteino proteasas. Los extractos crudos de plantas de la familia *Bromeliaceae* con altos niveles de actividad proteolítica se han utilizado por mucho tiempo en la medicina tradicional. Hoy día, estas enzimas son utilizadas en la industria alimenticia, biotecnológica y farmacéutica. Sin embargo, el número de proteasas vegetales que se han aislado y caracterizado es aún muy bajo. Hasta la fecha solo se han estudiado en este sentido menos del 1% de las especies vegetales conocidas. En el presente estudio, las cisteino proteasas fueron aisladas a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* Mez. Una nueva cisteino proteasa se purificó por cromatografía de intercambio aniónico usando un sistema FPLC. Se realizó la caracterización cinética y molecular de la enzima purificada. En el ensayo de titración, la actividad residual de la enzima se comportó como una línea recta que interceptó a la abscisa en 1.97 μM de E-64, lo que corresponde al 40% de enzima activa. Los parámetros cinéticos (K_m , V_m , and k_{cat}) fueron determinados con varios sustratos sintéticos. Los ensayos de cinética de la enzima purificada se determinaron con PFLNA ($K_m = 0.33 \text{ mM}$, $k_{cat} = 4.27 \text{ seg}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 13.22 \text{ seg}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) pero no fue detectada actividad sobre Z-Arg-

Arg-p-nitroanilida. También la enzima exhibió actividad frente a Z-Phe-Arg- p-nitroanilida and Bz-Phe-Val-Arg- p-nitroanilida. La masa molar de la enzima fue de 23. 412 KDa (MALDI-TOF-TOF) y su punto isoeléctrico aproximadamente 4.5. La secuencia N-terminal de la proteasa mostró elevada similitud con otras cisteino proteasas aisladas de tallos de diferentes plantas de la familia *Bromeliaceae*.

Análisis del proteoma de plantas de la familia *Bromeliaceae* por electroforesis 2D

Hernández Martha*, Pérez Aurora, Carvajal Carol.

*Autor para correspondencia.

Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila, Cuba. CP 69 450. e-mail: mhernandez@bioplantass.cu

La proteómica vegetal está comenzando, comparada con otros sistemas, como humanos y levaduras. El genoma de plantas contiene cientos de proteasas, pero solo unas pocas proteinasas de plantas han sido totalmente purificadas y caracterizadas. Las enzimas proteolíticas están involucradas en todo el ciclo de vida de las proteínas. Ellas son las más estudiadas, mejor caracterizadas y más frecuentemente utilizadas por el hombre. Las plantas de la familia *Bromeliaceae* contienen altas concentraciones de cisteino proteasas. La bromelina (de tallos de piña) ha sido utilizada en la alimentación y la industria farmacéutica. En años recientes existe un renovado interés por estas enzimas, después de informarse su elevada actividad antimetastizante y antitumoral. En el presente estudio se utilizó electroforesis bidimensional para

la separación y comparación de extractos crudos y purificados de plantas de la familia *Bromeliaceae*. Fueron comparados diferentes protocolos de extracción de proteínas. Un análisis proteómico en respuesta al cultivo *in vitro* de la piña (*Ananas comosus* L. Merr) por electroforesis 2D fue realizado. Los proteomas de otras plantas de la familia *Bromeliaceae* fueron comparados. Se detectaron similitudes y divergencias entre estas enzimas.

Proteomic analysis of *Bromeliaceae* family plants by 2D electrophoresis

Compared with other systems, mainly human and yeast, plant proteomics is at very early beginning. Plant genome encodes hundreds of proteases, but only a few plant proteinases have been totally purified and characterized. Proteolytic enzymes are involved in all the live cycle of proteins. They are the most widely studied, the best characterized and those most frequently used by the man. *Bromeliaceae* family plants usually contain high concentration of cysteine proteinases. Bromelain (from pineapple stem) has been used in food and pharmaceutical industry. In recent years there has been renewed interest for this enzyme after its high anti-metastatic and antitumoral activity was reported. In the present study 2D electrophoresis was utilized for the separation and comparison of proteases from crude and purified plant *Bromeliaceae* family extracts. Different protein extraction protocols were compared. Proteomics analysis in response to *in vitro* culture of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) by 2D electrophoresis was realized. Proteome of other *Bromeliaceae* family plant were compared. Similarity and divergences between those enzymes were detected.

INTERACCIÓN PLANTA PATÓGENO

Motif detection to study gene subfunctionalization

Aminael Sánchez¹, Karen Lemmens^{2*}, Pieter Monsieurs², Valerie Storms², Orelvis Portal¹, Elio Jiménez¹, Kathleen Marchal². *Author for correspondance.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830.

