



XI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal

9 al 11 de abril de 2014

**Instituto de Biotecnología
de las Plantas (IBP)**

...del laboratorio al campo



syngenta.





IX SIMPOSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

9 - 11 de abril de 2014

XI International Symposium on Plant Biotechnology

9 - 11 de abril de 2014

RESÚMENES / ABSTRACTS

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



XI SIMPOSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
9 - 11 de abril de 2014

COMITÉ ORGANIZADOR/ *Organizing Committee*

Presidente de Honor

Dr.C. Andrés Castro Alegría
Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Rector

Presidente

Dr.C. Osvaldo Fernández Martínez
Instituto de Biotecnología de las Plantas
Director

Vicepresidente

Dr.C. Marisol Freire Seijo
Instituto de Biotecnología de las Plantas
Subdirectora de Investigaciones

Secretaria Ejecutiva

Dr.C. Yelenys Alvarado Capó
Instituto de Biotecnología de las Plantas
Jefa del Grupo de Información y Comunicación

COMITÉ CIENTÍFICO

Dr.C. Osvaldo Fernández Martínez
Dr. C. Marisol Freire Seijo
Dr. C. Yelenys Alvarado Capó
Dr.C. Rafael Gómez Kosky
Dr. C. Manuel Alejandro de Feria Silva
Dr. C. Raúl Barbón Rodríguez
Dr.C. Elisa Quiala Mendoza

Dr.C. Naivy Pérez Alonso
Dr.C. Novisel Veitía Rodríguez
Dr.C. Lourdes García Rodríguez
Dr.C. Leyanis García Aguila
Dr.C. Michel Leiva Mora
Dr.C. Borys Chong Pérez

Auspiciadores



Patrocinadores



Edición: Yelenys Alvarado-Capó

Diagramación: Marta Rodríguez Rodríguez

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 / <i>Programme</i>	
Empleo de métodos biotecnológicos para la propagación de plantas/ <i>Use of biotechnological methods for plants propagation</i>	1
Estrés biótico, abiótico y nutrición en plantas/ <i>Biotic, abiotic stress and plant nutrition</i>	30
Compuestos activos en plantas/ <i>Active compounds in plants</i>	46
Mejoramiento genético de plantas/ <i>Plants breeding</i>	60
Otras temáticas / <i>Others thematics</i>	81

EMPLEO DE MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROPAGACIÓN DE PLANTAS / Use of biotechnological methods for plants propagation

T1.1 Protocolo para la propagación *in vitro* de *Tectona grandis* L. con el empleo de medios de cultivos semisólidos y biorreactores de inmersión temporal

E. Quiala^{1*}, M. V. Jiménez-Tello¹, Luis Valledor, M-J. Cañal, Maité Chávez¹, Manuel de Fera¹, Mariana La O¹, Marta Pérez¹, Miladys León, Raúl Barbón¹. *Autor para correspondencia.

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

La teca (*Tectona grandis* L.) está considerada entre las cinco primeras especies maderables de mayor importancia a nivel mundial y en Cuba se encuentra dentro de las 21 especies forestales priorizadas por el sector estatal forestal para el fomento de plantaciones comerciales. El presente trabajo resume 6 años de investigaciones encaminadas a obtener una metodología de propagación clonal *in vitro* de árboles de teca con el empleo de medios de cultivo semisólidos (SS) y sistemas de inmersión temporal (SIT). Durante el establecimiento del banco de plantas donantes, los brotes epicórmicos con una semana de rebrote en el tocón constituyeron el material vegetal más adecuado para la revigorización de los árboles adultos. Para el desarrollo del protocolo de propagación *in vitro* en SS y SIT se estudiaron diferentes factores. Se obtuvo un protocolo para la propagación masiva en SS. Durante el cultivo en los SIT, se logró establecer una relación entre los cambios morfológicos y los desórdenes anatómicos y fisiológicos y la concentración de 6-BAP utilizada, lo que permitió definir indicadores tempranos de la calidad de las plantas y seleccionar la concentración más adecuada de 6-BAP para el cultivo de los brotes. Además, se demostró que el empleo de los SIT durante la etapa final de la fase de multiplicación con una concentración de 2.22 μ M 6-BAP, mejoró la calidad de las plantas, estas sobrevivieron en un alto porcentaje durante la aclimatización. Los estudios de proteómica realizados mediante MALDI-TOF-TOF permitieron por primera vez demostrar que la hiperhidricidad de los brotes es el resultado de una sobreacumulación de citoquininas endógenas en formas activas que disminuyó la expresión de las enzimas de tipo

Peroxidasas, afectando la capacidad antioxidante y adaptativa de las plantas. Por primera vez se describe un protocolo eficiente y mejorado para la propagación comercial de la teca que combina los SS con el endurecimiento *in vitro* de las plantas en los SIT, previo a la fase de aclimatization.

Palabras clave: aclimatización *in vitro*, automatización, forestal, hiperhidricidad, teca

Protocol for *in vitro* propagation of *Tectona grandis* L., using semisolid culture and temporary immersion bioreactors

Teak tree is one of the most important tropical hardwood timber species. At present teak ranks among the top five tropical hardwood species in the world. In Cuba it is inside the 21 forest species prioritized by the forest state sector for the development of commercial plantations. The present work summarizes 6 years of investigations aimed to obtain a methodology for clonally *in vitro* propagation of 35-years old teak trees using semisolid culture medium (SS) and temporary immersion systems (TIS). During the establishment of the bank of plants donors, the epicormic buds with one week after sprouting constituted the most appropriate vegetable material for the revigorization of the mature trees. For the development of the propagation protocol *in vitro* in SS and TIS different factors were studied. A protocol for the massive propagation in SS was obtained. During the cultivation in the TIS, it was possible to establish a relationship between the morphological changes and the anatomical and physiologic disorders and the used concentration of 6-BAP, allowing to define early indicators of the plants quality and to select the optimal concentration of 6-BAP for shoot culture in TIS. It was also demonstrated that the use of TIS during the final stage of the multiplication phase with 2.22 μ M 6-BAP was successful for enhance plants quality and the percent of survivor during the acclimatization. The proteomic studies by MALDI-TOF-TOF shows, for first, that the hyperhydricity is the result of an over accumulation of endogenous active cytokinin decreasing the expression of peroxidase enzyme; affecting the antioxidant defense of plants and its competition for the *ex vitro* adaptation. For the first time, we refer an improved and successful protocol for *in vitro* propagation of teak, combining the multiplication in SS with the *in vitro* hardness of plants in TIS, prior to acclimatization phase.

Key words: automation, forestry, *in vitro* acclimatization, hyperhydricity, teak

T1.2 The effect of growth regulator in micropropagation of tow *Capsicum annuum* L. cultivars

Noaman Enfishi*, W Galleb, A Abothher, A Balkier, K Alabid, K Abuajila. *Author for correspondence

Department of plant tissue. Biotechnology Research Center. Atwiesha -Tripoli-Libya e-mail: nme755@yahoo.co.uk

The application of modern biotechnology for improvement of pepper productivity requires an efficient *in vitro* plant regeneration protocol. In this study an experiment was carried out to examine the effects of different combinations of plant growth regulators on the *in vitro* micropropagation of tow genotypes of *Capsicum annuum* L., (Z215, Y195) thus optimizing the protocol for *in vitro* micro propagation culturing of nodal segments in MS culture media. Among the different concentrations of plant regulator (TDZ, KIN, BA, IBA, NAA The best response was observed on medium containing 8.88µM BA and 2.45 µM IBA, especially for number of buds per explant and percentage of rooting in Varsity Z215 then Y195 The elongated shoots were rooted on medium containing IBA 2.45 µM Plantlets were transplanted to soil and acclimatized in the greenhouse showing normal development and growing to maturity bearing normal fruits with seeds.

Key words: *Capsicum annuum* L., *in vitro* micro propagation, Nodal cutting, plant growth regulators

T1.3 Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en seis clones de interés regional para Norte de Santander, Colombia

Alina K Sigarroa Rieche^{1*}, Claudia Yanet García Rojas² y Luz Stella Monsalve González³.

¹Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación Ambiente y Vida. Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS), Cúcuta, Norte de Santander, Colombia. e-mail: asigarroa@ufps.edu.co

*Autor para correspondencia: Dirección Postal: Av. Gran Colombia, No. 12 E-96, Colsag, Cúcuta, Norte de Santander, Colombia.

La embriogénesis somática es un método de regeneración de plantas *in vitro* reconocido en todo el mundo por su eficiencia, especialmente en especies donde la organogénesis ha

demostrado problemas como en el caso del cacao. En Colombia, este cultivo tiene gran importancia económica y social, representa la fuente principal de ingresos para unas 25 000 familias campesinas y por sus características, se presenta como alternativa en la sustitución de cultivos ilícitos, por lo cual el gobierno nacional viene enfocando esfuerzos y recursos que lo conviertan en una alternativa viable para los productores rurales de estas zonas. El país requiere material vegetal para establecer nuevas plantaciones y renovar las existentes afectadas por envejecimiento, heterogeneidad y problemas fitosanitarios. Este trabajo crea las bases para una alternativa de solución, pues evaluó las condiciones óptimas para establecer embriones somáticos primarios en cuatro genotipos comerciales de interés nacional (THS-565, ICS-95, CCN-51 y IMC-67) y dos genotipos regionales (FDC-01 y FDC-04) escogidos por rendimiento, precocidad y resistencia/tolerancia a enfermedades. Fueron evaluados dos medios de cultivo, dos condiciones ambientales y dos tipos de explantes. Los resultados arrojan la necesidad de adicionar TDZ al medio de cultivo de inducción para los seis genotipos en estudio, el mejor desarrollo de los explantes se logró al usar glucosa como fuente de carbono, los estaminoideos presentan una mejor formación de callo, sin embargo, en petaloideos se obtienen mayor número de embriones somáticos y mejor desarrollo de los mismos, la combinación Kinetina-2,4 D favorece la ES de baja frecuencia para casi todos los genotipos. Se comprobó la alta dependencia del genotipo, por lo cual las condiciones ambientales, los balances hormonales y la frecuencia embriogénica son diferentes para cada uno de los clones, mostrando mejor respuesta embriogénica los clones ISC-95 y CNN-51 dentro de los genotipos comerciales y el FDC-04 entre los regionales.

Palabras clave: embriogénesis somática, explante, genotipo, *Theobroma cacao*

Somatic embryogenesis is a method of plant regeneration *in vitro* recognized worldwide for its efficiency, especially in species where organogenesis has shown problems as in the case of cocoa. In Colombia, this crop has great economic and social importance, the main source of income for about 25 000 farm families and their characteristics, is presented as an alternative for illicit crop substitution, whereby the national government is focusing efforts and resources to become a viable alternative for farmers in these areas. The country needs to establish new plant material and renovate existing plantations

affected by aging, heterogeneity and plant health problems. This work creates the foundation for an alternative solution, as assessed optimal conditions to establish primary somatic embryos in four commercial genotypes of national interest (THS-565, ICS-95, CCN-51 and IMC-67) and two regional genotypes (FDC and FDC-01-04) chosen for yield, earliness and resistance / tolerance to diseases. Were evaluated two culture media, two environmental conditions and both types of explants. The results show the need to add to the culture medium TDZ induction six genotypes in the study, the best development of the explants was accomplished by using glucose as the carbon source, the staminodes exhibit better callus formation, however, petaloid greater number of somatic embryos and development of better they are obtained, the combination Kinetin-2, 4 D favors low frequency ES for almost all genotypes. The high dependence of genotype was found, so the environmental conditions, hormonal balances and embryogenic frequency are different for each of the clones, showing the best embryogenic response ISC-95 and CCN-51 clones within the commercial genotypes and FDC-04 between regional.

Keywords: explant, genotype, somatic embryogenesis, *Theobroma cacao*

T1.4 Efecto del tiempo de inmersión sobre brotes de *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland cultivados en SIT RITA

Mallelyn González González^{1,2*}, Y García-Ramírez², M. Freire-Seijo², E. Quijalá², Mariana La O², Berkis Roque, E. Mena, Ortelio Hurtado². *Autor para correspondencia.

¹Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: mallelyngg@uclv.edu.cu

²Instituto 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.

En Cuba, la plantación a escala comercial de *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland (*B. vulgaris*) constituye una opción viable para atenuar los problemas medioambientales. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del tiempo de inmersión sobre los brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT (RITA). Para ello se cuantificaron una serie de indicadores morfológicos y fisiológicos partiendo de la determinación del contenido de agua, fenoles y lignina. Se demostró que tiempos cortos de

inmersión (un minuto) favorecen la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*, se logró una mayor calidad en los brotes obtenidos expresada en el número de brotes por explante (5.0), contenido de agua (92.1%), fenoles totales (49.1 mg GAE.g⁻¹ MS) y contenido de lignina (13.1%). Los resultados de este estudio proporcionan, por primera vez información sobre la propagación rápida y exitosa de *B. vulgaris* en SIT.

Palabras clave: bambú, indicadores morfo - fisiológico, multiplicación *in vitro*

T1.5 Nueva alternativa para el desarrollo de la embriogénesis somática en el cultivar 'FHIA-25' (*Musa* spp., Grupo AAB)

Dayana Rodríguez González*, Jorge López Torres, Aymé Rayas Cabrera, Damicela Reynaldo Álvarez, Nery Montano Pérez, Maricel Bauta Toledo. *Autor para correspondencia.

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Finca 'Tres Carolinas', Apdo. 6, Santo Domingo CP 53 000, Villa Clara *e-mail: tculture.biotec@inivit.cu

La embriogénesis somática constituye una herramienta auxiliar para la mejora genética de los plátanos y bananos, además de permitir obtener producciones superiores en un menor período de tiempo y a un costo más bajo. El presente trabajo se realizó con el cultivar de plátano (AAB) 'FHIA-25' el cual posee buena resistencia a la Sigatoka negra y altos rendimientos, pero con la limitante del bajo contenido de azúcar del fruto. Teniendo en cuenta lo anterior se realizó la investigación con el objetivo de disponer de un método de regeneración de plantas por embriogénesis somática a nivel celular, que pueda facilitar la mejora de la calidad del fruto mediante la transformación genética en el INIVIT. Se desarrolló una metodología para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir de ápices de brotes de yemas axilares, en medio de cultivo líquido. Se obtuvieron suspensiones celulares embriogénicas homogéneas directamente en el medio de cultivo líquido sin pasar por una fase de callo, obteniéndose los mayores volúmenes de multiplicación celular a la densidad de 3.0% del volumen de células sedimentadas. La incubación de los embriones somáticos producidos durante 30 días en el medio de cultivo de maduración de embriones incrementó en germinación. Las plantas provenientes de los embriones somáticos, en comparación con las plantas regeneradas por organogénesis, mostraron en ambos casos un

alto porcentaje de supervivencia en la fase de aclimatización, sin la presencia de cambios fenotípicos.

Palabras clave: embrión somático, plátano, suspensiones celulares embriogénicas

New alternative for developing somatic embryogenesis in cultivar 'FHIA-25' (*Musa* spp., AAB group)

Somatic embryogenesis constitutes an auxiliary tool for genetic improvement of plantain and banana, besides, allows obtaining higher yields in less time and at lower cost. The present work was carried with plantain cultivar (AAB) 'FHIA-25' which has good resistance to Black Sigatoka and high yields, but with the limitation of low fruit sugar content. Based on the above considerations, a research was conducted with the aim of providing a plant regeneration method by somatic embryogenesis at cellular level, which may facilitate the improvement of fruit quality through genetic transformation at INIVIT. A methodology for plant regeneration via somatic embryogenesis from shoot apices of axillary buds in liquid culture medium was developed. Homogeneous embryogenic cell suspensions were directly obtained in liquid culture medium without going through callus phase. The highest cellular multiplication volumes were obtained at 3.0% density of sedimented cell volume. Embryo germination increased with the incubation of somatic embryos formed after 30 days in mature culture medium. Plants from somatic embryos showed in both cases a high survival rate in the acclimatization phase, without the presence of phenotypic changes compared to plants regenerated by organogenesis.

Keywords: embryogenic cell suspensions, plantain, somatic embryo

T1.6 Influencia del ácido giberélico en la altura del cultivar 'C90-469' durante el enraizamiento *in vitro*

Aydiloides Bernal Villegas^{1*}, Zenaida Ela Occeguera Águila¹, Mayra Jiménez Vázquez¹, Jorge L. Montes de Oca Suárez¹, Pablo Machado Armas¹, Mercedes Capote Albornoz², Aldo Valencia Núñez¹, José R. Garcías Fardales¹. *Autor para correspondencia.

¹Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar. (ETICA Centro - Villa Clara). Autopista Nacional km 246. Ranchuelo. Villa Clara. Cuba.

²Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Cuba. e-mail: biofábrica@vc.azcuba.cu

Durante la fase de enraizamiento *in vitro*, los efectos de la intensidad de la luz y la temperatura, deben contribuir a la obtención de brotes con un tamaño y desarrollo adecuado, que posibiliten la obtención de plántulas enraizadas de buena calidad y homogeneidad. Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el comportamiento de la altura del cultivar 'C90-469' en fase de enraizamiento. Se evaluó el efecto de tres dosis de ácido giberélico en un medio de cultivo 50% de sales MS 5 mg l⁻¹ de AIA y 4% de sacarosa. Como resultado se obtuvo que el empleo de 0.2 mg l⁻¹ de ácido giberélico, favoreció la mayor altura de los explantes a los 21 días de enraizados. En el año 2012 se lograron producir 238 708 plantas *in vitro* del cultivar 'C90-469'.

Palabras clave: ácido giberélico, explantes, *in vitro*

Influence of giberelic acid in the height of sugarcane cultivar 'C90-469' during *in vitro* rooting

During the *in vitro* rooting stage, the effects of the light intensity and the temperature should contribute to obtain sprouts with an appropriate size and development that resulted in rooted plantlets with good quality and homogeneity. So the present work had as objective to determine the behaviour of the height of cultivar 'C90-469' in the rooting stage. The effects of three dose of Giberelic acid were evaluated in a MS medium at 50% of salts and 4% of sucrose. The use of 0.2 mg l⁻¹ of Giberelic acid, favored the greater height of explants at 21 days of rooting. In the year 2012 it was possible to produce 238 708 *in vitro* plantlets of cultivar 'C90-469'.

Key words: explants, giberelic acid, *in vitro* culture

T1.7 Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de *Theobroma cacao* L.

Reinaldo Trujillo*, Janet Quiñones, Yemeys Quirós, Mayelin Mora, Aurora Pérez, Yanelis Capedesuner, Leyanes Días, Maribel Rivas, Martha Hernández. *Autor para correspondencia.

Centro de Bioplantitas. Laboratorio Ingeniería Metabólica. Universidad Máximo Gómez Báez de Ciego de Ávila. Carretera a Morón, km 9. Ciego de Ávila, CP 69 450. Cuba.

En plantas superiores muchos fenómenos y papeles se atribuyen a los metabolitos secundarios. *Theobroma cacao* L. es el material de partida para la producción de chocolate, se conoce en la medicina popular como antiséptico, diurético, antiparasitario y es una fuente importante de compuestos fenólicos. El cultivo *in vitro* es una fuente alternativa para la producción de metabolitos. En estos momentos es posible producir plantas a partir de numerosos explantes y genotipos. Sin embargo, el cacao es generalmente una especie recalcitrante y para establecer el cultivo *in vitro* es muy importante la selección del material vegetal de partida. El objetivo de este trabajo fue establecer callos y suspensiones celulares embriogénicas de *Theobroma cacao* L. Las nucelas, pétalos, estaminoides y hojas jóvenes se cultivaron en un medio de callogénesis y se midió el crecimiento de los callos y la formación de embriones. Las suspensiones celulares se establecieron a partir de callos, se realizó conteo de células y se midió la formación de embriones. Los estaminoides y pétalos mostraron mayor crecimiento de callos y mayor formación de embriones. Se obtuvieron suspensiones celulares con células meristemáticas y agregados celulares. Se logró la formación de embriones en medio de cultivo líquido.

Palabras clave: callos embriogénicos, suspensiones embriogénicas, *Theobroma cacao*

In higher plants, many processes and roles are attributable to secondary metabolites. The nature of polyphenol compounds is complex. *Theobroma cacao* L. fruits are the raw material for chocolate production. Chocolate is known in popular medicine as an antiseptic, diuretic and anti-parasitic agent. Chemically, cacao seeds contain fat, theobromine, caffeine, starch, β -carotene and phenolic compounds. Phenols have been associated to plant and tissue maturation processes, defense mechanisms and sensory mechanisms. *In vitro* culture is an alternative source for the production of secondary metabolites. A few papers report cocoa somatic embryogenesis from floral parts. It is now possible to produce plantlets from numerous explants and genotypes. However, cocoa remains a generally recalcitrant species and is very important to select de initial material for *in vitro* culture. This work aimed at establishing embryogenic callus and cell suspension of *Theobroma cacao* L. The nucelle, petals, staminods and leaves were cultured on a callogenesis medium. The callus grown and embryo formation were measured. Cell

suspensions from calli were established. Cell suspensions with meristematic cells and cell clusters were obtained. Embryos formation in medium was achieved.

Keywords. embryogenic callus, embryogenic suspension, *Theobroma cacao*

T1.8 Enraizamiento *in vitro* de Pistacho (*Pistacia vera*)

Mariela Cid, Iris Capote, Danilo Pina, Maritza Escalona, Marcos Daquinta

Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 9 CP 69 450. Cuba. e-mail: mariela@bioplantas.cu

El pistacho es uno de los frutales menos explotados, la principal causa es el elevado costo del material vegetal por las dificultades de propagación de la especie (la selección de un patrón clonal propagado vegetativamente). La aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* a las especies de *Pistacia* permitirá, además de la propagación clonal masiva, estudiar algunos aspectos en las etapas de la micropropagación. Este trabajo tuvo como objetivo ensayar varias condiciones en la fase de enraizamiento. Explantes provenientes de la multiplicación, con una longitud promedio de 1.5-2.5 cm y 2-4 entrenudos, se colocaron en un medio de cultivo MS modificado con ácido indolbutírico (AIB) (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mg l⁻¹) todo el tiempo a la luz. Los mejores resultados se obtuvieron con 3 mg l⁻¹, donde se logró un 64% de brotes enraizados, un mayor número de raíces (1.2) y longitud de la raíz principal (3.44). Sobre este resultado se ensayaron varias condiciones, los brotes se colocaron los primeros 5 días en la oscuridad, después pasaron a la luz en diferentes medios de cultivos, MS con vermiculita, MS sin vermiculita y MS con 3 mg l⁻¹ de AIB. Se mantuvo todo el tiempo a la luz el tratamiento MS con 3 mg l⁻¹ (control) y MS con 3 mg l⁻¹ de AIB más vermiculita. El mayor número de plantas enraizadas (92%) se logró en el tratamiento MS con 3 mg l⁻¹ de AIB cuando se colocó los primeros cinco días a la oscuridad y el resto a la luz, este tratamiento alcanzó el mayor número de raíces por planta (1.8).

Palabras clave: cultivo *in vitro*, enraizamiento, pistacho

***In vitro* rooting of Pistachio (*Pistacia vera*)**

Pistachio is one of the fruit crops less exploited mainly for the high cost of plant material due difficult propagation of specie (selection of the rootstock). The use of *in vitro* techniques will permit not only mass propagation since study different steps of micropropagation. In order to optimize *in vitro* rooting were developed two experiments. Shoot from multiplication with 1.5 2.0 cm length were collocated in MS medium supplemented with IBA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mg l⁻¹) under light conditions. The best results were obtained at 3.0 mg l⁻¹ (64% of rooting shoot), high number of roots (1.2) and rooting length (3.44 cm). Under these conditions was also assayed the effect of light and dark during the first five day of rooting. Treatments were MS plus vermiculite, MS without vermiculite and MS supplemented with 3 mg l⁻¹ IBA. The higher number of rooting shoots (92%) and number of root per shoot (1.8) was achieved using MS + 3 mg l⁻¹ IBA 5 days at dark and later under light conditions.

Keyword: enraizamiento, *in vitro* culture, pistachio

T1.9 Microinjerto *in vitro* de *Theobroma cacao* L.

Yulien Miguélez Sierra^{1*}, Annia Hernández Rodríguez², Yanelis Acebo Guerrero², Mondher El Jaziri³. *Autor para correspondencia.

¹Facultad Agroforestal de Montaña, Universidad de Guantánamo, Carretera a Santiago de Cuba, Km 2½, Guantánamo, Cuba. e-mail: yulien@fam.cug.co.cu

²Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25, No. 45, Plaza, La Habana.

³Laboratorio de Biotecnología vegetal, Universidad de Bruselas, Bélgica, Rue Adrienne Bolland 8, 6041 Charleroi, Belgium.

El microinjerto *in vitro* de *Theobroma cacao* fue evaluado con vistas a la creación de una colección de germoplasma de cacao en Cuba. Los clones UF- 677 y UF 650 fueron usados como portainjerto y las yemas injertadas se tomaron de clones de cacao tipo Trinitario colectados en la región de Baracoa, Cuba. Tres métodos de injerto fueron utilizados y se obtuvo un 95% y 85% de éxito en el injerto, respectivamente, cuando los ápices fueron injertados en la posición apical o lateral en hipocótilos de plantas de tres semanas de edad. El injerto lateral con yemas laterales no brotadas presentó un éxito más bajo (55%) pero los brotes resultantes alcanzaron una mayor altura (1.76 cm) y número de hojas (3.72), que en los otros métodos de injerto, después de seis semanas de

cultivo. Se realizó un estudio histológico de las plantas injertadas el cual proporcionó evidencia de la unión de los tejidos injertados y del desarrollo de elementos vasculares en la zona de unión del injerto. Se evaluó la respuesta en el microinjerto de tres clones de cacao antiguo de la zona de Baracoa, durante nueve semanas, con supervivencia de 75-94% y la obtención de plantas con características del crecimiento aptas para la siguiente fase. La aclimatización de plantas microinjertadas con diferentes métodos resultó en un máximo de 81.81% de supervivencia y demostró que solo las plantas con brotes de un centímetro o más y al menos dos hojas sobreviven en las condiciones *ex vitro*.

Palabras clave: aclimatización, *in vitro*, microinjerto, *Theobroma cacao*, yemas laterales

The micrografting *in vitro* of cacao was evaluated as a tool for the creation of a germplasm collection of cacao in Cuba. The clones UF 677 and UF 650 were used as the rootstocks and clones of type Trinitario, collected at Baracoa, Cuba, were used as scion. Three methods of grafting were used for that study obtaining 95% and 85%, of graft success, respectively, when apexes were grafted in apical or side position in hypocotyls of seedlings three weeks old. Side graft with lateral buds not sprouted presented a lower graft success (55%) but the resultant shoots reached superior growth traits (average of 1.76 cm height and 3.72 leaves) compared with the apexes in the other methods after six weeks of culture. A histological study of grafted plants provided evidences of graft union and subsequent development of new vascular elements at the union area. The response to the micrografting of three clones of ancient cacao growing at Baracoa was evaluated during nine weeks. A survival of 75-94% and plants with adequate growth parameters were obtained. The acclimatization study showed that a height of 1 cm or more and at least two leaves in the shoots are required for obtaining survival of the *in vitro* micrografted plants after transferred to *ex vitro* conditions.

Keywords: acclimatization, *in vitro*, lateral buds, micrografting, *Theobroma cacao*

T1.10 Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio en la desinfección de meristemo apical de caña de azúcar

Daniela Guardado-Félix¹, Junio Flores-Castellanos¹, Roberto Gutiérrez-Dorado¹, Héctor Manuel Cárdenas-Cota², Cuauhtémoc Reyes-Moreno¹ y Ángel Valdez-Ortiz^{1*}. *Autor para correspondencia.

¹Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. de las Américas y Josefa Ortiz de Domínguez, S/N, CP 80 010, Culiacán, Sinaloa, México.

²Centro de Ciencias de Sinaloa, Av. de las Américas 2 771 Nte., CP 80 010, Culiacán, Sinaloa, México. e-mail: angelvaldezortiz@yahoo.com.mx.

Para el éxito en el establecimiento de un sistema de cultivo *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), la obtención de explantes meristemáticos libres de contaminantes exógenos, representa un punto clave, su aseguramiento permitiría la producción de plántulas con alta calidad fitosanitaria. Evaluar la desinfección de tejido meristemático (TM) utilizando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) a diferentes tiempos de lavado, analizar los efectos posteriores en su micropropagación e identificar a los principales microorganismos contaminantes. Se utilizó TM de caña de azúcar, el cual fue tratado con NaClO en disolución a diferentes concentraciones (3, 6 y 10%) combinados con tiempos de 10, 15 y 20 min. Con estos, se realizaron las fases de establecimiento y multiplicación *in vitro*. Para la identificación de los microorganismos, se utilizó la tinción de Gram y una prueba de resistencia a antibióticos. El mejor porcentaje de desinfección de TM (73.3%) se alcanzó con el tratamiento de 10% de NaClO por 20 min., no se observaron, además, efectos negativos en las posteriores etapas de micropropagación. Las levaduras son potencialmente los contaminantes más difíciles de eliminar durante la desinfección, ya que éstas fueron las únicas en permanecer en algunos de los explantes tratados. Se logró establecer un protocolo eficiente para la desinfección de explantes meristemáticos de caña de azúcar, logrando niveles hasta de 73.3%. Se identificó a las levaduras como principales microorganismos contaminantes.

Palabras clave: caña de azúcar, desinfección, micropropagación, tejido meristemático

Sodium hypochlorite concentration effect on the apical meristem sugarcane disinfection

For the establishment of the *in vitro* culture of sugarcane (*Saccharum officinarum*), obtainment of apical meristem explants free of exogenous contaminants is a principal issue, reaching this, would be possible the production of seedlings with high quality. The surface sterilization of meristematic tissue (MT) using different concentrations of sodium hypochlorite (NaClO) at

different times of washing was evaluated. Their subsequent effects on micropropagation were analyzed and the identification of the main contaminating microorganisms was performed. MT of sugarcane was treated with a NaClO solution at different concentrations (3, 6 and 10%), combined with times of 10, 15, and 20 min. Using these MT, the establishment and multiplication *in vitro* was carried out. To identify polluting microorganisms, Gram stain and antibiotic resistance tests were used. The best MT surface sterilization percentage (73.3%) was obtained with 10% NaClO for 20 min treatment. No negative effects were observed in subsequent stages of micropropagation. Moreover, yeasts are potentially the most difficult contaminants to remove during disinfection, since only these organisms remained on the treated explants. The establishment of an efficient protocol for the surface sterilization of meristem explants of sugarcane was achieved, reaching levels around 73.3%. The yeasts were identified as major contaminating microorganisms.

Palabras clave: disinfección, meristemático tissue, micropropagación, mugarcane

T1.11 Cultivo de células en suspensión de la nueva variedad de papa 'Pastusa Suprema' con miras a la producción de proteínas recombinantes

Luisa Fernanda Granger¹, Isabel Cristina Zuluaga¹, Mario Arias¹, Rafael Arango^{1,2*}. *Autor para correspondencia.

¹Grupo de Investigación Biotecnología Industrial. Universidad Nacional de Colombia. Calle 59 A No 63 – 20. Medellín, Colombia.

²Unidad de Biotecnología Vegetal. Corporación para Investigaciones Biológicas. Carrera 72 A No 78 B – 141, CP 05 0034. Medellín, Colombia. e-mail: rearango@unal.edu.co.

La nueva variedad de papa 'Pastusa Suprema' (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*) es una promisoriosa plataforma de producción de proteínas recombinantes. Para explorar su potencial biotecnológico se realizó inducción de callos y establecimiento de suspensiones. Se determinó la composición hormonal, el tipo de explante y el fotoperíodo que favorecen la inducción de callos friables. Todos los explantes formaron callos friables en medio de cultivo Murashigue y Skoog (MS) con 1.5 y 3.0 mg l⁻¹ de ácido 2,4-dicloro fenoxiacético (2,4-D) o ácido naftalenacético (ANA). No hubo diferencias significativas entre el porcentaje de inducción obtenido con 2,4-D y con

ANA. Los entrenudos mostraron menor organogénesis y mayor formación de callo friable que los nudos. El índice de crecimiento fue significativamente más alto en oscuridad que en el fotoperíodo de 12 horas luz. A partir de los callos friables se establecieron suspensiones celulares. Se evaluó el efecto de la suplementación con 2,4-D y ANA en concentraciones de 0.5, 1.5 y 3.0 mg l⁻¹; no hubo diferencias significativas entre los índices de crecimiento de estos tratamientos. Este es el primer reporte del cultivo de callos y células en suspensión de esta nueva variedad vegetal. Los resultados obtenidos permitirán caracterizar la cinética de crecimiento y la producción total de proteína, con el fin de explorarla como plataforma de producción de proteínas recombinantes de interés biotecnológico.

Palabras clave: cultivo de callos, cultivo de células vegetales, *Solanum tuberosum* ssp. andigena

Cell suspension culture of the new potato variety 'Pastusa Suprema' towards foreign protein production

The new potato variety 'Pastusa Suprema' (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*) is a promising platform for recombinant protein production. In order to explore its biotechnology potential, this research aimed to induce callus and to grow cell suspensions. We determined the appropriate hormone concentrations, type of explant (node and internode) and photoperiod for friable callus induction. All the explants formed calli when cultured in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2,4-dichloro phenoxyacetic acid (2,4-D) or naphthalenacetic acid (NAA), at concentrations of 1.5 and 3.0 mg l⁻¹. There was no significant difference between the percentage of calli obtained with 2,4-D and NAA. Internodes showed less organogenesis and more friable callus formation than nodes. Darkness significantly increased the growth index compared with a photoperiod of 12 hours light. By passing friable callus to liquid medium we obtained cell suspensions. The effect of 2,4-D and NAA, at concentrations of 0.5, 1.5 and 3.0 mg l⁻¹, was evaluated; there was no significant difference between the growth indexes of these treatments. This is the first report of cell suspension culture from this new potato variety. The results obtained will allow us to characterize the kinetic growth and total protein production of the cell suspension culture, in order to survey its potential as a platform for recombinant protein production.

Keywords: callus culture, plant cell culture, *Solanum tuberosum* L.

T1.12 Establecimiento de cultivos *in vitro* de callos y de raíces en suspensión de *Moringa oleífera*.

Concepción Cortes-Barranca¹, Ana X Agustín-Joaquín¹, Ariana A Huerta-Heredia², Paula N Robledo-Narvaez¹, Jacqueline Capataz-Tafur³, David Paniagua-Vega^{2*}. *Autor para correspondencia.

¹Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca, Ingeniería en Industrias Alimentarias, Veracruz, México.

²Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable. Tierra Blanca, Veracruz, México. 95180. e-mail: paniagua_vega@hotmail.com

³Universidad del Papaloapan, Instituto de Biotecnología. Tuxtepec, Oaxaca, México. 68301

Moringa (Moringa oleífera Lam.) es una planta tropical de la familia *Moringaceae*, de crecimiento acelerado ampliamente reconocida por su aporte nutricional en la alimentación, tanto de animales como de humanos. *Moringa* se encuentra en una etapa de investigación preliminar donde se pretende descubrir las propiedades potenciales de sus fitoquímicos. Sus raíces producen metabolitos secundarios (glucosinolatos, isotiocianatos y alcaloides) con una amplia actividad biológica. La micropropagación clonal *in vitro* es una herramienta biotecnológica que no necesariamente involucra la manipulación genética. Garantiza la inocuidad y calidad de las plantas, debido a que permite el control de las condiciones bióticas y abióticas. El objetivo del este trabajo fue establecer, a partir de semillas silvestres de *M. oleífera*, cultivos *in vitro* de callos y raíces. Se desinfectaron semillas de *M. oleífera* mediante inmersiones en detergente (15 min), etanol 70% (5 min) e hipoclorito de sodio 4% (5 min). Estas se colocaron en medio de cultivo Murashige y Skoog a la mitad de la concentración de sus sales (MS), sacarosa 20 g l⁻¹, Phytigel^R 2 g l⁻¹ y pH 6 y se incubaron en condiciones de oscuridad. Se obtuvo un 95% de germinados asépticos en 15 días. Los explantes de tallos a partir de los germinados fueron enraizados en 25 ml de medio de cultivo ½ MS con sacarosa 20 g l⁻¹, Phytigel 2 g l⁻¹, ácido indol acético (IAA) 0.1 mg l⁻¹, pH 6 y 30±2°C, en luz continua. Los explantes de tallos cultivados en 25 mL de medio de cultivo MS, sacarosa 20 g l⁻¹, P 2 g l⁻¹, BAP 1 mg.ml⁻¹, 2,4-D 0.1 mg l⁻¹, pH 6.0 y 28±2°C e incubados en condiciones de fotoperíodo 16/8 h, presentaron la mayor cobertura de callo a los 20 días. A partir de las

raíces de los germinados se estableció el cultivo de raíces en suspensión en medio de cultivo MS, sacarosa 20 g l⁻¹ y IAA 1.5 mg l⁻¹, agitación orbital 110 rpm, 25±5°C, en oscuridad.

Palabras clave: cultivo de callos, cultivo de raíces en suspensión, *Moringa oleifera*

Establishment of *in vitro* callus and root suspension cultures of *Moringa oleifera*

Moringa (Moringa oleifera Lam.) is a tropical plant of the family *Moringaceae*, growth accelerated widely recognized for its nutritional value in food, both animal and human. *Moringa* is in a preliminary stage of research which aims to discover the potential properties of phytochemicals. Its roots produce secondary metabolites (glucosinolates, isothiocyanates and alkaloids) with broad biological activity. *In vitro* clonal micropropagation is a biotechnological tool that involves no genetic manipulation. Ensures the safety and quality of the plants, because it allows control of biotic and abiotic conditions. The aim of this study was to establish from wild *M. oleifera* seeds, *in vitro* callus and roots culture. *M. oleifera* seeds were disinfected by immersion in detergent (15 min), 70% ethanol (5 min) and 4% sodium hypochlorite (5 min). These were placed on Murashige and Skoog medium with half of concentration of salts (MS) supplemented with 20 g l⁻¹ sucrose, 2 g l⁻¹ Phytigel^R and pH 6 and incubated under dark conditions. Aseptic sprouts were obtained (95%) in 15 days. Explants stems from the sprouts were rooted in 25 mL of medium MS supplemented with 20 g l⁻¹ sucrose, 2 g l⁻¹ Phytigel^R 0.1 mg l⁻¹ indole acetic acid (IAA), pH 6.0, and 30±2°C in continuous light. Explants stems cultured in 25 mL of MS medium, 20 g l⁻¹ sucrose, 2 g l⁻¹ Phytigel^R, 1 mg/mL BAP, 0.1 mg l⁻¹ 2,4-D, pH 6 and 28±2°C and incubated under conditions of photoperiod 16/8 h, presented the increased coverage of callus at 20 days. Root suspension culture was established from the germinated roots growing in MS, 20 g l⁻¹ sucrose and 1.5 mg l⁻¹ IAA, orbital agitation 110 rpm, 25±5°C in darkness.

Keywords: callus cultures, root suspension cultures, *Moringa oleifera*

T1.13 Estandarización de la fase de enraizamiento de brotes de caña de azúcar var. 'CP 72 20-86' *in vitro*

Junio Flores-Castellanos¹, Daniela Guardado-Félix¹, Roberto Gutiérrez-Dorado¹, Héctor Manuel Cárdenas-Cota², Jorge Milán-Carrillo¹ y Ángel Valdez-Ortiz^{1*}.
*Autor para correspondencia.

¹Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. de las Américas y Josefa Ortiz de Domínguez, S/N, CP 80 010, Culiacán, Sinaloa, México.
e-mail: angelvaldezortiz@yahoo.com.mx

²Centro de Ciencias de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.

El desarrollo de un sistema de enraizamiento es un paso esencial para la micropropagación de caña de azúcar. Sin embargo, son pocos los reportes enfocados en encontrar las condiciones óptimas para esta etapa. Además, los requerimientos nutricionales y ambientales son distintos de una variedad a otra. El objetivo de este trabajo fue encontrar las condiciones óptimas para inducir raíces en brotes generados *in vitro* de la variedad CP 72-2086. Se inocularon brotes generados a partir de meristemos apicales en 16 tratamientos, que contenían 40 g l⁻¹ de sacarosa (pH 5.8), con variaciones en la concentración de ácido indolacético (AIA) (1 a 5 mg l⁻¹), agar (0 y 7 g l⁻¹) y MS (0.5X y 1X). La presencia y número de raíces por brote fue registrada cada siete días durante tres semanas. Se logró inducir raíces en 100% de las muestras de siete de los tratamientos probados; cinco de éstos, desarrollaron de 11 a 13 raíces a los 21 días; cuatro de ellos no contenían AIA, mostrando diferencia significativa con aquellos que sí contenían. Se ha informado que altas concentraciones de auxinas promueven la deposición del etileno, el cual inhibe la iniciación de la formación de raíces y posterior alargamiento de las mismas; además, aumenta el riesgo de generar variación somaclonal. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con 0.5X y 1X de MS, y en aquellos con y sin agar. Concentraciones de 0.5X MS, 40 g l⁻¹ de sacarosa, medio de cultivo líquido y sin reguladores de crecimiento son suficientes para generar un buen sistema radicular a los 21 días en plántulas de caña de azúcar, variedad CP 72-2086. Por lo tanto, el proceso de enraizamiento puede ser economizado al no utilizar auxinas y agar para la fase de enraizamiento.

Palabras clave: ácido indolacético, auxinas, caña de azúcar, enraizamiento, micropropagación

Standardization of the *in vitro* rooting phase of sugarcane shoots var. 'CP 72 20-86'

Development of rooting system is an essential step for *in vitro* micropropagation of sugarcane. However, few reports have focused on finding the optimal conditions for this. In addition, nutritional

and environmental requirements are different between sugarcane varieties. To find the optimal conditions for rooting *in vitro* sugarcane shoots Var. CP 72-2086. Micropropagated sugarcane shoots obtained from apical meristems explants were subcultured using 16 different treatments containing 40 g l⁻¹ of sacarose (pH=5.8), varying concentrations of indolacetic acid (IAA) (1 to 5 mg l⁻¹), agar (0 and 7 g l⁻¹) and MS medium (0.5X and 1X). Presence and number of roots per shoot was recorded each 7 days during 3 weeks. Rooting in 100% of the samples was achieved in 7 of the 16 treatments; 5 of them, developed 11.1 to 13.1 roots at day 21; since cultivated. 4 of them did not contain IAA at all, showing significative difference with those that contained growth regulator. It has been found that high auxins concentrations promote ethylene deposition, which inhibits the start of root formation and subsequent elongation; moreover, the use of growth regulators increases the risk of generating somaclonal variation. No significative differences were observed between treatments with 0.5X and 1X strength MS, neither with or without agar. Concentrations of 0.5X MS, 40 g l⁻¹ of sacarose, in liquid medium without growth regulators is enough to achieve an efficient root system within 21 days in seedlings of sugarcane var. CP 72-2086. Therefore, rooting process can be readily economized lacking the use of growth regulator and agar for this stage.

Keywords: auxin, indolacetic acid, micropropagation, rooting, sugarcane

T1.14 Efecto del medio de cultivo, tipo de frasco de cultivo y la densidad de inoculación en la maduración y germinación de embriones somáticos de *Musa* spp. cv. 'Grande naine' (AAA)

Maritza Reyes*, Borys Chong-Pérez, Novisel Veitía, Rafael G. Kosky. *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. e-mail: maritza@ibp.co.cu

Este trabajo fue realizado con el objetivo de determinar el efecto del medio de cultivo de maduración, el tipo de frasco de cultivo y la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de banano 'Grande naine' (*Musa* AAA). Los embriones somáticos obtenidos a partir de suspensiones celulares embriogénicas fueron colocados como explantes en el medio de cultivo para su maduración. Se empleó como

medio de cultivo las sales MS con diferentes concentraciones de ABA y como controles los medios de cultivo con sacarosa 30 y 45 g l⁻¹. Para esto se utilizaron dos tipos de frascos de cultivo (vidrio y plástico). Los cultivos fueron colocados en condiciones de oscuridad total y temperatura de 27± 2°C durante 25 días de cultivo. Los embriones somáticos provenientes de cada tratamiento fueron evaluados su estado de maduración en el medio de cultivo de germinación durante los primeros cinco días de cultivo y al final del proceso (30 días). Para esto se empleó medio de germinación en frasco de cultivos plásticos y dos densidades de inoculación (alta y baja). Los cultivos fueron colocados en cámaras de cultivo con luz solar y 25±2°C. Se comprobó que los factores estudiados tuvieron influencia sobre la germinación de embriones somáticos de banano cv. 'Grande naine' y deben ser tenidos en cuenta en el proceso de producción masiva de plantas *in vitro* mediante esta tecnología.

Palabras clave: banano, competencia *in vitro*, embriogénesis somática, germinación, tipo de frasco

T1.15 Efecto del genotipo en el establecimiento *in vitro* de variedades de papa cubanas y foráneas

Leyanis García-Águila*, Marta Pérez, Mariana La O, Felipe Jiménez-Terry, Zoe Sarría, Yelenys Alvarado-Capó, Mayelin Rodríguez, Novisel Veitía, Manuel De Feía, Daniel Agramonte. *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: leyanis@ibp.co.cu

En el cultivo de la papa, las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos se aplican para apoyar los procesos de producción de semilla, lo cual garantiza la uniformidad, calidad genética y sanitaria del material vegetal de plantación. Sin embargo, se conoce que existe una respuesta diferencial de los tejidos vegetales al cultivo *in vitro*, la cual se atribuye a la influencia del genotipo. Es por ello, que este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del genotipo en el establecimiento *in vitro* de variedades de papa cubanas y foráneas. Como material vegetal inicial se utilizaron los brotes de los tubérculos correspondientes a cada variedad. Estos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de

sodio al 1.0%, antes de la extracción de los ápices meristemáticos (0.3 a 0.5 mm de longitud). Los ápices se colocaron en tubos de ensayo sobre medio de cultivo semisólido a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 16 horas de iluminación artificial. A los 40 días de cultivo, se determinó el porcentaje de supervivencia y se realizó una caracterización morfológica del crecimiento vegetal. Las variedades 'Ibis' y 'Yuya' fueron las de mayor porcentaje de supervivencia de sus ápices con diferencias significativas con el resto de las variedades. Como resultado de la caracterización morfológica se identificaron tres tipos de plantas, cuya frecuencia de aparición se manifestó diferente en cada variedad. Las plantas que se obtuvieron de las variedades 'Marinca', 'Yara', 'Romano', 'Ibis' y 'Yuya' en su mayoría mostraron características morfológicas típicas del desarrollo *in vitro* de este cultivo, con una coloración verde intenso, tallo y entrenudos bien definidos, con hojas redondeadas. El resto de las variedades presentaron una mayor frecuencia de plantas con crecimiento en rosetas por la no definición del tallo con entrenudos, además de la presencia de hojas lanceoladas de color verde pálido. Las plantas que presentaron un hábito de crecimiento *in vitro* característico del cultivo, fueron subcultivadas y se encuentra en fase de multiplicación.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, morfología, *Solanum tuberosum*, supervivencia

T1.16 Embriogénesis somática de híbridos de café en medios de cultivo líquido

Raúl Barbón^{1*}, Alina Capote¹, Manuel de Feria¹, Marta Turino, Maite Chávez¹, Elisa Quiala, Pedro Miranda².
*Autor para correspondencia.

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

²Estación Experimental Agroforestal de Jibacoa. Rincón Naranjo. Manicaragua. Villa Clara. Cuba. CP 54 590.

Debido al crecimiento de la demanda de plantas de café con alta calidad productiva y sanitaria se hace cada vez más necesario la aplicación de métodos biotecnológicos para el desarrollo de métodos de propagación eficientes en nuevos cultivares y híbridos. La presente investigación se realizó con el objetivo de estudiar la influencia de genotipos híbridos durante la fase de establecimiento, maduración y germinación de la embriogénesis en medios de cultivo líquido. Para

este estudio se utilizaron como material vegetal dos híbridos de café (434 y 80) obtenidos por métodos tradicionales. Para el establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas se partió de agregados celulares embriogénicos obtenidos a partir de callos con embriogénesis somática de alta frecuencia. Se empleó el medio de cultivo propuesto por Dufour para la fase de establecimiento y multiplicación; mientras que en la fase de diferenciación se utilizó el medio de cultivo propuesto por Zamarripa. Se observó a partir de los resultados que la masa fresca obtenida, que el híbrido de 434 tuvo una mejor respuesta al establecimiento y multiplicación de los agregados celulares embriogénicos. Se determinó un mayor crecimiento de la masa fresca durante la fase de establecimiento en el híbrido 434 con respecto al híbrido 80. En la fase de diferenciación de embriones somáticos la respuesta del híbrido 434 fue superior desde el punto cuantitativo. Se obtuvo un promedio de 932 ES/100ml; mientras que, en el híbrido 80 se obtuvo un promedio de 516 ES/100 ml. Además, fue notable la diferencia morfológica de los embriones somáticos de ambos híbridos. Los embriones somáticos del híbrido 434 se caracterizaban por ser embriones somáticos típicos, sin embargo, los embriones somáticos procedentes del híbrido 80 estaban engrosados y con un aspecto redondeado, en los cuales no se podía distinguir el polo apical y radicular.

Palabras clave: embrión somático, diferenciación, germinación, suspensión celular

T1.17 Caracterización de la diversidad genética de *Dioscorea alata* L. y producción de semilla biotecnológica en la región oriental de Cuba

Misterbino Borges García¹, Bernard Malaurie², Nora Scarcelli², Gemma Arnau³, Jean Louis Noyer⁴, Denis Filloux⁴, James Tregear², Louis Charles Demenoral⁵, Rafael Gómez Kosky⁶, Silvio Meneses Rodríguez¹, Juan J. Silva Pupo¹, Edil Estrada Abeal¹, Yanet Hernández Jerez¹, Aracelis Villavicencio⁷. *Autor para correspondencia.

¹Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Bayamo 85100 Granma, Cuba. e-mail: mborgesg@udg.co.cu

²Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR DIAPC, F-34 000 Montpellier, France.

³CIRAD Département BIOS/UR75, Station de Roujol 97 170, Petit Bourg, Guadeloupe, France.

⁴CIRAD, UMR 1096 PIA Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

⁵UMR-5253 ICGM Université de Montpellier 2, Montpellier, France.

⁶Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

⁷Biofábrica Granma. Bayamo 85100 Granma, Cuba.

La presente investigación tuvo como objetivos i)- caracterizar el germoplasma de *Dioscorea alata* en la región oriental de Cuba y efectuar un diagnóstico viral mediante la utilización de las técnicas moleculares más recientes, así como ii)- obtener una metodología de conservación y micropropagación que permita propagar material sano del clon Caraqueño. Diez accesiones representativas fueron caracterizadas mediante indicadores morfo-agronómicos y con el uso de cinco marcadores microsatélites específicos del género *Dioscorea*. El método Coating - PCR fue utilizado para detectar badnavirus; Coating RT-PCR para identificar potexvirus, potyvirus (YMV; YMMV) y potyvirus universal. Los análisis morfo-agronómicos permitieron determinar la existencia de seis fenotipos mientras que el análisis molecular realizado por primera vez en Cuba reveló la presencia de cuatro genotipos diferentes. Por primera vez en Cuba también se detectó la existencia de badnavirus. Se obtuvo una metodología completa para la propagación y conservación del clon Caraqueño la cual fue optimizada desde la fase de cultivo *in vitro* hasta la fase de campo. La metodología fue validada con éxito con relación a los estudios morfo-agronómicos, histológicos y moleculares, la cual no produce en las plantas provenientes del cultivo *in vitro* durante un primer y segundo ciclo de cultivo en campo, modificaciones morfo-agronómicas, histológicas, ni moleculares, con relación a las plantas procedentes de la propagación convencional. Esta metodología asegura también el buen estado fitosanitario del material vegetal, lo que permite que pueda ser aplicada en condiciones similares a otros clones. Este resultado ha sido introducido a escala productiva en la práctica socio – económica en la agricultura urbana y periurbana de la provincia Granma, lo que ha permitido el fortalecimiento de los subprogramas de la agricultura urbana: raíces y tubérculos tropicales. Actualmente se incrementa la producción de semilla biotecnológica a partir de ajustes y variantes complementarias aplicadas a partir de la tecnología de producción de plantas *in vitro* tales como el cultivo de las plantas aclimatizadas en

canteros semiprottegidos para la producción de tubérculos sanos, los cuales son empleados para aumentar el material de propagación *ex vitro* mediante la técnica de minisegmentos.

Palabras clave: conservación, cultivo *in vitro*, diagnóstico de virus, marcadores moleculares microsatélites, ñame, propagación

Characterization of the genetic diversity of *Dioscorea alata* L. and seed biotechnological production in the eastern region of Cuba

The present investigation had as objective i) - to characterize the *Dioscorea alata* germplasm in the eastern region of Cuba and to make a viral diagnosis by means of the use of the most recent molecular techniques, as well as ii) - to obtain a conservation and micropropagation methodology that it allows to spread healthy material of the clone Caraqueño. Ten representative accessions were characterized by means of morfo-agronomic indicators and with the use of five markers specific microsatellites of the genre *Dioscorea*. The Coating - PCR method was used to detect badnavirus and the Coating RT - PCR method to identify potexvirus, potyvirus (YMV; YMMV) and universal potyvirus. A complete methodology was obtained for the propagation and conservation of the clone Caraqueño which was optimized from the cultivation phase *in vitro* until the field phase. The methodology was validated with success with relationship to the morfo-agronomic, histological and molecular studies which doesn't produce in the plants coming from the *in vitro* culture during a first and second cultivation cycle in field, anything morfo-agronomical, histological, and molecular modifications, in comparison to the plants coming from the conventional propagation. This methodology also assures the good healthy state of the plant material, what allows that it can be applied under similar conditions to other clones. This result has been introduced to productive scale in the social and economic practical in the urban and periurban agriculture of the Granma Province, which has allowed the invigoration of the urban agriculture programmes: tropical roots and tubers. At the moment the production of biotechnological seed is increased starting from adjustments and complementary variants applied apart from the technology of *in vitro* plants production such as the cultivation of the acclimatized plants in soil with organic matter under greenhouse for the production of healthy tubers, which are employees to increase the propagation material *ex vitro* by means of the minicuttings technique.

Keywords: conservation, *in vitro* culture, microsatellites molecular markers, propagation, virus diagnose, yam

T1.18 Ozono como alternativa para la desinfección de explantes durante la propagación masiva in vitro de plantas

José Efraín González*, Manuel Cabrera Jova. *Author for correspondence

Instituto Nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP. 53000, Villa Clara, Cuba. e-mail: diagnostico@inivit.cu

El éxito de la micropropagación depende en gran medida de una eficiente técnica para la desinfección superficial y esterilización de los materiales vegetales a establecer *in vitro*. Los explantes empleados pueden contener a una amplia gama de contaminantes microbianos, fúngicos o bacterianos. La presencia de cualquier contaminante interfiere con el crecimiento de explante. Los explantes comúnmente se lavan en agua estéril, se enjuagan en etanol, y la superficie se esteriliza mediante el uso de productos químicos con base de cloro. Para materiales herbáceas se utilizan generalmente soluciones de calcio o de base de hipoclorito de sodio, 1.5% (v / v). El ozono es un poderoso desinfectante oxidante con una amplia gama de aplicaciones. La Organización Mundial de la Salud ha recomendado su uso y se aplica ampliamente en la desinfección del agua, los alimentos y los locales que requieren condiciones asépticas extremos, tales como salas de operaciones. En este trabajo se evaluó el ozono como una alternativa para la sustitución de hipoclorito de sodio en la desinfección de los segmentos nodales de ñame durante la etapa de establecimiento para la propagación de plantas *in vitro*. Se evaluó el efecto del ozono en la desinfección de ñame segmentos nodales en fase gaseosa y acuosa en comparación con hipoclorito de sodio. La inmersión de ñame segmentos nodales en agua que contiene ozono disuelto con una concentración de ozono de 1.0, 1.5 y 2.0 ppm durante 5 a 10 minutos dio los mejores resultados, el 100% de ñame segmentos nodales resultaron libres de contaminación microbiana y en días para la brotación (7.5), porcentaje de la brotación (88%), y el crecimiento de los brotes (4.81 cm), en comparación con el hipoclorito de sodio utilizado convencionalmente.

Palabras clave: Dioscorea, microorganismos, Ozono, propagación *in vitro*, segmento nodal

Ozone as an alternative for disinfection of explants during *in vitro* mass plant propagation

The micropropagation's success depends largely of an efficient technique for surface disinfection and sterilization of the plant materials to establish *in vitro*. Surface of plant parts carry a wide range of microbial contaminants fungal or bacterial. The presence of any contaminant will interfere with the growth of explant. The explants commonly are washed in sterile water, rinsed in ethanol, and surface sterilization is achieved by using chemical with chlorine base. Calcium or sodium hypochlorite base solutions, 1-5% (v/v) are usually used for soft herbaceous materials. Ozone is a powerful oxidant disinfectant with a wide range of applications. The World Health Organization has recommended its use and is widely applied in the disinfection of water, food and locals that require extreme aseptic conditions such as operating rooms. In this paper ozone was used as an alternative for replacing sodium hypochlorite in the disinfection yam nodal segments during the establishment stage for *in vitro* mass plant propagation. It was evaluate the ozone effect on disinfection yam nodal segments in gaseous and aqueous phase in comparison to sodium hypochlorite. The immersion of yam nodal segments in water containing dissolved ozone with an ozone concentration of 1.0, 1.5 and 2.0 ppm during for 5 to 10 minutes gave the best results, 100% yam nodal segments free of microbial contamination and in terms of sprouting initiation (7.5 days), sprouting percentage (88%), and sprouts growth (4.81 cm), in comparison to the conventionally used sodium hypochlorite.

Keywords: Dioscorea, *in vitro* propagation, microorganisms, nodal segment, Ozone

T1.19 Acción del PECTIMORF® en la micropropagación de la yuca (*Manihot esculenta*)

Lorenzo Suárez*, Ma Margarita Hernández, Miladys Sanchez. *Autor para correspondencia.

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. e-mail: lguerra@inca.edu.cu

El Pectimorf® es una mezcla de oligogalacturónidos (OG (DP 7-16)), es considerado un regulador de crecimiento no tradicional y es producido por el Departamento de Fisiología y Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Presenta la particularidad

de activar mecanismos de defensa y de modificación de los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas. Lo antes expuesto motivó el desarrollo del siguiente trabajo, cuyo objetivo fue evaluar la efectividad de esta sustancia, a emplearse como posible complemento o sustituto total de los reguladores del crecimiento empleados tradicionalmente en el medio de cultivo para la propagación *in vitro* de la yuca (*Manihot esculenta*, Crantz). Se demostró que el Pectimorf® induce y desarrolla la producción de yemas, crecimiento y enraizamiento de los brotes y la acumulación de carbohidratos en las raíces. Además, se demostró la estabilidad genética de las plantas *in vitro* a través de técnicas de análisis electroforético en extractos foliares. Los resultados contribuyen con el esclarecimiento de los mecanismos de acción de esta sustancia y su aplicación futura en las unidades biotecnológicas (biofábricas) de Cuba.

Palabras clave: Cassava, oligogalacturonidos, Pectimorf®

Actions of PECTIMORF® in the micropropagation of cassava

Pectimorf® is a mixture of oligogalacturonides (OG (DP 7-16)), is considered a non-traditional growth regulator and is produced by the Department Physiology and Biochemistry of the National Institute of Agricultural Sciences, has the particularity to activate defense mechanisms and modification of the processes of growth and development of plants. The above reason, the development of the next work, whose aim was to evaluate the effect of the Pectimorf® (mixture of Oligogalacturonides (DP 7 - 16)), in the culture medium employed for the micropropagation of the cassava, in order to substitute or to minimize the concentrations of auxina (NAA) and cytokinins (BAP). It was demonstrated that Pectimorf® induces production buds, growth of rooting and shoots and favored the accumulation of carbohydrates in the roots. Moreover, the genetic stability of the plantlets was demonstrated by electrophoretic analysis techniques leaf extracts. The results contribute to the elucidation of the mechanisms of action of this substance and its future application in biotechnological units (biofábricas) of Cuba.

Keywords: Cassava, oligogalacturonides, Pectimorf®

T1.20 Enraizamiento *in vitro* del cultivar de caña de azúcar 'C95-414' con el

bioestimulante cubano Fitomas – E y su desarrollo en la fase de aclimatización

Carlos Reyes Esquirol*, Mayra Jiménez Vázquez, Aydiloide Bernal Villegas J. L. Montes de Oca Suárez, José Ramón García Fardales. *Autor para correspondencia.

Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Centro. Autopista Nacional km. 246. Ranchuelo. Villa Clara. Cuba. *e-mail: fitomejoramiento@epica.vc.azcuba.cu

Se estudió el efecto de tres concentraciones de Fitomas-E (0.5, 1.0 y 1.5 ml l⁻¹ en el medio de cultivo en comparación con el ácido indolacético (AIA) (1.3 mg l⁻¹), sobre el enraizamiento *in vitro* y posterior aclimatización del cultivar de caña de azúcar 'C95-414'. Las variables evaluadas en ambas fases fueron: porcentaje de plantas enraizadas, número de raíces, longitud del tallo, la raíz y la hoja +1, número de hojas activas y masa fresca y seca de la planta. Los resultados demostraron las ventajas de este producto natural en relación con el AIA con las tres concentraciones ensayadas alcanzándose valores significativamente superiores en relación al control en porcentaje de plántulas enraizadas y longitud del tallo y de la hoja +1 de las mismas, lo que permitió que al ser trasplantadas a la fase de aclimatización tuvieran en mejores condiciones para enfrentar el cambio brusco de una fase a la otra. El resto de las variables medidas no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Estos resultados sugieren la conveniencia de sustituir el AIA por el Fitomas-E en el enraizamiento de cultivares de caña de azúcar como una alternativa en la sustitución de importaciones, añadiéndole al medio de cultivo preferiblemente 1.0 ml l⁻¹ de este bioestimulante.

Palabras clave: bioestimulante, cultivo *in vitro*, variedades

T1.21 Empleo del Sistema de Inmersión Temporal para la micropropagación del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB)

Milagros Basail Pérez*, Víctor Medero Vega, Marlenys Torres Delgado, Jorge López Torres, Arletys Santos Pino, Aymé Rayas Cabrera, Maricel Bauta Toledo, Yoel Beovidez García, Alexi Ortega Ortiz. *Autor para correspondencia.

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

El trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) con el objetivo de incrementar el coeficiente de multiplicación en el cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB) en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT). Se estudiaron diferentes tiempos de inmersión (10, 20 (control) y 30 minutos) y frecuencias de inmersión (3, 6 (control) y 8 horas) en frascos Nalgene de 10 L de capacidad, además, se estudió el volumen de medio de cultivo por explante (20, 40 (control) y 60 ml de medio de cultivo/explante), así como el tiempo de subcultivo (15, 18, 21 (control) y 25 días) y la densidad de explantes por frasco (20, 40 (control), 60 y 80 explantes/frasco de cultivo). Se utilizó el medio de cultivo de multiplicación MS con 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP; 3.5 mg l⁻¹ de AIA; 30.0 g l⁻¹ de sacarosa; 10.0 mg l⁻¹ de ácido ascórbico. Los resultados permitieron establecer una metodología para la micropropagación en el Sistema de Inmersión Temporal del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB) la cual consistió en utilizar un tiempo de inmersión de 10 minutos con una frecuencia cada tres horas, es decir, ocho inmersiones al día, además, para cada frasco de 10 L se inocularon 60 explantes y la renovación con 3 600 ml de medio de cultivo y un tiempo de cultivo de 18 días permitió alcanzar la mayor productividad del material vegetal en fase de multiplicación. Estos resultados, utilizando el Sistema de Inmersión Temporal permitieron establecer una metodología eficiente para la micropropagación del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB).

Palabras clave: frecuencia, inmersión, multiplicación, propagación *in vitro*, tiempo

Use of Temporary Immersion System for micropropagation of plantain cultivar 'INIVITPV-2011' (AAB)

This work was developed at the Plant Biotechnology Laboratory from the Research Institute of Tropical Root and Tuber Crops (INIVIT) in order to increase the multiplication coefficient in plantain cultivar 'INIVITPV-2011' (AAB) in Temporary Immersion Systems (TIS). Different immersion times (10, 20 (control) and 30 minutes) and immersion frequencies (3, 6 (control) and 8 hours) in 10 L Nalgene flasks, and culture medium volume per explants (20, 40 (control) and 60 ml culture medium/explants) were studied, as well as, subculture time (15, 18, 21 (control) and 25 days) and explants density per flask (20, 40 (control), 60 and 80 explants / culture flask). The multiplication culture medium

MS supplemented with 2.0 mg l⁻¹ 6-BAP, 3.5 mg l⁻¹ IAA, 30.0 g l⁻¹ sucrose, 10.0 mg l⁻¹ ascorbic acid was used. Results obtained allowed to establish a methodology for micro-propagation of plantain cultivar 'INIVITPV-2011' (AAB) in temporary immersion system, which consisted of using a 10 minute immersion time with 3 hour frequency (8 immersions per day). Besides, 60 explants were inoculated in each 10 L flask, and the renewal with 3 600 ml culture medium and 18 day culture time allowed obtaining the highest productivity in the multiplication stage. These results, using the temporary immersion system allowed establishing a method for micro-propagation of plantain cultivar 'INIVITPV-2011' (AAB).

Key words: frequency, immersion, multiplication, *in vitro* propagation, time

T1.22 Propagación masiva de microbulbos de *Lilium* var. Conca'dor por estimulación adventicia de microbulbos a partir de escamas y crecimiento de microbulbos en Biorreactores de Inmersión Temporal BIT®

Maritza Escalona¹, Yarianne Lezcano¹, Mariela Cid¹, Lelurlys Nápoles¹, Margarita García², Alfonso Herrera², Bárbara Companioni¹. *Autor para correspondencia.

¹Centro de Bioplasmas, Universidad Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: mescalona@bioplasmas.cu

²Laboratorio VITROALMA, México.

Los cultivares de *Lilium* son muy populares en algunos países de América, Europa y Asia a consecuencia de sus atractivas y hermosas flores. Los bulbos se producen comercialmente para la producción de flor cortada y plantas en maceta. La propagación *in vitro* a partir de escamas en medio de cultivo semi-sólido ha sido muy utilizada para la producción de plantas y la introducción de nuevas variedades. Con el objetivo de establecer un protocolo eficiente para la producción de bulbos se emplearon los Biorreactores de Inmersión Temporal. En la multiplicación de microbulbos se evaluó el tipo de explante (microbulbos, microbulbos seccionados y escamas inducidas) y la frecuencia de inmersión (2 y 4 F/día), así como el efecto de la frecuencia de inmersión (2, 4 y 6 F/Día) en la formación de microbulbos a partir de escamas previamente inducidas en medio de cultivo semisólido. En la fase de crecimiento de los microbulbos se evaluaron la frecuencia de inmersión (2, 4 y 6 F/día), el volumen de medio de cultivo (200, 400 y 600 ml) y la concentración de nitratos en el medio de cultivo MS (simple y doble) en la masa fresca de los microbulbos así

como en el número de escamas/microbulbo y otros indicadores morfológicos. En la fase de multiplicación, con el empleo de las escamas pre-inducidas 15 días en medio de cultivo semi-sólido a una frecuencia de cuatro veces al día (cada seis horas) se logró un 100% de respuesta de las escamas a la formación de microbulbos con un promedio de 4.6 microbulbos/escama. En la fase de crecimiento con el empleo de una frecuencia de inmersión cada 12 horas (2 F/día) se lograron incrementos significativos en el número y masa fresca de los microbulbos, así como en el número de escamas/microbulbos. De igual forma, un volumen de 600 ml con el doble de la concentración de los nitratos del medio de cultivo MS incrementó la masa fresca, la circunferencia de los microbulbos y el número de escamas/microbulbos.

Palabras clave: frecuencia, inmersión

The mass propagation of *Lilium* (Conca'dor variety) by stimulation of multiple adventitious bulb-scale formation and growing in Temporary Immersion Bioreactor BIT[®]

Lilium cultivars are very popular in some countries of America, Europe and Asia, mainly because of their large, attractive flowers. Bulbs are produced commercially for use in the cut-flower and potted-plant industries. Propagation *in vitro* of bulb-scales have been used to plant production and the introduction of new variety. Temporary Immersion Culture (BIT[®]) was used to established mass propagation of bulbs. Multiple adventitious bulb scales of *Lilium* were investigated. Type of explants (bulb, middle bulb and scales) and immersion frequency (2 and 4 F/day), as well as the effect of immersion frequency (2, 4 and 6 F/day) in the number of bulb scales differentiated from scale previously induced in semisolid medium were determined. In the bulbs growing phase, the immersion frequency (2, 4 and 6 F/day), the volume of culture medium (200 400 and 600 ml) and the concentration of nitrate in the MS medium (single and double) in the fresh mass and the number of scale /bulbs were determined. Multiple adventitious bulb scale of *Lilium* were optima using induced scales in semisolid medium as explants and a immersion frequency of every 6 hours (4 F/day), under this conditions 100 % of scale response to adventitious bulbs fomatión with a media of 4.6 bulbs/scale. In the growing phase, 2 F/day achieves to increase the number of fresh mass of bulbs. The use of a double concentration of nitrate and 600 ml of culture

media increase the size (circumference) and quality of the bulbs previous acclimatization.

Keywords: immersion, frequency

T1.23 Propagación *in vitro* de Cas (*Psidium friedrichsthalianum* (Niedenzu)

Lelurlys Nápoles Borrero¹, Mariela Cid Ruiz¹, José Luis Domínguez Álvarez², Danilo T. Pina Morgado¹, Reinaldo Trujillo Sánchez¹, Oscar Concepción Laffitte¹. *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: lnápoles@bioplasmas.cu

²Dirección de Centros Regionales, Universidad Autónoma Chapingo, México.

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es uno de los frutales tropicales de mayor importancia por el alto valor nutricional e industrial de sus frutos, el uso medicinal de sus compuestos y la creciente demanda en mercados nacionales e internacionales. Numerosos problemas afectan el cultivo del guayabo, sin embargo, resalta la incidencia de plagas y enfermedades como la mosca frutera y los nemátodos agalladores de raíces. Especies del mismo género del guayabo como el Arrayán (*Psidium sartorianum*) y el Cas (*Psidium friedrichsthalianum*) pueden ser utilizadas como portainjertos por su rusticidad y vigorosidad. La guayaba Cas, tiene además la característica de ser tolerante al ataque de los nemátodos y es difícil su propagación por semilla. La adecuación del protocolo de propagación *in vitro* del guayabo *P. guajava* cv. Enana Roja Cubana, desarrollado por el Centro de Bioplasmas a otras especies *Myrtaceae* con valor agregado como patrón o portainjerto constituyó el objetivo del presente trabajo. Se obtuvo el establecimiento *in vitro* satisfactorio de yemas apicales juveniles de las ramas de Cas (*P. friedrichsthalianum*), con el uso de hipoclorito de calcio al 1% durante 25 minutos. Se logró obtener un control adecuado de la contaminación microbiana y el 70% de los explantes establecidos mostraron bajos índices de oxidación fenólica. La aclimatización de los brotes enraizados en Cuba logró alcanzar un porcentaje de supervivencia del 77.0% para el Cas vegetativo, mientras que en las condiciones de México el porcentaje de supervivencia fue del 95.6% después de 30 días de aclimatización.

Palabras clave: guayabo, portainjerto, propagación *in vitro*

***In vitro* propagation of Cas (*Psidium friedrichsthalianum* (Niedenzu))**

Guava (*Psidium guajava* L.) are considered one of the most important tropical fruit crops because of high nutritional and industrial properties of its fresh fruits, medical uses and rising demand on national and international markets. Several problems affect guava cultivation, however, plague and diseases, such as "fly of fruits" and root nematode infestation, are the most frequent. Other species of the same guava genus can be used as grafts by their vigorous and robustly, they are Arrayan (*Psidium sartorianum*) and Cas (*Psidium friedrichsthalianum*). Guava Cas is tolerant to nematode attack and is reported difficult for seed propagation. To adequate of *in vitro* propagation protocols of guava (*P. guajava* cv. Enana Roja Cubana), developed by Bioplant Centre, to other species of *Myrtaceae* with high quality as grafts, like Cas (*P. friedrichsthalianum*), was the goal of this work. Suitable *in vitro* culture of apical fresh buds of Cas with adequate regulation of contaminants and 70% of explants with low index of phenolic compound presence was possible by the immersion of shoot from branches in sodium hypochlorite (1%) during 25 minutes. Acclimatization of shoots rooted reach 77.0% in Cuba while 95.6% was reached in Mexico after 30 days of culture.

Keywords: guava, graft, *in vitro* propagation

T1.24 Minitubérculos de ñame y su utilización en el programa de producción de semilla

Víctor R. Medero Vega^{1*}, Cristina Pérez Rodríguez², Allán Ramírez Diéguez², Daniel Rodríguez Pérez¹, Milagros Basail Pérez¹, Aymé Rayas Cabrera¹, Jorge López Torres¹, Arletys Santos Pino¹, Yoel Beovides García¹, Marlenys Torres Delgado¹, Ania Robaina Jiménez¹, Yanelis Bravo Corrales¹ y Carmen Pons Pérez¹. *Autor para correspondencia.

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

²Empresa Productora y Comercializadora de Semillas, Biofábrica de Villa Clara. Carretera a Maleza, km 2 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

En la Red Nacional de Biofábricas se trabaja en la aplicación de la metodología de micropropagación del ñame (*Dioscorea rotundata* Poir) para garantizar un material de plantación de alta calidad genética y fitosanitaria que permita el desarrollo del cultivo en el país. La producción de plantas *in vitro* de ñame se ha logrado de forma satisfactoria y la metodología funciona sin

dificultades, pero la adopción de este tipo de material de plantación no ha sido la esperada debido a que durante su trasplante a campo se pierde hasta un 60%. Por tal motivo, se realizó una investigación para lograr la producción de minitubérculos durante la fase de aclimatización, como una alternativa en el programa de producción de semilla. En la Biofábrica de Villa Clara se realizaron varios experimentos con el clon 'Blanco o Ñame de Guinea'. Se utilizaron bolsas de polietileno con un sustrato formado por estiércol vacuno bien descompuesto y libre de nemátodos. Se evaluó el coeficiente de ahijamiento y se realizaron cortes de esquejes de una y dos yemas. Los minitubérculos cosechados por bolsa se clasificaron según su masa fresca y tamaño en cuatro calibres (1 de 6 a 10g, 2 de 11 a 29g, 3 de 30 a 59g y 4 con más de 60g). Estos minitubérculos fueron plantados nuevamente en bolsa y además, se evaluó la respuesta agronómica en campo. El mejor resultado en cuanto a supervivencia se alcanzó con el calibre cuatro (100%), seguido del calibre tres (95%); calibre dos (87%) y un 69% con el calibre uno. En condiciones de campo las plantas procedentes de minitubérculos mostraron una mejor respuesta en cuanto a porcentaje de brotación y rendimiento en relación con las plantas producidas *in vitro*. Desde el 2011 las Biofábricas comercializan los minitubérculos como material vegetal de plantación dentro del programa de producción de semilla.

Palabras clave: material de plantación, minitubérculos, ñame, plantas *in vitro*

Yam minitubers for seed production program

In the National Biofactory Network, a micropropagation methodology of yam (*Dioscorea rotundata* Poir) is being applied to ensure a planting material of high genetic and phytosanitary quality so as to enable crop development in the country. *In vitro* production of yam plants has been achieved successfully and the methodology works efficiently, but the adoption of this type of planting materials has not been as expected because during field transplanting, up to 60% is lost. Therefore, an investigation was carried out to achieve the mini-tuber production during the acclimatization phase, as an alternative in the seed production program. In Villa Clara Biofactory several experiments with clone 'Blanco or Ñame de Guinea' were performed. Polyethylene bags with free nematode substrate consisting of well decomposed cow dung were used. The shooting coefficient was evaluated and stem cuts of one or two buds were

carried out. Harvested minitubers per bag were classified into four groups according to their fresh mass and seed size (1: from 6 to 10g, 2: from 11 to 29g, 3: from 30 to 59g and 4: more than 60g). Minitubers were planted again in bags and besides, the agronomic response was evaluated. The best result in terms of survival was achieved with size 4 (100%), followed by size 3 (95%), size 2 (87%) and size 1 (69%). Under field conditions, plants from minitubers showed a better response in terms of sprouting percentage and yield relative to *in vitro* grown plants. Since 2011, biofactories have commercialized minitubers as planting material within the seed production program.

Keywords: planting material, minitubers, yam, *in vitro* plants

T1.25 Metodología para la producción de explantes de malanga (*Colocasia esculenta* Schott) clon 'INIVIT MC-2001'

Diosdada Galvez*, Sergio Juan Rodríguez, Manuel Cabrera, Yoel Beovides, Ania Robaina, Daniel Rodríguez. *Autor para correspondencia.

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. e-mail: propag.biotec@inivit.cu

La malanga es un cultivo valioso y estratégico a desarrollar en el país, por lo que se necesita de nuevos clones y propágulos de calidad. La producción de material vegetal de plantación por métodos biotecnológicos puede contribuir a cumplir con esa demanda. Se evaluaron seis métodos de desinfección de los ápices de las yemas axilares. En la fase de establecimiento se evaluó la influencia de la concentración de 6-BAP, en la fase de multiplicación la influencia del tipo y concentración de reguladores de crecimiento y el efecto del estado físico del medio de cultivo, así como el efecto de tres sistemas de cultivo semiautomatizados sobre el coeficiente de multiplicación. La estrategia para el establecimiento y multiplicación de explantes en el nuevo clon de malanga *Colocasia esculenta* 'INIVIT MC-2001' permitió incrementar el número de ellos con calidad fisiológica y sanitaria a entregar a las biofábricas, con un 85.38% de eficiencia en el establecimiento de los ápices de las yemas axilares cuando se desinfectaron los cormos con hipoclorito de sodio al 3.0% durante 25 minutos. Con el medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS y 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP en la fase de establecimiento, se logró a los 29 días de cultivo, que el 100% de los explantes presentaran las características morfofisiológicas

necesarias para ser transferidos a la fase de multiplicación. En esta última fase al emplear el medio de cultivo con 4.0 mg l⁻¹ de 6-BAP y en estado semisólido en los tres subcultivos, se logró un coeficiente de multiplicación promedio de 3.7. Para incrementar la multiplicación de los explantes y las entregas a las biofábricas, se definió emplear sistemas de inmersión temporal o de inmersión constante con aireación al medio de cultivo.