²CMPG, Department of Microbial and Molecular Systems K.U.Leuven, Kasteelpark Arenberg 20, B-3001 Leuven, Belgium. e-mail: karen.lemm@biw.kuleuven.be

Pathogenicity among fungi can not be explained solely by the presence of pathogen-specific genes. Therefore other mechanisms must be causing the difference between pathogenic and non-pathogenic fungi. One possibility is that homologous genes in pathogenic and non-pathogenic fungi are regulated differently. Studying the regulatory network and elements could reveal the mechanism underlying pathogenicity. The *Ascomycete* comprises a heterogeneous group of species, containing both pathogenic and non-pathogenic species. Within the *Ascomycete* class, the intergenic sequences of many orthologous gene families were found to be enriched for the same regulatory elements. In this study, however, we use phylogenetic footprinting in order to search for motifs differentially present in the pathogenic orthologs but absent in the non-pathogenic ones. Phylogenetic footprinting is based on the assumption that among phylogenetically related species, the regulating sequences in the upstream regions of orthologous genes are selectively conserved by evolution. Starting from the annotated genome of *Saccharomyces cerevisiae*, we identified for each gene in the yeast genome its orthologs and their corresponding upstream regions in five other fungal species of varying phylogenetic distance (human pathogen *Aspergillus nidulans* and plant pathogens: *Magnaporthe grisea*, *Mycosphaerella fijiensis* and *Ustilago maydis*; non-pathogenic: *Neurospora crassa*). Orthologous mapping was based on the reciprocal smallest distance approach. Intergenic sequences which appeared conserved among the pathogenic species but absent from the non-pathogenic ones were subjected to Gibbs sampling (BlockSampler) in order to further refine the alignments. Regulatory elements differentially present in pathogenic fungi point towards genes potentially related to the fungal pathogenicity.

Recent advances in the identification and characterization of *Phytophthora* species damaging fruit trees: state of the art in Cuba

M. Machado¹, A. Alvarez², L. Santiago², C. Collazo¹, M. Ramos Leal³, G. Boland⁴, A. Stechyshyn-Nagasawa⁴, M-A. Renaud⁵, A. Martínez¹, A. Díaz², M.C. Pérez⁶, M.O. López⁷, L. Mora², M. Peña¹, J. Taylor¹, O. Coto¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical, Ave. 7ma. 3005, entre 32 y 34, Apartado Postal 11 300, C. Habana, Cuba.

²Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN). 5^a y 30, # 502, Miramar, Playa, C. Habana, Cuba.

³Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 25 y J, Vedado, C. Habana, Cuba.

⁴Departamento de Biología Ambiental, Universidad de Guelph, Ontario, Canadá.

⁵División de Servicios a Laboratorios, Universidad de Guelph, Ontario, Canadá.

⁶Grupo de Proyectos del CITMA, Cuba.

⁷Instituto Nacional de Investigaciones en Sanidad Vegetal (INISAV), MINAG, Cuba

The oomycete genus *Phytophthora* comprises species of plant pathogens, many responsible for some of the most serious and economically important plant diseases. A number of *Phytophthora* spp. can attack the phloem and cambial tissue of trees, causing stem necroses and root rot. In many hosts, such as citrus, walnut, strawberry, raspberry, potato, avocado and tomato, multiple species of *Phytophthora* can infect the plant, the relative severity of disease can vary among pathogen species causing important economic losses. Difficulties in the accurate identification of the *Phytophthora* species responsible continue to hamper effective disease control. Identification and taxonomy of *Phytophthora* species have been based on morphological characters despite there has been some controversy on the authenticity of several species delineated on the basis of morphological characters, differences between some species are small and some characteristics are so variable that the taxonomy of the genus is considered to be difficult. Accurate identification is requisite for appropriate control measures, since species differ in their epidemiology and pathogenicity. Molecular tools have been used to evaluate intraspecific and interspecific variation in *Phytophthora* species. In Cuba, *Phytophthora* resistance is an important target of breeding programmes in several crops including fruit trees like citrus and avocado. A collection of *Phytophthora* spp. strains isolated from commercial and farming

avocado or fruits orchards is been constructed. Studies are been conducted for the identification and characterization of these isolates based on morphological, physiological and molecular markers (ITS and *Lpv 3* primers). Amplification using these primer pairs permitted differentiation of *Phytophthora* spp. from *Phytium* spp. a related oomycete, and sequences of the amplified DNA products obtained with *Lpv 3* primer pairs confirmed the necessity of using a combined approach for accurate identification of these fungal isolates.

Avances recientes en la identificación y caracterización de especies de *Phytophthora* que afectan árboles frutales: Estado del trabajo en Cuba

Phytophthora comprende diferentes especies de patógenos, muchas de ellas responsables de serias enfermedades vegetales de importancia económica. Un número importante de especies de este hongo atacan el floema y los tejidos internos de los árboles, causando necrosis en tallo y raíz. En muchos hospederos, incluyendo cítricos, nuez, fresa, frambuesa, papa, aguacate y tomate, son varias las especies de *Phytophthora* que pueden afectar las plantas y la severidad relativa de la enfermedad varía entre las especies del patógeno. Las dificultades en la identificación correcta de *Phytophthora* spp. obstaculizan el control efectivo. La identificación y taxonomía de *Phytophthora* spp. se basa en la observación de caracteres morfológicos a pesar de la existencia de controversias acerca de la autenticidad de varias especies clasificadas sobre la base de estos caracteres. Por otra parte, las diferencias entre algunas especies son tan pequeñas y algunas características son tan variables que la taxonomía del género se considera difícil. Una identificación correcta es requisito para la implementación de medidas adecuadas de control, considerando además que estas especies difieren en su epidemiología y patogenicidad. Las herramientas moleculares han sido empleadas para evaluar la variación intra e interespecífica en *Phytophthora* spp. En Cuba, la resistencia a este patógeno es un objetivo importante de los programas de mejoramiento en frutales como cítricos y aguacateros. Una colección de cepas de *Phytophthora* spp. aisladas de jardines de aguacatero y plantaciones de otros frutales está siendo construida. Se realizan estudios para identificar y caracterizar estos aislados utilizando marcadores morfológicos, fisiológicos y moleculares (cebadores específicos ITS y *Lpv 3*). La amplificación utilizando estos cebadores permitió diferenciar cepas de *Phytophthora* spp. de *Phytium* spp., un oomiceto relacionado, y la secuenciación de los productos de

ADN amplificados utilizando los cebadores *Lpv 3* confirmó la necesidad de utilizar un enfoque combinado para una correcta identificación de estos aislados.