Palabras clave: desinfección, SIT, 6-BAP

T1.26 Evaluación en campo de la estabilidad genética de plantas de banano (*Musa* spp.) cv. 'FHIA-18' (AAAB) regeneradas por organogénesis directa con reguladores del crecimiento no tradicionales

Humberto Izquierdo*, María C. González¹, Miriam de la C. Núñez¹, Luis Pérez², Eduard Pinzón³, Souresh Algoe³, Ruth Proenza², Juan C. Cabrera⁴. *Autor para correspondencia.

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Carretera a Tapaste km 3.5 San José de las Lajas, Mayabeque. Cuba. CP 32 700. e-mail: hioviedo@inca.edu.cu

²Biofábrica de Semillas. San José de las Lajas. Mayabeque. Cuba.

³Facultad de Agronomía. Universidad Agraria de La Habana (UNAH). San José de las Lajas, Cuba.

⁴Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix (FUNDP), Namur, Bélgica.

El trabajo se realizó con el objetivo de evaluar en campo la estabilidad genética de plantas de banano (*Musa* spp.) cv. 'FHIA-18' (AAAB) regeneradas por organogénesis directa con reguladores del crecimiento no tradicionales (análogo de brasinoesteroides y mezcla de oligogalacturónidos). Para este estudio se plantaron 3 200 plantas y se utilizaron como control 800 plantas obtenidas por organogénesis con los reguladores del crecimiento tradicionales (AIB, AIA y 6-BAP) e igual cantidad procedente de semilla asexual (cormo). La distancia de plantación fue 3.0 x 3.0 x 1.20 m. Se realizaron cuatro repeticiones en un diseño experimental de Bloques al Azar. Las evaluaciones se realizaron a los 180, 300 y 600 días a través de los caracteres morfológicos y agronómicos de mayor aporte a la detección de la variabilidad genética. Los resultados mostraron alta estabilidad genética en las plantas obtenidas por organogénesis directa con el análogo de brasinoesteroides (Biobras-6) y la mezcla de

oligogalacturónidos (Pectimorf), dado por el bajo porcentaje de variación somaclonal (0.12%). El peso del racimo, el número de manos y de frutos (evaluación de los caracteres agronómicos) no presentaron diferencias estadísticas entre las plantas procedentes del cultivo *in vitro*, pero sí con respecto a las plantas de semilla asexual. Los resultados de este trabajo pudieran validar la organogénesis directa con el empleo del Biobras-6 y el Pectimorf en todas las fases para la propagación masiva del clon de banano (*Musa spp.*) 'FHIA-18' (AAAB).

Palabras clave: análogo de brasinoesteroides, caracteres morfológicos y agronómicos, cultivo *in vitro*, mezcla de oligogalacturónidos, variación somaclonal

The work was carried to evaluate the genetic stability in banana (*Musa spp.*) plants 'FHIA-18' (AAAB) clone regenerated by direct organogenesis with no-traditional growth regulators (brassinosteroids analogue and oligogalacturonides mixture). A number of 3 200 plants were planted and 800 plants obtained by organogenesis with traditional growth regulators (IBA, IAA and 6-BAP) and same quantity coming from asexual seeds were used as control for this study. The plantation distance of 3.0 x 3.0 x 1.20 m. Four repetitions were carried out in a Random Blocks experimental design. Evaluations were made at 180, 300 and 600 days through out morphological and agronomic characters of more contribution to detection of genetic variability. Results showed high genetic stability in plants obtained by direct organogenesis with the brassinosteroids analogue (Biobra-6) and the oligogalacturonides mixture (Pectimorf), given by the low percentage of somaclonal variation (0.12%). The bunch weigh, number of hands/bunch and number of fruits/hands (evaluation of the agronomic characters) did not present statistical differences among the plants coming from the *in vitro* culture, but some differences were observed when compared to plants from asexual seeds. Results of this work validate direct organogenesis with the employment of Biobras-6 and Pectimorf in all the phases for the massive propagation of banana (*Musa spp.*) 'FHIA-18' (AAAB) clone.

Key words: brassinosteroids analogue, morphological and agronomic characters, *in vitro* culture, oligogalacturonides mixture, somaclonal variation

T1.27 Estrategias para la conservación de semilla de papa

Felipe Jiménez-Terry*, Daniel Agramonte, Marta Pérez, Mileidy León-Miranda, Mayelin Rodríguez, Mariana La O, Mayra Acosta-Suárez, Yelenys Alvarado-Capó, Michel Leiva-Mora. *Autor para la 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

La conservación de los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) obtenidos por métodos biotecnológicos en Cuba se efectúa en condiciones de baja temperatura por un tiempo aproximado de ocho meses. Sin embargo, el alto consumo energético, las pérdidas postcosecha y la necesidad de disponer de alternativas para la conservación que puedan ser factibles para productores locales han llevado a valorar la posibilidad de conservar los tubérculos por cortos períodos de tiempo sin necesidad de refrigeración. Se podría, incluso, realizar dos ciclos de producción en una misma campaña. Es por ello, que este trabajo se realizó con el objetivo de elaborar una estrategia para la conservación de los tubérculos con categoría de semilla producidos en casas de cultivo y campo. Se establecieron como tratamientos dos condiciones generales de conservación, una en cámara refrigerada y otra en un área con ventilación natural. En ambas se colocaron tubérculos que fueron cubiertos superficialmente con zeolita previo a su almacenamiento. Como control se emplearon tubérculos a los cuales no se les aplicó zeolita. Durante el periodo se registraron indicadores de calidad de los tubérculos, porcentaje de pérdidas de tubérculos y porcentaje de pérdida de masa a los ocho meses de conservación. En el caso de las condiciones de almacenamiento con ventilación natural se también se determinó el estado de los tubérculos a los dos, cuatro y seis meses de conservación..

Como resultado de la investigación se determinó una estrategia de conservación de la semilla biotecnológica de papa, la cual consiste en utilizar dos alternativas dependientes de la capacidad, tiempo de conservación y volumen de tubérculos como factores principales. Las alternativas de conservación de los tubérculos semilla son: conservación de la semilla biotecnológica de papa durante 8 meses en cámara refrigerada con el uso de zeolita en polvo aplicada a los tubérculos y conservación en área de condiciones ambientales semicontroladas y ventilación natural durante 2 o 4 meses. Los resultados de esta investigación demostraron que fue posible conservar minitubérculos de papa en

áreas con ventilación natural lo cual constituye una alternativa que puede reducir el gasto energético en el programa de producción de semilla de este tubérculo. La calidad en la conservación de los minitubérculos de papa producidos en casas de cultivo con sustrato zeolita 100% permite disponer de la semilla biotecnológica de este cultivo para las plantaciones posteriores con elevados índices de brotación y rendimiento en campo

Palabras clave: cámara refrigerada, *Solanum tuberosum*, zeolita

T1.28 Empleo de técnicas biotecnológicas para la producción de semilla de papa en Cuba

Manuel de Feria^{1*}, Daniel Agramonte¹, Felipe Jiménez-Terry¹, Novisel Veitía¹, Michel Leiva-Mora¹, Naivy Pérez-Alonso¹, Elio Jiménez, Yelenys Alvarado-Capó¹, Janet Igarza², Zoe Sarria¹, Marta Pérez¹, Mayra Acosta-Suárez¹, Miladys León¹, Leyanes García-Águila¹, Maité Chávez¹, Elisa Quiala¹, Alina Capote¹, Raúl Barbón¹, Blanca Pérez¹, Osvaldo Fernández¹, Tatiana Pugh³, Miguel Pérez⁴ y Mario San Roman⁴
*Autor para la 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: mdeferia@ibp.co.cu

²Laboratorio de Biotecnología Vegetal (CITMA), Holguín, Cuba.

³Escuela Socialista de Agricultura Tropical (INIA), Maracay, Venezuela.

⁴Laboratorio Cultivo de Tejidos y el Campo Experimental de Mucuchíes (INIA). Mérida, Venezuela

En Cuba la producción de papa se limita al período invernal, cada año se importan miles de toneladas de semilla y el país invierte por este concepto varios millones de dólares, sin que esto garantice la calidad fitosanitaria, ni elevados rendimientos. Con el objetivo de dar respuesta a esta problemática, el Instituto de Biotecnología de las Plantas de conjunto con empresas del Ministerio de la Agricultura y varios centros de investigación dentro y fuera del país, han desarrollado estudios y experiencias dirigidos a la obtención de semilla con garantías genéticas y fitosanitarias. La aplicación de un riguroso sistema de selección en campo y diagnóstico de las principales enfermedades del cultivo, garantizó la producción a escala comercial de plantas *in vitro* como material vegetal de plantación para su siembra tanto en casas de

cultivo como en campo. Esta experiencia permitió obtener como promedio cuatro minitubérculos por planta, con más del 75% con características que les confieren la categoría de semilla. Las plantas *in vitro* también fueron empleadas para la producción de microtubérculos en sistema de cultivo basados en la inmersión temporal de los explantes en medio de cultivo líquido, con lo cual se logró un salto cualitativo y tecnológico en la producción de material vegetal de plantación. Con este sistema de cultivo y en dependencia de la variedad, se obtienen como promedio entre 3.5 y 4.5 microtubérculos por planta. El 90% de estos con un diámetro mayor a 4.0 mm y masa fresca superior a 0.5 g, características que permiten su conservación en frío durante ocho meses y su plantación tanto en casas de cultivo como en campo donde el rendimiento promedio ha sido entre 5.0 a 6.0 minitubérculos por planta lo cual superó los resultados obtenidos al sembrar plantas producidas *in vitro*. Al mismo tiempo, durante varias campañas de producción se evaluó la multiplicación de esta semilla en campo y finalmente en la campaña 2012-2013 se constató la respuesta en condiciones de producción de semilla con tres multiplicaciones en campo, con un rendimiento promedio de las cuatro variedades en estudio de 26.0 t ha⁻¹. Los análisis realizados desde el punto de vista económico, validan la factibilidad de este esquema para su introducción a la producción, al tiempo que se continúan estudiando y evaluando nuevas propuestas para su aplicación y fomento a escala local con base en el empleo de microorganismos promotores del crecimiento vegetal para la obtención de tan preciado tubérculo.

Palabras clave: inmersión temporal, microtubérculos, minitubérculos, *Solanum tuberosum*

T1.29 Respuesta de plantas *in vitro* de papa en casa de cultivo con sustrato de zeolita

Mariana La O, Felipe Jiménez-Terry*, Daniel Agramonte, Marta Pérez, Mayelin Rodríguez, Miladys León, Manuel de Feria, Yelenys Alvarado-Capó. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54 830. e-mail: felipe@ibp.co.cu

El esquema de producción de semilla de papa desarrollado en el Instituto de Biotecnología de las Plantas por métodos biotecnológicos, comprende entre sus variantes, la siembra directa en campo de plantas producidas *in vitro*

previamente aclimatizadas. Esta variante ha presentado como principales debilidades, las pérdidas y daños que sufren las plantas durante el proceso de traslado hasta las áreas de producción y la supervivencia en estas condiciones. Con el objetivo de buscar alternativas que permitieran disminuir estas pérdidas, se propuso evaluar la supervivencia y respuesta de estas plantas producidas *in vitro* a partir de su siembra directa en casas de cultivo utilizando zeolita como sustrato, a partir de la posibilidad de mejorar la incidencia de la temperatura, la intensidad luminosa y la humedad como factores determinantes en las primeras semanas de cultivo. De una parte, se tomaron plantas procedentes de la fase de enraizamiento *in vitro* y se sembraron directamente en casas de cultivo y otras se sembraron en contenedores para su aclimatización antes de realizar su plantación directa en campo. En ambos tratamientos, se cuantificaron las pérdidas relacionadas con el traslado de las plantas y su supervivencia en las dos primeras semanas de cultivo y se evaluó además, al final del proceso el número y masa fresca de los minitubérculos obtenidos por planta. Se pudo comprobar que el número de tubérculos y las pérdidas totales fueron menores en las casas de cultivo con respecto al campo. Estos resultados demostraron que es posible realizar la siembra directa en casas de cultivo de plantas producidas *in vitro* sin que medie un proceso de aclimatización y endurecimiento previo, como ocurre en la plantación directa a campo.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, sustrato, supervivencia, propagación *in vitro*

T1.30 Respuesta morfológica y agronómica en casa de cultivo de plantas cultivadas *in vitro* dos variedades de papa cubanas

Novisel Veitía^{1*}, Adriana Rea Guanoluisa², Amanda Martirena-Ramírez¹, Carlos Romero¹, Miladys León¹, Ortelio Hurtado^{1*} Autor para la correspondencia.

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

²Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas.

El empleo de cultivares de papa cubanos para la producción de semilla original mediante métodos biotecnológicos contribuye a disminuir las importaciones por el concepto de compra de semilla. El presente trabajo se realizó con el

objetivo de determinar la respuesta morfológica y agronómica de plantas cultivadas *in vitro* de los cultivares de papa cubanos 'Grettel' y 'Yara' procedentes del programa de mejoramiento genético del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, las cuales fueron plantadas en casa de cultivo. Se midió la altura de las plantas y el número de tallos por planta. Posteriormente, en el momento de la cosecha se cuantificó el número, masa fresca y calibre de los tubérculos por planta. Además, se evaluó la forma de los tubérculos y el color de la piel en cada cultivar. Como resultado se logró la producción de semilla original de dos cultivares cubanos incluidos en el programa nacional de producción de semilla. Se constataron diferencias morfológicas entre ambos cultivares cultivadas en casa de cultivo a partir de plantas obtenidas *in vitro*. El cultivar 'Grettel' presentó el mayor número de tubérculos por planta pero de menor calibre que los de la 'Yara'. Estos resultados contribuyen a la planificación de la producción de semilla original de papa de ambos cultivares mediante métodos biotecnológicos.

Palabras clave: categoría de semilla, *Solanum tuberosum*, tubérculos

Morphological and agronomic response in greenhouse of *in vitro* plantlets of two Cuban potato cultivars

The use of Cuban potato cultivars for the production of basic seed by biotechnological methods helps reduce imports by the concept of buying seed. The present study was conducted to determine the morphological and agronomic response of plantlets of two varieties of Cuban potato. This potato plants grown *in vitro* of 'Grettel' and 'Yara' varieties from the breeding program of the National Institute of Agricultural Sciences (INCA) which were planted in the greenhouse were used. The plant height and number of stems per plant was measured. Subsequently at the time of harvest the number, weight and size of the tubers per plant was quantified. Furthermore the form of tubers and the skin color in each variety was evaluated. As a result the production of basic seed of two Cuban varieties included in the national seed production program was achieved. Morphological differences between varieties of Cuban potato 'Yara' and 'Grettel' in greenhouse from *in vitro* plantlets were found. The variety 'Grettel' had the highest number of tubers per plant but smaller calibre than the 'Yara'. These results allow to the production plan of basic seed potatoes of two varieties by biotechnological methods.

Keywords: seed category, *Solanum tuberosum*, tubers

T1.31 Metodología para la propagación masiva de *Aloe vera* L.

Alina Capote*, Naivy Pérez-Alonso, Anabel Pérez, Elio Jiménez. *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: alina@ibp.co.cu

Aloe vera L. Burm tiene una gran demanda en la industria medicinal y de cosméticos. Los compuestos extraídos de sus hojas poseen propiedades excepcionales que los hacen indispensables en la elaboración de productos terapéuticos nutricionales y de belleza. La propagación por hijuelos de esta especie no satisface el mercado nacional debido a su lento desarrollo, de ahí la necesidad de utilizar el cultivo *in vitro* como alternativa para su propagación. Con este objetivo, se desarrolló una metodología que abarcó el establecimiento *in vitro*, la multiplicación en medios de cultivo semisólidos y en sistemas de inmersión temporal (RITA) hasta su desarrollo en casa decultivo y su posterior siembra en condiciones naturales. Los resultados mostraron que se logró el establecimiento *in vitro* de ápices con un 93% de explantes libres de contaminantes. En la fase de multiplicación los mejores resultados se alcanzaron con 6-BAP y AIB, con lo cual se obtuvo un coeficiente de multiplicación de 5.1. Como alternativa para reducir los costos y mejorar la calidad de las plantas se utilizaron los sistemas de inmersión temporal (RITA) en el último subcultivo de multiplicación, lo que permitió un incremento en el coeficiente de multiplicación (7.5). Durante la fase de aclimatización el 100% de las plantas sobrevivió y el mayor crecimiento se obtuvo con el sustrato que contenía el 100% de Compost de cachaza. En condiciones naturales el crecimiento y desarrollo de estas plantas fue superior a las plantas procedentes del método de propagación tradicional. Los resultados permiten disponer de un sistema de propagación factible para la producción masiva de plantas de sábila mediante el cultivo *in vitro*.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, planta medicinal, RITA, sábila

T1.32 Cálculo y registro de los costos de producción *in vitro* bajo la tecnología de embriogénesis somática en el Instituto de Biotecnología de las Plantas

Geidy Camacho Damas^{1*}, Annie Martínez Pérez¹, Lismary Rodríguez Milián¹, Leidy Boada Turiño¹, Patricia Díaz Caballero², Marili Martín García³. *Autor para correspondencia. e-mail: geidy@ibp.co.cu

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.

²Facultad de Ciencias Económicas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba, CP 54 830.

³Dirección de Economía, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km.5, Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

La propagación de plantas *in vitro* forma parte de la aplicación de la Biotecnología en la agricultura moderna. La embriogénesis somática es un sistema de regeneración de plantas más eficiente por su alto coeficiente de multiplicación y aumento de los niveles de producción en las Biofábricas. Sin embargo, es necesario conocer el costo real de las producciones con la mayor exactitud y rapidez, como base indispensable para el análisis de la eficiencia productiva. Es por ello, que esta investigación tuvo como objetivo establecer un sistema de cálculo y registro de los costos de producción bajo la tecnología de embriogénesis somática para la propagación de plantas de plátano en la Biofábricas del Instituto de Biotecnología de las Plantas. Para dar cumplimiento al objetivo se estudiaron las características del proceso productivo como parte de un procedimiento biológico y su incidencia en el procesamiento de la información contable. El cálculo del costo de la producción se realizó a partir de la información primaria registrada en modelos habilitados para cada fase por las que transita la producción. Como resultado se establecieron nuevos centros de costos para identificar los gastos de producción en cada una de las fases del proceso productivo, así como la creación de las cuentas contables de producción terminada, producción en proceso, gastos asociados a la producción y costos de ventas. Estos elementos se conformaron según lo establecido por la resolución 354/2013 del Ministerio de Finanzas y Precios de Cuba. La elaboración del 'Registro de Producción en Proceso' brindó la información para realizar el cálculo del costo real de producción utilizando los

cinco pasos establecidos para los sistemas de costos por procesos, lo que permitió conocer el costo real de una planta *in vitro* teniendo en cuenta las características que imprime la embriogénesis somática, como parte de un proceso biológico.

Palabras clave: biofábricas, costo, embriogénesis somática, plantas *in vitro*

T1.33 Propagación comercial de cultivares de *Musa* sp. a través de la tecnología de embriogénesis somática y su beneficio para la agricultura

Leyanes García-Águila*, Zoe Sarria, Alexis Rodríguez, Blanca Pérez, Miladys León, Zaida Pérez, Maritza Reyes, Miguel Suárez, Deivis Mirabal, Michel Chamizo. *Autor para correspondencia: e-mail: leyanis@ibp.co.cu

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.

Los resultados científicos obtenidos en el IBP sobre embriogénesis somática en *Musa* sp. hacen de este sistema de regeneración una alternativa eficaz para la propagación de plantas a escala comercial. Es por ello, que este trabajo tuvo como objetivo mostrar los avances en el desempeño de estos resultados a partir de la ejecución de un contrato para la propagación comercial de un millón de plantas de diferentes cultivares de *Musa*. Para ello, se implementaron aspectos relacionados con la organización del proceso productivo en la Biofábrica, unido a la capacitación del personal técnico y especialista a través del desarrollo de cursos teórico-práctico. Además, se elaboró un sistema de cálculo y registro de los costos de producción bajo la tecnología de embriogénesis somática. Los resultados mostraron que se requiere de la introducción mensual de flores masculinas, las cuales forman callos con estructuras embriogénicas empleados en el establecimiento de suspensiones celulares. Esto ha permitido la formación mensual de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido de las cuales se obtuvo plantas enraizadas que posteriormente se transfirieron a la casa de cultivo para su aclimatación. El desarrollo del proceso productivo ha permitido la disponibilidad 380 000 plantas a partir de los embriones germinados, las cuales se encuentran 12 hectáreas sembradas en campo.

Palabras clave: embriones somáticos, germinación, propagación

T1.34 Propagación *in vitro* de *Annanas comosus* L. Merr para la renovación de plantaciones comerciales

Zoe Sarria Hernández, Leyanis García-Águila,* Zaida Pérez, Miladys León, Amado Pérez Ortelio Hurtado, Blanca Pérez, Marlon Mesa, Tereza Salbarria, Yudit Sánchez, Lisvey Concepción, Elizabeth Peralta, Eloisa Rodríguez, Alexis Rodríguez, Deivis Mirabal. *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: leyanis@ibp.co.cu

La propagación *in vitro* de la piña ofrece a los productores la posibilidad de introducir rápidamente nuevas variedades de alta calidad genética por su rendimiento y fitosanitaria por estar libre de plagas y enfermedades. Además, de la obtención plantas en cualquier época del año por el trabajo en condiciones controladas. Teniendo en consideración estos aspectos, este trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de piña que comprendiera desde la selección de las planta donante en campo hasta la aclimatación de las plantas en casa de cultivo. Para ello, se seleccionaron vástagos de plantas con producción alta y estable, de notable vigor y calidad sanitaria. Se realizó la extracción y desinfección de las yemas axilares con una solución de hipoclorito de sodio al 2.0% durante 15 minutos. La siembra de las yemas se realizó en tubos de cultivo que contenían 10 ml de medio de cultivo en estado líquido. Estos se colocaron en cámaras de crecimiento con luz solar, los brotes de las yemas axilares estuvieron listos para iniciar la multiplicación a los 40 días. Los subcultivos se realizaron cada 30 días. Previo a la fase de enraizamiento se empleó un medio de cultivo para estimular el crecimiento de los brotes, luego se transfirieron las plantas a la fase enraizamiento, se separó cada brote individual, se clasificaron por tamaño y se colocaron en frascos que contenían medio de cultivo en estado líquido. A los 35 días se realizó la siembra de las plantas en contenedores que contenían un sustrato compuesto por humus de lombriz (75 %) y zeolita (25%). Se realizaron dos aplicaciones de fertilizantes nitrogenados semanales hasta los 90 días y una semanal de fórmula completa antes de su traslado a campo, cuando las plantas alcanzaron una altura superior a 6 cm, más de seis hojas desarrolladas

y diámetro del tallo entre ≥ 1.5 mm fueron trasladadas a campo.

Palabras clave: aclimatización, piña, subcultivos

T1.35 Respuesta de plantas de fresa cv. 'Oso grande' en casa de cultivo

Ortelio Hurtado Ribalta

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: ortelio@ibp.co.cu

Las principales variedades de fresa se han desarrollado en zonas templadas y zonas frías de montañas. Aunque, a partir de diferentes trabajos de mejoramiento y selección se han obtenido variedades adaptadas a zonas tropicales, en Cuba requieren temperaturas medias de 20 a 25°C para su cultivo. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la respuesta de plantas de fresa cv. 'Oso grande' en casa de cultivo durante un año. Se utilizó un invernadero tipo túnel, el cual presenta una estructura de acero galvanizado, cubierta con rafia, malla de sombreo 70%, extractores y control ambiental (ambitrol 100). La distancia de siembra empleada fue de 40 x 30 cm y el riego se realizó dos veces al día durante dos minutos. Durante el cultivo se evaluó el número de flores, número de frutos, estolones y el rendimiento productivo por planta. Los resultados muestran una producción de 14.61 kg, la cual es significativa para la venta de fruta fresca fuera de época al mercado. Además, brinda la posibilidad de producir fresa en Cuba en casa de cultivo en temporadas de verano donde las temperaturas son superiores a las requeridas por este cultivo para su fructificación y posterior desarrollo del fruto. Se comprobó que las plantas lograron desarrollar los frutos a pesar de las temperaturas elevadas con un adecuado manejo de las condiciones de la casa de cultivo.

Palabras clave: flores, fructificación, frutos

T1.36 Cultivo *in vitro* de tres cactáceas endémicas de Cuba en peligro de extinción

Elisa Quiala^{1*}, Grecia Montalvo², Jesús Matos², Reynaldo Mederos², Maité Chávez¹, Hernán Morfi², Raúl Barbón¹, Manuel de Fera¹, Alina Capote¹, Naivy Pérez-Alonso¹, Miladys León¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Cuba. e-mail: elisa@ibp.co.cu

²Empresa nacional para la Protección de la Flora y la Fauna Villa Clara.

Cuba posee una de las floras insulares más ricas del mundo, pero al igual que la gran mayoría de los países del trópico presenta problemas con la destrucción de sus ecosistemas naturales y más de 1 000 especies corren determinados riesgos a corto o mediano plazo. Ante estos datos, se impone la necesidad de tomar medidas y desarrollar estrategias encaminadas a contrarrestar la pérdida de la biodiversidad vegetal. Este trabajo resume más de 12 años de investigaciones encaminadas a la conservación de la flora endémica de la región central de Cuba. El principal objetivo fue desarrollar metodologías de micropropagación que contribuyeran al incremento del número de posturas de tres especies en peligro de extinción endémicas de la región central y cuya propagación por vías tradicionales ha sido infructuosa. Se obtuvo una metodología para la propagación *in vitro* de *Pilosocereus robinii*, *Pilosocereus* sp. y *Melocactus actinacanthus*, tres especies cactáceas que habitan en manigua costera y los cerros de Pelo Malo y Agabama, respectivamente. Por primera vez se logra el cultivo *in vitro* de estas especies endémicas en peligro de extinción y se describe una estrategia que permite incrementar el número de posturas conservando la diversidad genética natural. Las plantas propagadas *in vitro* de las tres especies de cactáceas permitieron reforzar poblaciones naturales dentro del área protegida 'El recreo' de la Empresa Nacional para la Conservación de la Flora y la Fauna de Villa Clara. Además se aportaron un total de dos nuevas especies al Jardín Botánico de la UCLV.

Palabras clave: conservación de biodiversidad, cactus, cultivo de tejidos, especie amenazada.

***In vitro* culture of three endemic and endangered species of Cuban flora**

Cuba has one of the richest island floras in the world, but like the majority of tropical countries have problems with the destruction of natural ecosystems and more than 1 000 species are threatened in the short or medium term. Furthermore, it is urgent to take action and develop strategies to counteract the loss of plants biodiversity. This paper summarizes over 12 years of research work for the conservation of the

endemic flora of central Cuba. The aim of this work was to increase the number of plants of three endemic species in extinction danger which propagation by traditional propagation technique has been unsuccessful. A methodology for the *in vitro* propagation of *Pilosocereus robinii*, *Pilosocereus sp.* y *Melocactus actinacanthus* was developed. For the first time the *in vitro* culture of these endangered endemic species were achieved. Also a strategy to increase the number of plants conserving the natural genetic diversity is described. The *in vitro* propagated plants of the three species of cacti were used for reinforce the natural populations within the protected area "El Recreo" localized in the National Company for the Conservation of Flora and Fauna of Villa Clara, Cuba. In addition a total of two new species were provided to the Botanical Garden of the Central University of Las Villas.

Key words: biodiversity conservation, cactus, tissue culture, endangered specie

T1.37 Obtención de plantas de *Platycterium bifurcatum* (Cav.) C.Chr. con el empleo del cultivo de tejidos

Lourdes R. García*, Damaris Torres, Carlos Romero.
*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. *e-mail: lourdes@ibp.co.cu

Platycterium bifurcatum (Cav.) C.Chr. (cuerno de alce) es uno de los helechos más demandados en el mercado internacional por su majestuosidad y belleza. A través del cultivo de tejidos se han realizado numerosos intentos para desarrollar protocolos de propagación *in vitro* a partir de esporas. La presente investigación tuvo como objetivo obtener esporofitos *in vitro* de *Platycterium bifurcatum* a partir de esporas germinadas en medios de cultivo. Como material vegetal para la colecta de las esporas se emplearon frondas fértiles de plantas madres de *P. bifurcatum*. Estas fueron desinfectadas con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (1, 2, 3%) durante 15 minutos. Se evaluó el porcentaje de contaminación microbiana y la germinación de las esporas. Posteriormente, se estudió la concentración de las sales MS para la multiplicación de los prótalos obtenidos (0, 25, 50, 75, 100%) y el efecto del estado físico del medio de cultivo para el crecimiento de los esporofitos formados. Además, se definieron las condiciones necesarias para la aclimatización de las plantas. Con los resultados obtenidos se

definió un procedimiento para la obtención de plantas aclimatizadas de esta especie empleando el cultivo de tejidos.

Palabras clave: esporofitos, gametofitos, germinación de esporas *in vitro*

Obtaining *Platycterium bifurcatum* (Cav.) C.Chr. plants using tissue culture

Platycterium bifurcatum (Cav.) C.Chr. (Elkhorn) is one of the most popular fern in the international market for its majesty and beauty. Through tissue culture have been numerous attempts to develop protocols for *in vitro* propagation from spores. The present investigation was aimed to obtain *in vitro* sporophytes of *Platycterium bifurcatum* from germinated spores in culture media. As plant material for collecting spores fertile were used mother plants fertile fronds of *P. bifurcatum*. These were disinfected with different concentrations of sodium hypochlorite (1, 2, 3%) for 15 minutes. The percentage of contamination and spore germination was evaluated. Additionally, we studied the MS salts concentration for the prothallus multiplication (0, 25, 50, 75, 100%) and we quantified sporophytes number by explant. Also we investigated the effect on the physical state of the culture medium for growth sporophytes. In addition, the conditions for acclimatization of plants were defined. With the results obtained was defined a procedure for obtaining acclimatized plants using tissue culture.

Keywords: sporophytes, gametophytes, germination of spores *in vitro*

T1.38 Efecto del 6-BAP sobre la morfología y fisiología de los brotes de *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl cultivados en Sistemas de Inmersión Temporal

Yudith García-Ramírez, Mallelyn Gonzales-González, Elisa Quiala, Marisol Freire-Seijo, Mariana La O, Leonardo J. Moreno-Bermúdez, Ortelio Hurtado. *Autor para correspondencia.

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

En Cuba, la plantación a escala comercial de especies de bambúes constituye una opción viable para atenuar los problemas medioambientales. El presente trabajo, se realizó con el objetivo de determinar el efecto del 6-BAP sobre la morfología y fisiología de los brotes *in*

in vitro de *B. vulgaris* cultivados en RITA. Se estudiaron cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de 6-BAP (3.0, 6.0 y 9.0 mg l⁻¹) y un tratamiento control sin regulador del crecimiento. El tiempo de inmersión fue de un minuto y la frecuencia de inmersión cada seis horas. Se midieron los indicadores morfológicos y anatómicos. Como resultado se determinó que el 6-BAP influyó en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*. Los mejores resultados se alcanzaron con una concentración de 6.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, con la cual se incrementó el número de brotes (5.1 brotes/explante) en ausencia de brotes hiperhídricos. Se determinó que el 6-BAP en concentraciones de 6.0 y 9.0 mg l⁻¹ induce un incremento en el contenido de agua en los brotes. Además, estos altos niveles de 6-BAP contribuyeron a una menor acumulación de compuestos fenólicos y el contenido de lignina. La clorofila total se incrementó significativamente cuando se utilizó 6.0 mg l⁻¹ de 6-BAP. Estos resultados, permiten incrementar el número de brotes/explante durante la multiplicación *in vitro*. Permitirá optimizar las condiciones de cultivo *in vitro*, lo cual conduciría a un perfeccionamiento de los métodos de propagación *in vitro* de esta especie.

Palabras clave: citoquinina, Bambú, Medio de cultivo líquido, Semi, automatización

Effect of 6-BAP treatments on morphology and physiology of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl in temporary immersion system

In Cuba, a commercial scale planting of species of bamboo is a viable option to mitigate environmental problems. The present study was conducted to determine the effect of 6-BAP on the morphology and physiology of *in vitro* grown shoots *B. vulgaris* in RITA. And a control without growth regulator; four treatments with different concentrations of 6- BAP (3.0, 6.0 and 9.0 mg l⁻¹) were studied. The immersion time was one minute and immersion frequency every 6 hours. Morphological and anatomical indicators were measured. It was determined that 6- BAP influenced the *in vitro* multiplication of *B. vulgaris*. The best results were achieved with a concentration of 6.0 mg l⁻¹ of 6- BAP, with which the number of shoots (5.1 shoots/explant) in the absence of increased hyperhydric shoots. It was determined that 6- BAP at concentrations of 6.0 and 9.0 mg l⁻¹ induces an increase in the water content in the shoots. Furthermore, these high levels of 6-BAP contributed less accumulation of phenolic compounds and lignin content. The total

chlorophyll increased significantly when used 6.0 mg l⁻¹ of 6- BAP. These results allow increasing the number of shoots/explanting during *in vitro* multiplication. They will also optimize the *in vitro* culture conditions, leading to an improvement of *in vitro* propagation methods for this species.

Keywords: cytokinin, Bamboo, liquid culture medium, Semi, automation

1.39 Efecto de diferentes gelificantes en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de organogénesis indirecta

Damaris Torres*, Novisel Veitía, Raúl Collado, Lourdes R. García, Idalmis Bermúdez-Carballo, Carlos Romero. *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: damaris@ibp.co.cu

El genotipo, el tipo de explante, la concentración de los reguladores del crecimiento se han estudiado para incrementar la eficiencia en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. Sin embargo, los estudios sobre el efecto del agente gelificante en la inducción de brotes son escasos. Es por ello, que el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del agente gelificante sobre la multiplicación de callos organogénicos y la regeneración de brotes de *P. vulgaris* cv. 'BAT-93', 'BAT-304', 'BAT-482', 'Ica Pijao' y 'CIAP 7247F'. Se determinó la masa fresca de los callos (g) y en la regeneración de brotes se cuantificó el número de callos con brotes, el número de brotes por callo y el número de brotes hiperhídricos. Los resultados mostraron que el gelificante influyó en la multiplicación de los callos y regeneración de brotes en los cinco cultivares. Se encontró que 'Ica Pijao', 'CIAP7247F' y 'BAT-93', mostraron los mayores valores en la masa fresca (g) de los callos cuando se empleó agar microbiológico E. Sin embargo, 'BAT-482' alcanzó el mayor valor de masa fresca de los callos en medio de cultivo endurecido con gelrite. Los callos de 'BAT-304' presentaron valores de masa fresca similares en los dos tratamientos. En la regeneración las variedades 'BAT-93' y 'CIAP 7247F' mostraron los mayores valores en el número de callos con brotes y brotes por callo en medio de cultivo solidificado con gelrite. No obstante, en este tratamiento hubo mayor número de brotes hiperhídricos independientemente del cultivar. Palabra clave: agar, cultivo *in vitro*, frijol común, gelrite

Effect of different gelling in agent the regeneration of plants from *Phaseolus vulgaris* L. indirect organogenesis

Genotype, type of explant and concentration of growth regulators have been studied to increase efficiency in plant regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. However, studies on the effect of the gelling agent in shoots induction are not enough. Therefore, the present study aimed to determine the effect of gelling agent on organogenic calli proliferation and shoots regeneration of *P. vulgaris* cv. 'BAT-93', 'BAT-304', 'BAT-482', 'Ica Pijao' and 'CIAP 7247F'. Callus fresh weight (g) was determined. Number of calli with shoots, number of shoots per callus and number of hyperhydric shoots was measured in shoots regeneration. Results showed that gelling influenced the calli multiplication and shoot regeneration in the five cultivars. 'Ica Pijao', 'CIAP7247F' and 'BAT-93' showed the highest values in calli fresh weight (g) using microbiological agar E. Besides, 'BAT-482' reached the highest value of fresh weight of calli in culture medium hardened with gelrite. 'BAT-304' calli showed similar values of fresh weight in both treatments. During regeneration, cultivars 'BAT-93' and 'CIAP 7247F' showed the highest values in the number of callus with shoots and shoots per callus in culture medium solidified with gelrite. Nevertheless, in this treatment there were more hyperhydric shoots regardless the cultivar.

Keywords: agar, *in vitro* culture, common bean, gelrite

T1.40 La coinnovación como parte de la innovación tecnológica. Vínculo universidad-productores

Marisol Freire-Seijo^{1*}, Novisel Veitías¹, Ubaldo Alvarez², Miguel Rodríguez Orozco², Alfredo Marín Cardenas², Miguel Suárez Castellá³, Sandra Pérez Lopes⁴, Kenia Correa⁶, Gilberto Hernández Pérez³, Saray Sánchez⁵, Mildrey Soca⁵, Katerine Oropesa Casanova⁵, Osmel Alonso Amaro⁵, Reinaldo Catalá⁵, Maybe Campos Gómez⁵. *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. CP 54 830. Cuba. *email: marisolf@ibp.co.cu

²Centro de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. CP 54 830. Cuba.

³Facultad de Ingeniería Industrial y Turismo, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas.

Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. CP 54 830. Cuba.

⁴OIKOS.

⁵Estación experimental de pastos y forrajes Indio Hatuey, Perico, Matanzas.

⁶CARE.

La producción de alimentos en Cuba es un tema polémico y a la vez neurálgico en cualquier escenario de debate nacional sobre seguridad alimentaria. Generalmente decisores y actores de la cadena agroalimentaria cubana, relacionan el tema de la seguridad alimentaria con la necesidad de realizar inversiones materiales para la producción de alimentos sin detenerse a reflexionar sobre la incidencia que tiene en ello: la desarticulación de los procesos de innovación tecnológica, y de la cadena investigación-producción-procesamiento-distribución-acceso. Aspectos estos que reclaman un cambio de paradigma ante los nuevos desafíos del escenario agropecuario cubano, donde se valora aún más la descentralización y los procesos autogestionados. Para el desarrollo de la experiencia fueron identificadas 40 tecnologías agropecuarias generadas por centros de investigación y en un proceso participativo fueron seleccionadas, implementadas y monitoreadas por parte de productores e investigadores en 13 fincas de tres municipios de la provincia Villa Clara. En dichos escenarios se logró el incremento y diversificación de las producciones luego de constatar que el 75% de las tecnologías han recibido acciones de capacitación por diferentes vías. Los avances del proyecto han permitido crear un nuevo sistema de relaciones, donde la investigación – aplicación – experimentación se realiza de conjunto entre investigadores y campesinos, todos aportan y aprenden; además de ser el campo un gran laboratorio, en estrecha relación con los sistemas de servicios y el mercado, en función de satisfacer la demanda. El sistema de trabajo permitió socializar y enriquecer las tecnologías logrando adaptarlas a las condiciones propias de cada productor, así como transmitir las experiencias y conocimientos a nuevos productores.

Palabras clave: fincas, diversificación, capacitación, campesinos

Co-innovation as part of technological innovation. Link university-producers

Food production in Cuba is controversial and time in any scenario nerve national debate on food

security. Generally makers and actors of Cuban food chain, linking the issue of food security with the need for capital investment for food production without stopping to reflect on the impact that has on it: the dismantling of the processes of technological innovation, and research-production-processing-distribution-access chain. These aspects call for a paradigm shift to the new challenges of the Cuban agricultural scenario, where decentralization and self-managed processes are even more valued. For the development of expertise were identified 40 agricultural technologies generated by research and a participatory process were selected, implemented and monitored by producers and researchers from 13 estates 3 municipalities in the province of Villa Clara. In these scenarios the increase and diversification of production after finding that 75% of the technologies have received training activities was achieved in different ways. The progress of the project have to create a new system of relations, where research - application - experimentation is carried out jointly by researchers and farmers, all contribute and learn as well as being a great field laboratory closely with systems services and the market, in order to satisfy the demand. The work system allowed socialize and enrich the technologies making suit the conditions of each producer and convey the experience and knowledge to new producers.

Keywords: Country, diversification, training, farmers

T1.41 Protocolo para la micropropagación de la Palma forrajera (*Opuntia* sp.) variedad F-16 'Oreja de Elefante'

Pablo E Machado Armas¹, Mayra Jimenez Vázquez¹, Julio Zoe de Brito², Manoel Urbano Ferreira Junior², Leandro Gómez², Aydiloide Bernal Villegas¹, Jorge L. Montes de Oca Suárez¹, Zenaida Occeguera Águila¹.
*Autor para correspondencia.

¹Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). e-mail: biofabrica@vc.azcuba.cu

²Instituto Agronómico de Pernambuco, Brasil (IPA).

El presente trabajo se desarrolló en la Biofábrica Itapirema, perteneciente al Instituto Agronómico de Pernambuco, Brasil, con la participación de investigadores y especialistas de la Biofábrica, del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Con el objetivo de establecer un protocolo para la micropropagación de la Palma Forrajera (*Opuntia* sp.), debido al problema presente en las plantaciones comerciales, para

poder suplir la demanda de forraje como alimento animal y a su vez la sobrevivencia de las personas que viven en las zonas semidesérticas. Se logró establecer un banco de donantes, para garantizar el proceso inicial, además de realizar un pre tratamiento a las plantas donadoras. Los brotes o cladodios fueron lavados con abundante agua con detergente, seguidamente se realizó una desinfección con alcohol (70% v/v) durante 30 segundos, después fueron sometidos a un tratamiento con Hipoclorito de sodio (1.5%) durante 15 minutos. Seguidamente fueron cortados en fragmentos de 2 cm², con aproximadamente entre tres a cuatro aréolas, e inoculados en un medio de cultivo líquido compuesto por las sales de Murashige y Skoog, con 1.0 mg l⁻¹ de 6-BAP, 0.1 mg l⁻¹ de AIA, 100 mg l⁻¹ de mio-inositol, 1.0 mg l⁻¹ de tiamina y sacarosa 20 g l⁻¹, ajustado a un pH de 5.7. Se logró acortar la fase de establecimiento de tres meses a 18 días, principal limitante del proceso. La fase de multiplicación se estandarizó en los BIT, estableciéndose el protocolo para el desarrollo de esta tecnología.

Palabras clave: cladodios, micropropagación, zonas semidesérticas

T1.42 Estandarización de una metodología para la germinación asimbiótica, propagación *in vitro* y aclimatización *ex vitro* de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae)

Catalina Restrepo Osorio*, Ana María Benavides Duque. *Autor para correspondencia.

Universidad de Antioquia. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Carrera 78 A # 71B-141. Colombia. e-mail: crestrepo@cib.org.co

Colombia posee más de 3 000 especies de orquídeas, sin embargo debido a la continua destrucción de sus hábitats naturales, el comercio no autorizado y la recolección despiadada de los amantes de las orquídeas, muchas especies están desapareciendo a un ritmo alarmante. Su alta demanda comercial, sin duda, ha dado lugar a un mayor énfasis en la propagación masiva y en la conservación de importantes orquídeas. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo eficiente para la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Epidendrum secundum*, orquídea nativa de Santa Elena (corregimiento de Medellín, Antioquia), estudiar los efectos de los reguladores de crecimiento y condiciones de cultivo para el desarrollo de las *vitroplantas* y su posterior endurecimiento *ex vitro*. En la fase de germinación se evaluaron diferentes

concentraciones de reguladores del crecimiento: Bencil Amino Purina (BAP), Ácido Naftalenacético (ANA) y ácido dichlorophenoxiacético (2,4 D). Las semillas se mantuvieron en condición de oscuridad y condiciones de fotoperiodo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. A los 15 días de haber sido sembradas las semillas, se obtuvo 100% de germinación en todos los medios de cultivo evaluados. Para la elongación y enraizamiento de las plántulas se usó una concentración de 2.69 μM de ANA y 0.29 μM de Ácido Giberélico. En el proceso de aclimatización de las *vitroplantas* se utilizó la micropropagación foto-autotrófica el cual es una estrategia de bajo costo y alta efectividad.

Palabras clave: asimbiótica, germinación, *in vitro*, *ex vitro*

A standardized methodology for asymbiotic germination, *in vitro* propagation and *ex vitro* acclimatization of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae)

Colombia has more than 3 000 orchid's species, however due to their natural habitat destruction, unauthorized trading and ruthless collection from orchids lovers, species have begun to disappear at an alarming rate. Its high commercial demand has undoubtedly led to a greater emphasis on mass propagation and conservation of important orchids. The aim of this study was to develop an efficient protocol for *in vitro* asymbiotic germination of *Epidendrum secundum* seeds, native orchid of Santa Elena (district of Medellin, Antioquia). Furthermore, the current study aimed to test the effects of growth regulators and culture conditions for development *vitroplantas* and subsequent *ex vitro* hardening. In the germination phase, different phytohormones were evaluated: Benzyl Amino Purine (BAP), naphthalene acetic acid (NAA) and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The seeds were kept in dark condition and photoperiod conditions: 16 hours of light and 8 hours of darkness. Within 15 days of the seeds sown, it was obtained a 100% germination in all media tested. For elongation and rooting of seedlings, it was used a 2.69 mM naphthalene acetic acid and 0.29 μM gibberellic acid. In the acclimatization process for *vitroplantas*, it was used photo-autotrophic micropropagation which is a strategy of low cost and high effectiveness.

Keywords: asymbiotic, germination, *in vitro*, *ex vitro*

T1.43 Estandarización de una metodología para la propagación clonal *in vitro* de aguacate cv. Hass (*Persea americana*, Mill.) a partir de ápices y nudos

Catalina Restrepo Osorio*, Aura Inés Urrea Trujillo, Alejandro Gil Correal, Felipe Andrés Gómez Velásquez.*Autor para correspondencia.

Universidad de Antioquia. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Carrera 78 A # 71B-141. e-mail: crestrepo@cib.org.co

La gran expansión que ha tenido en los últimos años el cultivo del aguacate en Colombia hace indispensable establecer un sistema eficiente de propagación, que satisfaga las necesidades del mercado nacional e internacional mediante material de siembra con excelente calidad productiva y sanitaria. El uso de las herramientas biotecnológicas y específicamente del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales otorga múltiples ventajas para la selección, saneamiento, multiplicación y disponibilidad de material vegetal que pueden contribuir a satisfacer esas necesidades. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un método de micropropagación de la variedad de aguacate Hass a partir de yemas apicales y axilares. Las yemas fueron obtenidas a partir de plantas donadoras en vivero, las cuales fueron mantenidas en condición de oscuridad (etiología) y luz para evaluar la inducción y el desarrollo de los brotes. Luego que las yemas fueran desinfectadas e introducidas *in vitro* se encontró que los explantes provenientes de brotes etiolados obtuvieron un 95% de supervivencia. Para la inducción de brotes *in vitro* las yemas se cultivaron en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones hormonales: IBA (Ácido Indolbutírico), BAP (Bencilaminopurina), y GA₃ (Ácido Giberélico). Estos explantes fueron también sometidos a condiciones de luz y oscuridad, estos últimos por 15 días y después fueron transferidos a 18 horas de fotoperiodo. Se encontró que no existieron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre los medios de cultivo evaluados para la inducción de brotes, sin embargo se observaron diferencias entre las condiciones de cultivo de luz y oscuridad empleados, dando mejor resultado los explantes que provenían de oscuridad (etiología) en vivero y después en condición luz *in vitro*. En la fase de multiplicación los explantes que generaron el mayor número de brotes fue en el medio de cultivo con IBA (0.2 mg l⁻¹) y BAP (1.5 mg l⁻¹). Palabras clave: etiología, Hass, hormonas, *in vitro*, yemas.

A standardized methodology for *in vitro* clonal propagation of avocado cv. Hass (*Persea americana*, Mill.) from shoot meristems and axillary buds

The great growth in recent years of avocado in Colombia makes it essential to establish efficient propagation systems, in order to meet the needs of the domestic and international market. For this, is essential to establish an efficient propagation system, which satisfies the needs of domestic and international market through planting material with excellent production and health standards. The use of biotechnological tools and specifically *in vitro* plant tissue culture provides many advantages for the selection, sanitation, multiplication and availability of plant material can help satisfy those needs. The aim of this study was to develop a method of micropropagation of Hass avocado variety from apical and axillary buds. The buds were obtained from donor plants cultured in the nursery. Those plants were kept in dark condition (etiolation) and light to evaluate the induction and development of shoots. After disinfection and *in vitro* introduction of shoots, it was found that explants from etiolated shoots had a 95% survival. For *in vitro* shoot induction, buds were cultured in MS medium with different phytohormones concentration: IBA (indolebutyric acid), BAP (benzylaminopurine), and GA₃ (gibberellic acid). These explants were also subjected to light and dark conditions, for 15 days and then were transferred to 18-hour photoperiod. It was found no significant differences ($p \geq 0.05$) between the culture media evaluated for shoot induction, however there were differences between light and darkness conditions employed. The best results were obtained with the explants from darkness (etiolation) in nursery followed by light condition *in vitro*. In multiplication phase, the explants with the largest number of shoots was obtained in media with 0.2 mg l⁻¹ of IBA and 1.5 mg l⁻¹ of BAP.

Keywords: etiolation, Hass, hormones, *in vitro*, buds

ESTRÉS BIÓTICO, ABIÓTICO Y NUTRICIÓN EN PLANTAS/ *Biotic, abiotic stress and plant nutrition*

T2.1 Plant innate immunity: how to get a durable disease resistance?

Orlando Borrás-Hidalgo

Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Cuba.

Plants that in nature are exposed to biotic stresses often resist to pathogen infection by rapidly activating the innate immune system. An efficient activation of the resistance responses relies on the prompt perception/transduction of signal molecules that are common to many classes of pathogens (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) and are recognized by germ line-encoded pattern recognition receptors (PRRs). Resistant responses are also triggered by race-specific molecules (effectors, Avr products) recognized by the so-called Resistance (R) proteins that are present in specific cultivars of several but not all crop plants. R proteins have been widely used in breeding programs as well as for genetic transformation to protect plants against specific pathogen genotypes. Usually R-mediated resistance does not last for a long time since pathogens continually evolve more aggressive genotypes. More recently it has been proposed that a PRR-mediated recognition of PAMPs may be utilized to confer to transgenic plants a larger spectrum of disease resistance. Indeed, the Arabidopsis EFR that recognizes the bacterial elongation factor EF-Tu has been shown to confer resistance against several bacteria when transferred into *Solanaceae* plants. It has also been proven that chimeric PRRs may be used to engineer resistance against both bacteria and fungi. The combination in a single plant of different PRRs as well as of chimeric PRRs that recognize several non-self-structures likely represents the best way of constructing broad-spectrum and long lasting disease resistances. Here, we show the last insights related with plant innate immunity to get a durable disease resistance.

Keywords: biotic stresses, PAMPs

T2.2 Caracterización de *Monilophthora roreri* (CIF & PAR) EVANS para apoyar programas de mejoramiento genético del cacao

Karina Carrera-Sánchez^{1,2}, Laura Mosquera Paredes¹, Leiva-Mora Michel¹, Daysi Changoluisa¹.

*Autor para correspondencia.

¹Universidad Estatal Amazónica. Campus Principal km 2½ vía a Napo (Paso Lateral). Puyo –Pastaza-Ecuador. e-mail: mcarrera@uea.edu.ec

²Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830 e-mail: michel@ibp.co.cu

El cacao es de gran importancia económica y social para Ecuador. Aproximadamente el 80% de la producción orgánica puede afectarse por la incidencia de *Moniliophthora roreri* (Cif & Par). La caracterización fitopatológica de este hongo fitopatógeno, sería de gran ayuda para apoyar programas de mejoramiento genético en la búsqueda de genotipos de cacao resistentes. A partir de siete fincas de producción orgánica de cacao en la provincia del Napo, se realizaron aislados monospóricos. Estos se caracterizaron en base a: borde, elevación, líquido de transpiración, coloración, diámetro y textura de las colonias, tipo y tamaño de las conidios, velocidad de crecimiento. Para evaluar la caracterización morfológica de *M. roreri* se utilizaron medios de cultivo sólidos y líquidos como PDA y V8MMA, respectivamente. La elevación de las colonias varió de 0 a 10 mm, el color varió del blanco, salmón y café. Cuatro de las siete cepas cubrieron la caja Petri de 90 mm a los 15 días, con una velocidad de crecimiento de mm.día⁻¹. Se observaron conidios globosos, subglobosos y elípticos, con dimensiones variables tanto en largo como ancho. No se encontraron diferencias morfológicas entre los aislados en relación al borde (liso), líquido de transpiración (presencia) y textura (pulverulenta). Con la caracterización de *M. roreri* se podrá contar con una colección de aislados que serán de gran utilidad para apoyar programas de mejoramiento genético del cacao en la búsqueda de genotipos resistentes al agente causal de la moniliasis en los cacaotales ecuatorianos.

Palabras clave: Amazonía, basidiomicetes, fitopatología, mejoramiento genético, moniliasis

Cocoa is an important crop in the economy and social of Ecuador. Approximately 80% of organic production may be affected by *Moniliophthora roreri* (Cif & Par). The phytopathological characterization of the causal agent of Moniliasis, would be of great help to support Cocoa breeding program to find resistant genotypes. From seven cocoa organic farms in Napo province, single spore isolates were obtained. They were characterized based on: borders, elevation, transpired liquid, coloration, diameter and texture of colonies, conidia type and size, growth velocity. For morphological and fisiological characterization the PDA and V8MMA, were used respectively. Colonies elevation varied from 0 to 10 mm. White, salmon and coffee colors were observed. Four of seven strains covered Petri dishes (90 mm) in 15 days, with growth velocity of 2.48 mm day⁻¹. Globose, subglobose and elliptic conidia were observed in all isolates, with

variables dimensions in large and width. None morphological differences were observed related with border (smooth), transpiration liquids (presence) and texture (powdery). Characterization of *M. roreri* isolates may be useful to a fungal culture collection might be applied to support Cocoa breeding programs to find resistant genotypes to the causal agent of moniliasis in Ecuador.

Keywords: Amazonia, basidiomycete, moniliasis, phytopathology, plant breeding

T2.3 Inhibition of molecular patters associated to pathogens confers high protection against fungi and oomycetes in plants

Ingrid Hernández Estévez

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. División de Plantas (CIGB). La Habana, Cuba. e-mail: ingrid.hernandez@cigb.edu.cu

The diseases caused by fungi and oomycetes are the major constraints in crop production of agricultural interest in Cuba and elsewhere. Find alternatives through biotechnological tools for the control of these diseases is the biggest challenge for researchers on the topic. Plants that in nature are exposed to biotic stresses often resist to pathogen infection by rapidly activating the innate immune system. An efficient activation of the resistance responses relies on the prompt perception/transduction of signal molecules that are common to many classes of pathogens. The pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), like proteases and polygalacturonases are pathogenicity mechanisms used by pathogens in early infection to overcome the initial plant defenses. This work shows the use of protease inhibitors and pathogen polygalacturonases for broad spectrum resistance to fungal diseases and oomycetes in plants. The expression of polygalacturonase inhibitor in tobacco plants protects them against fungi and oomycetes under field conditions. On the other hand, was accomplished the identification, molecular characterization and function analysis of a new protease inhibitor which confers high resistance levels to oomycetes in plants.

Keywords: PAMPs, diseases, polygalacturonase

T2.4 Identificación taxonómica de dos cepas de hongos micorrizógenos arbusculares promisorias en las prácticas agrícolas sostenibles

Yakelin Rodríguez-Yon^{1*}, Yolande Dalpé², Sylvie Séguin², Madelaine Quiñones³, Belkis Peteira³. *Autor para correspondencia.

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas. Carretera a Tapaste km 3½, CP 32 700. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. e-mail: yakelin@inca.edu.cu, ryakelin40@yahoo.es

²Eastern Cereal and Oilseed Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada.

³Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas. Apdo. Postal 10. Mayabeque, Cuba.

La proyección estratégica del Programa Micorrizas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas contempla entre sus acciones: la obtención de biofertilizantes, su introducción en las prácticas agrícolas y su comercialización en el mundo. Dentro de estos bioproductos se destacan el EcoMic® y LicoMic®, compuestos a base de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), los cuales son reconocidos a nivel mundial. El objetivo de este trabajo fue identificar por taxonomía polifásica dos de las cepas promisorias de HMA, básicas de dichos productos, dados los resultados satisfactorios de su aplicación a diversos cultivos de interés económico en diferentes tipos de suelo. Se realizaron estudios morfológicos de las esporas, y moleculares mediante la secuenciación del ADN ITS y V-H⁺ATPasa. Como principal resultado se logró conocer la identidad de las dos cepas de mayor repercusión económica y ecológica en la agricultura cubana y latinoamericana. Se revela que la cepa INCAM-4 constituye una especie nueva para la ciencia, siendo denominada *Glomus cubense*, por sus características morfológicas distintivas y el análisis filogenético de las secuencias obtenidas. Además, se demuestra que la cepa INCAM-2 es *Funneliformis mosseae*, syn. *Glomus mosseae*. Se informaron cinco cebadores nuevos del marcador V-H⁺ATPasa, eficaces en la identificación de especies del orden *Glomerales*. Se exponen y discuten aspectos como el establecimiento de una metodología molecular factible que permita el monitoreo y seguimiento de la cepas promisorias en los sistemas agrícolas donde se aplican; así como, el diseño de cebadores cepa-específicos a partir de marcadores moleculares con capacidad para detectar alto grado de polimorfismo intra-específico.

Palabras clave: *Funneliformis mosseae*, polimorfismo, taxonomía polifásica

Taxonomic identification of two promising arbuscular mycorrhizal fungal strains in sustainable agricultural practices

The strategic projection of Mycorrhiza Program from the National Institute of Agricultural Science includes within its activities: the biofertilizer manufacture, its application in agricultural practices and world marketing. Among these bio-products highlight EcoMic® and LicoMic®, two compounds based on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which are recognized worldwide. The aim of this study was to identify through polyphasic taxonomy two of the promising AMF strains, which are basic of such products, considering their successful results when applied to diverse economically important crops in different types of soil. Spore morphological studies and molecular analyses of rDNA ITS region and V-H⁺ATPase were performed. Our main result was to know the identity of both highly economic strains with ecological impact on Cuban and Latin-American agriculture. The distinctive morphological characteristics and phylogenetic analyses revealed that INCAM-4 strain is a new species for science, named *Glomus cubense*. Moreover, it was shown that INCAM-2 strain is *Funneliformis mosseae*, syn. *Glomus mosseae*. Both are placed in the *Glomeraceae* family, genera *Glomus* and *Funneliformis*, respectively. Five new primers from V-H⁺ATPase market were reported, which could be useful in the *Glomerales* species identification. Some aspects are also presented and discussed, such as the establishment of a feasible molecular assay for the long-term and specific tracing of inoculated AMF strains in agroecosystems; as well as, the design of strain-specific primers from molecular markets able to detect high degree of intra-specific polymorphism.

Keywords: *Funneliformis mosseae*, polymorphism, polyphasic taxonomy

T2.5 Fuentes de fósforo (P) más cachaza con y sin Azotofos sobre los microorganismos del suelo

Maikel Abreu Jiménez^{1*}, Enrique Parets Selva¹, Leónides Castellanos González¹, Leandro Rosato Moda², Renato de Mello Prado², Aida Margarita Romero Jiménez¹, Rene Cupull Santana³.

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Cienfuegos. Cuba. e-mail. majimenez@ucf.edu.cu

²Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, UNESP
Campus Jaboticabal, e-mail:
lerosattomoda@yahoo.com.br

³Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: renecs@uclv.edu.cu
El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de cuatro fuentes de fósforo más cachaza con o sin el biofertilizante Azotofos sobre los microorganismos del suelo en diferentes momentos después del tratamiento. Fue establecido un experimento en condiciones de laboratorio en esquema factorial 4(2)+1, empleándose cuatro fuentes de fósforo; roca fosfatada, fosfato natural, superfosfato triple y roca fosfórica cubana y dos fuentes del compuesto orgánico a base cachaza enriquecida con microorganismos (Azotofos) y solo cachaza (sin enriquecimiento) y un control (sin cachaza, ni abonado), con tres repeticiones. Fueron totalizadas el total de bacterias los hongos y las bacterias solubilizadoras de fósforo a los 30, 60, 90, 120 y 150 días después de iniciado el experimento. El uso diferentes fuentes de P con cachaza enriquecida con Azotofos aplicadas a un suelo con alto tenor de P no fue importante para alterar las poblaciones de las bacterias totales y los hongos y solo influyó sobre las bacterias solubilizadoras de P a corto plazo (30 y 60 días después de la aplicación).

Palabras clave: biofertilizantes, cachaza, fuentes de fósforo, microorganismos del suelo

The objective of the investigation was to evaluate the effect of four phosphorus sources plus filter pie with or without the biofertilizer Azotofos on the microorganisms in the soil at different moments after the treatment. An experiment in factorial design 4(2)+1 was established, being the four phosphorus sources; rock phosphate, natural phosphate, triple phosphate and Cuban phosphoric rock; two sources of the organic compound to base filter pie enriched with Azotofos microorganisms and only filter pie (without enrichment) and a control (without filter pie, neither Azotofos), with three repetitions. The total of bacteria, the fungus and the phosphorus solubilizers bacteria were evaluated at the 30, 60, 90, 120 and 150 days after initiate the experiment. The use different sources of P with filter pie enriched with Azotofos applied to the soil with high tenor of P, was not important to alter the populations of the total bacteria and fungus, and only it affected the phosphorus solubilizers bacteria in short term (30 and 60 days after the application).

Key words: biofertilizers, filter pie, phosphorus source, soil microorganisms

T2.6 Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas obtenidos de plantas de la familia Rutaceae frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra en *Musa* spp.

Dianella Iglesias*, Katia Ojito-Ramos, Frank Alamo Hernández, Orelvis Portal. *Autor para correspondencia.

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara CP 54 830, Cuba. e-mail: diglesias@uclv.cu

Musa spp. es atacada con severidad por el hongo hemibiotrófico *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra, cuyo control es fundamentalmente mediante el uso de fungicidas químicos. Debido a la fungoresistencia y perjuicios ambientales, resulta necesaria la búsqueda de alternativas naturales y efectivas para su manejo, como el empleo de extractos vegetales. La familia *Rutaceae* contiene especies con elevadas concentraciones de compuestos fenólicos, de los cuales se conoce su actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos, por lo que pudiera resultar de utilidad el uso de extractos vegetales a partir de especies de esta familia contra *M. fijiensis*. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de *Swinglea glutinosa*, *Amyris balsamifera*, *Zanthoxylum pseudodumosum*, *Zanthoxylum nanophyllum* y *Zanthoxylum flavus* frente a *M. fijiensis*. Los extractos se obtuvieron mediante extracción asistida por ultrasonido, se realizó una caracterización fitoquímica y se cuantificó el contenido de fenoles totales. Para cada extracto, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante dilución en agar y la fracción química que inhibía el crecimiento del hongo mediante bioautografía. En todos los extractos se identificó la presencia de fenoles, aminoácidos, aminos, quinonas y flavonoides y las concentraciones de fenoles totales fueron superiores a 117 mg de equivalentes de ácido gálico/ml de extracto. Los extractos alcohólicos de *S. glutinosa*, *A. balsamifera* y de las especies endémicas *Z. pseudodumosum* y *Z. nanophyllum* mostraron actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*. Los extractos de *S. glutinosa* en metanol y *A. balsamifera* en etanol inhibieron 100% el crecimiento micelial del hongo, resultando las quinonas, los flavonoles 3-glicosilados y las flavonas los compuestos

químicos con mayor actividad. Este estudio demostró la potencialidad del uso de extractos alcohólicos de hojas de plantas de la familia *Rutaceae* para el control agroecológico de *M. fijiensis*.

Palabras clave: compuestos químicos, extractos vegetales, plantas endémicas, plátanos y bananos

***In vitro* antifungal activity of leaves extracts from plants of the Rutaceae family against Mycosphaerella fijiensis Morelet, causal agent of black Sigatoka in Musa spp.**

Musa spp. is attacked with severity by the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka which control is mainly based on the use of chemical fungicides. Due to the fungal-resistance and environmental damages, it is necessary to find natural and effective alternatives for their management, like the use of plant extracts. The *Rutaceae* family has species with high concentrations of phenolic compounds with known antifungal activity against fungal phytopathogens, for what could be very useful the use of plant extracts from species of this family against *M. fijiensis*. The aim of this research was to determinate the *in vitro* antifungal activity of leaves extracts from *Swinglea glutinosa*, *Amyris balsamifera*, *Zanthoxylum pseudodumosum*, *Zanthoxylum nanophyllum* and *Zanthoxylum flavus* against *M. fijiensis*. The extracts were obtained by ultrasound-assisted extraction, phytochemically characterized and the total content of phenols was quantified. For each extract, it was determined the percentage of inhibition of the mycelial growth by agar dilution and the fraction that inhibited the fungal growth by the bioautography test. In all the extracts were identified the presence of phenols, aminoacids, amines, quinones and flavonoids, and the concentrations of total phenols were superiors to 117 mg of equivalents of gallic acid/mL of extract. The alcoholics extracts of *S. glutinosa*, *A. balsamifera*, and the endemic species *Z. pseudodumosum* and *Z. nanophyllum* showed *in vitro* antifungal activity against *M. fijiensis*. The extracts of *S. glutinosa* in methanol and *A. balsamifera* in ethanol inhibited 100% the mycelial growth and the quinones, the flavonols 3-glycosides and the flavones the compounds presented the greater activity. This research demonstrated the potential of the use of leaves extracts from plants of the *Rutaceae* family in the agro-ecological control of *M. fijiensis*.

Keywords: bananas and plantains, chemical compounds, endemic plants, plant extracts

T2.7 Aggressiveness of papaya ringspot virus cuban isolates on Carica papaya L. cv. Maradol roja in greenhouse conditions

Orelvis Portal¹, Maylin Cruz², Dariel Cabrera Mederos¹. *Autor para correspondencia.

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5, CP 54 830 Santa Clara, Cuba. dcabreram@uclv.edu.cu

²Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera a Maleza km 2.5, Santa Clara, Cuba.

Papaya ringspot virus (PRSV) constitutes the most important pathogen that affects papaya plantations. Symptoms of PRSV produced on papaya plants after mechanical inoculation were described to develop an evaluative scale in greenhouse conditions. Symptomatic leaves from different papaya growing areas in Cuba were collected and assayed by polymerase chain reaction and indicator plants for the confirmation of the PRSV presence. The aggressiveness of twenty-four PRSV Cuban isolates was determined through the assessment of symptoms severity produced on papaya plants cv. Maradol roja under same conditions. An evaluative scale from 0 to 6 grades was developed based on observations of PRSV symptoms progress. Symptoms produced by PRSV Cuban isolates included clearing of the veins, mottling and swelling zones on the adaxial leaf surface, deformation of young leaves and filiformity. Isolates from Nueva Paz, Güines, and San José de Las Lajas in the west, Palma Soriano and Puerto Padre in the east and Jagüey Grande and Sancti Spiritus in center of the country were the most aggressive according their area under the disease progress curve values, which reflects that symptoms severity of this virus is not related to the main growing papaya regions in Cuba.

Keywords: mechanical inoculation, papaya, PRSV

T2.8 Actividad fitotóxica y metabolitos extracelulares aislados en filtrados de cultivos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 2

Nayanci Portal González^{1*}, Osbel Pino¹, Karlina García², Fabiola Escalante², Maribel Rivas⁴, Aurora Pérez⁴, Martha Hernández⁴, Barbarita Companioni⁴, Luis Manuel Peña Rodríguez², Alain Soler³, Ramón Santos Bermúdez⁴. *Autor para correspondencia.

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Ciego de Ávila. Cuba. e-mail: nayanci@agronomia.unica.cu

²Centro de investigación Científica de Yucatán. Mérida. Yucatán. México.

³CIRAD. PRAM. Le Lamentin cedex 2. Martinica.

⁴Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Cuba.

El marchitamiento por *Fusarium* o Mal de Panamá es una enfermedad destructiva de plantas de bananos causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (*Foc*). Se han hecho muchos esfuerzos para comprender los mecanismos de patogénesis en *Foc*, sin embargo, esto no ha conducido al mejor entendimiento de los factores que gobiernan la resistencia o susceptibilidad de las plantas. En el presente trabajo se cultivó un aislado correspondiente a la raza 2 del microorganismo en medio de cultivo líquido durante 30 días y se cosecharon muestras diarias para evaluar su actividad fitotóxica a través de un bioensayo simplificado de punteadura en hojas de cultivares resistentes y susceptibles a la enfermedad *in vivo*. El microorganismo es capaz de producir en estas condiciones moléculas fitotóxicas de forma continua a partir de los 10 días de su crecimiento. Se determinó la estructura química del componente fitotóxico presente en los FCC de 16 y 29 días de edad por HPLC, GS-MS y RMN-¹H, coincidiendo con la toxina no-hospedero específica ácido fusárico. Se determinó la concentración de proteínas extracelulares excretadas por el microorganismo al medio de cultivo líquido.

Palabras clave: Mal de Panamá, proteínas

Phytotoxic activity and extracellular metabolites isolated from Culture Filtrates of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 2

Fusarium wilt (Panama disease) is widely considered a destructive disease of banana plantation caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (*Foc*). There have been many efforts to understand the mechanisms of pathogenesis in *Foc*, however, this has not led to a better understanding of the factors governing resistance or susceptibility of plants. An isolate corresponding to race 2 was cultivated in liquid medium for thirty days and daily samples harvested to evaluate their phytotoxic activity by using a simplified leaf-spot bioassay from both resistant and susceptible cultivar toward *in vivo*

disease. The Microbe is able to produce phytotoxic compounds continuously since ten day of culture under above described condition. The chemical structure for the main phytotoxic compounds isolated from both 16- and 29-days-old culture filtrates was recorded by GS-MS and RMN-¹H corresponding to a previously described non-host specific toxin fusaric acid. Extracellular proteins secreted by microbe to culture medium were detected.

Keywords: Panamá disease, proteins,

T2.9 Rizobacteria *Brevibacillus borstelensis* B65, estimuladora del crecimiento del cultivo de berenjena (*Solanum melongena* L.)

S Nápoles Vinent^{1*}, M Serrat Díaz², T Orberá Ratón², E Ortega Delgado³. *Autor para correspondencia.

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias. Santiago de Cuba. Cuba.

²Facultad de Ciencias Naturales. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Santiago de Cuba. Cuba.

³Universidad de la Habana. Facultad de Biología. Laboratorio de Fisiología Vegetal. La Habana. Cuba. e-mail: sucleidis@agr.uo.edu.cu

El cultivo de berenjena (*Solanum melongena* L.) constituye prioridad del programa de producción de alimentos orgánicos en Santiago de Cuba. La presente investigación estuvo encaminada a evaluar los efectos del biopreparado bacteriano de la rizobacteria *Brevibacillus borstelensis* B65 en el crecimiento de la especie vegetal en estudio, variedad 'FHB-1'. El biopreparado bacteriano fue obtenido en el CEBI a partir aislamiento de la cepa *Brevibacillus borstelensis* B65 de la rizosfera del cultivo de caña de azúcar. La investigación se realizó de forma paralela en el organopónico La Ketty, centro de referencia nacional de la agricultura urbana en Santiago de Cuba y en la parcela experimental del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), perteneciente a la Universidad de Oriente. Las semillas de berenjena tratadas y las no tratadas (control) con la bacteria, fueron sembradas en una mezcla de humus de lombriz y tierra (1:1) y cultivadas bajo condiciones protegidas durante la fase de semillero y las plantas adultas a cielo abierto. Los resultados obtenidos mostraron los efectos de B65 sobre el aumento del porcentaje de germinación de berenjena (12%) por encima de su control. La bacteria B65 aumentó significativamente el tamaño de las posturas, del tallo y la longitud de

las raíces, así como el peso del tallo, raíces y hojas, lo cual se relacionó con los niveles de las fitohormonas ácido indolacético y etileno producidos por este microorganismo y con su actividad solubilizadora de fosfato de calcio. *Brevibacillus borstelensis* B65 incidió significativamente sobre el desarrollo de posturas de berenjena para el trasplante cultivadas bajo tratamiento orgánico y en el incremento significativo el número de frutos por plantas procedente de las semillas tratadas con el bioproducto bacteriano a los 75 y 100 días después del trasplante, lo cual corroboró la actividad estimuladora del crecimiento vegetal de esta bacteria.

Palabras clave: berenjena, *Brevibacillus*, biofertilizante, fitohormonas

Eggplant (*Solanum melongena* L.) it constitute priority of organic foodstuffs programs in Santiago de Cuba. In the present research there were evaluated the effect of a biological formulation made with the rhizobacteria strain *Brevibacillus borstelensis* B65, on growth of the vegetable specie in study, variety FHB-1 sowed under organic treatment. It byproduct obtained at CEBI from isolated from sugarcane rhizosphere. The work is developed in two experimental places, in the organoponic La Ketty, which is located in the periphery of Santiago de Cuba city, in El Caney town and the experimental parcel of the National Centre of Applied Electromagnetism (CNEA), which is located in Santiago de Cuba city. Eggplant seeds were treated and not (control) with the bacterial formulation and transferred into an organic substrate mixture of earthworm castings and soil (1:1) and cultivated under guarded conditions during the phase of nursery and the grown plants to open heaven. The results showed the effects of B65, increasing the eggplant seeds percentage of germination in 12 percent upper their respective control. The bacteria B65 increased the size of the postures significantly, of the shaft and the longitude of the roots, as well as the peso of the shaft, roots and leave, the effects all were attributed with its indolacetic acid production levels to the ethylene phytohormone secretion activity of B65. *Brevibacillus borstelensis* B65 significantly increased the seedlings and shots length as root growth in eggplant and pepper. Also, B65 increased the roots, leaves and shoots weight, and its calcium phosphate solubilization activity. The strain B65 affects positively the eggplant plantlets development under organic treatment and I in the increment significant the number of fruits for plants of the had dealings with

bacterized seeds the at 75 100 days later of the transplant, which corroborated the activity promoting of the vegetable growth of this bacteria, corroborating its plant growth promoting traits.

Key words: Eggplant, *Brevibacillus*, biofertilizer, plant hormone

T2.10 Efecto del H₂O₂ sobre el crecimiento *in vitro* de un aislado cubano de *Mycosphaerella fijiensis*

María Ileana Oloriz*, Bárbara Ocaña. *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. e-mail: marileana@

Rayado negro de la hoja (Sigatoka negra) es una de las enfermedades de mayor importancia para el cultivo de bananos y plátanos. Ésta es ocasionada por el hongo hemibiotrófico *Mycosphaerella fijiensis*. La enfermedad ha resultado de difícil control en condiciones de clima tropical como las existentes en Cuba. Una de las posibles fuentes de resistencia encontradas en *Musa* a *M. fijiensis* está dada la respuesta hipersensible (RH) en el cultivar resistente 'Calcutta 4'. Con el objetivo de determinar el efecto del H₂O₂ sobre la capacidad de crecer en condiciones *in vitro* de un aislado cubano de *Mycosphaerella fijiensis* CCIBP-Pf-83, se probaron varias concentraciones de H₂O₂ adicionadas al medio de cultivo líquido. Luego de crecer el micelio por espacio de una semana se determinó la masa seca del micelio y la toxicidad del filtrado del hongo sobre hojas del cultivar 'Grande naine'. Los resultados mostraron reducción del crecimiento del micelio a partir de la concentración de 50 mmol l⁻¹ de H₂O₂. También ocurrió un incremento de la toxicidad del cultivo filtrado sobre el cv. 'Grande naine'. Los resultados demostraron la capacidad del H₂O₂ de reducir el crecimiento del aislado cubano CCIBP-Pf-83 de *M. fijiensis* y provocar la excreción de especies tóxicas para la planta al medio de cultivo.

Palabras clave: rayado negro de la hoja, cultivo *in vitro*, ROS, toxicidad

T2.11 Caracterización y diversidad genética de aislados de *Rhizobium* asociados a frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en el sur del Ecuador

Klever Iván Granda Mora¹, Francisco Guaman Díaz², Aminael Sánchez Rodríguez³, Yelenys Alvarado-Capó⁴ y Roldán Torres Gutiérrez⁵. *Autor para correspondencia.

¹Centro de Biotecnología. Universidad Nacional de Loja. Av. Pío Jaramillo S/N. PBX: 072547252 - Casilla Letra "S", Loja-Ecuador.

²Carrera de Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Loja. Av. Pío Jaramillo S/N. PBX: 072546671, Loja-Ecuador.

³Departamento de Ciencias Naturales. Universidad Técnica Particular de Loja. San Cayetano Alto. Calle París S/N, Loja, Ecuador.

⁴Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

⁵Proyecto Prometeo. SENESCYT-Universidad Nacional de Loja. Av. Pío Jaramillo S/N. Ecuador. e-mail: roldantg@gmail.com

El estudio consistió en determinar la variabilidad de aislados diazotróficos simbióticos procedentes del cultivo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en diferentes zonas agroecológicas del sur del Ecuador. Se muestrearon un total de nueve cantones, los cuales se geo-referenciaron mediante el Sistema de Posicionamiento Global. La determinación de la variabilidad de los aislados se realizó mediante la caracterización morfo-cultural, pruebas bioquímicas, fisiológicas e identificación genética, donde se evaluó: tinción al Gram, crecimiento, color, mucus, bordes y elevación de las colonias; crecimiento en medios Mac Conkey, Agar Kligler, Extracto de Levadura Manitol Agar-Rojo Congo, Peptona Glucosa Agar y producción de catalasa; crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl y niveles de pH y temperaturas. La identificación genética de los aislados obtenidos se realizó mediante la técnica molecular 16S ADNr. La infectividad de los aislados se analizó en condiciones controladas en invernadero. De un total de 50 aislados iniciales, 34 de ellos presentaron diferencias en al menos un parámetro morfo-cultural evaluado. Los resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas demostraron la pureza de las cepas aisladas, las cuales corresponden con las características pertenecientes al género *Rhizobium*. La implementación de las técnicas moleculares, el alineamiento y ensamblaje de las secuencias demostró la presencia de dos géneros bacterianos, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*. Para este último género se identificaron 10 especies, lo que demuestra la alta variabilidad genética de este género al Sur del Ecuador. Estos estudios crean las bases para

la evaluación de la eficiencia de cepas nativas de diazotrofos para la elaboración de inoculantes.