Identificación de secuencias que se expresan diferencialmente en la interacción no compatible *Musa acuminata* - *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Milady Mendoza-Rodríguez^{1*}, Aminael Sánchez¹, Orelvis Portal¹, Mayra Acosta-Suárez¹, Berkis Roque¹, Elio Jiménez¹ y Monica Hofte². *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní, km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail: milady@ibp.co.cu

²Laboratory of Phytopathology. Department of Crop Protection. Faculty of Bioscience Engineering. University of Gent. Belgium.

La enfermedad Sigatoka negra producida por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (teleomorfo) (*Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, anamorfo), se considera la enfermedad foliar más destructiva y costosa a nivel mundial que afecta la producción de bananos y plátanos. El estudio de los genes involucrados en la respuesta de defensa en la planta ante el ataque de patógenos, constituye un paso importante para la elucidación de los mecanismos moleculares de resistencia a enfermedades. En este trabajo, se obtuvo una biblioteca sustractiva de ácido desoxirribonucleico complementaria (ADNc) que contiene secuencias expresadas diferencialmente en el genotipo resistente 'Calcutta 4' (*Musa acuminata*, AA) ante la infección con *M. fijiensis* (6 a 12 días posteriores a la inoculación). La biblioteca consta de un total de 600 clones recombinantes, con longitud de inserto entre 100 y 1 400 pares de bases (pb) y una longitud promedio de 537 pb. Como resultado del ensamblaje con la herramienta bioinformática CAP3, de 97 secuencias de la biblioteca sustractiva fueron obtenidas 63 secuencias blanco expresadas, que incluían 42 secuencias aisladas y 21 ensamblajes. La identificación de las mismas según su homología con secuencias anotadas en la base de datos para proteínas no redundante (GenBank), permitió agruparlas en: destino de proteínas (1.6%), estrés oxidativo (4.8%), metabolismo (6.3%), producción de energía (6.3%), función desconocida (38.1%) y sin homología (42.8%).

Identification of differentially expressed sequences in non-compatible interaction *Musa acuminata* - *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

The black leaf streak disease caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (teleomorph) (*Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton,

anamorph), is considered the most destructive and costly foliar disease of bananas and plantain. The study of plant genes involved in defense response to pathogens, is an important step for the elucidation of molecular mechanisms of disease resistance. In this work, we obtained a suppressed subtractive library (SSH) which contains differentially expressed sequences in the resistant genotype 'Calcutta 4' (*Musa acuminata*, AA) after infection with *M. fijiensis* (6 to 12 days post inoculation). The library consists of 600 recombinant clones, with insert size between 100 and 1 400 bp and an average size of 537 bp. Assembling of 97 sequences with CAP3 algorithm resulted in 63 ESTs, which include 42 singletons and 21 contigs. The identification of the sequences according to their homology with annotated sequences at protein non-redundant database GenBank, allowed us to group them in six functional categories: protein destiny (1.6%), oxidative stress (4.8%), metabolism (6.3%), energy production (6.3%), unknown function (38.1%) and without homology (42.8%).

Obtención y empleo de filtrados del cultivo de *Alternaria solani* Sor. para la selección *in vitro* de genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.) resistentes al tizón temprano

N. Veitía*, L.R. García, I. Bermúdez-Carabaloso, M. Acosta-Suárez, M. Leiva-Mora, P. Orellana, D. Torres, Y. Padrón, C. Romero. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Martha Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: novisel@ibp.co.cu

El presente trabajo tuvo los siguientes objetivos: obtener un filtrado fitotóxico del cultivo de *Alternaria solani* Sor. sobre plantas de papa de la variedad Desirée cultivadas *in vitro* para diferenciar genotipos susceptibles y resistentes al tizón temprano y evaluar en cantero y campo la respuesta de las plantas resistentes *in vitro* al filtrado del cultivo del hongo patógeno. Los resultados demostraron que el aislado influyó en la fitotoxicidad del filtrado del cultivo. Se seleccionó el aislado CCIBP-VAs₄ el cual provocó las mayores afectaciones sobre las plantas de papa var. Desirée cultivadas *in vitro*; se determinó utilizar un filtrado del cultivo obtenido en medio de cultivo Richard, incubado durante 30 días y emplear la dilución 1:3 (v/v) para una mejor diferenciación entre el genotipo susceptible y el resistente. Se demostró la utilidad del filtrado del cultivo como agente selectivo al ser aplicado sobre plantas *in vitro* con variabilidad inducida. Se encontró correspondencia entre la respuesta de las líneas al filtrado del cultivo

y al patógeno. De 1 000 líneas con variabilidad inducida el 4.5% fueron resistentes al filtrado del cultivo, el 0.6% mostraron resistencia en cantero al patógeno inoculado artificialmente y el 0.1% de las líneas mantuvo esta respuesta en campo frente al patógeno inoculado de forma artificial y naturalmente. Finalmente se elaboró un esquema de trabajo para el empleo de la selección con el filtrado del cultivo con la inducción de mutaciones en plantas *in vitro* de papa que puede ser utilizado en la obtención de genotipos mejorados de este cultivo.