Palabras clave: variabilidad genética, cepas nativas

Characterization and genetic diversity of *Rhizobium* isolates associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at southern Ecuador

The study consisted to determine the variability of symbiotic diazotrophic isolates from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) of different agro-ecological zones of southern Ecuador. A total of nine cantons were sampled, which were geo-referenced using the Global Positioning System. Determining the isolates variability was performed by morpho-cultural characterization, biochemical, physiological and genetic identification tests, where assessed: Gram stain, growth, color, slime, elevation and edges of colonies; growth on several media, such as Mac Conkey, Kligler Agar, Yeast Extract Mannitol Agar-Congo Red, Peptone Glucose Agar and catalase production; growth at different NaCl concentrations and pH and temperatures levels. The genetic identification of isolates was performed by 16S rDNA molecular technique. The isolates infectivity was analyzed under greenhouse conditions. From a total of 50 initial isolates, 34 of them differed in at least one morpho-cultural parameter assessed. The results of biochemical and physiological tests showed the purity of the isolated strains, which correspond to the characteristics of *Rhizobium* genus. The implementation of molecular techniques showed the presence of two bacterial genera, *Mesorhizobium* and *Rhizobium*. For the latter genus 10 species were identified, demonstrating the high genetic variability of this genus at Southern Ecuador. These studies lay the foundation for evaluating the efficiency of native diazotrophic strains for inoculants production.

Keywords: genetic variability, native strains

T2.12 Incidencia de *Aspergillus* spp. y sus micotoxinas en maíz almacenado del norte de Tamaulipas

Martínez P, HY^{1*}, García O, JG¹, Hernández D, S¹, Mayek P, N¹, Reyes M, CA², Vázquez C, G³. *Autor para correspondencia.

¹Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza. 88 710, Reynosa, Tamaulipas, México. e-mail: hadassayugo@gmail.com

²Campo Experimental Valle de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Carretera Matamoros-Reynosa km 61, Rio Bravo, Tamaulipas, México. CP 88 900.

³Campo Experimental Valle de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 13.5 de la Carretera los Reyes-Tezcoco, Coatlínchán, Tezcoco, Estado de México, CP 56 250.

El maíz es imprescindible en la dieta mexicana, sin embargo es afectado por la presencia de hongos que producen micotoxinas, causando gran variedad de efectos tóxicos en seres vivos. Identificar los géneros fúngicos en grano de maíz de Tamaulipas, México y las aflatoxinas presentes, su asociación con las características físico-químicas y nutricias y la identificación molecular del género *Aspergillus* spp. Se realizó el análisis de incidencia de hongos, posteriormente el análisis físico-químico (% humedad, peso hectolítrico, peso de 100 semillas, índice de flotación, lisina y triptófano) al inicio y después del almacenamiento. Las variables se analizaron con el programa STATISTIC. La cuantificación de aflatoxinas presentes se realizó en un HPLC según la norma mexicana NOM -247-SSA1-2008. Para la identificación molecular de *Aspergillus* se utilizó el gen calmodulina (*Cmda*) y un secuenciador ABI-3730XL Genetic Analyzers. Se compararon las secuencias en la base de datos del NCBI. Se analizó la presencia de genes para aflatoxinas (*afIR*, *afID*, *afIQ*) en los aislados de *Aspergillus*. Por efecto de fecha de reciba *Fusarium* fue el único hongo que mostró diferencia altamente significativa ($P \leq 0.1$), *Penicillium* lo fue por efecto de almacén y *Aspergillus* tuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la interacción de los dos factores investigados. Todos los maíces híbridos del 2011 son granos pequeños y suaves, en 2012 fueron de suavidad intermedia. El análisis de aflatoxinas mostró que el 13.18% (12 de 91) de las muestras observaron niveles detectables de la aflatoxina B1, con valores desde 3.48 a 81.33 ppb. Se obtuvieron e identificaron 60 aislamientos como *Aspergillus flavus* (Ref. NRRL3357, NCBI) y todos presentan el factor de transcripción *afIR*, excepto el aislado 111 el cual mostró la ausencia de *afIR* y del gen *afIQ*. Palabras clave: aflatoxinas, *Aspergillus flavus*, maíz, molecular

Incidence of *Aspergillus* spp. and mycotoxins in stored Maize at the northern of Tamaulipas

Maize is essential in the Mexican diet, however is affected by the presence of fungi that produce

mycotoxins, causing a variety of toxic effects on living beings. To identify the fungal genera in maize grain from Tamaulipas, Mexico and aflatoxins, their association with physicochemical and nutritional characteristics and molecular identification of *Aspergillus* spp. analysis of incidence of fungi was performed, then the physicochemical analysis (% moisture, test weight, 100 seed weight, flotation index, lysine and tryptophan) at the beginning and after storage. The variables were analyzed with the program STATISTIC. Quantification of aflatoxins was performed on a HPLC according to the Mexican standard NOM-247-SSA1-2008. For the molecular identification of *Aspergillus*, was used the calmodulin gene (*Cmda*) and an ABI-3730XL sequencer Genetic Analyzers. Comparing the sequences in the NCBI database. Genes for the presence of aflatoxins (*afIR*, *afID*, *afIQ*) in *Aspergillus* isolates were analyzed. The effect of date of receipt *Fusarium* was the only fungus showed highly significant difference ($p \leq 0.1$), *Penicillium* was the effect of store and *Aspergillus* had a significant difference ($P < 0.05$) in the interaction of the two factors investigated. All of the 2011 maize hybrids are small and soft grains in 2012 were intermediate softness. Aflatoxin analysis showed that 13.18% (12 of 91) of the samples observed detectable levels of aflatoxin B1, with values from 3.48 to 81.33 ppb. Were obtained and identified as *Aspergillus flavus* 60 isolates (Ref. NRRL3357, NCBI) and all present the transcription factor *afIR*, 111 except the isolated which showed the absence of *afIR* and *afIQ* gene.

Keywords: aflatoxin, *Aspergillus flavus*, maize, molecular

T2.13 Estrategias de control de hongos tóxicos en maíz en el Norte de Tamaulipas, México

JG García-Olivares^{1*}, EA Elizondo-Marín², HY Martínez-Padrón¹, MG Vázquez-Carrillo³, CA Reyes-Méndez³, S Hernández-Delgado¹. *Autor para correspondencia.

¹Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Blvd. Del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, 88710, Reynosa, México. e-mail: jggarcia@ipn.mx

² Universidad Autónoma de Tamaulipas-UAM-Reynosa Rhode.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

En el norte de Tamaulipas, México se cultivan entre 50 y 100 mil hectáreas con maíz (*Zea mays* L.) anualmente. La incidencia y daños por hongos toxígenos en el grano son frecuentes en campo y almacén. Se establecieron dos experimentos en campo en condiciones de riego y bajo diseños de bloques completos al azar en Díaz Ordaz (DO) y Reynosa (REY), Tamaulipas. En DO se sembró en febrero de 2013 el híbrido 8285 (Garst®) y en REY en enero el híbrido 30P40 (Pioneer®). En cada experimento se probaron los tratamientos: 1) biofungicida Quali (Unidad Regional Agrícola del Norte de Tamaulipas); 2) cepa 808 de *Trichoderma* sp. (CBG-IPN); 3) cepa AF36 de *Aspergillus flavus* (Syngenta®) y 4) testigo. A la cosecha se determinó el rendimiento de grano al 14% de humedad. Del grano cosechado se identificaron y estimaron las incidencias de hongos potencialmente toxígenos. Los rendimientos de grano en REY fueron más del doble de los de DO debido al híbrido y/o la siembra en fecha óptima en REY. En el grano de maíz se detectó a *A. flavus* (<10%), *A. niger* (5-35%), *Fusarium* (20-60%) y *Penicillium* (>70%), con incidencias similares entre localidades para *A. flavus* y *Penicillium* pero mayores para *A. niger* y *Fusarium* en REY. En ambos experimentos, los tres tratamientos de control exhibieron mayores rendimientos de grano que el testigo así como mayores incidencias de hongos toxígenos. El análisis costo-beneficio indicó pérdidas en DO en todos los tratamientos pero ganancias en los tres tratamientos con control en comparación con el testigo en REY. Los tres tratamientos de manejo y control de hongos toxígenos (Quali, AF 35 y *Trichoderma*) mejoraron la relación costo/beneficio y el rendimiento de grano del maíz en el norte de Tamaulipas en comparación con maíz sin aplicación de medidas de control.

Palabras clave: hongos toxígenos, manejo integrado, *Zea mays* L.

Strategies for control of toxigenic fungi in maize at Northern Tamaulipas, México

At northern Tamaulipas, México annually are cultivated between 50 – 100 thousand hectares with maize (*Zea mays* L.). Incidence and damage by toxigenic fungi in maize grain are frequent under field and stored conditions. We established two experiments under field conditions and irrigation using randomized complete block designs in Díaz Ordaz (DO) and Reynosa (REY), Tamaulipas. In DO the experiment was sown in February 2013 using the hybrid 8285 (Garst®) while in REY was sown in January the hybrid

30P40 (Pioneer®). At each experiment four treatments were assessed: 1) biofungicide Quali (provided by Unidad Regional Agrícola del Norte de Tamaulipas); 2) strain 808 of *Trichoderma* sp. (CBG-IPN); 3) strain AF36 of *Aspergillus flavus* (Syngenta®) and 4) control. Grain yield with 14% humidity contents were estimated at harvest. Harvested grain was used to identify and to estimate the incidences of potentially toxigenic fungi. Grain yield in REY were two-fold higher than DO due the hybrid and/or the sowing at optimal date in REY. In maize grain were detected *A. flavus* (<10%), *A. niger* (5-35%), *Fusarium* (20-60%), and *Penicillium* (>70%) with incidences similar between locations for *A. flavus* and *Penicillium* but higher than DO for *A. niger* and *Fusarium* in REY. Through both experiments the three treatments for fungi control exhibited higher grain yields than control as well as highest incidences of toxigenic fungi. Cost-Benefit analysis indicated losses for DO for all treatments but profits for the three treatments of fungi control compared with control in REY. All three treatments for management and control of toxigenic fungi (Quali, AF 35 and *Trichoderma*) improved the cost/benefit rate as well as grain yield of maize cultivated at northern Tamaulipas compared with maize without fungi control strategies.

Key words: Toxigenic fungi, integrated management, *Zea mays* L.

T2.14 Uso de técnicas moleculares para la detección de *Phymatotrichopsis omnivora* en suelos cultivados con algodón

García-O, J*, Quiroz-V JD, Martínez-P HY, Oliva-H-AA, Hernandez-DS, Hernandez-M JL. *Autor para correspondencia.

Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Blvd del Maestro s/n Esq. Elias Piña Col. N Mendoza. Reynosa, Tam 88710. e-mail: jggarcia@ipn.mx

La pudrición Texana es una enfermedad de amplia distribución en el norte de México, causándoles infección en raíz, impidiendo el movimiento del floema, el marchitamiento y muerte de la planta de algodón. Obtener un método de diagnóstico para *Phymatotrichopsis omnivora* en lotes sembrados de algodón en el noreste de México. El patógeno se aisló por lavado de filamentos de hifas en el agua y sembrado en agar con antibiótico. *P. omnivora*, es identificado mediante la amplificación del ITS-rDNA utilizando primers específicos para *P. omnivora* (PoITSA 5'-

CCTGCGGAAGGATCATTTAAA-3' y 5'-PoITSB GGGGGTTTTCTTTGTTAGGG -3'). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar la región ITS de *P. omnivora* se llevo a cabo en un volumen final de 50 ml, las condiciones del termociclador son las siguientes: desnaturalización a 95°C durante 3 min, seguido por 41 ciclos de 94°C durante 30 s, 50°C durante 45 s y 72°C durante 45 s y una extensión final de 72°C durante 7 min. Las secuencias se obtuvieron en un secuenciador automático (ABI Prism ®) utilizando la tecnología de Big Dye ®. Las secuencias obtenidas se alinearon y se corrigieron en ChromasPro (Technelysium Pty Ltd) y se compararon con la mayoría de secuencias similares del GenBank utilizando BLASTn. Después de la secuenciación se diferenciaron poblaciones de *P. omnivora* obtenidas de diferentes sitios. A partir de lo anterior se puede utilizar esta técnica para conocer si los suelos están infectados con el fitopatógeno.

Palabras clave: algodón, diagnóstico, metagenómica, *Phymatotrichopsis omnivora*

Using molecular techniques for the detection of *Phymatotrichopsis omnivora* in soils cultivated with cotton

To obtain a diagnostic method for *Phymatotrichopsis omnivora* in cotton planted in northeastern Mexico. The pathogen was isolated by washing hyphal filaments in water and sown in agar with antibiotics. *P. Omnivorous*, is identified by ITS- rDNA amplification using specific primers for *P. omnivora* (PoITSA CCTGCGGAAGGATCATTTAAA - 5'- 3' and 5'- PoITSB GGGGGTTTTCTTTGTTAGGG 3'). Chain reaction (PCR) to amplify the ITS region of *P. omnivorous* was performed in a final volume of 50 ml. Thermocycler conditions were as follows: denaturation at 95°C for 3 min, followed by 41 cycles of 94°C for 30 s, 50°C for 45 s and 72°C for 45 s and a final extension of 72°C for 7 min. Sequences were obtained on an automatic sequencer (ABI Prism ®) using the Big Dye ® technology. The obtained sequences were aligned and corrected in ChromasPRO (Technelysium Pty Ltd) and compared with most similar sequences from GenBank using BLASTn. After sequencing *P. omnivora* populations obtained from different sites differed. From the above you can use this technique to see if the soil is infected with the phytopathogen.

Keywords: cotton, diagnosis, metagenomics *Phymatotrichopsis omnivorous*

T2.15 Formulación de un producto biológico a base de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para el control de *Mycosphaerella fijiensis*

Rosa Castro^{1,2*}, Marcia Pesántez¹, Yelenys Alvarado-Capó². *Autor para correspondencia.

¹Departamento de Fitopatología. Facultad de Recursos Naturales. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Panamericana Sur km 1.5. Riobamba. Chimborazo. Ecuador. CP 06-01-4703 e-mail: rcastro@esPOCH.edu.ec

²Instituto 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

En Ecuador, el cultivo orgánico de banano tiene gran importancia económica. Sin embargo, la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) afecta la productividad y limita las exportaciones de la fruta. Ante esta problemática se requieren alternativas que permitan mantener los niveles productivos sin el uso de fungicidas químicos. En la búsqueda de ellas, la ESPOCH ha incursionado en la producción semi-comercial de productos biológicos. El objetivo de este trabajo fue formular un bioproducto a base de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para el control de Sigatoka negra. Se hicieron aislamientos y se caracterizaron morfológica, bioquímica y molecularmente. En base a los resultados se seleccionaron cepas y se realizaron pruebas de eficiencia a nivel de laboratorio, invernadero y campo frente al patógeno. Además, se multiplicó la cepa seleccionada, se formuló el bioproducto y se realizaron ensayos de estabilidad y caducidad del productor. Se obtuvieron aislados de *Trichoderma* spp. asociados a la rizosfera de plantas de *Musa* spp. en bananeras orgánicas. En base a sus características se seleccionaron dos cepas de *Trichoderma harzianum* con las cuales se logró la formulación de un bioproducto que se nombró TRIKOFUN. La curva de crecimiento presentó la fase de crecimiento hasta los 15 días con una población de aprox. $3,05 \times 10^9$ UFC/ml de formulado, seguida de la fase estacionaria que se extendió hasta los 24 días, donde la concentración permaneció constante. Al cabo de 60 días de almacenado el producto contenía $1,44 \times 10^9$ UFC/ml. El tiempo máximo de viabilidad de TRIKOFUN, conservado a 4°C fue de 45 días después de formulado. Este bioproducto fue registrado en el Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador y se emplea sistemáticamente por los productores de las bananeras orgánicas del grupo agrícola Prieto, del grupo Marún, del grupo Quirola desde hace

siete años. Además se ha extendido su uso a otros cultivos agrícolas.

Palabras clave: banano orgánico, bio-producto, cepa, Trikofun

T2.16 Empleo del exoesqueleto triturado de *Panulirus argus* (Latreille) en el control de la enfermedad mal seco de la malanga

Michel Chamizo^{1*}, Daimy Isabel Carrazana², Annarella Chea³. *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: mchamizo@ibp.co.cu

²Facultad de Química-Farmacología. Universidad 'Marta Abreu' Central de Las Villas. Carretera a Camajuaní km.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

³Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

El procesamiento de la langosta es una de las principales actividades de la industria pesquera cubana. El exoesqueleto branquial usualmente se desecha convirtiéndose en un residuo difícil de manipular y muy contaminante del medio ambiente. En Cuba se ha propuesto una alternativa de manejo agrotécnico para el control de la enfermedad fungica 'mal seco' en la malanga. Sin embargo, su combinación con el uso de bioproductos puede contribuir a un mejor resultado. Es por ello, que este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del exoesqueleto seco y triturado de *Panulirus argus* (Latreille) en la incidencia de la pudriciones secas causadas por *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) en el cultivo de la malanga. Como material vegetal se utilizaron plantas obtenidas *in vitro* y cultivadas en bolsas sobre sustrato de humus de lombriz de los clones Blanca INIVIT y Blanca Venegas. A los 30 días de cultivo, se efectuaron tres tratamientos con la aplicación sobre el sustrato de 3.0 g del bioproducto, 3.0 g de Mancozeb y el control sin tratar. Se evaluó la incidencia de la enfermedad y el rendimiento de las plantas a los 11 meses en campo. Los resultados mostraron que la incidencia de la enfermedad fue menor en el tratamiento con el bioproducto, dado por el menor porcentaje de infestación, con diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos. El rendimiento total del cultivo fue superior cuando se realizó el tratamiento con el bioproducto, por un incremento en la masa fresca de los rizomas secundarios. Dado la relativa simplicidad en la

obtención del bioproducto estudiado, este constituye una alternativa viable y enmarcada en el concepto de agricultura sostenible.

Palabras clave: bioproducto, Blanca INIVIT, *Panulirus*, *Sclerotium*

T2.17 Reducción de la biomasa de *Mycosphaerella fijiensis* en plantas de *Musa* spp. inoculadas artificialmente y en presencia de filtrados bacterianos con actividad antifúngica

Mileidy Cruz-Martín^{1*}, Mayra Acosta-Suárez¹, Eilyn Mena¹, Berkis Roque¹, Michel Leiva-Mora¹, Tatiana Pichardo¹, Miguel Tzec Simá², Yelenys Alvarado-Capó¹, Blondy Canto Canche². *Autor para correspondencia e-mail: mileidy@ibp.co.cu

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

²Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Mérida Yucatán, México.

En trabajos previos se demostró que los filtrados de cultivo de la cepa bacteriana CCIBP.B-C5 aislada de la filósfera de *Musa* spp. y con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis* eran capaces de disminuir el número de lesiones necróticas y el progreso de Sigatoka negra en plantas de bananos inoculadas artificialmente con suspensiones miceliales de *M. fijiensis*. No obstante, se requiere un mayor conocimiento del efecto que tienen estos filtrados sobre el patógeno en la interacción *Musa*-*M. fijiensis*, es por ello que el trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de los filtrados de cultivo de esta cepa sobre la biomasa del hongo en plantas inoculadas artificialmente en casa de cultivo. Se aplicó el filtrado de cultivo bacteriano en contacto con el micelio del hongo (envés) y sin contacto con este (haz) a las 72 horas posteriores a la inoculación del patógeno. Se cuantificó la biomasa fúngica mediante la técnica de PCR en tiempo real y se empleó el método de curva estándar. Como resultado se observó una disminución significativa de la biomasa del hongo a partir de los tres días posteriores a la inoculación con respecto al control, en las plantas donde el filtrado de cultivo fue aplicado por el envés de la hoja. En las plantas donde el filtrado se aplicó por el haz, la biomasa de *M. fijiensis* solo fue significativamente inferior al control inoculado, a los seis días posteriores a la inoculación. Este estudio corrobora el efecto

inhibidor del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP.B-C5 sobre el desarrollo de la enfermedad y coinciden con los resultados de actividad antifúngica obtenidos *in vitro*. Sugieren además, que en esta respuesta, pueden estar involucrados otros mecanismos, como la inducción de resistencia en las plantas, sin embargo, se requieren realizar otros estudios.

Palabras clave: bananos, bacterias, filósfera, PCR en tiempo real, Sigatoka negra

***Mycosphaerella fijiensis* biomass reduction in *Musa* spp. plants artificially inoculated in presence of bacterial filtrates with antifungal activity**

In previous work it was shown that culture filtrates of the bacterial strain CCIBP.B - C5 isolated of the phyllosphere of *Musa* spp. and antifungal activity *in vitro* against *Mycosphaerella fijiensis* were able to decrease the number of necrotic lesions and the progression of Black sigatoka on banana plants artificially inoculated with mycelial suspensions of *M. fijiensis*. However, a better understanding of the impact of these filtrates on the pathogen in the *Musa* M. *fijiensis* interaction is required, that why, the aim of the work was to determine the effect of culture filtrates of this strain on the fungal biomass in artificially inoculated plants on greenhouse. The bacterial culture filtrate was applied in contact with the mycelium (lower leaf surface) and without contacting (upper leaf surface) at 72 hours after inoculation of the pathogen. The fungal biomass was quantified using the technique of real time PCR and the standard curve method was used. A significant decrease in fungal biomass at three days after inoculation where the culture filtrate was applied on the lower leaf surface compared to control plants was observed. On plants where the culture filtrates was applied by the upper leaf surface, the *M. fijiensis* biomass was only significantly lower than controls at six days after inoculation. This study confirms the inhibitory effect of the culture filtrate of the strain CCIBP.B-C5 on the development of disease and is consistent with the results of *in vitro* antifungal activity. Also, they suggest that in this response, other mechanisms may be involved, such as the induction of resistance in plants, however, further studies are required.

Keywords: bananas, bacteria, Black sigatoka, phyllosphere, Real time PCR

T2.18 Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a *Fusarium solani* (Mart) y

***Fusarium oxysporum* (Schltd) agentes causales de la pudrición seca de minitubérculos de papa**

Berkis Roque¹, Mayra Acosta-Suárez^{1*}, Michel Leiva-Mora¹, Maireby Herrera², Yelenys Alvarado-Capó¹, Mileidy Cruz-Martín¹, Tatiana Pichardo¹, Eilyn Mena¹ y Felipe Jiménez-Terry. *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: mayra@ibp.co.cu

²Instituto Superior Pedagógico de Cienfuegos. Cienfuegos.

Una de las principales limitantes en la conservación de los minitubérculos de papa obtenidos por métodos biotecnológicos radica en que no existen alternativas eficiente para el control de las especies del género *Fusarium*. El presente trabajo se propuso como objetivo determinar el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* agentes causales de la pudrición seca de minitubérculos de papa. Se utilizaron cepas conservadas en la Colección de Cultivos Microbianos del IBP. Se realizó la técnica del cultivo dual del antagonista frente a los patógenos en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa. Las variables evaluadas fueron: tasa de crecimiento del antagonista y los patógenos, porcentaje de inhibición del crecimiento radial, concentración de conidios, porcentaje de inhibición de la esporulación, grado de micoparasitismo, interacción de las hifas, así como las formas e intensidad del antagonismo. *T. viride* mostró *in vitro* antagonismo físico e hiperparasítico frente a *F. oxysporum* y *F. solani*; así como una actividad antagónica de intensidad elevada debido a su velocidad de crecimiento y la competencia por espacio y nutrientes.

Palabras clave: biocontrol, pudrición seca de la papa, postcosecha

T2.19 Identificación de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición seca de minitubérculos de papa

Mayra Acosta-Suárez^{1*}, Michel Leiva-Mora¹, Maireby Herrera², Yelenys Alvarado-Capó¹, Mileidy Cruz-Martín¹, Berkis Roque¹, Tatiana Pichardo¹, Eilyn Mena¹ y Felipe Jiménez-Terry. *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: mayra@ibp.co.cu

²Instituto Superior Pedagógico de Cienfuegos. Cienfuegos.

El Instituto de Biotecnología de las Plantas, ha desarrollado desde 1994 una tecnología para la producción de semilla original de papa. Sin embargo, han ocurrido pérdidas de minitubérculos en la cosecha y conservación por enfermedades, debido principalmente a la presencia de microorganismos patógenos del suelo, dentro de ellos, el género *Fusarium*. La identificación de las especies de este género ayudaría a diseñar estrategias para su control. El presente trabajo se propuso como objetivo: Identificar las especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición seca de minitubérculos de papa conservados en refrigeración. Para esto, minitubérculos de papa cv. 'Grettel', con síntomas de pudrición seca y previamente desinfectados se colocaron en cámara húmeda por siete días. El micelio crecido fue transferido a placas de Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa y se purificaron los aislados en similar medio de cultivo. Se describieron las características culturales de las colonias y se realizaron observaciones en microscopio óptico del micelio y las estructuras de reproducción. Para la identificación de los aislados de *Fusarium*, se utilizaron los métodos de clasificación tradicionales. Se aislaron nueve cepas de *Fusarium* y se identificaron dos especies: *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. Los resultados de este trabajo permitirán desarrollar alternativas de control más eficientes para controlar la enfermedad y mejorar la calidad fitosanitaria de la semilla de papa.

Palabras clave: Características culturales, características morfológicas, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*

Identification of *Fusarium* species associated to dry rot of potato minitubers

Since 1994, IBP has developed a technology for producing of potato original seed. Nevertheless, many losses of minitubers in the harvest and conservation had occurred by diseases, mainly for pathogenic species of the *Fusarium* genera. The identification of the species would help to design strategies for its control. The aim of this work was to identify the species of *Fusarium* associated to the dry rot of preserved potato minitubers. For this, potato minitubers cv. 'Grettel' with symptoms of dry rot and previously disinfected were placed seven days in humid camera. The grown mycelium was transferred to Petri plates with Potato Dextrose Agar and

purified in the same culture medium. The colony cultural characteristics were described. Besides, morphological characteristics of mycelia and reproductive structures were observed in optical microscope. Traditional classification methods were used for *Fusarium* species identification. Nine isolates of *Fusarium* were obtained and two species were identified: *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*. The results of this work will allow the development of more efficient alternatives for controlling the disease and to improve the phytosanitary quality of potato seed.

Key words: Cultural characteristics, morphologic characteristics, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*

T2.20 Effect of light intensity on physiological and biochemical changes in pineapple plantlets (*Ananas comosus* (L.) Merr.) 'MD-2'

Justo L. González-Olmedo*, Romelio Rodríguez, Carlos E. Aragón, René Rodríguez-Escriba, Dariel López, Rosa Becquer, Yaima Pino and Yolanda Garza-García, A. Chalfun-Junior. *Autor para correspondencia.

Agro-Biology Laboratory. Bioplant Center. University of Ciego de Avila, CP 69 450. Cuba. e-mail: justo@bioplantas.cu

The present work evaluated the physiological and biochemical changes in plantlets of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) 'MD-2' growing under two different environmental conditions (light intensity, relative humidity and temperature). All measurements were carried out at 28 days each three hour during day and night conditions. Measurements of leaf gas exchange and transpiration rate, chlorophyll contents, pH leaf sap, succulence index, Superoxide Dismutase (SOD) activity and total proteins contents were made in the leaves of the pineapple MD-2 over a 28 days period under high and low photosynthetic photon flux density ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Maximum exchange CO_2 rate (8.25 and $3.0 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were measured in leaves under high light (HL) and low light (LL) respectively at six hours, while transpiration rate in leaves of plantlets growing under HL was highest between 3 and 6 hours compared with plantlets in LL (these values were duplicate at 6 h, 1.22 and $0.63 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in HL to LL). During the experiment leaf chlorophyll content was affected by long-term HL and there was a significant decrease in the chlorophyll a/b ratio ($0.07 \mu\text{g g}^{-1} \text{FW}$). Significant increment of pH was found between 12 and 18 h (pH 4 to 6 respectively) in both treatments, a significant difference was observed in the plantlets growth

under HL (pH 6) compared with LL (pH 5) plantlets to 15 h during light period. Leaf acidity was greater in the afternoon than in the subsequent evening and morning, indicative of CAM metabolism in both light intensities. SOD activity was increased after 12 h in both treatments, plantlets grown under HL were approximately double those LL plantlets (0.15 and 0.09 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ FW respectively) at 18 h. In pineapple plantlets during hardening state the CAM metabolism was more evident when plantlets were grown under high photosynthetic photon flux density conditions. Isoenzyme patterns and transcriptomic profiles were also measured. Isoenzymes of SOD and CAT were identified by electrophoresis and the transcript levels of OEE 1 and CAT were associated with CAM metabolism in pineapple plants.

Keywords: carbon metabolism, Light intensity, oxidative stress, photosynthesis, RT-qPCR. Transpiration

T2.21 Superoxide dismutase activity and jasmonic acid during *in vitro-ex vitro* transition of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) micropropagated plantlets

Garza-García, Y¹, Mboghli, A.², Rodríguez-Escriba, R.C.², López, D.², Rodríguez, R.², Aragón, C. E.², González-Olmedo, J. L.^{2*}. *Autor para correspondencia.

¹Biotechnology Dpt., Faculty of Chemistry, University of Coahuila, Mexico.

²Agro-biology Lab., Centro de Bioplasmas, University of Ciego de Avila, Cuba. e-mail: justo@bioplasmas.cu

Recent agriculture is characterized by intensive and cleaning productions, which need seeds with high quality in large quantities bonded by *in vitro* culture labs. Nevertheless *in vitro-ex vitro* transition and during acclimatization occur losses due to the death of plantlets unable to survive this abiotic stress. Reactive Oxygen Species production during jasmonic acid-induced changes previous transition was demonstrated. The role of superoxide dismutase in regulation of oxidative metabolism signaling in response to environmental stress is analyzed. Pineapple plantlets treated with jasmonic acid showed higher protein biosynthesis, which can be associated with a better regulated metabolic predisposition to face this phase, when superoxide dismutase activity showed adequate control against this stress related to superior water-use efficiency and survival.

Keywords: environmental stress, water-use efficiency, survival

T2.22 Molecular characterization of *Musa acuminata* - *Mycosphaerella fijiensis* Morelet interaction

Milady F. Mendoza-Rodríguez^{1*}, Orelvis Portal², María I. Oloriz¹, Bárbara Ocaña¹, Luis E. Rojas¹, Eduardo Canales³, Orlando Borrás³, Elio Jiménez y Mónica Hofte⁴. *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

²Departamento de Biología. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Cuba.

³Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 e/ 158 y 190, Playa, P.O. Box 6162, La Habana 10 600, Cuba.

⁴Laboratory of Phytopathology, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Coupure Links 653, B-9000 Gent, Belgium.

Black leaf streak or "black Sigatoka" is caused by the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet [anamorph: *Pseudocercospora fijiensis* Morelet (Deighton)], is the most important foliar disease affecting bananas and plantain worldwide. The molecular bases which govern banana-*M. fijiensis* interaction constitute an important step for the development of efficient strategies for the sustainable management of the disease. At the present work gene expression analysis during the incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* and compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis* interaction was made throughout real time polymerase chain reaction. Banana plants were inoculated with the monoascosporic isolate of *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83, which belong to the Microbiol Culture Collection of Apply Microbiology. Leaf samples plants were taken at 3, 6, 9, 12 and 15 days after pathogen inoculation and from non inoculated plants at the beginning of the experiment. Three biological replicates were used for every point. Primer were designed from selected sequences of a suppression subtractive library (SSH) made at an early stage of infection of 'Calcutta 4' plants with this pathogen and from genes involved in phenylpropanoids biosynthesis (Portal *et al.*, 2011) with PRIMER3 software. In the incompatible interaction the activation of genes related with primary metabolism *Psl* (*photosystem I reaction center subunit N*), secondary metabolism *Sams* (*S-adenosyl methionine synthetase*), oxidative stress process *Trx* (*thioredoxin*) and phenylpropanoids pathway

derived genes such as *C4h* (*Cinnamate-4-hydroxylase*) and *Ifr* (*Isoflavone reductase*) at 6 days post inoculation suggest their possible role in 'Calcutta 4' plant defense response faced *M. fijiensis* pathogen. However at the compatible interaction the fold change of these genes seem to be not enough for banana disease resistance.

Keywords: Black Sigatoka, Gene expression, *Musa* spp., *Mycosphaerella fijiensis* and Real time PCR

Caracterización molecular de la interacción *Musa acuminata* - *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

El rayado negro de la hoja o Sigatoka negra causada por el hongo hemibiotrófico *Mycosphaerella fijiensis* Morelet [anamorfo: *Pseudocercospora fijiensis* Morelet (Deighton)], es la enfermedad foliar más importante que afecta bananos y plátanos mundialmente. Las bases moleculares que gobiernan la interacción banano-*M. fijiensis* constituye un paso importante para el desarrollo de estrategias eficientes para el manejo sostenible de la enfermedad. En el presente trabajo el análisis de la expresión de genes durante la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* y la compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis* fue realizada a través de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Las plantas de banano se inocularon con un aislado monoascospórico de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83, perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas (Cuba). Las muestras de hojas de plantas se colectaron al inicio y a los 3, 6, 9, 12 y 15 días posteriores a la inoculación con el patógeno. Tres réplicas biológicas se utilizaron por cada punto. Los cebadores se diseñaron de secuencias seleccionadas de la biblioteca sustractiva (SSH) creada en un estadio temprano de la infección de plantas de 'Calcutta 4' con este patógeno y de genes involucrados en la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides (Portal *et al.*, 2011) con el programa PRIMER3. En la interacción incompatible la activación de genes a los seis días posteriores a la inoculación en la relacionados con el metabolismo primario *Psl* (*centro de reacción del fotosistema I*), el metabolismo secundario *Sams* (*S-adenosilmetionina sintetasa*), el proceso de estrés oxidativo *Trx* (*Tioredoxina*) y de los genes derivados de la ruta de los fenilpropanoides *C4h* (*Cinamato-4-hidroxilasa*) e *Ifr* (*Isoflavona reductasa*) sugieren su posible papel en la respuesta de defensa de plantas de 'Calcutta 4' frente al patógeno *M.fijiensis*. Sin embargo, en la

interacción compatible las veces de cambio de estos genes parece no ser suficiente para la resistencia a la enfermedad en bananos.

Keywords: expresión de genes, *Musa* spp., *Mycosphaerella fijiensis*, PCR en tiempo real, Sigatoka negra

T2.23 Efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la obtención de minitubérculos de papa en casa de cultivo

Yelenys Alvarado-Capó^{*1}, Michel Leiva-Mora¹, Mileidy Cruz-Martín¹, Eilyn Mena¹, Mayra Acosta-Suárez¹, Berkis Roque¹, Tatiana Pichardo¹, Leyanes García-Aguila¹, Felipe Jiménez-Terry¹, Ortelio Hurtado¹, Novisel Veitia¹, Legnara Padrón²

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: yelenys@ibp.co.cu

²Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas.

En el cultivo de la papa las prácticas agronómicas tanto para la producción de semilla, como tubérculos para el consumo humano buscan obtener altos rendimientos, pero se requiere un uso intensivo de fertilizantes que además de su elevado costo, provocan afectaciones medioambientales tanto al suelo como al agua. Ante esta problemática el uso de microorganismos que contribuyan a la nutrición de la planta y permitan disminuir el uso de fertilizantes químicos ha cobrado gran importancia, es por ello que el que el trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la obtención de minitubérculos de papa. Se emplearon plantas *in vitro* de papa cv. 'Romano', obtenidas por organogénesis. Se evaluaron siete tratamientos, para ello se utilizaron cinco cepas bacterianas (CCIBP-M27, CCIBP-C5, CCIBP-B14, CCIBP-W13 y CCIBP-B12) pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos del IBP, con propiedades como promotoras del crecimiento vegetal, además se incluyeron los controles con y sin fertilizantes. La Inoculación de las cepas bacterianas ($A_{D0600}=1$ se realizó por inmersión de raíces 30 minutos. Las variables evaluadas fueron: altura (cm), número de tallos, masa fresca planta (g), masa seca planta (g), número de tubérculos por planta, masa fresca de los tubérculos. Se comprobó que la inoculación de bacterias al momento de la plantación influyó en el crecimiento y desarrollo de plantas *in vitro* de

papa cv. 'Romano'. Además, se observaron diferencias en el efecto de las cepas según las variables evaluadas. La aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la obtención de minitubérculos de papa podría disminuir el uso de fertilizantes químicos.

Palabras clave: *Solanum tuberosum* L., crecimiento, desarrollo

COMPUESTOS ACTIVOS EN PLANTAS/ *Active compounds in plants*

T3.1 Técnicas biotecnológicas para la producción de compuestos activos de plantas medicinales

Naivy L. Pérez-Alonso^{1*}, Alina Capote Pérez¹, Raúl Barbón¹, Elisa Quijál¹, Anabel Pérez Pérez¹, Rafael Gómez Kosky¹, André Gerth², Dirk Wilken², Elio Jiménez González¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) Carretera a Camajuaní Km 5,5 Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: naivy@ibp.co.cu

²BioPlanta GmbH, Leipzig, Alemania

Existe un marcado interés en la aplicación de métodos de cultivo *in vitro* y técnicas biotecnológicas para la producción de plantas medicinales y el incremento de sus compuestos activos. Con este objetivo, se desarrollaron distintos métodos de cultivo *in vitro* para especies de plantas con propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, cardiotónicas y nutracéuticas: *Cymbopogon citratus*, *Fabiana imbricata*, *Lavandula officinalis*, *Morinda royoc*, *Hypericum perforatum*, *Digitalis purpurea*, *Digitalis lanata* y *Taxus chinensis*. Las estrategias desarrolladas en estas especies están relacionadas con el cultivo de células y órganos, el cultivo en sistemas de inmersión temporal (SIT) y la elicitación. La concentración de compuestos activos en los brotes cultivados en SIT fue mayor que en los cultivos de células y biorreactores. Desde que los SIT permiten la producción de biomasa a gran escala, esta técnica representa una alternativa para la producción e incremento de metabolitos secundarios mediante la optimización y manipulación de los parámetros ambientales. Mediante la variación de las condiciones y la adición de elicitores fue posible la activación transitoria de las rutas biosintéticas en el cultivo de suspensiones de *T. chinensis* y en el cultivo de brotes de *D. purpurea* y *D. lanata*.

Además, se pudo demostrar que el cultivo *in vitro* es una fuente potencial para la identificación y producción de nuevos compuestos al compararse los perfiles metabólicos de las biomásas obtenidas por distintos métodos de cultivo *in vitro* y plantas de campo. Estos estudios demuestran el potencial de la aplicación de las técnicas biotecnológicas para la producción de compuestos activos de plantas medicinales.

Palabras clave: compuestos activos, cultivo de células, elicitores, sistemas de inmersión temporal

Biotechnological approaches for active compounds production from medicinal plants

The application of plant tissue methods and biotechnological approaches has aroused widespread interest for the production of medicinal plants and increase of secondary metabolites. With this aim, *in vitro* culture techniques were developed for plants species with anticancer, anti-inflammatory, cardiotoxic and nutraceutical properties: *Cymbopogon citratus*, *Fabiana imbricata*, *Lavandula officinalis*, *Morinda royoc*, *Hypericum perforatum*, *Digitalis purpurea*, *Digitalis lanata*, *Taxus chinensis*. The strategies developed in these species are related to cell and organ culture, temporary immersion systems (TIS) and elicitation. Concentrations of bioactive compounds were always higher in plant material grown in TIS compared to cell suspension and bioreactors. Since TIS allows the industrial scale-up of biomass, this technique represent an alternative for secondary metabolites production and increase by optimization and manipulation of culture conditions. Results showed that transient activation of biosynthetic ways was possible by culture conditions variation and elicitation in cell suspensions of *Taxus chinensis* and shoot cultures of *D. purpurea* y *D. lanata*. Besides, *in vitro* culture is a potential source for identification and isolation of new compounds when metabolic profile between field-grown plants and *in vitro* culture biomass were compared. These studies demonstrate the potential for application of biotechnological approaches for production of active compounds from medicinal plants.

Key words: active compounds, cell culture, elicitors, temporary immersion systems

T3.2 Producción de azadirachtina en callos y cultivo de células en medio líquido de *Azadirachta indica* y evaluación de su actividad biológica

Amelia Capote Rodríguez*, Viviana Rodríguez, Margarita Alfonso Hernández, Rubén Avilés Pacheco, Odalys Pérez Díaz, María Elena Álvarez y Yolanda Martínez. *Autor para correspondencia.

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). La Habana, Cuba. e-mail: dircientifica@inifat.co.cu

El Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) es una especie leñosa de gran importancia económica, debido a sus propiedades medicinales y su uso como insecticida natural. Entre los metabolitos que produce con actividad insecticida se encuentra la azadirachtina (AZA), molécula tetraterpenoide con actividad repelente o inhibidora del desarrollo de los insectos, la cual se está utilizando para la elaboración de bioproductos para el control de plagas que afectan los cultivos de importancia económica. La naturaleza química compleja de esta molécula y los diversos requerimientos estructurales necesarios para lograr su actividad, han impedido realizar su síntesis química y la de algunos de sus análogos bioactivos. La aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos constituye una alternativa para la inducción de metabolitos secundarios. Por tanto, los objetivos del presente trabajo fueron detectar la presencia de azadirachtina (AZA) en callos y cultivo de células de Nim en medio líquido mediante la técnica de cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y estudiar su actividad insecticida mediante bioensayos utilizando *Drosophila melanogaster* como insecto indicador. Las técnicas analíticas utilizadas permitieron detectar la presencia de AZA en callos y suspensiones celulares de Nim. En las muestras de callos solo se encontraron trazas no cuantificables; sin embargo, en las suspensiones celulares fue posible detectar su presencia en dependencia del tiempo de cultivo. Estas llegaron a contener un equivalente de 4.8 mg de azadirachtina/g de tejido vegetal. En los bioensayos insecticidas realizados se detectó afectación en la oviposición de las hembras grávidas y prolongación de la fase larval (superlarvas). Se interrumpió la formación de las pupas y provocó la muerte de las larvas. Estos resultados corroboran la posibilidad de inducir la síntesis de esta sustancia utilizando las técnicas de cultivo de tejidos.

Palabras clave: azadirachtina, bioensayos, cultivo de tejidos, metabolitos secundarios, nim

T3.3 Betalainas a partir de cultivo *in vitro* de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*)

Martha Hernández^{1*}, Jennifer Gonzaga², Patricia Esquivel³, Víctor M. Jiménez²

¹ Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, 69450, Cuba. e-mail: mhernandez@bioplantass.cu

² CIGRAS, Universidad de Costa Rica, 2060, San Pedro, Costa Rica, e-mail: victor.jimenez@ucr.ac.cr

³ CITA, Universidad de Costa Rica, 2060, San Pedro, Costa Rica.

La pitahaya (*Hylocereus* spp.), pertenece a la familia botánica *Cactaceae*, se encuentra especialmente en regiones semidesérticas, y cálidas tropicales de América Latina. Es una especie de valor comercial, sus frutos (de forma y color atractivo y con buenas propiedades intrínsecas) son de interés para la industria alimenticia. Las especies de pulpa roja o morada son ricas en betalainas, pigmentos de alto valor como antioxidantes y colorantes alimentarios naturales. En los frutos de *Hylocereus costaricensis* se han detectado altas concentraciones de betalainas, sin embargo su extracción es difícil. Con el objetivo de inducir la pigmentación de callos de *Hylocereus costaricensis* var. 'Orejona', obtenidos a partir de semillas germinadas *in vitro* y de areolas de tallos de plantas adultas cultivadas *in vitro*, se cultivaron en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), ácido jasmónico (AJ) y ciclodextrinas (CD). El mayor incremento de masa fresca de los callos se obtuvo con 22 µM de BAP. En los callos de pitahaya cultivados en medio de cultivo MS con 45 y 90 µM BAP se observaron diferentes intensidades de pigmentación. Los mayores niveles de pigmentación se lograron en el medio de cultivo con 45 µM BAP. Los mejores resultados para la pigmentación se registraron cuando los cultivos de callo se iniciaron a partir de plantas adultas de pitahaya (brotes laterales de areolas). Además, se establecieron suspensiones celulares a partir de callos de pitahaya. Se detectó la presencia de coloración roja en el material vegetal y en el medio de cultivo líquido de las suspensiones. Se evaluó la influencia de la luz en el desarrollo de la pigmentación. Esta investigación proporciona una guía para el estudio de genes relacionados con la expresión de betalainas en el cultivo *in vitro*. El cultivo *in vitro* puede ser una alternativa interesante para obtener colorantes alimentarios.

Palabras clave: betalainas, elicitores, *Hylocereus costaricensis*, *in vitro* culture

Betalains from *in vitro* cultures of pitahaya (*Hylocereus costaricensis*)

Pitahaya belongs to the genus *Hylocereus* of the botanical family *Cactaceae*, found especially in the semi-desert, hot tropical regions of Latin America. Pitahaya has several commercial outcomes because the fruits are attractive in shape and color and they have very good intrinsic properties of high interest for the food industry. The red-fleshed species are rich in betalains, meeting the increasing interest for antioxidant products and natural food colorants. High concentrations of betalains have been detected in fruits of *Hylocereus costaricensis* but their extraction as proven to be difficult. In this work experiments to induce pigmentation were conducted using pitahaya calluses obtained from seeds germinated *in vitro* and from areoles from adult plants. Murashige and Skoog (MS) medium with different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP), jasmonic acid (JA) and cyclodextrins (CDs) were tested. The largest increase in fresh weight of calluses was obtained by using 22 μ M BAP. The callus culture of *H. costaricensis* on MS medium supplemented with 45 and 90 μ M BAP produced different intensities of pigmentation. The highest mass of pigmented callus was observed on medium supplemented with 45 μ M BAP. The best results for pigmentation were observed when the callus cultures were started from pitahaya adult plants (lateral shoots from areoles). In addition, cell suspension cultures were established from calluses of pitahaya. The presence of red color in plant material and in the liquid medium suspension cultures was also detected. Additionally, the influence of light on the development of pigmentation was evaluated. Our investigation provides a guide for further study of genes associated with betalain expression in pitahaya *in vitro* cultures. *In vitro* culture could be an interesting alternative for obtaining food colorants such as betalains.

Keywords: betalains, elicitors, *Hylocereus costaricensis*, *in vitro* culture

T3.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de flores de *Gliricidia sepium*

Leydi Fonte Carballo*, Maykelis Díaz Solares, Rey Machado Castro, Yudit Lugo Morales, Dairom Blanco Betancourt. *Autor para correspondencia.

Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Central España Republicana, CP 44 280, Matanzas, Cuba. e-mail: leydis.fonte@ihatuey.cu

Gliricidia sepium ha sido catalogado como un árbol multipropósito debido a sus disímiles usos. Además es un pilar importante en la medicina tradicional de muchos pueblos de América Latina, aunque la mayoría de estos resultados se han basado en estructuras como la raíz, el tallo y las hojas; no tomando en cuenta las flores. Por ello el objetivo fue determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes extractos de la flor. Se identificaron los metabolitos secundarios involucrados en la respuesta antimicrobiana y la concentración mínima inhibitoria (CMI). La actividad antimicrobiana de los extractos se evaluó frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* mediante el método de perforaciones en agar y disco-placa-cultivo. Para determinar la existencia de diferencias entre los tratamientos, en función del diámetro del halo de inhibición, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis al no cumplirse los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad, utilizando el software InfoStat versión Libre. Los resultados indicaron que para ambos métodos, en los cuatro microorganismos evaluados, los extractos etanólicos (fresco y seco) de flores en la dilución de 100% fueron los que tuvieron mayor efecto inhibitorio. Sin embargo en el método de disco-placa-cultivo, *Staphylococcus aureus* fue la bacteria más susceptible de este grupo frente al extracto fresco etanólico de flor, al mostrar halos de inhibición de 25.0 mm en la dilución al 25%. Se concluye que en los dos métodos evaluados, los extractos etanólicos de flores presentaron mayor efecto inhibitorio que los metanólicos. Además la actividad antimicrobiana que mostraron estos extractos pudo estar influenciada por los metabolitos secundarios detectados como es el caso de los flavonoides y las antraquinonas que juegan un importante papel en la defensa de la plantas frente a patógenos.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, extractos vegetales, *Gliricidia sepium*

Evaluation of the antimicrobial activity of extracts from *Gliricidia sepium* flowers

Gliricidia sepium has been classified as a multipurpose tree due to its different uses. In addition, it is an important milestone in the traditional medicine of many Latin American countries, although most of these results have been based on structures such as the root, stem and leaves; not taking the flowers into consideration. For such reason, the objective of

this work was to determine the *in vitro* antimicrobial activity of different flower extracts. The secondary metabolites involved in the antimicrobial response and the minimum inhibitory concentration (MIC) were identified. The antimicrobial activity of the extracts was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* through the method of agar diffusion and disc-dish-culture. To determine the existence of differences among the treatments, with regards to the diameter of the inhibition halo, the non-parametric Kruskal Wallis test was used as the assumptions of variance and normality homogeneity were not fulfilled, using the software InfoStat, free version. The results indicated that for both methods, in the four evaluated microorganisms, the fresh and dry ethanolic flower extracts in the 100% dilution were the ones with a higher inhibitory effect. However, in the disc-dish-culture method, *Staphylococcus aureus* was the most susceptible bacterium of this group before the fresh ethanolic flower extract, showing inhibition halos of 25.0 mm in the 25% dilution. It is concluded that in the two evaluated methods the ethanolic flower extracts showed higher inhibitory effect than the methanolic ones. In addition, the antimicrobial activity shown by these extracts could have been influenced by the detected secondary metabolites as in the case of flavonoids and anthraquinones which play an important role in the defense of plants against pathogens.

Key words: antimicrobial activity, *Gliricidia sepium*, plant extracts

T3.5 Inhibición de la actividad tirosinasa de extractos de raíces de 12 variedades de *Morus alba*

Maykelis Díaz Solares^{1*}, Yudit Lugo Morales¹, Jacqueline Aparecida Takahashi², Yanio E. Milián Rodríguez¹, Giraldo J. Martín Martín¹. *Autor para correspondencia.

¹Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Central España Republicana, CP 44 280, Matanzas, Cuba. e-mail: maykelis.diaz@ihatuey.cu

²Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química. Laboratorio de Biotecnología y Bioensayos. Av. Antonio Carlos, 6627 CEP 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brasil.

La tirosinasa es una enzima multifuncional que cataliza los dos primeros pasos de la melanogénesis en mamíferos y es la responsable de las reacciones de pardeamiento enzimático en las frutas dañadas durante el manejo post-

cosecha y el respectivo procesamiento. Ni la hiperpigmentación en la piel humana, ni el pardeamiento enzimático en las frutas son deseables. Estos fenómenos han contribuido a buscar nuevos inhibidores de la tirosinasa para su uso en alimentos y cosméticos. Para la investigación se utilizaron 12 variedades e híbridos de *Morus alba* (Tigreada, Indonesia, IZ-40, IZ-64, IZ-13/6, IZ-15/7, IZ-56/4, Yu-12, Yu-62, Murcia, Universidad y Cubana) de la colección de la Estación Experimental "Indio Hatuey". Las raíces secas fueron pulverizadas y se extrajeron los metabolitos secundarios con hexano, etanol comercial y agua destilada por el método de percolación. Después de la extracción exhaustiva, el solvente fue retirado utilizando rotoevaporador sobre vacío. Los extractos fueron rotulados y conservados en refrigeración. Se empleó el ANOVA de clasificación simple y la prueba de rangos múltiples de Duncan para la comparación de medias ($P < 0,05$). Los resultados obtenidos demostraron que todos los extractos etanólicos y acuosos de las variedades de morera en estudio presentaron una alta actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa por encima del 90% de inhibición. Los extractos hexánicos mostraron menor actividad antitirosinasa y fueron significativamente diferentes a los controles positivos utilizados (ácido kójico e hidroquinona). Por tanto, *Morus alba* puede considerarse como una fuente natural inhibidora de la tirosinasa y se recomienda el uso de los extractos acuosos y etanólicos de raíces con fines farmacéuticos y cosmetológicos.

Palabras clave: extractos de raíces, *Morus alba*, tirosinasa

Inhibition of the tyrosinase activity of root extracts from 12 *Morus alba* varieties

Tyrosinase is a multifunctional enzyme which catalyzes the first two steps of melanogenesis in mammals and is responsible for the enzymatic browning reactions in damaged fruits during post-harvest management and their respective processing. Neither hyperpigmentation in the human skin nor enzymatic browning in fruits is desirable. These phenomena have contributed to search for new tyrosinase inhibitors to be used in foodstuffs and cosmetic products. For the study 12 *Morus alba* varieties and hybrids (Tigreada, Indonesia, IZ-40, IZ-64, IZ-13/6, IZ-15/7, IZ-56/4, Yu-12, Yu-62, Murcia, Universidad and Cubana), from the collection of the Research Station "Indio Hatuey", were used. The dry roots were pulverized and the secondary metabolites were extracted with hexane, commercial ethanol and

water distilled by the percolation method. After exhaustive extraction the solvent was withdrawn using the rotary evaporator under vacuum. The extracts were labeled and preserved in refrigeration. Simple classification ANOVA and Duncan's multiple range test were used for mean comparison ($P < 0.05$). The obtained results proved that all the ethanolic and aqueous extracts of the studied mulberry varieties showed high inhibiting activity of tyrosinase over 90% inhibition. The hexanic extracts showed lower anti-tyrosinase activity and were significantly different from the positive controls used (kojic acid and hydroquinone). Thus, *Morus alba* can be considered a natural tyrosinase-inhibitor source and the use of aqueous and ethanolic root extracts is recommended for pharmaceutical and cosmetic purposes.

Key words: *Morus alba*, root extracts, tyrosinase

T3.6 Identificación de compuestos fenólicos en extractos de hojas, flores y semillas de *Theobroma cacao* L.

Quiñones-Gálvez J.¹, Hernández M.¹, Trujillo R.¹, Quirós Y.¹, Capdesuñer Y.¹, Ramírez E.², Molina-Torres J.². *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Ingeniería metabólica, Centro de Bioplantas CP 69 450, Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: cubaplantas@gmail.com

²Laboratorio de Fitobioquímica. CINVESTV-Irapuato, México

Theobroma cacao L. (cacao), familia *Esterculiaceae*, es una planta rica en fenoles. Los fenoles de plantas son de especial interés por su potente actividad antioxidante, antimicrobiana, insecticida, entre otras. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el contenido y composición de extractos fenólicos crudos en hojas, flores y semillas de seis clones promisorios del Banco de Germoplasma de Cacao de Baracoa, Cuba. Se cuantificó por espectrofotometría, a 725 nm, el contenido de fenoles totales de extractos de hojas, flores y semillas y se determinó la composición por cromatografía en capa fina de alta resolución. Se encontró mayor contenido de fenoles en extractos de semillas, seguidos por hojas y menor concentración en flores, siendo las semillas del clon UF-677 las que mostraron mayor concentración y las flores de UF650 y CCN51 las de menor. Todos los extractos mostraron presencia de gran variedad de fenoles entre los que se encontraron flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas y cumarinas. Estos

resultados proporcionan una información básica prometedora para la evaluación de cuáles compuestos pudieran relacionarse con las actividades biológicas encontradas en otros estudios.

Palabras clave: fenoles, cacao, CCF

Identification of phenolic compounds in leaves, flowers and seeds extracts of *Theobroma cacao* L.

Theobroma cacao L. (cacao), *Esterculiaceae* family, is a plant rich in phenols. Plant phenols are of special interest for their potent antioxidant, antimicrobial and insecticidal activity, among others. This study aimed to determine the content and composition of crude phenolic extracts on leaves, flowers and seeds of six promising clones of Cacao Germplasm Bank of Baracoa, Cuba. Was quantified by spectrophotometry at 725 nm, the total phenolic content of extracts of leaves, flowers and seeds, and the composition was determined by High Performance Thin Layer Chromatography. Higher content of phenols in extracts of seeds were found, followed by leaves and minor in flowers, seeds being UF677 clone that showed the highest concentration and flowers of CCN51 and UF650 the lower. All extracts showed the presence of a variety of phenols including flavonoids, phenolic acids, coumarins and anthocyanins. These results provide promising baseline information for the assessment of compounds which may be related to the biological activities found in other studies.

Key words: cocoa, phenols, TLC

Identification of phenolic compounds in leaves, flowers and seeds extracts of *Theobroma cacao* L.

Theobroma cacao L. (cacao), *Esterculiaceae* family, is a plant rich in phenols. Plant phenols are of special interest for their potent antioxidant, antimicrobial and insecticidal activity, among others. This study aimed to determine the content and composition of crude phenolic extracts on leaves, flowers and seeds of six promising clones of Cacao Germplasm Bank of Baracoa, Cuba. Was quantified by spectrophotometry at 725 nm, the total phenolic content of extracts of leaves, flowers and seeds, and the composition was determined by High Performance Thin Layer Chromatography. Higher content of phenols in extracts of seeds were found, followed by leaves and minor in flowers, seeds being UF677 clone that showed the highest concentration and

flowers of CCN51 and UF650 the lower. All extracts showed the presence of a variety of phenols including flavonoids, phenolic acids, coumarins and anthocyanins. These results provide promising baseline information for the assessment of compounds which may be related to the biological activities found in other studies.

Key words: cocoa, phenols, TLC

T3.7 Obtención de extractos crudos potenciales para el control de enfermedades agrícolas a partir de exudados foliares de diferentes líneas de tabaco

Erinelvis Rodríguez, Madelín García, Maribel Rivas*, Janet Quiñones, Martha Hernández, Yanelis Capdesuñer. *Autor para correspondencia.

Laboratorio de Ingeniería metabólica, Centro de Bioplantas CP 69 450, Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: cubaplantas@gmail.com

Las plantas son fuente de miles de constituyentes que son moléculas biológicamente activas, de las cuales los más estudiados son compuestos de bajo peso molecular conocidos también como metabolitos secundarios, con múltiples usos en la agricultura y la alimentación. La selección de plantas para obtener productos naturales, capaces de ser utilizados como insecticidas, debe ser de fácil cultivo con principios activos potentes. Los productos naturales son una alternativa para el control de microorganismos que ocasionan enfermedades. El presente estudio se realizó con el objetivo general de obtener extractos vegetales bioactivos para su posterior uso en el control de plagas y/o enfermedades de cultivos de importancia agrícola. Se trabajó en la obtención de extractos crudos, ricos en productos naturales. Se sembraron 10 accesiones de *Nicotiana tabacum* en la Estación de Tabaco de Cabaiguán y se evaluaron indicadores morfológicos cada 14 días. Se evaluó comparativamente el uso de diferentes solventes con polaridad similar (Etanol 90%, Metanol, Diclorometano, Acetato de etilo y n-Butanol). Se obtuvieron extractos crudos a partir de hojas de 10 líneas de tabaco y se seleccionó el etanol 90% como solvente por ser el que generó mayor rendimiento. La línea Nic1019 mostró el extracto más concentrado mientras que la Nic 1006 el de mayor rendimiento. Se realizó una cromatografía en capa fina de los extractos que reveló una extracción efectiva de los compuestos mayoritarios en todos los casos y una composición diferente comparativamente entre las líneas.

Palabras clave: cromatografía en capa fina, exudados foliares, *Nicotiana tabacum*

Plants are sources of thousands of constituents that are biologically active molecules, of which the most studied are low molecular weight compounds also known as secondary metabolites, with multiple uses in agriculture and food. The selection of plants for natural products, capable of being used as insecticides, should be easy to grow, with powerful active ingredients, with high chemical stability and optimal production. Natural products are an alternative to control disease-causing microorganisms. The present study was undertaken with the overall objective of obtaining bioactive plant extracts for later use in the control of pests and / or diseases of agriculturally important crops (tomatoes, beans, soy, pineapple and corn). We worked on getting crude extracts rich in natural product. Ten lines of *Nicotiana tabacum* were sowed in the Station of Tobacco of Cabaiguán and morphological indicators every 14 days were evaluated. In order to select the best solvent to obtain the extracts, different solvents comparatively with similar polarity (Ethanol 90%, Methanol, Diclorometano, Ethyl Acetate and n-Butanol) were evaluated. The crude extracts were obtained from leaves exudates of ten tobacco lines and using as a solvent the Ethanol 90%, the one that generated bigger yield. The line Nic 1019 showed the extract with more concentration and the biggest yield was found in the line Nic 1006. A Thin layer chromatography was carried out to separate the main compounds and to analyze comparatively the chemical diversity of the extracts obtained after an effective extraction of the major compounds in all the cases.

Keywords: leaves exudates, *Nicotiana tabacum*, Thin layer chromatography

T3.8 Obtención de extractos vegetales ricos en metabolitos para el control de plagas y enfermedades de cultivos de importancia agrícola

Capdesuñer Y.^{1*}, Quiñones-Gálvez J. ¹, Pérez A. ¹, Trujillo R. ¹, Díaz L. ¹, Carvajal C. ¹, Rivas M. ¹, Quirós Y. ¹, Mora M. ¹, Rodríguez E. ², Gallo M. ², García-Yanes J.L. ³, Hernández M¹. *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantas. CP 69 450, Cuba. e-mail: mhernandez@bioplantas.cu

²UCTB Estación Experimental de Tabaco de Cabaiguán. Sancti Spiritus. Cuba.

³Estación de Protección de Plantas Ciego de Avila, Cuba.

El uso de plaguicidas de origen botánico es una alternativa actual para reducir los daños ambientales ocasionados por el uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos. Por otra parte la creciente demanda de garantías de inocuidad y seguridad alimentaria de cultivos de consumo han puesto de manifiesto la importancia de modificar el control fitosanitario a través de la aplicación exógena de productos naturales que muestren actividad biológica contra fitopatógenos. La selección de plantas para obtener productos naturales, capaces de ser utilizados como plaguicidas, debe ser de fácil cultivo, con principios activos potentes, alta estabilidad química y de óptima producción. El presente estudio se realizó con el objetivo general de obtener extractos vegetales bioactivos para el control de plagas y/o enfermedades de cultivos de importancia agrícola. Se trabajó en la obtención de extractos crudos, ricos en productos naturales de *Nicotiana tabacum*, *Theobroma cacao*, *Moringa oleifera*, *Morinda royoc*, *Ananas comosus* y *Hohenbergia penduliflora*. Se evaluó comparativamente el uso de solventes con diferente polaridad (etanol 90%, metanol, diclorometano, acetato de etilo, hexano, isopropanol y n-butanol) en la obtención de extractos vegetales de diferentes órganos de plantas adultas de los cultivos seleccionados. Las metodologías utilizadas permitieron la obtención de extractos con diferentes concentraciones, rendimientos y diversidad en la composición química. Estos resultados constituyen un punto de partida en la generación de productos con potencial actividad biológica para la posterior formulación de plaguicidas botánicos. Palabras clave: metabolitos, plaguicidas botánicos, seguridad alimentaria

Obtention of plant extracts, rich in metabolites for controlling plagues and diseases of agriculturally important crops

The use of botanicals pesticide is a current alternative to reduce the environmental damage caused by the indiscriminate use of synthetic pesticides. Moreover, the growing demand for innocuous and food security it has been noticed that is very important to modify the control sanitation trough exogenous application of natural products that show biological activity against plant pathogens. The selection of plants for natural products, capable of being used as pesticides, must be easy to grow, with powerful active ingredients, high chemical stability and

optimal production. The present study had the general objective of obtaining bioactive plant extracts for the control of pests and/or diseases of agriculturally important crops. We worked on obtaining crude extracts, rich in metabolites from *Nicotiana tabacum*, *Theobroma cacao*, *Moringa oleifera*, *Morinda royoc*, *Ananas comosus* and *Hohenbergia penduliflora*. The use of solvents with different polarity (ethanol 90%, methanol, dichloromethane, ethyl acetate, hexane, isopropanol and n-butanol) in the preparation of plant extracts of various organs of adult plants from the selected cultures were comparatively evaluated. The methodologies used allowed to obtain extracts with different concentrations, yields and diversity in the chemical composition. These results are a starting point in the generation of products with potential biological activity for further development of botanical pesticides.

Keywords: metabolites, botanical pesticides, food security

T3.9 Potencial actividad antimicrobiana de extractos fenólicos de hojas, flores y semillas de *Theobroma cacao* L.

García-Yanez J*, Quiñones-Gálvez J¹, Molina-Torres J², Hernández M¹, Vazquez J, Quirós Y¹, Capdesuñer Y¹, Ramírez E², Trujillo R¹. *Autor para correspondencia.

1 Laboratorio de Ingeniería metabólica, Centro de Bioplantitas CP 69 450, Ciego de Ávila, Cuba.

2 Laboratorio de Fitobioquímica. CINVESTV-Irapuato, México.

En la actualidad resulta de gran importancia buscar alternativas naturales para el control de enfermedades en plantas para disminuir el uso de productos químicos. Los fenoles son un grupo de compuestos que tienen un papel importante para la respuesta de las plantas ante diferentes tipos de estrés. Con el objetivo de buscar alternativas naturales para el control de enfermedades en plantas, se obtuvieron extractos fenólicos de hojas, flores y semillas de cacao. El efecto de los extractos sobre el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Pseudomonas* sp. y *Pectobacterium* sp. se evaluó mediante un ensayo de difusión en agar. Se evaluó como controles negativo el medio de cultivo y el solvente. Se encontró actividad antimicrobiana de todos los extractos sobre *Phytophthora* sp. Sin embargo para *Pseudomonas* sp. solo la mayor concentración de los extractos de semillas

inhibió levemente el crecimiento de la bacteria. No hubo control del resto de los microorganismos para las concentraciones y tipos de extractos ensayados

Palabras clave: cacao, fenoles, *Phytophthora*, *Pseudomona*

Potential antimicrobial activity of phenolic extracts of leaves, flowers and seeds of *Theobroma cacao* L.

Today is very important to look for natural alternatives for the control of plant diseases to reduce the use of chemicals. Phenols are a group of compounds that play an important role in the response of plants to different types of stress. In order to find natural alternatives for controlling plant diseases, phenolic extracts were obtained from leaves, flowers and seeds of cacao. The effect of the extracts on the *in vitro* growth of *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp. *Rhizoctonia* sp., *Pseudomonas* sp. and *Pectobacterium* sp. was evaluated by an agar diffusion assay,. The culture medium and the solvent was evaluated as negative controls. Antimicrobial activity of the extracts was found on *Phytophthora* sp. However for *Pseudomonas* sp. only the highest concentration of seed extracts slightly inhibited the growth of bacteria. There was no control of the rest of the microorganisms to the concentrations and types of extracts tested

Key words: Phenols, cocoa, TLC

T3.10 Evaluation of twenty six methanolic extracts of medicinal plants used to treat respiratory ailments by the ethnia Mayo from South of Sonora, Mexico against *Mycobacterium tuberculosis*

Enrique Wenceslao Coronado Aceves^{1*}, Adriana Garibay Escobar², Jaime López Cervantes³, Ramón Enrique Robles Zepeda², Carlos Arturo Velázquez Contreras², Dalia I. Sánchez Machado³, Olga N. Campas Baypoli³. *Autor para correspondencia.

¹Doctorado en Ciencias Especialidad en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Sonora. 5 de febrero 818 Sur, CP 85 000, Cd. Obregón, Sonora, México. e-mail: enriquew.coronadoa@a2004.uson.mx

²Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora. Rosales y Luis Encinas. CP 83 000. Hermosillo, Sonora, México.

³ Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora.

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused mainly by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). According to the World Health Organization, in 2012, 1.3 million people died of this disease, from which 170 000 deaths were from multidrug resistant Mtb. Therefore it is an urgent need of finding new antimycobacterial compounds. Plants are considered as a rich natural source of compounds with biological activities. Mexico possesses one of the richest floras on the planet. Sonoran Mayos commonly uses plants as traditional remedies. Twenty six medicinal plants were chosen by ethnobotanical criteria, collected from the south of the state of Sonora, air-dried, powdered and allowed to macerate in methanol at room temperature for seven days, filtered and concentrated under reduced pressure. Methanolic extracts were tested against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv using the Alamar Blue redox bioassay. *Convolvulus arvensis* showed antimycobacterial activity at 500 µg/ml, while *Argemone mexicana*, *Bursera laxiflora*, *Datura discolor*, *Ficus petiolaris* and *Lippia palmeri* were active at 1000 µg/ml. Dichloromethane, ethyl acetate (AcOEt) and water extracts were further prepared separately from the six most active plants. Most of the dichloromethane and AcOEt extracts kept their activity at 1000 µg/ml, while none of the aqueous extracts were active. Methanolic extract of *Convolvulus arvensis* was chromatographed over silica gel column eluted with a stepwise gradient using mixtures of hexane, AcOEt, and methanol, affording 20 fractions. Fractions 2, 8, 9 and 10 showed activity at 500 µg/ml; all them were eluted with hexane-AcOEt mixtures. From this study we conclude that extraction with intermediate-polarity solvents favors the possibility to obtain active antimycobacterial compounds; the active plants are consistent with their traditional use, and *Convolvulus arvensis* is a good candidate for further studies of isolation and chemical characterization of antitubercular compounds produced from the secondary metabolism of this plant.

Key words: Alamar Blue, Medicinal plants, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis

Evaluación de veintiséis extractos metanólicos de plantas medicinales utilizadas para tratar enfermedades respiratorias por la etnia Mayo del sur de Sonora, México contra *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*. Según la

Organización Mundial de la Salud, en 2012, 1.3 millones de personas murieron de TB, de los cuales 170 000 muertes fueron por Mtb multidrogorresistente. Por ello es urgente encontrar nuevos compuestos antimicobacterianos. Las plantas son consideradas como una fuente natural de compuestos con actividades biológicas. México posee una de las floras más ricas del planeta. Los Mayos sonorenses comúnmente utilizan las plantas como remedio tradicional. Veintiséis plantas medicinales fueron elegidas mediante criterio etnobotánico, colectadas en el sur de Sonora, secadas, molidas y maceradas en metanol a temperatura ambiente durante siete días, filtradas y concentradas a presión reducida. Los extractos metanólicos fueron evaluados contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv mediante el bioensayo de óxido-reducción con Azul Alamar. *Convolvulus arvensis* mostró actividad antimicobacteriana a 500 µg/ml, mientras que *Argemone mexicana*, *Bursera laxiflora*, *Datura discolor*, *Ficus petiolaris* y *Lippia palmeri* fueron activos a 1000 µg/ml. Las seis plantas más activas fueron extraídas por separado con diclorometano, acetato de etilo (AcOEt) y agua. La mayoría de los extractos con diclorometano y AcOEt mantuvieron su actividad a 1000 µg/ml, mientras que ningún extracto acuoso resultó activo. El extracto metanólico de *Convolvulus arvensis* fue separado mediante cromatografía en columna sobre sílica gel eluida con gradientes de hexano, AcOEt y metanol, obteniéndose 20 fracciones. Las fracciones 2, 8, 9 y 10 mostraron actividad a 500 µg/ml; todas ellas fueron eluidas con mezclas de hexano-AcOEt. De este estudio se concluye que la extracción con solventes de polaridad intermedia favorecen la posibilidad de obtener compuestos antimicobacterianos; las plantas activas concuerdan con su uso tradicional; y *Convolvulus arvensis* es un buen candidato para estudios posteriores de aislamiento y caracterización química de compuestos antituberculosos producto del metabolismo secundario de esta planta.

Palabras clave: Azul Alamar, plantas medicinales, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis

T3.11 Establecimiento de cultivo de raíces transformadas de *Azadirachta indica* A. Juss

Alejandro Cruz-Hernández¹, Eugenio Pérez Molphe-Balch², Paul Mauricio Sanchez Ocampo³, Jacqueline Capataz-Tafur^{4*}. *Autor para correspondencia. e-mail: jcapataz@unpa.edu.mx

Universidad del Papaloapan, ¹División de Estudios de Posgrado. ³Instituto de Biotecnología. CP 68 301. Tuxtpec, Oaxaca México.

²Universidad Autónoma de Aguascalientes. Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas. CP 20 100, Aguascalientes, Aguascalientes México. *

Azadiractina, es un metabolito secundario de alto valor obtenido a partir *Azadirachta indica* (Neem). Sin embargo, su alta demanda se ve afectada por la variabilidad genética y problemas de contaminación durante la colecta de las semillas. Una de las alternativas para su producción, es el cultivo de raíces transformadas establecidas a partir de células vegetales infectadas con *Agrobacterium rhizogenes*, ofreciendo un sistema prometedor para la producción de metabolitos secundarios. El objetivo fue establecer cultivos de raíces transformadas a partir de callos de *A. indica* mediante infección con *A. rhizogenes*. Los callos de *A. indica* se sumergieron en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) + 50 µl de acetosiringona + 5 ml de bacteria cepa A4/pESC4 por 30 min y fueron transferidos a medio de cultivo MS con 50 µl de kanamicina y 250 mg l⁻¹ de clauforán por 30 min. Los callos fueron co-cultivados con *A. rhizogenes* en el medio de cultivo MS sin antibióticos de 24 a 48 h. Posteriormente, se sub-cultivaron en medio de cultivo MS sólido con sacarosa al 3% y antibióticos, en condiciones de oscuridad durante 21 días, y finalmente se expusieron a luz por siete días. La presencia bacteriana fue eliminada mediante sub-cultivos en medio de cultivo MS disminuyendo la concentración de antibióticos. La transferencia de los genes bacterianos a las raíces, se verificó mediante pruebas histoquímicas para detección de la actividad GUS. Observando inducción exitosa de raíces en los callos a partir del día 14 y libre de bacteria a través de los sub-cultivos. El crecimiento de raíces fue positivo en medio de cultivo sin fitoreguladores y con geotropismo negativo. Las pruebas histoquímicas para la detección de la actividad GUS fueron positivas, observándose una tonalidad de color azul en las raíces. En conclusión se obtuvieron raíces transformadas con *A. rhizogenes* a partir de callos de *A. indica*.

Palabras clave: azadiractina, *Agrobacterium rhizogenes*, pruebas histoquímicas

Establishment of hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss

Azadirachtin is a secondary metabolite of high value obtained from *Azadirachta indica* (Neem).

However, its high demand is affected by the problems of genetic variability and contamination during seed collection. One of the alternatives for production, culture is established from transformed roots of infected plant cells with *Agrobacterium rhizogenes*, offering a promising system for production of secondary metabolites. The aim was to establish of hairy roots culture from callus of *A. indica* by infection with *A. rhizogenes*. *A. indica* callus were immersed in liquid Murashige and Skoog (MS) + 50 µl of acetosyringone + 5 ml A4/pESC4 bacteria strain by 30 min and transferred to MS medium supplemented with 50 µl of kanamycin and 250 mg / L claforan for 30 min. Callus were co-cultivated with *A. rhizogenes* on MS medium without antibiotics for 24 to 48 h. Subsequently, sub-cultured on solid MS medium supplemented with 3% sucrose and antibiotics, in the dark for 21 days, and finally exposed to light for seven days. The bacterial presence was removed by subculturing on MS medium by decreasing the concentration of antibiotics. Confirmation of the transfer of bacterial genes the roots was monitored by histochemical assays for the detection of GUS activity. Root induction was observed in callus from day 14. Root induction was successful and free of bacteria via subculturing. The roots were able to grow in the culture medium in the absence of exogenous growth regulators were negatively geotropic. Histochemical assays for the detection of GUS activity were positive roots showed a blue color. In conclusion roots transformed with *A. rhizogenes* from callus obtained from *A. indica*.

Keywords: azadirachtin, *Agrobacterium rhizogenes*, histochemical tests

T3.12 Sapogenine, phenolic compounds and sugar content of micropropagated and young wild type plants of maguey (*Agave salmiana*)

Puente-Garza, César A¹, Gutiérrez-Urbe, Janet A¹, Gutiérrez-Mora, Antonia², García-Lara, Silverio^{1*}.

¹Centro de Biotecnología-FEMSA. Escuela de Biotecnología y Alimentos. Tecnológico de Monterrey-Campus Monterrey. Av. Eugenio Garza Sada 2501, Monterrey, Nuevo León 64 849, México. e-mail: sgarcialara@itesm.mx

²Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., División de Micropropagación y Mejoramiento Genético Vegetal. Av. Normalistas 800 S.H., Guadalajara, Jalisco 44 270, México.

Maguey is a very important plant for the industry of 'pulque' and other products derived from this

plant known as functional foods, but the plant has problems with the availability and standardization of plant selection. In this work a micropropagation protocol was established to generate maguey plants (*Agave salmiana*) from young germinated plantlets by axillary shoots. At the same time we evaluated the impact of this process in the phytochemical profile of the new plants. The optimal induction of axillary shoots was observed when plantlets were incubated on a solidified Murashige and Skoog (MS) culture medium supplemented with L2 vitamins and 0.0398 mg l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 10 mg l⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP). The micropropagation protocol took 15 weeks, obtaining an efficiency of 87.5% after acclimatization process under controlled conditions. The total phenolic (TP) concentration, antioxidant capacity (ORAC), sugar content, phenolic compounds identification and sapogenines content were compared between wild type (WT), *in vitro* (IN), *ex vitro* with water (EXW) and *ex vitro* without water (EXN) plants. The results show that highest TP content are in IN and EXN plants, however ORAC for IN plants was three times higher than EXN and EXW plants, and three times higher compared with the WT plants. The reducing sugar content was similar between EXW and EXN plants. Glucose was not detected in WT plants. Different sapogenines were detected in all the samples. In summary, we successfully micropropagated IN plants from seeds and they contained different amount of their TP content and ORAC activity compared with WT, however they showed a similar content once they were transferred *ex vitro*.

Keywords: micropropagation, agave, *Agave salmiana*, axillary shoots, antioxidant activity, phenolic compounds, sapogenine, carbohydrates

Contenido de sapogeninas, compuestos fenólicos y azúcares de plantas de maguey (*Agave salmiana*) micropropagadas y silvestres jóvenes

El maguey es una planta importante en la industria del pulque y productos funcionales derivados, pero tiene problemas de disponibilidad y estandarización para la selección de plantas. En el presente trabajo se estableció un protocolo para la micropropagación de plántulas mediante yemas axilares. Al mismo tiempo se evaluó el efecto de este proceso en el perfil fitoquímico de las nuevas plantas. La producción óptima de yemas axilares se observó cuando las plántulas se incubaron en un medio de cultivo sólido

Murashige y Skoog (MS) con vitaminas L2 y 0.0398 mg l⁻¹ ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) y 10 mg l⁻¹ 6-bencilaminopurina (BAP). La micropropagación tomó 15 semanas con una eficiencia del 87.5% después de aclimatización bajo un ambiente controlado. Se determinó el contenido total de compuestos fenólicos (TP), capacidad antioxidante (ORAC), azúcares reductores (DNS y cuantificación mediante HPLC), además, se identificaron los compuestos fenólicos y sapogeninas de plantas silvestres (WT), y provenientes de un ambiente *in vitro* (IN), *ex vitro* con irrigación (EXW) y *ex vitro* sin irrigación (EXN). Los resultados muestran que el contenido más alto de TP se encontró en las muestras IN y EXN, pero el ORAC mostró que las plantas IN tienen una actividad antioxidante tres veces mayor que EXN y EXW, y más de tres veces mayor que las WT. El contenido de azúcares reductores no varió entre WT, EXN y EXW. Diferentes sapogeninas previamente informadas para otras especies de agave se encontraron en todas las muestras. En resumen, se lograron micropropagar plantas de *Agave salmiana in vitro*, y estas contienen diferentes concentración de TP y ORAC comparadas con las WT, pero vuelven a mostrar concentraciones similares una vez trasladadas *ex vitro*.