Obtaining and employment of culture filtrates of *Alternaria solani* Sor. for *in vitro* selection of potato genotypes (*Solanum tuberosum* L.) resistant to the early blight

An investigation related with the factors that affect to obtaining the culture filtrate, and in the differentiation of susceptible and resistant genotypes as well as the application of these in plants with variability induced in Cuba has not been carried out in potato. For that reason, the experiments that were carried out had as objectives: to obtain a phytotoxic culture filtrate of *Alternaria solani* Sor. on potato plants of the variety Desirée *in vitro* cultured to differentiate susceptible and resistant genotypes to the early blight and to evaluate in seedbeds and field the response of the resistant plants *in vitro* to the culture filtrate of the pathogen. The results demonstrated that the isolated one influenced in the phytotoxicity of the culture filtrate. The isolated CCIBP-VAs₄ the one was selected which caused the biggest affectations on potatoes plants var. Desirée. It was determined to use a Richard medium to obtain a culture filtrate, incubated during 30 days as well as, to use the dilution 1:3 (v/v) for a better differentiation between the susceptible genotype and the resistant one. On the other hand, it was demonstrated the utility of the culture filtrate like selective agent when being applied on plants *in vitro* with induced variability. It was correspondence among the answer from the lines to the culture filtrate and the pathogen one. Of the 1 000 lines with induced variability 4.5% was resistant to the culture filtrate, 0.6% showed resistance in seedbeds to the pathogen one inoculated artificially and 0.1% of the lines maintained this response in field in front of the pathogen one inoculated in an artificial way and naturally. Finally a schedule was elaborated for the employment of the selection with the culture filtrate combined with the induction of mutations in plants *in vitro* cultured of potato var. Desirée that can be used in the selection of enhanced genotypes of this crop.

Expression of two NAC family transcription factors during incompatible interaction *Puccinia melanocephala* H & P. Syd –*Saccharum* spp.

María I. Oloriz^{1*}, Luis Rojas¹, Víctor Gil², Aminaél Sánchez¹, Orelvis Portal¹, Monica Hofte³, Elio Jiménez¹.
*Author for correspondence.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830.
e-mail maria@ibp.co.cu

²Centro de Investigaciones Agropecuarias. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830.

³Laboratory of Phytopathology. Department of Crop Protection. Faculty of Bioscience Engineering. University of Gent. Belgium.

Plant defense mechanisms are strictly regulated processes. Complex regulatory networks modulated by different families of transcription factors play a role in defense gene expression. Previously, a suppressed subtractive library (SSH) was constructed which contain differentially expressed sequences in a rust resistant mutant (IBP8518) during the first seven days after inoculation with *P. melanocephala* uredinospores. The expression of NAC and NAM transcription factors identified in the SSH, was studied by RT-PCR analysis in infected leaves from the rust resistant mutant (IBP8518) and the susceptible genotype B4362. The accumulation of both transcription factors in early time point of the incompatible interaction *P. melanocephala*-sugarcane was confirmed. This result is an evidence of the role of NAC transcription factor family in the complex regulatory network of sugarcane defense against this pathogen.

Expresión de dos factores de transcripción de la familia NAC durante la interacción incompatible *Puccinia melanocephala* – *Saccharum* spp.

Los mecanismos que protegen a las plantas contra patógenos son procesos estrictamente regulados. Un paso importante en esta regulación lo constituye la activación o represión transcripcional por diferentes factores de transcripción de numerosos genes relacionados con la defensa. Previamente fue construida una biblioteca sustractiva de caña de azúcar, en la que se tienen secuencias parciales de los genes diferencialmente expresados en un mutante resistente a la roya (IBP8518) durante los 7 días posteriores a la infección con *Puccinia melanocephala* H & P. Syd. Fue estudiada la expresión diferencial de dos factores de transcripción (NAC y NAM), mediante RT-PCR en hojas del mutante resistente a la roya y el genotipo susceptible B4362. Quedó demostrada la acumulación de ambos

transcritos en un estado temprano de la interacción en el mutante resistente. Este resultado es una evidencia del papel de estos miembros de la familia NAC en la compleja regulación de la defensa a *P. melanocephala* en caña de azúcar.

Influencia del mecanismo de defensa en caña de azúcar utilizando *Gluconoacetobacter diazotrophicus* contra la bacteria patógena *Xanthomonas albilineans*

Leidy Cortegaza¹, Fabiano Vinagre², Juana Perez¹, Ignacio Santana¹, Adriana S Hemerly², Ariel D Arencibia^{1,2}

¹Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Carretera CUJAE km 2½, Marianao, Ciudad Habana, Cuba. CP 19 390.

²Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ 21491-590, Rio de Janeiro, RJ/Brazil

Una nueva función de la bacteria simbiótica *Gluconoacetobacter diazotrophicus* se identificó y caracterizó durante la interacción patogénica caña de azúcar-*Xanthomonas albilineans*. Las células vivas de *G. diazotrophicus* tienen y/o producen moléculas elicitoras que activan la respuesta defensiva de la caña de azúcar lo que resulta en la resistencia de la planta a *X. albilineans*, en este caso se demostró que controla la transmisión del patógeno a los nuevos brotes agámicos que emergen. Un total de 47 fragmentos de transcritos expresados diferencialmente durante la interacción se identificaron mediante AFLP-ADNc. Los transcritos demostraron homologías significativas con genes de la ruta del etileno (26%), proteínas reguladas por auxinas (9%), proteínas relacionadas con la patogénesis β -1,3 Glucanasas (6%) y genes de Ubiquitina (4%), como los principales mecanismos de señalización. Los resultados indican hacia una forma de resistencia sistémica adquirida en la interacción caña de azúcar-*G. diazotrophicus* que origina la protección al ataque de *X. albilineans*, patógeno que no elicita rutas metabólicas similares.

Influence of defense mechanism in sugarcane using against pathogen bacteria

A new role of symbiotic bacterium *Gluconoacetobacter diazotrophicus* has been identified and characterized while it is involved in the sugarcane-*Xanthomonas albilineans* pathogenic interactions. Living *G. diazotrophicus* possess and/or produce elicitor molecules which activate the sugarcane defense response resulting in the plant resistance to *X. albilineans*, in this particular case controlling the pathogen transmission to emerging agamic shoots. A total of 47 differentially expressed transcript derived fragments (TDFs) were identified by cDNA-AFLP.

Transcripts showed significant homologies to genes of the ethylene signaling pathway (26%), proteins regulated by auxins (9%), β -1,3 Glucanase proteins (6%) and ubiquitin genes (4%), as major signaling mechanisms. Results point toward a form of systemic acquired resistance in sugarcane-*G.diazotrophicus* interactions which origin a protection against *X.albilineans* attack whereas non elicited similar pathways.

***Manihot flabellifolia* Pohl fuente silvestre de resistencia a la Mosca Blanca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Hemiptera: Aleyrodidae)**

Arturo Carabalí^{12*}, Anthony C. Bellotti¹, James Montoya-Lerma², Martin Fregene¹. *Autor para correspondencia.

¹Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), A.A. 6713, Cali, Colombia.

²Grupo de Investigaciones Entomológicas Universidad de Valle, Cali, Colombia. e-mail: artcamo@univalle.edu.co

Los parentales silvestres de *Manihot* son fuente de genes útiles contra insectos-plaga de *Manihot esculenta* Crantz. *Aleurotrachelus socialis* es una de las plagas más importantes en el cultivo de yuca en el Neotrópico. En Colombia, sus altas poblaciones reducen hasta en un 79% su rendimiento. Esto conlleva a los agricultores a intensificar el uso de insecticidas que, además de costoso e inducir el desarrollo de resistencia en el insecto, contamina el medioambiente. No obstante, el desarrollo de variedades genéticamente resistentes viene surgiendo como una alternativa en el manejo de sus poblaciones. Basados en investigaciones previas que demuestran la existencia de niveles moderados-altos de resistencia a *A. socialis* en especie silvestre de yuca, *M. flabellifolia* se planteó este estudio dirigido, inicialmente, a caracterizar esta nueva fuente de resistencia, evaluando la biología, demografía de *A. socialis* sobre ocho accesiones de *M. flabellifolia*, un testigo susceptible (CMC40) y otro resistente (MEcu72). Los promedios de longevidad y fecundidad de *A. socialis* sobre las accesiones fueron significativamente similares con MEcu72, pero diferentes comparados con CMC40. El tiempo de desarrollo no fue significativamente diferente, oscilando entre 35 y 40 días en las accesiones y MEcu72 y 33.5 días sobre CMC40. En contraste, la tasa de crecimiento de la población (r_m) fue significativamente inferior en las accesiones de *M. flabellifolia*, destacándose Fla61 con un crecimiento 98 y 99% menos que el obtenido sobre MEcu72 y CMC-40, respectivamente. Se establecieron cruces interespecíficos de *M. esculenta* sub sp. *M. flabellifolia* y a través de retrocruzamientos se generaron 150 progenies (BC2). A partir de ejes embrionarios se desarrollaron 15 copias de cada

progenie. Una vez identificados las poblaciones resistentes/susceptibles, el proyecto busca identificar genes para resistencia a *A. socialis* y el desarrollo de marcadores de bajo costo para su rápida introgresión dentro del genoma de yuca.

***Manihot flabellifolia* Pohl Wild Resistance Source Against the Whitefly *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Hemiptera: Aleyrodidae)**

The wild relatives of *Manihot* are source of useful genes against *Manihot esculenta* Crantz insect-pests. *Aleurotrachelus socialis* is the most important pest in cassava crops in Neotropical areas. In Colombia, its highest densities cause yield lost up to 79%. This carries the intensification of insecticides application by farmers that it is expensive, induce insect resistance and, environmentally noxious. For those reasons the genetic resistance varieties represent alternatives to the control of this pest. Based on previous studies, which revealed that the cassava wild species, *M. flabellifolia*, display from moderate to high levels of resistance to *A. socialis*, it was planned to characterize this new source of resistance evaluating the biology and demography of *A. socialis* on eight accessions of *M. flabellifolia* and two controls, one susceptible (CMC40) and one resistant (MEcu72). The mean of longevity and fecundity of *A. socialis* on *M. flabellifolia* accessions were significantly similar with the resistant control, MEcu72, but significantly different with the susceptible control, CMC40. Development time was not significant different, ranging between 35 to 40 days for the wild accessions and MEcu72 and 33.5 days on CMC40. In contrast, the growth rate of the population (r_m) was significantly lower in the *M. flabellifolia* accessions, standing out Fla61 with 98 and 99% of growth less than the growth on MEcu72 and CMC-40, respectively. Interspecific crosses of *M. esculenta* sub sp. *M. flabellifolia* and backcrossing programs were established, generating 150 progenies BC2. By embryos axes were developed 15 copies of each progeny. The on going task of the project is the identification of the susceptible-resistance populations for *A. socialis* and developing low-cost markers for their rapid introgression into de cassava genome.

Actividad antifúngica de metabolitos bacterianos frente a *Mycosphaerella fijiensis*

Mileidy Cruz-Martín*, Cynthia Sánchez-García, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Michel Leiva-Mora, Berkys Roque. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de las Villas. Carretera a Camajuaní, km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail mileidy@ibp.co.cu

La aparición de cepas de *Mycosphaerella fijiensis* resistentes a fungicidas químicos tradicionalmente usados, así como el incremento de las demandas por las medidas de bioseguridad, ha propiciado un mayor interés de encontrar alternativas biológicas para el control de este patógeno. El presente trabajo tuvo como objetivo: aislar e identificar bacterias con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*, mediante la extracción, purificación y caracterización de metabolitos secundarios así como evaluar su actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*. Los aislamientos se realizaron de la filosfera de hojas de bananos y plátanos mediante el método de diluciones seriadas. Los ensayos de actividad antifúngica se realizaron a través del método de cultivo dual. Las cepas seleccionadas fueron caracterizadas morfológica y bioquímicamente. Se determinó la concentración total de proteínas y se seleccionó el porcentaje de saturación con sulfato de amonio al que precipitó la mayor concentración de proteínas. Se comprobó la actividad antifúngica en todas las etapas de purificación de los metabolitos mediante el método de Dilución en Agar. Se le realizó además, un ensayo de hemaglutinación, así como se evaluó el efecto de la temperatura en la actividad antifúngica. La cepa seleccionada (CCIBP-B.1), exhibió un marcado efecto inhibitorio del crecimiento del aislado de *M. fijiensis* y se identificó como perteneciente al género *Bacillus*. Los compuestos exudados al medio de cultivo mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento del patógeno. La mayor concentración de proteínas se alcanzó con un 70% de saturación con sulfato de amonio. Se observó que el precipitado mantuvo su actividad antifúngica aun cuando se le aplicó calor y no se observó hemaglutinación de la muestra frente a ninguno de los dos tipos de eritrocitos humanos. Estos resultados sugieren la posible naturaleza proteica de los metabolitos secundarios con actividad antifúngica, de la cepa CCIBP-B.1, por lo que brindan una alternativa para la obtención y empleo de un bioproducto para el control de la Sigatoka negra.

Antifungal activity of bacterial metabolites against *Mycosphaerella fijiensis*

The appearance of resistant strains of *Mycosphaerella fijiensis* to traditionally chemical fungicides, as well as the increment of demands for biosecurity measures, it has propiated a higher interest of finding biological alternatives for the control of this pathogen. The present work had as objective: to isolate and to identify bacteria with antifungal activity against *M. fijiensis*, by extraction, purification and characterization of secondary metabolites as well as the *in vitro*

antifungal activity against *M. fijiensis*. The isolations were carried out from phyllosphere of banana and plantain leaves by using serial dilution method. The evaluation of antifungal activity was made according to the method of dual culture. The selected strains were characterized morphological and biochemically. The concentration of total proteins was determined and the saturation percentage with ammonium sulphate was selected to which precipitated the biggest concentration of proteins. The antifungal activity was proven in all the stages of metabolites purification by the method of Agar Dilution. Hemagglutination assay was also carried out, as well as the effect of temperature in the antifungal activity. The selected strain (CCIBP-B.1), exhibited a high inhibitory effect of the growth of *M. fijiensis* isolated and it was identified as belonging to the genus *Bacillus*. The secondary compounds showed an inhibitory effect in the growth of the pathogen. The higher concentration of proteins was reached with 70% saturation of ammonium sulphate. It was observed that the precipitate maintained their antifungal activity after boiling and hemagglutination of the sample was not observed against of none of the two types of human erythrocytes. These results suggest the possible proteic nature of the secondary metabolites with antifungal activity of the strain CCIBP-B.1. These results can offer an alternative for the obtaining and employment of a bioproduct for controlling Black Sigatoka.

Aislamiento y caracterización del gen que codifica para la enzima Isocitrato liasa de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Bárbara Ocaña^{1*}, Orelvis Portal¹, Mayra Acosta-Suárez¹, Aminael Sánchez¹, María I. Oloriz¹, Neyda Bacallao¹, Mónica Höfte², Elio Jiménez¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad de Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

²Laboratory of Phytopathology. Department of Crop Protection. Faculty of Bioscience Engineering. University of Gent. Belgium.

Las producciones anuales de plátanos y bananos se encuentran afectadas por la enfermedad conocida como Sigatoka negra, causada por el hongo hemibiotrófico *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo: *Pseudocercospora fijiensis*). El objetivo del estudio fue aislar el gen que codifica para la enzima Isocitrato liasa de *M. fijiensis* y realizar su caracterización mediante ensayos de expresión. Además se determinó el crecimiento y producción de conidios de *M. fijiensis* en medios de cultivo con distintas fuentes de carbono (sacarosa, glucosa, glicerol, etanol, acetato de

potasio). Se aisló un fragmento de 1 561 pb del gen de la *icl* del aislado CCIBP-Pf-83 con el empleo de oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de secuencias del gen de la *icl* de los hongos *Mycosphaerella graminicola*, *Penicillium marneffeii*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa*. Se demostró que *M. fijiensis* es capaz de crecer en medio de cultivo mínimo con 1% de glicerol y etanol, con tasas de producción de masa seca superiores, en el caso de glicerol, a las medias obtenidas en medios de cultivo mínimos con glucosa y sacarosa al 1% y etanol al 1%, con una producción de masa seca superior al medio de cultivo control (PDB). Además, se comprobó la capacidad del hongo de producir conidios durante el cultivo en Medio Mínimo con glicerol al 1% y Medio Mínimo con etanol al 1%. Se demostró mediante RT-PCR con oligonucleótidos específicos (ICL Mif D e ICL Mif R), la expresión del gen de la *icl* de *M. fijiensis* en el Medio Mínimo con glicerol al 1% y en el Medio Mínimo con etanol al 1% en muestras de micelio a los 7 y 21 días de cultivo. Los resultados permiten esclarecer la regulación del metabolismo de carbohidratos en *M. fijiensis* y contribuyen al desarrollo de nuevas estrategias de control de la enfermedad.

Isolation and characterization of the gene that encodes the enzyme Isocitrato lyase of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

The production of bananas and plantains is seriously affected by Black Sigatoka disease, caused by the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorph: *Pseudocercospora fijiensis*). The objective of this study was to isolate the gene that encodes the enzyme Isocitrato lyase from *M. fijiensis* and to characterize its expression. Mycelium growth and conidia production of *M. fijiensis* in culture media with different carbon sources (sucrose, glucose, glycerol, ethanol, and potassium acetate) were also determined. We isolated a fragment of 1 561 bp of the gene for the *icl* using degenerate oligonucleotides designed from *icl* sequences from phylogenetically related fungal species. It was demonstrated that *M. fijiensis* is able to grow in minimal medium containing 1% glycerol and ethanol, with dry mass production rates, in the case of glycerol, higher than media with 1 % glucose and 1% sucrose. In the medium with 1% ethanol 1% dry weight production was higher than in control PDB medium. In addition, we checked the ability of the fungus to produce conidia during culture in Minimal Medium with 1% glycerol and 1 % ethanol. It was shown by RT-PCR analysis, with specific oligonucleotides (ICL

Mif D and ICL Mif R), the expression of the *icl* gene of *M. fijiensis* at 7 and 21 days culture in medium with 1% glycerol and 1% ethanol. The findings shed light on the regulation of carbohydrate metabolism in *M. fijiensis* and may contribute to the development of new control strategies for the disease.

Actividad fitotóxica y proteínas microbianas en filtrados de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (raza 1 y raza 2)

Nayanci Portal González^{1*}, Bárbara Companioni², Christelle Achade¹, Beaufray Mvila¹, Mayda Arzola², Indira Persaud¹, Mayra Acosta-Suárez³, Cynthia Sánchez-García³, Michel Leiva-Mora³, Berkis Roque³, Yelenys Alvarado-Capó³, Ramón Santos Bermúdez². *Autor para correspondencia.

¹ Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 1/2. Ciego de Ávila. Cuba. e-mail: nayanci@agronomia.unica.cu, nayansi@bioplantas.cu

² Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 1/2. Ciego de Ávila.

³ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ . Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

La enfermedad de Panamá o Fusariosis causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* es una de las enfermedades de mayor importancia económica y dañina del género *Musa*. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar la actividad fitotóxica y las proteínas totales de filtrados de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 y raza 2 que permita el empleo de moléculas señales producidas por el patógeno para la selección precoz de cultivares resistentes en el marco de programas de mejoramiento genético del cultivo, así como para el diseño de nuevas estrategias de mejoramiento basadas en la ingeniería genética y la biotecnología. Se evidenció que *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (GCV 01210) y raza 2 (GCV 0124) producen los mayores niveles de actividad fitotóxica extracelular en la fase logarítmica de su crecimiento. La máxima actividad fitotóxica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* se obtuvo a los 15 y 16 días para la raza 1 y para la raza 2 respectivamente. A partir de los 11 días *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 es capaz de excretar al medio de cultivo moléculas de naturaleza proteica con varios patrones de excreción aunque los mayores niveles se alcanzaron a los 13 días con valores de 1.698 mg.ml⁻¹; La excreción de proteínas al medio de cultivo por el aislado de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2 comenzó a partir del día cinco manteniendo valores por encima de 0.448 mg.ml⁻¹ y alcanzando la mayor concentración el día 21 con valor de 0.826 mg.ml⁻¹. En cuanto a la respuesta

diferencial de diferentes cultivares frente al filtrado de cultivo concentrado *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 (día 15) y raza 2 (día 16) se evidenció una resistencia parcial o tolerancia de los cultivares 'FHIA 01', 'FHIA 02', 'FHIA 03', 'FHIA 04', 'FHIA 18' y 'FHIA 21' a ambas razas del patógeno mientras que los cultivares más susceptibles a la raza 1 fueron 'Gros Michel', 'Yangambi km 5', 'Pisang Lilin' y 'Manzano criollo' y para la raza 2 fueron 'Burro criollo', 'Burro CEMSA' y 'Pisang jari guaya', el cultivar 'Paka' mostró susceptibilidad frente a las dos cepas del microorganismo.

Phytotoxic activity and microbial proteins in culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (race 1 and race 2)

Panama disease or Fusariosis, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, is one of the most important diseases for musaceas plants. The present research was developed with the main objective of determine the phytotoxic activity as well as total proteins in culture filtrate obtained from isolated of both race, Race 1 and Race 2, of the pathogenic microorganism, in view to design in the future strategies for plant breeding and markers for molecular diagnosis of races. It was evident that *F. oxysporum* f. sp. *ubense* race 1 (GCV 01210) and race 2 (GCV 0124) are able to produce the highest levels of extra cellular phytotoxic activity in the log phase of growing with slower difference in the moment for that (15 and 16 days respectively). However, the ability in produce extra cellular proteins for both race showed a notorious difference. The microorganism like to Race 1 was able to produce and excrete to the liquid medium proteinaceous molecules since 11 days of growing. Although with different patterns of synthesis during the growing phase, the higher levels were achieves at 13 days (1.698 mg.ml⁻¹). For the microorganism linked with Race 2, the excretion of proteinaceous compounds started before, since 5 days it was recorded a value superior to 0.448 mg.ml⁻¹, reaching the higher concentration at 21 days (0.826 mg.ml⁻¹). Related to the differential response from different cultivars toward the concentrated culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 1 (day 15) and race 2 (day 16) it was evident a partial resistance or tolerance in the cultivars 'FHIA 01', 'FHIA 02', 'FHIA 03', 'FHIA 04', 'FHIA 18' and 'FHIA 21' to both races. While the cultivars more susceptible toward race 1 were 'Gros Michel', 'Yangambi km 5', 'Pisang Lilin' and 'Manzano criollo', for the race 2 were 'Burro criollo', 'Burro CEMSA' and 'Pisang jari guaya', 'Paka' cultivar showed susceptibility toward both strain of the microorganism.

Papaya Ringspot Virus (PRSV-P): Aspectos Biológicos y Epidemiológicos

Dariel Cabrera^{1*}; Orelvis Portal²; Maylin Cruz³; Ricardo Hernández⁴.
*Autor para correspondencia.

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: dcabreram@uclv.edu.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

³Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera Maleza km 2 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

⁴Centro de Estudio para la Transformación Agraria Sostenible (CETAS). Universidad de Cienfuegos, Carretera a Rodas, km 3, Cuba.

El *potyvirus* de la mancha anular de la papaya se ha registrado en muchos países tropicales y subtropicales como el mayor obstáculo en la producción de papaya y responsable de pérdidas en las cosechas. En los últimos años se han identificado infecciones del virus con gran severidad en áreas cultivadas de diferentes provincias y a pesar de los avances en el conocimiento y manejo de la enfermedad, no ha sido posible controlar su efecto negativo en las plantaciones cubanas. El objetivo de este trabajo fue comparar la expresión de los síntomas entre un aislado verdadero previamente caracterizado, procedente de Villa Clara y un nuevo aislamiento colectado de plantaciones ubicadas en la provincia Cienfuegos. Se inocularon plantas jóvenes de papaya cultivar Maradol roja, empleándose Carborundum (600 mesh) como abrasivo y posteriormente se evaluó el desarrollo de la infección. El nuevo aislamiento mostró dificultades para su transmisión mecánica, con retardo en la aparición de los síntomas y un mosaico leve.

Papaya Ringspot virus (PRSV-P): Biological and Epidemiological Aspects

Papaya ringspot potyvirus has been reported in many tropical and subtropical countries as the biggest obstacle in the papaya production and responsible of considerable losses in the harvest. In the last years virus infections have been identified with great severity in cultivated areas of different provinces and spite of the advances in the knowledge and management of the disease, it has not been possible to control their effects in cuban plantations. The objective of this work was to compare the symptoms expression between a true isolated previously characterized from Villa Clara and an isolate collected in plantations located in Cienfuegos province. The inoculation was carried out on young plants of papaya Maradol roja, by using Carborundum (600 mesh) like abrasive and after infection development was evaluated. The new isolate showed difficulties for its mechanical transmission, with retard in symptoms appearance and a light mosaic.