Palabras clave: actividad antioxidante, agave, *Agave salmiana*, carbohidratos, compuestos fenólicos, micropropagación, sapogenina, yemas axilares

T3.13 Producción *in vitro* de azadiractina en cultivos de callos *Azadirachta indica* A. Juss

Alejandro Cruz-Hernández¹, Paul Mauricio Sánchez¹, David Paniagua-Vega², Julián Mario Peña-Castro³, Jacqueline Capataz-Tafur^{3*}. *Autor para correspondencia.

¹Universidad del Papaloapan. División de Estudios de Posgrado. Oaxaca. México. CP 68 301.

³Instituto de Biotecnología. Tuxtepec, Oaxaca. México. CP 68 301.

²Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca, Ingeniería en innovación Agrícola Sustentable. Tierra Blanca, Veracruz, México. C.P. 95180. e-mail: jcapataz@unpa.edu.mx

Azadirachta indica A. Juss (Neem) produce limonoides, siendo el más importante la azadiractina por sus efectos insecticidas y antialimentarios. Sin embargo, dicho metabolito se encuentra principalmente en semillas en concentraciones variadas. Por lo que el cultivo *in vitro* ofrece una alternativa para su producción. El

objetivo fue establecer cultivos de callos friables productores de azadiractina a partir de hojas y semillas. Se colocaron explantes de hojas juveniles y de semillas previamente desinfectadas en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) con diferentes combinaciones de fito-reguladores, (T₁): ANA 2.0 mg l⁻¹+ BA 1.0 mg l⁻¹, (T₄): IBA 8 mg l⁻¹ + BA 4 mg l⁻¹, (T₅): IBA 4 mg l⁻¹ + BAP 1 mg l⁻¹. El material vegetal (callos) fue liofilizado y extraído con metanol (3x15 ml). Los extractos metanólicos se partitionaron con diclorometano (3x15 ml). Se agruparon las capas de diclorometano y concentraron al vacío. El residuo fue disuelto en 1 ml de metanol, para los ensayos de cromatografía en capa fina. El perfil cromatográfico se realizó en placas de sílica gel F₂₅₄, utilizando azadiractina como estándar, con un sistema diclorometano: metanol (9.5:0.5) y como revelador una solución de vainillina: ácido sulfúrico 96%: etanol (3 g: 1.5 ml: 95 ml). Los mejores tratamientos para la formación de callos friables fueron T₁ y T₅. Con porcentajes de 90% y 100% para T₁ y T₅ respectivamente, a partir de hojas y del 100% y 80% respectivamente, a partir de semillas. Los extractos tuvieron el mismo factor de retención (R_f) (0.56) que el del estándar. Los extractos de callos provenientes de semillas (T₅) presentaron las bandas más intensas y se observaron otras bandas que nos sugiere la presencia de otros limonoides. En conclusión, se establecieron cultivos *in vitro* de callos provenientes de hojas y semillas, los cuales sintetizan limonoides como la azadiractina.

Palabras clave: azadiractina, callos friables, fito-reguladores de crecimiento

In vitro azadirachtin production by callus cultures of *Azadirachta indica* A. Juss

Azadirachta indica A. Juss (Neem) produces limonoids, being the most important azadirachtin, for its insecticidal and antifeedant effects. However, this metabolite is found mainly in seeds in varying concentrations. So, that the *in vitro* culture is an alternative for its production. The aim was to establish friable calluses cultures producer of azadirachtin from leaves and seeds. Explants from juvenile leaves and seeds previously disinfected were placed in MS culture media supplemented with three different combinations of plant regulators, (T₁): ANA 2.0 mg l⁻¹ + BA 1.0 mg l⁻¹, (T₄): IBA 8 mg l⁻¹ + BA 4mg l⁻¹, (T₅): IBA 4 mg l⁻¹ + BAP 1 mg l⁻¹. The plant material (callus) was lyophilized and extracted with methanol (3x15 ml). The methanol extracts were partitioned with dichloromethane (3x15 ml). The dichloromethane layers were

pooled and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in 1 ml of methanol, for thin-layer chromatography. The chromatographic profile was performed on silica gel F₂₅₄ plates using standard azadirachtin, dichloromethane-methanol (9.5:0.5) as mobile phase and an staining solution of vanillin: sulfuric acid 96%: ethanol (3 g: 1.5 ml: 95 ml). The best treatments for the formation of friable callus were T₁ and T₅. With percentages of 90% and 100% for T₁ and T₅ respectively, from leaves and 100% and 80% respectively, from seed. The extracts had the same retention factor (Rf) (0.56) as the standard. Callus extracts from seeds (T₅) showed the most intense bands and other bands that suggest the presence of other limonoids were observed. In conclusion, *in vitro* callus culture from leaves and seeds were established which synthesize limonoids as azadirachtin.

Keywords: azadirachtin, friable callus, phyto-growth regulators

T3.14 Plántulas, callos, raíces y células en suspensión de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Itzel V. Alvarado-Orea¹, Raquel M. Matías-Alvarez¹, Mauro Palmeros-Montes¹, Ángel Cárdenas-Cágal², Jacqueline Capataz-Tafur³, David Paniagua-Vega², Ariana A. Huerta-Heredia^{2*}. *Autor para correspondencia.

¹Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca, Ingeniería en Industrias Alimentarias e-mail: arianaahuertah@hotmail.com

²Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable. Tierra Blanca, Veracruz, México. 95180.

³Universidad del Papaloapan, Instituto de Biotecnología. Tuxtepec, Oaxaca, México. 68301.

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta medicinal originaria de Paraguay, que se caracteriza por la acumulación de glucósidos de esteviol. Estos compuestos tienen un poder edulcorante que en estado puro y cristalino que es 300 veces mayor que la sacarosa. En este trabajo se establecieron los cultivos *in vitro* de plántulas, callos, raíces y células en suspensión de *S. rebaudiana* con la finalidad de establecer estrategias biotecnológicas para la producción de metabolitos de interés comercial y medicinal. Para la obtención de brotes de *S. rebaudiana* el mejor resultado fue el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) con 20 g l⁻¹ de sacarosa, 1 mg l⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP) y 0.5 mg l⁻¹ de ácido indolacético (IAA). Los brotes vegetativos se pusieron a enraizar en MS con 20 g l⁻¹ de sacarosa y 0.5 mg l⁻¹ de ácido indolbutírico (IBA).

Dichos cultivos fueron incubados a 28 ± 2°C en fotoperiodo 16/8 h luz. Se estableció el cultivo de raíz a partir de las plántulas micropropagadas, donde se utilizó el mismo medio de cultivo utilizado para enraizar. Las raíces se mantuvieron en oscuridad, agitación a 110 rpm y una temperatura de 28 ± 2°C. Por otro lado, el cultivo de callos se estableció a partir de explantes de hojas. Se utilizó un medio de cultivo semisólido MS con 20 g l⁻¹ de sacarosa, 2.0 mg l⁻¹ de BAP y 2.0 mg l⁻¹ ácido naftalenacético (ANA). Para lograr el establecimiento de células en suspensión, los callos obtenidos se pusieron a disgregarse en MS con 20 g l⁻¹ de sacarosa, 2.0 mg l⁻¹ de BAP, 2.0 mg l⁻¹ ANA y 10 g l⁻¹ de ácido ascórbico. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad, agitación a 110 rpm y a una temperatura de 28± 2°C.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, *Stevia rebaudiana*

Plantlets, callus, roots and cell suspension cultures from *Stevia rebaudiana* Bertoni

Stevia rebaudiana Bertoni, an ancient perennial shrub of Paraguay, produces diterpene glycosides that are sweeteners, about 300 times sweeter than sucrose. *In vitro* propagation of *S. rebaudiana* like plantlets, callus, roots and cell suspension cultures were aimed in this work. For shoot multiplication were used MS media containing 20 g l⁻¹ sucrose, 1 mg l⁻¹ BAP and 0.5 mg l⁻¹ IAA. Shoots were transferred to MS media supplemented with 20 g l⁻¹ sucrose, 0.5 mg l⁻¹ IBA for rooting. Cultures were incubated at 28 ± 2°C under photoperiod of 16 h light and 8 h dark conditions. Root cultures derived from micropropagated plantlets, they were established in the same media for rooting plantlets. These cultures were incubated under dark conditions and orbital agitation of 110 rpm. Leaves explants from micropropagated plantlets were selected for callus induction. Callus were grown in MS media supplemented with 20 g l⁻¹ sucrose, 2.0 mg l⁻¹ BAP and 2.0 mg l⁻¹ NAA. Cell suspension culture were established in MS media supplemented with 20 g l⁻¹ sucrose, 2.0 mg l⁻¹ BAP, 2.0 mg l⁻¹ NAA and 10 g l⁻¹ ascorbic acid. These cultures were incubated under dark conditions and orbital agitation of 110 rpm.

Keywords. *In vitro* culture, *Stevia rebaudiana*

T3.15 Aislamiento y purificación de inhibidores de proteasas a partir de plantas Latinoamericanas

Hernández Martha^{1*}, Castillo Patricio², Muñoz Fernanda², Quinchuela Lorena², Echeverría Paulina², Jácome Gonzalo², Covaleta Giovanni³, Trejo Sebastián^{3,4}, Avilés Francesc³. *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila, CP 69 450, Cuba. e-mail: mhernandez@bioplantillas.cu

²Laboratorio de Investigaciones Aplicadas, Escuela Politécnica Nacional, Quito. Ecuador. e-mail: pesd@yahoo.com

³Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB), Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España. e-mail: FrancescXavier.Aviles@uab.es

⁴Servei de Proteomica i Biologia Estructural de la UAB, SePBioEs-UAB, Barcelona, España.

Los inhibidores de proteasas de plantas (IPP) son usualmente proteínas pequeñas presentes en tejidos de almacenamiento y en partes aéreas de las plantas. Además, su expresión se induce en respuesta al ataque de insectos y patógenos. Una de las más importantes estrategias de defensa en plantas para combatir depredadores involucra los IPP, efectivos contra insectos fitopatógenos y microorganismos. Por otra parte, enfermedades como la malaria, causada por microorganismos del género *Plasmodium*, provocan en el planeta más de 500 millones de infecciones y 2 millones de muertes al año. Recientes investigaciones de especies de *Plasmodium* permiten identificar proteasas como nuevas dianas terapéuticas y convierten a sus inhibidores en moléculas con potencial actividad antimalárica. Este estudio se enfocó en el aislamiento, purificación y caracterización de IPP a partir de especies Latinoamericanas. Se trabajó en la obtención de extractos crudos a partir de semillas de *Pisum sativum* var. *Lojanita*, *Phaseolus vulgaris* var. *Yunquilla*, *Amaranthus hybridus* var. *Sangorachi*, *Amaranthus caudatus*, *Lupinus mutabilis* y tallos de *Hymenocallis caymanensis*. Mediante el uso de microcromatografía de afinidad e IF MALDI TOF-MS, se hizo el cribaje y aislamiento de IPP de diferentes tipos catalíticos (CPA, tripsina y papaína). Se determinó la actividad inhibidora específica y se establecieron curvas dosis respuesta. En todas las semillas estudiadas se encontró actividad inhibidora. Para tres de los extractos la actividad fue mayor frente a tripsina y para otros tres frente a papaína. Se purificaron IPP, por cromatografía de afinidad (Sephacosa CL 4BS), a partir de extractos de semillas de *Lupinus mutabilis* y *Amaranthus sp.* Se escaló la

purificación a columnas de mayor capacidad en FPLC y se logró la purificación de fracciones activas frente a tripsina, de extractos de *Amaranthus hybridus* var. *Sangorachi* (masa molar \approx 9 200 Da), y *Amaranthus caudatus* (masas molares \approx de 7900 y 5500 Da). A los IPP aislados se les realizarán estudios posteriores de actividad biológica *in vitro*.

Palabras clave: actividad antimalaria, *Amaranthus sp.*, defensa de plantas, inhibidores de proteasas, *Lupinus*.

Isolation and purification of protease inhibitors from Latin-American plants

Plant PIs (PPIs) are usually small proteins restricted not only to storage tissues but expressed in the aerial parts of plants as well. Their expression is also induced in response to injury or attack by insects or pathogens. One of the important defense strategies in plants to combat predators involves PIs which are particularly effective against phytophagous insects and microorganisms. On the other hand, affections as Malaria, caused by microorganisms of the *Plasmodium* genus, cause more than 500 million infections and 2 million deaths per year. Advances in research of species of *Plasmodium* can characterize proteases as a new therapeutic target and their inhibitors can be converted into molecules with potential antimalarial activity. This study focuses on isolation, purification and characterization of PPIs from Latin-American plants. Crude extracts from seeds (*Pisum sativum* var. *Lojanita*, *Phaseolus vulgaris* var. *Yunquilla*, *Amaranthus hybridus* var. *Sangorachi*, *Amaranthus caudatus*), and *Hymenocallis caymanensis* stems, were obtained. The inhibitory activity on different proteolytic enzymes (CPA, trypsin and papain) was assayed by affinity micro- chromatography followed by MALDI TOF-MS IF. The specific inhibitory activity was determined and dose response curves were established. Inhibitory activity was found in all the tested seeds. The inhibitory activity against trypsin was greater for three of the extracts analyzed and other three were active against papain. Subsequently, inhibitors from the crude extracts of *Lupinus mutabilis* and *Amaranthus sp.* seeds were purified by affinity chromatography on Sepharose 4BS-CL, Purification was scaled and pure fractions (active against trypsin), were obtained from *Amaranthus hybridus* var. *Sangorachi* extracts (molar mass of about 9200 Da), *Amaranthus caudatus* extracts (molar mass of approximately 7900 and 5500 Da). In further

studies *in vitro* biological activity for purified fractions will be conducted.

Key words: antimalarial activity, *Amaranthus sp.*, plant defense, protease inhibitors, *Lupinus*

T3.16 Indicadores morfológicos para la comparación de diferentes líneas promisorias de tabaco (*Nicotiana tabacum*)

Gallo M^{1*}, Rodríguez E¹, Rivas M², Quiñones-Gálvez J², Hernández M², Capdesuñer Y². *Autor para correspondencia.

¹UCTB Estación Experimental de Tabaco de Cabaiguán. Sancti Spíritus. Cuba.

²Laboratorio de ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantas. CP 69 450, Cuba. e-mail: ycapdesuner@bioplantacuba.cu

Los aspectos morfofisiológicos de las plantas están en estrecha relación con la existencia de una amplia diversidad química en la composición de los metabolitos entre diferentes especies. Las plantas son una fuente extraordinaria para el aislamiento de productos naturales así como para el descubrimiento de nuevos metabolitos, productos para el desarrollo de medicinas, saborizantes, para alimentos, perfumes y otros químicos que se usan en diferentes industrias. Por lo que un punto de partida para las investigaciones en plantas relacionadas con la obtención de productos naturales es el estudio comparativo de la morfología de diferentes líneas. El objetivo de este trabajo es la determinación de indicadores morfológicos para la caracterización de diferentes líneas de tabaco. Se sembraron 10 accesiones de tabaco en la Estación de Tabaco de Cabaiguán (Nic 1003, Nic 1006, Nic 1015, Nic 1016, Nic 1017, Nic 1019, Nic 1061, SNN, BHmN, CE) y un total de 10 plantas por línea, utilizadas para su caracterización preliminar y la obtención extractos vegetales a partir de ellas. Se evaluaron indicadores morfológicos después de su trasplante a bolsas cada 14 días cómo número de hojas y altura. Se determinó la masa fresca foliar de tres plantas y la cantidad de hojas de las mismas. Los datos morfológicos evaluados muestran las diferencias entre líneas y una evidencia de la biodiversidad de la especie que comprende variedades comerciales y no comerciales. La mayoría de las líneas desarrollaron de dos a tres hojas cada 14 días. La línea 1016 presentó mayor altura, mayor número de hojas y mayor masa fresca de manera general en todos los momentos evaluados, seguida por la SNN. La línea BHmN siempre se

mantuvo por debajo en altura de todas las líneas, similar a la 1015. Estos resultados permiten realizar un acercamiento a una caracterización morfológica comparativa de desarrollo fisiológico entre líneas analizando estos indicadores.

Palabras clave: indicadores morfológicos, *Nicotiana tabacum*, líneas

T3.17 Caracterización *in silico* de una nueva esnaquina aislada de *Peltophorum dubium*, una planta nativa de Sudamérica

Rodríguez-Decuadro, Susana^{1*}, Pandolfi, Valesca³, Lima, Marx Oliveira³, Benko-Iseppon, Ana Maria³, Cecchetto Gianna². *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780, Montevideo, Uruguay. e-mail: sur9@fagro.edu.uy

²Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias - Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores 2124, Montevideo, Uruguay.

³Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal. Centro de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. Universidad Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária 50.670-420 Recife – PE, Brasil.

Las plantas son importantes fuentes de productos naturales biológicamente activos como los péptidos antimicrobianos (AMPs, *antimicrobial peptides*) de las clases esnaquinas, defensinas, tioninas y ciclótidos, entre otros. Estos péptidos tienen un rol fundamental en la defensa contra una amplia variedad de patógenos incluyendo bacterias, hongos, virus y protozoarios, por lo que su uso en la agricultura y en el desarrollo de fármacos ha sido propuesto desde su descubrimiento. Varios AMPs han sido identificados en plantas de importancia agrícola, mediante evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos. Este trabajo plantea la búsqueda de esnaquinas en plantas nativas, donde este tipo de péptidos han sido poco explorados, pero donde sin embargo la diversidad vegetal es más abundante. Específicamente, el objetivo fue aislar genes de esnaquinas de *Peltophorum dubium*, planta nativa de Sudamérica, para su posterior expresión en sistemas heterólogos. El uso de estas herramientas biotecnológicas, a pequeña y gran escala, permiten eliminar dificultades derivadas de la limitada cantidad extraíble de planta. Utilizando *primers* degenerados diseñados en zonas conservadas de secuencias conocidas, se obtuvo una secuencia con similitud significativa con genes de esnaquinas

(BLASTn-NCBI). La secuencia de nucleótidos del gen permitió detectar dos exones y un intrón (programa Fgenesh), característico de esnaquinas de tipo 1 (SN1, *S. tuberosum*). La secuencia aminoácídica deducida (88 residuos) presentó un dominio GASA completo (BLASTx, BLASTp-NCBI); seis puentes disulfuro (servidor DIANNA) y un péptido señal de 25 aminoácidos (*SignalP*), característicos de este tipo de AMP. Su PM y pI predicho por gel virtual 2D (JVirGel) fueron 6.92 y un 8.78, respectivamente. Finalmente, se determinó la estructura secundaria del péptido maduro, detectando dos hélices alfa (*PsiPred*). Las características de esta secuencia, deducidas por análisis *in silico*, corresponden a las reportadas para esnaquinas en plantas. La producción de este péptido en sistemas heterólogos permitirá evaluar su actividad antimicrobiana *in vitro*.

Palabras clave: bioinformática, expresión heteróloga, péptidos antimicrobianos

***In silico* characterization of a new snakin isolated from *Peltophorum dubium*, a native plant from South America**

Plants are important sources of biologically active natural products, as antimicrobial peptides (AMPs) of the snakin, defensin, thionin and cyclotide classes, among others. These peptides play a fundamental role in the defense against a variety of pathogens (e. g. bacteria, fungi, viruses and protozoa), so that its use in agriculture and drug development has been proposed since its discovery. Several AMPs have been identified in plants of agricultural importance, by evaluating the antimicrobial activity of extracts. This work focuses on finding snakins in native plants, where these peptides have been little explored, but where, however, plant diversity is most abundant. Specifically, the aim was to isolate snakin genes of *Peltophorum dubium*, a South American native plant, for subsequent expression in heterologous systems. The use of these biotechnological tools, at small and large scale, allows eliminating eventual difficulties arising from the limited amount of extractable plant compounds. Using degenerate primers designed on conserved regions of known sequences, a sequence with significant similarity to snakin genes (blastn-NCBI) was obtained. The nucleotide sequence (Fgenesh program) allowed us also to verify the presence of two exons and one intron, corresponding to a typical characteristic of Snakin 1 (SN1, from *S. tuberosum*). The deduced amino acid sequence of snakin (88 residues) showed a complete GASA domain (BLASTx, BLASTp-

NCBI); six disulfide bonds (*DIANNA server*) and one signal peptide of 25 amino acids (*SignalP*). It's PM and pI predicted by virtual 2D gel (JVirGel) were of 6.92 and of 8.78, respectively. Finally, the secondary structure of the mature peptide was determined, detecting two alpha helices (*PsiPred*). The characteristics of this sequence, deduced by *in silico* analysis, corresponded to those reported for snakins in plants. The production of this peptide in heterologous systems will assess their *in vitro* antimicrobial activity.

Keywords: antimicrobial peptides, bioinformatics, heterologous expression

**MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS/
*Plants breeding***

T4.1 Improving C₃ and C₄ photosynthesis to increase crop yield

Rowan F. Sage

Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Toronto, 25 Willcocks Street, Toronto, ON M5S3B2 Canada

As agricultural production approaches its yield ceiling, improving the intrinsic photosynthetic capacity of crops becomes an increasingly important strategy to enhance yield. Enhancing photosynthetic capacity requires an understanding of yield limitations. Theoretical models demonstrate that in C₃ plants, Rubisco activity limits photosynthetic capacity at the relatively low atmospheric CO₂ levels of recent geological times; however, at future levels of elevated atmospheric CO₂, the capacity to regenerate RuBP will become the predominant limitation. Redesigning leaves to enhance RuBP regeneration capacity, for example, by increasing the capacity to use carbohydrates, would be one means of boosting C₃ photosynthesis in a high CO₂ environment. In C₄ plants at high CO₂, limitations will shift from the C₄ metabolic cycle towards C₃ cycle reactions. Reducing the amount of C₄ metabolism while investing more resources in Rubisco and the C₃ cycle reactions is one strategy for improving C₄ photosynthetic capacity in future decades. One means to radically improve C₃ photosynthesis, particularly in warm environments, is to engineer the C₄ photosynthetic pathway into C₃ crops. Recent work demonstrates the C₄ pathway has

independently evolved at least 62 times indicating the engineering of the C₄ pathway into C₃ crops may be feasible in the near future. A global consortium of C₄ biologists are currently attempting to engineer the C₄ pathway into rice, in collaboration with the international Rice Research Institute in the Philippines. The progress of this project will be briefly reviewed.

T4.2 How far the expected climate change will affect food security in the Middle East?

Ahmad K. Hegazy^{1,3*}, Mahmoud A. Medany², Hanan F. Kabil³, Mona M. Maez² and Abdulrahman A. Alatar¹.
*Autor para correspondencia.

¹Botany and Microbiology Department, College of Science, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia. e-mail: akhegazy@yahoo.com

²Central Laboratory for Agricultural Climate (CLAC), Agriculture Research Center, Giza, Egypt.

³Botany Department, Faculty of Science, Cairo University, Giza 12613 Egypt.

This study aims at predicting the influence of the expected increase in air temperature on the spatial and temporal distribution of the three food crops *Triticum aestivum* L., cv. 'Gemiza 9', *Oryza sativa* L., cv. 'Sakha 101' and *Zea mays* L., cv. 'Hybrid 10'. Egypt is taken as study case from the Middle East. Optimum air temperature allowing maximum growth for each of the study crop cultivars and the current and projected air temperature patterns in the future years were used for projection of the seasonal and spatial crop distribution maps in the year 2005 and future years: 2025, 2050, 2075 and 2100. The predicted pattern of increase in air temperature by using SCENGEN software was added to the current climatological data. The study focuses on the management of the local agro-ecosystems in order to adapt planting or sowing practices for the projected climate change scenarios. Results showed that sowing dates of the three crops will be subject of change in order to allow maximum predicted planting area in the same region. The expected maximum areas that may be planted by the study crop cultivars vary irregularly in the coming 100 years. A great reduction in the area planted by *T. aestivum* is predicted and, by the year 2100, the high air temperatures will not support the cultivation of the tested cultivar. The maximum areas that will be planted by *O. sativa* may not be greatly affected by the projected increase in air temperature. By the year 2100, Upper Egypt will not support the plantation of *O. sativa* cultivar Sakha 101. For *Z. mays* crop, it will

not be greatly affected by the projected increase in air temperature, and the cultivar Hybrid 10 is predicted to continue in all regions of Egypt throughout the coming hundred years. The predicted thematic maps of temporal and spatial crop distribution are discussed as based on the expected scenarios. Climate change is threatening food security in the Middle East that urges biotechnology research to concentrate on the production of crop cultivars adapted to the expected plant growth environment.

Keywords: climatic change, rice, food security

T4.3 Selección *in vitro* e *in vivo* de mutantes de arroz tolerantes a la sequía

María Caridad González Cepero¹, Elizabeth Cristo¹, Noraida Pérez¹ y Mayra Rodríguez²

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba. mcaridad@inca.edu.cu

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Cuba.

En el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas se desarrolló un trabajo investigativo encaminado a la obtención de variedades de arroz de buen comportamiento agronómico en condiciones de bajos suministros de agua mediante el empleo de la mutagénesis *in vitro* para incrementar la variabilidad genética y se realizó la selección *in vitro* mediante el empleo de PEG 6 000. Las líneas seleccionadas fueron evaluadas en condiciones de campo utilizando riego por goteo hasta el establecimiento de la planta, el cual fue suspendido posteriormente y aplicado en la fase de floración. Se seleccionaron los genotipos de mejor comportamiento agronómico a partir de la evaluación del rendimiento y sus componentes principales, los cuales fueron evaluados desde el punto de vista fisiológico, bioquímico y molecular y se comprobó que existían diferencias con relación a la variedad donante. A partir de la metodología empleada se cuenta con dos líneas avanzadas que serán evaluadas en condiciones de producción.

Palabras clave: arroz, mejoramiento, mutación, sequía

T4.4 Actividad antifúngica *in vitro* de plantas transgénicas de arroz portadoras de un gen de defensa

Maylin Pérez-Bernal^{1*}, Magalis Delgado¹, Ariel Cruz², Daymí Abreu¹, Onel Valdivia¹ y Raúl Armas¹. *Autor para correspondencia.

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus. Apartado postal 83. Código postal 60 200. Sancti Spiritus, Cuba. e-mail: maylin.perez@cigb.edu.cu

²Estación Experimental de Arroz "Los Palacios", Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carretera La Francia km 1 ½, Los Palacios, CP 22900, Pinar del Río, Cuba.

El arroz constituye la base alimenticia de la mitad de la población mundial. En Cuba, la variedad 'Jucarito 104' ('J-104') ha sido una de las de mayor demanda por los productores, sin embargo, es muy susceptible a las enfermedades fúngicas. Tradicionalmente estas afectaciones son tratadas con agroquímicos sintéticos, pero afectan la salud de los operarios y la microbiota del suelo. Como una opción viable para sustituirlos, en el CIGB de Sancti Spiritus se ha aplicado la ingeniería genética para generar plantas de arroz 'J-104' portadoras de un gen que codifica para una defensina, involucrada en el mecanismo de defensa contra hongos. Para determinar de forma preliminar si estas plantas son resistentes a hongos fitopatógenos, se realizaron ensayos de reto *in vitro* contra *Sarocladium oryzae*. Aproximadamente 2 000 esporas del hongo se situaron en el centro de una placa de Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar. A su alrededor se colocaron discos de papel Whatman impregnados con 250 mg de extractos de proteínas totales solubles de cuatro líneas transgénicas, así como de plantas no transgénicas, agua destilada estéril, solución amortiguadora de extracción y un control positivo de fungicida comercial. Las placas se incubaron en la oscuridad a 30°C. Transcurridas 72 horas se observó que, al igual que el fungicida comercial, el extracto proteico de las plantas transgénicas mostró actividad antifúngica, formando un halo de inhibición del crecimiento micelial alrededor de los discos impregnados. En contraste, se verificó proliferación del fitopatógeno sobre los discos impregnados con agua destilada estéril, solución amortiguadora de extracción y del extracto proteico de las plantas no transgénicas. Estos resultados, junto con la previa amplificación por PCR del gen de la defensina, indican la incorporación y la expresión del transgén en la variedad cubana de arroz J-104.

Palabras clave: actividad antifúngica, arroz, extractos proteicos

***In vitro* antifungal activity of transgenic rice plants carrying a synthetic defensin gene**

Rice is the staple food for half the world's population. In Cuba, the 'Jucarito 104' ('J-104') variety has been one of the most demanded by producers, however, is very susceptible to fungal diseases. Traditionally these effects are treated with synthetic chemicals, but they affect the health of workers and the soil microorganisms. As a viable option to replace them, in CIGB of Sancti Spiritus has been applied genetic engineering to generate 'J-104' rice plants with a gene encoding a defensin involved in defense against fungi. To determine as a preliminary way if these plants are resistant to fungal pathogens, *in vitro* assays against *Sarocladium oryzae* were performed. Approximately 2 000 spores of the fungus were placed in the center of plates which contained Potato-Dextrose-Agar. Whatman paper discs impregnated with 250 mg of total soluble protein extracts of four transgenic lines were placed around, as well as non-transgenic plants, sterile distilled water, extraction buffer and a positive control of commercial fungicide. The plates were incubated in the dark at 30°C. After 72 hours it was observed that, as the commercial fungicide, the protein extracts of the transgenic plants showed antifungal activity, by inhibition of mycelial growth around disks. In contrast, proliferation of the pathogen on disks impregnated with sterile distilled water extraction buffer and the protein extract of non-transgenic plants was verified. These results, plus the previous PCR amplification of defensin gene, indicate the incorporation and expression of the transgene in 'J -104' Cuban rice variety.

Key words: antifungal activity, protein extracts, rice

T4.5 *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean using indirect organogenesis

R. Collado^{1*}, I. Bermúdez-Carabaloso¹, L.R. García¹, N. Veitia¹, D. Torres¹, C. Romero¹, A. Martirena-Ramírez¹, G. Angenon². *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: raulc@ibp.co.cu

²Laboratory of Plant Genetics, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Pleinlaan 2, B-1050 Brussels, Belgium.

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), constitute an important source of dietary protein for over half a billion people mainly in developing countries. A great number of bacterial, fungal, and viral diseases occur annually in bean-

producing regions all over the world, causing economic losses to bean producers. Major improvements in agronomic traits of cultivated common bean have been achieved through years of conventional breeding. However, traditional breeding methods became limited by low recombination potential, sexual barriers and embryo abortion in interspecific hybrids. Therefore, genetic transformation is needed to allow breeders to introduce novel traits that could contribute to improved performance and quality and to tolerance to abiotic and biotic factors that limit yield and reduce profitability. Based on the indirect organogenesis regeneration pathway, *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean was conducted. The use of green nodular calli, which have not been used as target explant for common bean transformation before, played an important role to successfully obtain transformed plants. Several factors such as *Agrobacterium* strain, plasmid, light conditions, bacterial concentration, co-cultivation period and type of callus were studied for optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation. Different concentrations of glufosinate ammonium (herbicide Finale) were assessed for determination of the minimal inhibitory concentration of the selective agent. The most efficient T-DNA transfer occurred when proliferative calli were inoculated with *Agrobacterium* strain EHA105 harbouring pCAMBIA3301 at a concentration of $OD_{600} = 0.5$, and co-cultivated under 16 h light/8 h dark photoperiod for 6 days. 0.5 mg l^{-1} of glufosinate ammonium was the minimum inhibitory concentration for selection of transformed tissue. A transformation system integrating *Agrobacterium*-mediated DNA transfer, efficient regeneration via indirect organogenesis, and the *bar* gene as selectable marker, was established. This system allowed obtaining transgenic plants with Mendelian inheritance of the transgenes based on PCR analysis, demonstrating its value for bean transformation.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, calli, common bean breeding, genetic transformation

Transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* de frijol común con el empleo de organogénesis indirecta

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es una fuente de proteínas importante para más de medio billón de personas, principalmente en países en desarrollo. Un gran número de enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus afectan la producción de frijol en todo el

mundo y provocan pérdidas económicas a los productores. Con el empleo del mejoramiento genético convencional se han logrado importantes avances en la mejora de características agronómicas de este cultivo. Sin embargo, los métodos de mejoramiento tradicional están limitados por el bajo potencial de recombinación, las barreras sexuales y el aborto de embriones en híbridos interespecíficos. La transformación genética constituye una alternativa que permite a los mejoradores introducir nuevos tratamientos para incrementar la tolerancia a estreses provocados por factores abióticos y bióticos que limitan el rendimiento y reducen la rentabilidad del frijol. Basados en la regeneración vía organogénesis indirecta se desarrolló la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en el frijol común. El empleo de callos nodulares verdes, los cuales no han sido utilizados antes para la transformación genética de frijol común, jugó un papel importante en la obtención de plantas transgénicas. Para optimizar la transferencia de ADN se estudiaron varios parámetros como la cepa de *Agrobacterium*, plásmidos, fotoperíodo, concentración bacteriana, período de co-cultivo y diferentes tipos de callos. Diferentes concentraciones de glufosinato de amonio (herbicida Finale) fueron estudiadas para determinar la concentración mínima inhibitoria del agente selectivo. La transferencia de ADN más eficiente ocurrió cuando los callos en fase de multiplicación fueron inoculados con la cepa EHA105 (pCAMBIA3301) a una DO_{600} de 0.5, y co-cultivados bajo fotoperíodo (16 h luz/8 h oscuridad) durante seis días. Se determinó que 0.5 mg l^{-1} de glufosinato de amonio es la concentración mínima inhibitoria para la selección del tejido transformado. Se estableció un sistema de transformación que integra la transferencia de ADN mediada por *Agrobacterium*, una regeneración eficiente vía organogénesis indirecta, y el gen *bar* como marcador de selección. Este sistema permitió obtener plantas transgénicas que transmitieron a sus progenies los transgenes con proporción Mendeliana según resultados de los análisis de PCR, lo que demostró su valor para la transformación de frijol.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*, callos, mejoramiento de frijol común, transformación genética

T4.6 Transformación genética de *Amaranthus* spp., mediada por *Agrobacterium* spp.

Yazmín García Canales, John P. Délano-Frier*. *Autor para correspondencia.

Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, (Cinvestav-Unidad Irapuato) km 9.6 del Libramiento Norte Carretera Irapuato-León. Apartado Postal 629, CP 36 821, Irapuato, Gto., México. e-mail: yagarcia@ira.cinvestav.mx

El amaranto es relevante por su alto contenido proteico en la semilla y características agronómicas deseables, como tolerancia a condiciones de sequía, salinidad y suelos pobres no aptos para otros cultivos. Diversas investigaciones han estudiado los elementos que le confieren al amaranto tolerancia a condiciones ambientales desfavorables, identificando numerosos genes de respuesta a estrés (a) biótico. Sin embargo, no se cuenta con un protocolo de transformación de amaranto estandarizado y confiable, que permita la caracterización *in situ* de estos genes, como herramienta de futura aplicación agrobiotecnológica. En este trabajo se evaluaron diferentes técnicas de transformación genética de amaranto de grano mediada por *Agrobacterium* spp., in planta e *in vitro*. Se evaluaron cinco estrategias: cuatro mediadas por *A. tumefaciens* (inoculación de meristemos apicales, callos derivados de embriones, semillas en germinación y vía inmersión floral) y una por *A. rhizogenes* (generación de brotes a partir de rizoclonos) en tres variedades de amaranto de grano (*Amaranthus hypochondriacus* var. Revancha, *A. hypochondriacus* var. Nutrisol y *A. cruentus* var. Amaranteca). Se optimizaron los factores que afectan la transformación, como la cepa de *Agrobacterium* spp., el método de infección, la densidad óptica del inóculo bacteriano (DO_{600}), la concentración de surfactante, y las condiciones de cultivo. Se seleccionaron transformantes putativas empleando medio de cultivo selectivo adicionado con Basta™ (4mg/ml) y ensayo visual de proteína verde fluorescente (GFP). Hasta el momento, dos inoculaciones de *A. tumefaciens* cepa AGL1, ajustadas a $DO_{600} \approx 1.0$, con 0.1% de surfactante y aplicadas vía inmersión floral justo al comienzo de la floración, así como explantes de plántulas germinadas *in vitro*, inoculados con *A. rhizogenes* cepa 1500, ajustada a $DO_{600} \approx 0.6$ y cocultivados durante 72 h, fueron las condiciones estandarizadas. Tomando en cuenta, el tiempo consumido y la versatilidad del método, la transformación *in planta* vía inmersión floral es la estrategia más promisoría.

Palabras clave: *Agrobacterium* spp., amaranto de grano, transformación genética

***Agrobacterium* spp.-mediated genetic transformation of *Amaranthus* spp.**

Amaranth is relevant due to its high seed protein content and desirable agronomic traits, such as tolerance to drought conditions, salinity and poor soils unsuitable for other crops. Several studies have searched for the elements responsible for amaranth's tolerance to unfavorable environmental conditions, and have found numerous (a) biotic stress response genes. However, there is not a standardized and reliable amaranth transformation protocol, which allows *in situ* characterization of these genes as a tool for future agro-biotechnological application. In this work, different *in planta* and *in vitro* techniques of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grain amaranth were evaluated. Five strategies were evaluated: four with *A. tumefaciens* (apical meristem inoculation, embryo-derived callus, germinating seeds and floral dip) and one with *A. rhizogenes* (shoot regeneration from root clones) in three varieties of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* var. Revancha, *A. hypochondriacus* var. Nutrisol and *A. cruentus* var. Amaranteca). The factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation were optimized, such as strain, infection method, optical density of bacterial inoculum (OD_{600}), surfactant concentration and cultivation conditions. Putative transformants were selected using selective medium supplemented with Basta™ (4 mg/ml) and a Green Fluorescent Protein (GFP) visual assay. So far, two inoculations of *A. tumefaciens* strain AGL1, adjusted to $OD_{600} \approx 1.0$, containing 0.1% surfactant and applied through floral dip right at the beginning of flowering and the generation of explants from *in vitro* cultures inoculated with *A. rhizogenes* strain 1500, adjusted to an $OD_{600} \approx 0.6$ and co-cultivated for 72 h, were the standardized conditions selected. Taking into account the time required and the versatility of the method, *in planta* transformation through floral dip is the most promising strategy.

Keywords: *Agrobacterium* spp., genetic transformation, grain amaranth

T4.7 How to overcome low fertility barrier for banana breeding: pollen conservation study example

Ricci Sébastien*, Cachel Esther, Salmon Frédéric. *Author for correspondance.

Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR

AGAP, Station de Neufchâteau, 97130 Capesterre-Belle-Eau, Guadeloupe (FWI), France

Dessert banana production for export is largely based on intensive monoculture, involving very few varieties belonging to Cavendish subgroup. This culture is threatened with several diseases and pests. Chemical control measures used in intensive cultivation are harmful to the environment, and are not available for all banana growers worldwide. Furthermore, for some diseases, there is no effective chemical control. Use of resistant or tolerant varieties is thus a sustainable way regardless of the mode of production. In this context, and in partnership with the Technical Tropical Institute (IT²), CIRAD (French Agricultural Research Centre for International Development) has developed a platform for creation and selection of dessert bananas. Apart from the development of interesting varieties for growers, this platform allows a better interaction between research and industry professionals, as well as a gradual rising of breeding activity. Unfortunately, concerning this last point, the low gametic fertility of varieties interesting to use in crossbreeding is currently an obstacle for obtaining sufficient quantity of seeds. Floral biology studies were thus initiated to identify the different 'biological locks' existing, and consider agronomical practices or other technical ways that could allow overcoming this barrier. The development of pollen conservation techniques, for example, could allow us to optimize the available flowers by removing the blooming time offset constraint. If the development of such a technique for banana is not as easy as for other crops, our studies show that banana's pollen can support a desiccation step, which seems essential for medium- or long-term cryopreservation.

Keywords: *Musa*, dessert banana, cryo preservation

T4.8 Impact of environmental conditions on banana's fertility

Maingueneau Aurore¹, Ricci Sébastien^{1*}, Goigoux Sandrine¹, Bakry Frédéric², Salmon Frédéric¹. *Author for correspondence

¹Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR AGAP, Station de Neufchâteau, 97130 Capesterre-Belle-Eau, Guadeloupe (FWI), France

²CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France

The CIRAD's (French Agricultural Research Centre for International Development) banana breeding program developed in Guadeloupe aims to provide varieties resistant to major pests and diseases, and suitable for marketing constraints. The main difficulty of banana improvement is low seed set due to reproductive barriers, in particular the low gametic fertility of genotypes used in crosses. Good diagnostics of gametic fertility of the genitors is thus necessary to face with sterility barriers, and to facilitate the development of new hybrids. In this context, since 2011, impact of environment on gamete fertility of banana is studied in Guadeloupe. Male and female fertility indicators were monitored on a panel of progenitors, during different periods of the year, on three sites encompassing contrasted environmental conditions (soils, temperatures, sunlight, rainfall, altitude). Preliminary results suggest that the environmental conditions are actually impacting banana's gamete fertility, with both seasonal and site effects. However, these effects are different according to genotypes and to male versus female fertility. These results will be considered to resize breeding plots optimizing male and female fertility of genitors to increase seed yield in our breeding program.

Keywords: *Musa*, breeding program, soil

T4.9 Panorama y perspectivas de las variedades cubanas de papa (*Solanum tuberosum* L.)

Jorge L. Salomón Díaz*, Juan G. Castillo Hernández, Ana Estévez, Eric Díaz, Ramón Tejeda, Beatriz Araujo, Odalis Céspedes y Aymara Pérez. *Autor para correspondencia.

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Carretera a Tapaste km 3 ½, GP. No. 1, San José de las Lajas, CP 32 700, Mayabeque, Cuba. e-mail: salomon@inca.edu.cu

Desde 1985 en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), se inició un programa de Mejoramiento Genético con el objetivo de obtener variedades cubanas de papa, tanto para la agricultura cubana como para otros países. El INCA ha probado por más de diez años en condiciones experimentales y en parcelas en campo de producción de las principales empresas de cultivos varios de Cuba (Ciego de Ávila, Villa Clara, Matanzas y La Habana), donde las mismas han mostrado ser superiores a los tubérculos-semilla de variedades comerciales y precomerciales foráneas que se importan. Se han obtenido y registrada 14 variedades de papa como resultado de este programa. Estas

presentan diferentes características agrícolas e industriales que responden a los diferentes manejos, usos y mercados. Con la utilización y comercialización de las variedades cubanas se lograrían importantes beneficios, recuperar parte de las inversiones realizadas en la obtención de las variedades, situar variedades cubanas en el mundo papero con el consiguiente mérito para la ciencia cubana, obtener cantidades suficientes de tubérculos-semilla nacional con calidad para lograr un efecto práctico económico e incrementar los rendimientos y la producción de papa a nivel nacional.

Palabras clave: mejoramiento genético, papa, variedades

T4.10 Metodología para la escisión de genes marcadores de selección en plantas de *Digitalis purpurea* L. mediante el sistema Cre/lox

Elizabeth Kairúz Hernández-Díaz^{1,2*}, Alina Capote², Anabel Pérez², Naivy Pérez-Alonso², Elio Jiménez², Borys Chong-Pérez². *Autor para correspondencia.

¹Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

²Instituto 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: kairuzhd@uclv.edu.cu

Las plantas del género *Digitalis* se caracterizan por producir glucósidos cardiotónicos, medicamentos empleados a nivel mundial en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. En investigaciones precedentes se desarrolló un protocolo de modificación vía *Agrobacterium tumefaciens* de discos foliares de *Digitalis purpurea* L., en el cual el empleo de antibiótico como agente selectivo es imprescindible. Sin embargo, los genes de resistencia no son necesarios luego del proceso de selección, por el contrario, su continua presencia afecta la percepción pública y provoca problemas tecnológicos. Con el objetivo de desarrollar una metodología para la escisión de genes marcadores de selección en plantas de *D. purpurea*, se empleó el sistema recombinante sitio-específico Cre/lox guiado por un promotor inducible a golpe de calor. Primeramente, se estudió el efecto de la aplicación del golpe térmico (dos veces 2 h con 16 h de intervalo entre ellos) en hojas y callos a 37, 40, 42 y 45°C. Luego, se transformaron discos foliares de plantas cultivadas *in vitro* con el vector binario

pAthsp-A, aplicando las condiciones propuestas. No se produjo regeneración de plantas en los explantes sometidos a 45°C, a diferencia de los restantes tratamientos. Los callos tratados a 40 y 42°C mostraron mayor eficiencia de regeneración, en comparación con los callos y hojas no sometidos a estrés por temperatura. Luego del proceso de selección de los eventos transgénicos, realizado durante la formación y multiplicación de callos, se aplicó el golpe térmico a 40 y 42°C. Diez líneas de plantas regeneradas se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Fue posible comprobar la escisión de los genes marcadores de selección a 42°C, en tres de las líneas. La metodología propuesta puede ser aplicada para la obtención de plantas transgénicas libres de marcadores de selección, que contengan un gen de interés para la sobreproducción de cardenólidos.

Palabras clave: cardenólidos, golpe térmico, transformación genética

Methodology for excision of selectable marker genes in transgenic *Digitalis purpurea* L. using a Cre/lox system

The plants of the genus *Digitalis* are characterized by the production of cardenolides, drugs widely used worldwide in the treatment of heart failure. In previous research a transformation protocol was developed from leaf disc of *Digitalis purpurea* L., using marker genes that confer resistant to antibiotics. However, selectable marker genes are not required after the selection process. Besides affect public perception and cause technological problems. The aim of this investigation was the development of a method to excise selectable marker genes in transgenic plants of *D. purpurea*, using the site-specific recombinant system Cre/lox, guided by an inducible heat shock promoter. We studied the effect of heat shock (twice 2 h with 16 h in between) at 37, 40, 42 and 45°C in leaves and calli. To check the effectiveness of the proposed conditions, we transformed leaf discs from plants grown *in vitro* with the plasmid pAthsp-A. No regeneration of plants occurred in explants subjected to 45°C, unlike the other treatments. The treatments of calli heat-shocked at 40 and 42°C showed increased efficiency of regeneration compared to the calli and leaves not subjected to temperature stress. After the selection process, conducted during the formation and multiplication of calli, the thermal shock was applied at 40 and 42°C. Ten lines were analyzed using the Polymerase Chain Reaction. It was possible to detect the excision of

selectable marker genes at 42°C in three lines. The proposed method can be applied for obtaining marker-free transgenic plants, which contain a gene of interest for cardenolides overproduction.

Keywords: cardenolides, genetic transformation, heat shock

T4.11 Inducción de mutaciones y selección de mutantes mediante la aplicación de irradiaciones con rayos gamma en el cultivar de boniato 'INIVIT BS-16'

Jorge López*, Alfredo Morales, Damisela Reinaldo, Nery Montano, Aymé Rayas, Víctor Mederos, Daniel Rodríguez, Yoel Beovidez, Milagros Basail y Arletys Santos. *Autor para correspondencia.

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP 53 000, Villa Clara, Cuba. e-mail: lab.cell.biotec@inivit.cu

El mejoramiento genético del boniato por la vía clásica ha propiciado la obtención de varios cultivares con buenos rendimientos agrícolas y adaptabilidad a condiciones adversas de la producción. Sin embargo, disponer de sistemas eficientes de regeneración de plantas por cultivo de tejidos, tales como la organogénesis y embriogénesis somática, vinculado con la inducción de mutaciones puede complementar y hacer más eficiente la mejora clásica de este cultivo. La investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales, en el cultivar de boniato 'INIVIT BS-16', con el objetivo de inducir variabilidad genética para la selección de mutantes y evaluar posteriormente su respuesta a condiciones adversas de la producción. Se determinó el método más apropiado para el establecimiento y multiplicación *in vitro* del cultivar objeto de estudio, así como se definió la mejor concentración de 2,4-D para la formación de callos con estructuras embriogénicas (2.0 mg l⁻¹). Los mejores resultados para la maduración y germinación de los embriones somáticos se alcanzaron con el medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento. Adicionalmente, se irradiaron ápices meristemáticos (15, 25, 35 y 45 Gy) en una fuente de Cobalto⁶⁰. Luego a partir de la Dosis Letal Media (35 Gy) obtenida se realizaron irradiaciones masivas las cuales permitieron la selección en campo de seis posibles mutantes (cinco en el primer ciclo y uno en el segundo ciclo) todos con características diferentes a la planta donante, los cuales fueron caracterizados por descriptores morfológicos.

Palabras clave: embriogénesis somática, organogénesis, mejora por mutaciones

Mutation induction and mutant selection through gamma radiation application in sweet potato cultivar 'INIVIT BS-16'

Sweet potato genetic improvement by classical methods has led to the production of several cultivars with good agricultural yields and adaptability to adverse production conditions. However, the availability of efficient plant regeneration systems through tissue culture, such as somatic embryogenesis and organogenesis, linked to mutation induction may complement and make classical breeding more efficient in this crop. The experiment was conducted at the Research Institute of Tropical Root and Tuber Crops, bananas and plantains (INIVIT) in sweet potato cultivar 'INIVIT BS-16', with the aim of inducing genetic variability for mutant selection and evaluate them later for response to adverse production conditions. The most appropriate method for establishing *in vitro* multiplication in the target cultivar was determined as well as the best 2,4-D concentration for callus formation with embryogenic structures (2.0 mg l⁻¹). The best results for somatic embryos maturation and germination were obtained with MS medium (1962) without growth regulators. Additionally, apical meristems (15, 25, 35 and 45 Gy) were irradiated in a Cobalt⁶⁰ source. Then, from the obtained Lethal Mean Dose (35 Gy), mass irradiations were performed to allow field selection of six possible mutants (five from the first crop and one from second one) which were characterized by morphological descriptors. All of them showed different characteristics to the donor plant.

Keywords: Improvement by mutations, organogenic, somatic embryogenesis

T4.12 Transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* de embriones somáticos de soya cultivar 'INCASoy-27'

J. Pérez-Pérez^{1,2*}, L.R. García¹, N. Veitía¹, R. Collado¹, I. Bermúdez-Carabaloso¹, D. Torres¹, C. Romero¹. *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.

²Universidad de Granma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Carretera vía Manzanillo, km 17.5, Peralejo, Bayamo, Granma, Cuba. e-mail: jperez@udg.co.cu

La soya (*Glycine max*) es un cultivo modelo y una de las principales fuentes de aceite vegetal y proteínas en el mundo. Su productividad ha sido limitada debido a susceptibilidad a los estreses ambientales, enfermedades, plagas y otros factores. Debido a su estrecha base genética y la autopolinización, el mejoramiento genético tradicional es difícil y la transformación genética, podría contribuir a obtener cultivares de soya mejorados. Sin embargo, la eficiencia de los protocolos de transformación son generalmente bajos, influenciado por el modo de regeneración, el genotipo, tipo de explante y las condiciones de co-cultivo. Los embriones somáticos secundarios constituyen un tejido blanco útil para la transformación genética, aunque su transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* es un desafío en esta especie. El objetivo de este trabajo fue, optimizar los parámetros implicados con la transferencia del ADN durante la transformación vía *A. tumefaciens* en embriones somáticos de soya cultivar 'INCASoy-27'. Se emplearon tres cepas bacterianas (EHA105, C58C1, LBA4404) que contenían el vector binario pCAMBIA3301 con los genes *uidA* y *bar*. Se evaluó la influencia del tiempo de sonicación, densidad óptica, temperatura, tiempo de inoculación y duración del co-cultivo. Como resultado se obtuvo la transformación genética de embriones somáticos de soya cultivar cubano 'INCASoy-27'. Se optimizaron las condiciones de co-cultivo con expresión transitoria del gen *uidA*. Este es el primer informe de transformación genética vía *A. tumefaciens* en embriones somáticos de un cultivar cubano de soya.

Palabras clave: gen *uidA*, *Glycine max*, regeneración, selección

***Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of somatic embryos from soybean 'INCASoy-27' cultivar**

Soybean (*Glycine max*) is a model legume crop and one of the major sources of vegetable oil and protein in the world. The productivity of soybean has been limited due to their susceptibility to environmental stresses, diseases, pest and other factors. Due to the fact the soybean is a self-pollinating crop and the genetic base is quite narrow, the commercial breeding is difficult and the genetic transformation could contribute to obtain soya cultivar improved. However, the efficiency transformation protocols generally remain low, influenced by the mode of regeneration, genotype, explant and co-culture conditions. Soybean secondary somatic embryos constitute a useful target tissue for genetic

transformation, although their *Agrobacterium*-mediated transformation has been a challenge in this specie. For these reasons, the objective of this work was to assessment parameters involved with the DNA transfer during *Agrobacterium*-mediated transformation in somatic embryos of soybean cultivar 'INCASoy-27'. Three *Agrobacterium* strains (EHA105, C58C1 or LBA4404) were used. The binary vector pCAMBIA1301 contains the *uidA* and *bar* gene. The influence of sonication time, optical density, temperature, inoculation and co-culture time period were evaluated. As result it was obtained the genetic transformation of the somatic embryos of Cuban soybean 'INCASoy-27' cultivar. Beside, the co-culture conditions for expression transitory of *uidA* gene were optimized. This is the first report of *A. tumefaciens*-mediated transformation on somatic embryos of cuban soybean cultivar.

Key words: *uidA* gene, *Glycine max*, regeneration, selection

T4.13 Selección participativa de mutantes de tomate de buen comportamiento agronómico en condiciones de bajos suministros de agua y fertilizantes

María Caridad González Cepero^{1*}, Delfina Trujillo¹, Dayné Horta¹. *Autor para correspondencia.
¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana. Cuba. e-mail: mcaridad@inca.edu.cu

El agua es una de los recursos finitos indispensables para la vida del hombre, las plantas y los animales, sin embargo la agricultura consume el 60% de esta por lo que se hace necesaria la obtención de nuevas variedades de alto potencial productivo en condiciones de riego mínimo. Para lograr tales objetivos se desarrolló un programa de mejoramiento genético que incluyó la inducción de mutaciones para crear variabilidad genética y la selección en campo con la participación de productores de diferentes provincias del país en condiciones de bajos suministros de agua y fertilizantes (riego por goteo durante tres días para el establecimiento de la planta y su suspensión total durante todo el ciclo, así como la aplicación del 50% del fertilizante recomendado) durante varias generaciones de los genotipos. Se cuenta con un grupo de genotipos con rendimientos superiores a los 3 kg por planta, tres de los cuales poseen contenidos de sólidos solubles totales superiores a 5% lo cual los hace excelentes para la industria.

Palabras clave: mutación, selección participativa, sequía, tomate

T4.14 Introducción del método de selección a nivel foliar de la resistencia al Mal de Panamá en nuevos clones de banano y plátano obtenidos en el programa de mejoramiento genético cubano

Companioni B.^{1*}, L. Díaz¹, M. Arzola¹, J. Ventura², N. Portal³, R. Santos¹ y J. C. Lorenzo¹. *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Interacción Planta-Patógeno, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: bcompanioni@bioplantas.cu

²Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

³UNICA, Universidad de Ciego de Ávila, Facultad de Agronomía, Ciego de Ávila, Cuba.

En trabajos previos se desarrolló un procedimiento para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia y susceptibilidad de cultivares de banano a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. En el marco del programa de mejoramiento genético que se desarrolla en el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), se logró que el clon 'Zanzíbar' fue factible la selección de 15 posibles mutantes, de los cuales resultaron materiales promisorios las variantes 'Z-13', 'Z-30' y 'Z-30 A'. El presente trabajo consistió en determinar la susceptibilidad y resistencia al Mal de Panamá mediante la aplicación del método de selección a nivel foliar de la resistencia en las variantes seleccionadas del clon 'Zanzíbar' irradiado. Se realizaron seis momentos de selección, y se utilizaron diez plantas de cada mutante. Los resultados evidenciaron que las plantas seleccionadas del clon 'Zanzíbar' irradiado (los mutantes: 'Z 13', 'Z 30' y el 'Z 30 A') indican ser materiales vegetales promisorios para el mejoramiento genético en el cultivo dirigido a la resistencia a esta enfermedad. Deben continuarse los estudios en campo de estos mutantes, para evaluar la resistencia a esta enfermedad mediante otros métodos de selección que incluyen la inoculación en campo con el patógeno.

Palabras clave: análisis discriminantes, clones irradiados, selección

T4.15 Production of marker-free transgenic banana with improved tolerance to Black Sigatoka disease

Borys Chong-Pérez^{1,2}, Maritza Reyes¹, Luis Rojas¹, Bárbara Ocaña¹, Mayra Acosta¹, Michel Leiva-Mora¹, Rafael G. Kosky¹, and Geert Angenon². *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. e-mail: boris@ibp.co.cu

²Laboratory of Plant Genetics, Institute for Molecular Biology and Biotechnology, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, B-1050 Brussels, Belgium.

Production of improved transgenic crops devoid of selectable marker genes remains challenging. In this study we generated marker-free transgenic banana cv. 'Grande Naine' (*Musa* AAA) constitutively expressing the tobacco osmotin gene *ap24*. Embryogenic cell suspensions were transformed with *Agrobacterium tumefaciens*, strain EHA105 harboring the vector pAthsp-AP24. This vector contains between two *loxP* sites in direct orientation the selectable marker gene cassette *pNos-hpt-tNos* and the *cre* recombinase gene driven by the heat shock promoter pHSP18.2 from *Arabidopsis thaliana*. After selection on hygromycin containing medium, primary transgenic somatic embryos were subjected to heat-shock and thereafter transferred to antibiotic-free regeneration medium. Molecular analyses of genomic DNA from regenerated plantlets confirmed the integration of *ap24* gene and the excision of the selectable marker and *cre* genes in 40% of the regenerants. Transgenic plants exhibited enhanced tolerance to *Mycosphaerella fijiensis* in an artificial inoculation assay under greenhouse conditions. From these results it could be concluded that the *Cre/lox* system can be used to produce marker-free disease-resistant transgenic banana plants.

Keywords: *Agrobacterium*; banana; *Cre-lox*; marker gene excision; *osmotin*; transgenic plant

T4.16 Efecto del estrés salino (NaCl) en la germinación y el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L in vitro

E. Mena^{*1}, M. Leiva-Mora¹, Edirisinghage Kasuni Dilhara Jayawardana², L.R. García¹, N. Veitía¹, I. Bermúdez-Caraballo¹, R. Collado, R. Cárdenas Ortiz³. *Autor para correspondencia.

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

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

³Planetary Science Laboratory. Department of Physics, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa importante consumida en el mundo. La salinidad induce pérdidas en la cosecha del frijol, principalmente en zonas áridas, semiáridas y no irrigadas. El objetivo de este estudio estuvo enfocado en determinar el efecto del estrés salino en la germinación de semillas y el crecimiento de plantas de *Phaseolus vulgaris*. Se utilizó como material vegetal el frijol común (color negro) 'ICA Pijao'. El estrés salino fue inducido mediante la aplicación de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM (-0.2, -0.4, -0.6, -0.8, -1.0 and -1.2 MPa respectivamente) y se empleó agua estéril como control. Las semillas de *Phaseolus vulgaris* germinaron a todas las concentraciones de NaCl excepto a 300 mM, pero la germinación se redujo significativamente a 200 y 250 mM. La longitud del tallo y la raíz de las plantas se redujeron bajo condiciones de salinidad en comparación con las plantas crecidas en agua estéril. De forma similar, el área foliar se redujo significativamente bajo condiciones de salinidad. Las variables evaluadas en este trabajo pueden proporcionar un nuevo criterio que respalde la selección *in vitro* de frijol común en los programas de propagación para encontrar genotipos resistentes a estrés salino.

Palabras clave: estrés abiótico, frijol común, salinidad, selección *in vitro*

Effect of salt stress (NaCl) in germination and growth of *Phaseolus vulgaris* L *in vitro*

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important food legume worldwide. Salinity induces losses in common bean yield, particularly in arid, semiarid and in non-irrigated areas. The objective of this study was focused on determining the effects of salt stress on seed germination and growth of plants of *Phaseolus vulgaris*. The common bean (black color) cv. 'ICA Pijao' was used as plant material, salt stress was induced by applying 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mM (-0.2, -0.4, -0.6, -0.8, -1.0 and -1.2 MPa respectively) and sterile water was used like control. Seeds of *Phaseolus vulgaris* germinated at all NaCl concentrations except at 300 mM but germination was already significantly reduced at 200 and 250 mM. Stem and root length of plants

were reduced under salt stress conditions in comparison with plants grown in sterile water. Similarly, foliar area was significantly reduced under salinity conditions. Parameters evaluated in this work may provide new criteria to support *in vitro* selection in common bean breeding programs to find salt stress resistance genotypes.

Key words: abiotic stress, bean, salinity, *in vitro* screening

T4.17 Sensibilidad al herbicida Glufosinato de amonio en diferentes materiales vegetales de *Phaseolus vulgaris* cv. 'CIAP 7247F'

Idalmis Bermúdez-Carabaloso*, Raúl Collado, Lourdes R. García, Novisel Veitia, Amanda Martirena, Damaris Torres, Carlos Romero. *Autor para correspondencia

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

El mejoramiento genético en *Phaseolus* mediante transformación genética requiere de un sistema de selección eficiente. Uno de los marcadores de selección utilizados es el gen *bar* de *Streptomyces hygrosopicus*, el cual codifica para la fosfinotricin acetil transferasa y confiere resistencia a la fosfinotricina y al Glufosinato de amonio. Estos son ingredientes activos en varios herbicidas comerciales como el Basta®, Finale® y Liberty®. La presente investigación tuvo como objetivo determinar la concentración mínima inhibitoria de Glufosinato de amonio (Finale®) sobre nudos cotiledonales, callos organogénicos, semillas germinadas *in vitro*, y plantas en casa de cultivo de frijol cv. 'CIAP 7247F'. Se utilizaron diferentes concentraciones de este herbicida en nudos cotiledonales (0, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40 y 0.50 mg l⁻¹), callos organogénicos (0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 y 0.60 mg l⁻¹), en semillas germinadas *in vitro* (0, 50, 60, 70, 80 mg l⁻¹) y fue aplicado al follaje de plantas en fase de aclimatización (0, 20.0, 30.0 y 40.0 mg l⁻¹). Se determinó que la concentración mínima inhibitoria en nudos cotiledonales fue 0.40 mg l⁻¹, en callos organogénicos de 0.50 mg l⁻¹, en semillas de 80 mg l⁻¹ y en plantas en fase de aclimatización de 30.0 mg l⁻¹ de Glufosinato de amonio. Los resultados demostraron que es posible utilizar este herbicida como agente selectivo en transformantes de frijol cv. 'CIAP 7247F' que porten el gen *bar*.

Palabras clave: agente selectivo, cultivo de tejidos, herbicida, transformación genética

Sensitivity to Glufosinate ammonium herbicide in different plant materials of *Phaseolus vulgaris* cv. 'CIAP 7247F'

Genetic breeding in *Phaseolus* by genetic transformation requires an efficient selection system. One of the selection markers most widely used is the bar gene from *Streptomyces hygrosopicus*, which encodes phosphinothricin acetyltransferase and confers resistance to phosphinothricin and glufosinate-ammonium. These are the active ingredients in several commercial herbicides such as BASTA®, Finale® and Liberty®. The present investigation was aimed to determine the minimum lethal concentration of glufosinate-ammonium (Finale®) in cotyledonary node, organogenic calli, seed *in vitro* germinate and plants grown in acclimatization phase of beans cv. 'CIAP 7247F'. Different concentrations of this herbicide were used in cotyledonary node (0, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40 y 0.50 mg l⁻¹), organogenic calli (0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 y 0.60 mg l⁻¹), and seed *in vitro* germinate (0, 50, 60, 70, 80 mg l⁻¹) and was applied to the foliage of plants in acclimatization phase (0, 20.0, 30.0 y 40.0 mg l⁻¹). Results showed that the minimum lethal concentration in cotyledonary nodes was 0.40 mg l⁻¹ glufosinate ammonium, in organogenic calli was 0.50 mg l⁻¹, seed *in vitro* germinate 80 mg l⁻¹ and in plants in acclimatization phase was 30.0 mg l⁻¹ of glufosinate ammonium. Results also demonstrated that the use of this herbicide as a selective agent of beans transformants cv. 'CIAP 7247' carrying the bar gene is possible.

Keywords: genetic transformation, herbicide, selective agent, tissue culture

T4.18 Respuesta de plantas *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) al estrés hídrico inducido con polietilenglicol

Leonardo J. Moreno-Bermúdez^{1*}, Rafael G. Kosky¹, Maritza Reyes¹, Catherine Mbabazi², Borys Chong-Pérez¹. *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: ljmoreno@ibp.co.cu

²Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Agronomía. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

Los plátanos y bananos se cultivan en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Están adaptados a buenas condiciones de

humedad, por lo que el déficit hídrico afecta su normal crecimiento y productividad. Las técnicas biotecnológicas permiten obtener nuevos genotipos que requieran de una menor cantidad de agua. Aprovechando las ventajas del cultivo *in vitro* se pueden seleccionar plantas tolerantes a la sequía, con el uso de agentes estresantes incorporados en los medios de cultivo. El objetivo del presente trabajo fue determinar la respuesta de plantas *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) al estrés hídrico inducido con polietilenglicol 6000. Se determinaron indicadores de estrés hídrico morfológicos (altura y número de brotes por planta), fisiológicos (contenido relativo de agua y contenido de clorofilas totales) y bioquímicos (contenido de prolina, malondialdehído y de hidrógeno) en plantas estresadas y no estresadas. En las plantas sometidas a estrés se evidenció una disminución en la altura y el número de brotes, y un aumento en el contenido de prolina y malondialdehído. Sin embargo, el contenido relativo de agua, de clorofilas totales y de peróxido de hidrógeno no se vio afectado por el estrés. Teniendo en cuenta estos resultados, el empleo del polietilenglicol como agente inductor de estrés hídrico, podría ser usado como método de selección de plantas *in vitro* de banano, mejoradas con el fin de lograr tolerancia al estrés hídrico.

Palabras clave: malondialdehído, prolina, selección, sequía

***In vitro* response of banana plants cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) to water stress induced with polyethyleneglycol**

Bananas and plantains are grown in tropical and subtropical regions of the world. These plants are adapted to humid condition; therefore water deficit affects their normal growth and productivity. Biotechnology techniques allow obtaining new genotypes which require a lower amount of water. Taking advantage of *in vitro* culture can be selected drought tolerant plants, with the use of stressors agents into the culture media. The aim of this work was to determine the response of *in vitro* banana plants cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) to water stress induced by polyethylene glycol. Morphological (height and shoots number per explant), physiological (water relative and total chlorophyll content) and biochemical (proline, malondialdehyde and hydrogen peroxide content) indicators of water stress were determined in stressed and unstressed plants. In stressed plants, a decrease in height and number of shoots per explant, and an increase in proline and malondialdehyde

content were observed. However, relative water, total chlorophyll and hydrogen peroxide content were not affected by stress. From these results, the polyethylene glycol could be used as water stress inducing agent for *in vitro* selection of banana plants, bred to achieve water stress tolerance.

Keywords: drought, malondialdehyde, proline, selection

T4.19 Formación de embriones somáticos a partir de semillas inmaduras en *Sorghum bicolor* L. Moench variedad 'CIAP 132-R'

Mayelín Rodríguez¹, Rafael G. Kosky¹, Silvio de Jesús Martínez², Mileydi Pons¹, Martha Pérez¹, Mariana La O.¹, Carlos Romero¹. *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: mayelin@ibp.co.cu

²Sede Universitaria Municipal de Camajuaní. Joaquín Paneca no. 62. Camajuaní. Villa Clara. Cuba.

A pesar de los avances obtenidos en la embriogénesis somática de *Sorghum bicolor* (L.) Moench los porcentajes de formación de callos con estructuras embriogénicas y regeneración de plantas son bajos y no cumplen las expectativas para los protocolos de regeneración de plantas. Es por ello que esta investigación tuvo como objetivo formar embriones somáticos a partir de callos obtenidos de semillas inmaduras en sorgo variedad 'CIAP 132-R'. Los resultados indican que con el empleo de diferentes concentraciones de 2,4-D fue posible formar callos a partir de las hojas cotiledonales de semillas inmaduras germinadas *in vitro*. Se observó una alta fenolización de los explantes para lo cual se añadió ácido ascórbico el que tuvo un efecto positivo en la reducción de la oxidación fenólica y en la formación de callos, ya que al añadir este antioxidante al medio de cultivo el 95% de los explantes formaron callos. La adición de auxina (2,4-D) y citoquinina (6-BAP) al medio de cultivo influyó sobre la formación de los embriones somáticos y solo en los tratamientos donde se combinaron estos reguladores del crecimiento se observaron los mejores resultados. Estos resultados permitieron la obtención de embriones somáticos en sorgo rojo variedad 'CIAP 132-R'.

Palabras clave: callos, 2,4-D, 6-BAP, embriogénesis somática, sorgo

T4.20 *In vitro* effect of water stress induced by PEG 6000 in germination and growth of *Phaseolus vulgaris* L

Michel Leiva-Mora^{1*}, Eilyn Mena Méndez¹, Edirisinghage Kasuni Dilhara Jayawardana², Lourdes R. García¹, N. Veitia¹, I. Bermúdez-Caraballosa¹, R. Collado, Rolando Cárdenas³. *Autor para correspondencia.

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

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

El desarrollo de cultivos más productivos bajo condiciones de sequía utilizando la biotecnología contribuirá a alcanzar un planeta más sostenible. El objetivo de este trabajo se concentró en determinar *in vitro*, los efectos del PEG 6000 en la germinación de semillas y en el crecimiento de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. bajo condiciones de estrés hídrico inducido. Semillas maduras de *Phaseolus vulgaris* (color negro) cv. 'ICA Pijao' se usaron como material vegetal. Ocho soluciones de PEG 6000 con diferentes valores del potencial osmótico se usaron como agentes inductores de sequía. El porcentaje de germinación, la longitud del tallo, longitud de la raíz y el área foliar fueron evaluadas en semillas y plantas sometidas a las condiciones de estrés hídrico. Las semillas embebidas de *Phaseolus vulgaris* cv. 'ICA Pijao' germinaron en todas las soluciones de PEG 6000, aunque en las soluciones de -0.330 y -0.407 MPa se redujo a la mitad. La longitud del tallo se redujo significativamente a partir de -0.407 MPa tanto a los tres y seis días de tener las plantas expuestas. La longitud de la raíz a los tres días fue más reducida en la solución de -0.407 MPa, mientras a los seis días la longitud de la raíz fue significativa tanto en las soluciones de -0.407 MPa y -0.330 MPa. El potencial osmótico de -0.407 MPa y -0.330 MPa redujo significativamente el área foliar, puesto que solo se observaron hojas en estado cotiledonal. Los programas de mejoramiento genético del frijol pueden utilizar estos resultados para establecer un agente selectivo uniforme como inductor del estrés hídrico *in vitro* y realizar selecciones más eficientes. Por otra parte la disponibilidad de parámetros fisiológicos asociados con el estrés hídrico asociados con la tolerancia a la sequía, pueden ayudar a encontrar nuevos cultivares de frijol con caracteres genéticos mejorados que los

hagan más útiles para lograr una agricultura más sostenible usando la biotecnología vegetal.

Palabras clave: Biotecnología vegetal, estrés abiótico, frijol, selección, sequía

The development of more productive crops under drought condition using plant biotechnology will contribute to reach a more sustainable planet. The aim of this work was focused to determine *in vitro* effects of PEG 6000 in germination of seeds and growth of plants of *Phaseolus vulgaris* L. under water stress induction. Matured seeds of *Phaseolus vulgaris* (black color) cv. 'ICA Pijao' were used as plant material. Eight solution of PEG 6000 with different osmotic potential were used as drought stressors. Germination percentage, stem length, root length and foliar area were evaluated in seeds and plants submitted to water stress conditions. Imbibed seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. 'ICA Pijao' germinated in all PEG- 6000 solution but it was reduced to half at -0.330 and -0.407 MPa osmotic potential. Stem length was significantly reduced at -0.407 MPa after 3 and 6 days in exposed plants. Root length after 3 days was more reduced in -0.407 MPa, while after 6 days reduction of root length was significant in -0.407 MPa and -0.330 MPa. Osmotic potential of -0.407 MPa and -0.330 MPa reduced more significantly foliar area because only cotyledonary stage was observed. Common bean breeding program using this results may overcome problems with control of water stress induction using *in vitro* condition. Otherwise, the availability of physiological parameters associated with drought tolerance might help to find new bean cultivars with genetically improved characters making them more suitable for a more sustainable planet using plant biotechnology.

Key words: abiotic stress, bean, drought, plant biotechnology selection

T4.21 Efecto de 2,4-D, 6-BAP y L-Prolina en la formación de embriones somáticos en sorgo variedad 'CIAP 132R'

Silvio Martínez Medina^{1,2*}, Rafael Gómez-Kosky¹, Raúl Collado López¹, Raúl Barbón Rodríguez¹, Mayelin Rodríguez¹, Marta Pérez¹, Luis Rojas, Luis Orlando Maroto⁴, Amanda Villoch⁴. *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: silvio@ibp.co.cu

²Filial Universitaria Municipal Camajuaní. Joaquín Páneca 62 A Entre Leoncia Vidal y Camilo Cienfuegos. Camajuaní. Villa Clara. Cuba. CP 52 500. e-mail: silviod@uclv.edu.cu

³Departamento de Biología. Facultad de ciencias Agropecuarias. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

Un protocolo eficiente de regeneración de plantas es requisito indispensable para desarrollar programas de mejoramiento mediante la transformación genética. El trabajo genético se realizó con el objetivo de formar embriones somáticos en sorgo cv. 'CIAP 132R' a partir de segmentos del cilindro central de las hojas enrolladas de brotes *in vitro*. Para la formación de callos se estudiaron diferentes concentraciones de 2,4-D. Tres concentraciones de ácido ascórbico fueron ensayadas para eliminar la oxidación fenólica. Para incrementar el porcentaje de formación de callos con estructuras embriogénicas se emplearon diferentes segmentos de brotes. Para la formación de embriones somáticos se adicionaron al medio de cultivo diferentes concentraciones de 2,4-D, 6-BAP y L-prolina. Se observaron dos tipos de callos; unos compactos con superficies lisa, friables, brillantes, de color amarilla, y otros blandos de coloración oscura y amarillo crema. El porcentaje de formación de callos se incrementó (67.5%), cuando se le adicionó al medio de cultivo de ácido ascórbico. Con ello se eliminó la oxidación fenólica en el medio de cultivo y en el explante. La frecuencia de formación de callos con estructuras embriogénicas aumento hasta un 95% con el empleo del segmento 1 como explante. El mayor número embriones somáticos por callo, se obtuvo en los medios de cultivo donde se redujeron las concentraciones de 2,4-D combinadas con 6-BAP y L-prolina como fuente de nitrógeno orgánico. La adición de L-prolina proporcionó mayor calidad de los embriones formados. Por vez primera, se logró la formación eficiente de embriones somáticos de sorgo a partir de segmentos de brotes *in vitro*.

Palabras clave: 2,4-D, brotes *in vitro*, callos, embriones somáticos, *Sorghum bicolor*

Effect of 2,4-D, 6-BAP and L-Prolina from somatic embryos formation in sorghum variety 'CIAP 132R'

An efficient protocol of plant regeneration is a prerequisite for developing breeding programs using genetic transformation. The work was

conducted to form somatic embryos in sorghum variety 'CIAP 132R' from segments of the central cylinder of the rolled leaves of *in vitro* shoots. For callus formation different concentrations of 2,4-D were studied. Three concentrations of ascorbic acid were tested to eliminate the phenolic oxidation. For increasing the percentage of callus formation with embryogenic structures, different segments of the shoots were used. Different concentrations of 2,4-D, 6-BAP, and L-proline were added to the culture medium for somatic embryos formation. Two types of calli, a compact with smooth, friable, bright yellow color surfaces, and other soft, dark colored and yellow cream were observed. The percentage of callus formation increased when of ascorbic acid was added to the culture medium. With this antioxidant phenolic oxidation was not observed in the culture medium and explants. The frequency of formation of callus with embryogenic structures increased up to 95% with the use of segment 1 as explant. The biggest number of somatic embryos per callus was obtained in the culture medium where 2,4-D concentrations were reduced, combined with 6-BAP and L-proline as nitrogen source. The addition of L-proline provided better quality of the formed embryos. For the first time, the efficient formation of somatic embryos of sorghum was obtained from segments of *in vitro* shoots.

keywords: 2,4-D, *in vitro* shoots, somatic embryos, *Sorghum bicolor*

T4.22 Efecto del sulfato de adenina en la formación de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'CIAP7247F' vía organogénesis indirecta

Amanda Martirena-Ramírez*, Novisel Veitia, Lourdes R García, Idalmis Bermúdez-Carballoso, Raúl Collado, Damaris Torres, Carlos Romero. *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: amanda @ibp.co.cu

El cultivo de tejido en frijol común constituye una herramienta en los programas de mejoramiento genético en la obtención de nuevas cultivares adaptados a condiciones de estrés biótico y abiótico. En el Instituto de Biotecnología de las Plantas se han desarrollado dos protocolos de regeneración de plantas, uno vía organogénesis directa y otro por la indirecta. Sin embargo, es necesario optimizarlos para aumentar el crecimiento y vigor de las plantas antes de ser

llevadas a casa de cultivo. De acuerdo con lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del sulfato de adenina en la regeneración de plantas a partir de callos de *P. vulgaris* cultivar 'CIAP 7247F'. Para ello, se adicionó al medio de cultivo de regeneración dos concentraciones tanto de sulfato de adenina como de adenina y un control para conformar un total de cinco tratamientos. Se cuantificó el número de brotes por tratamiento formados en el medio de cultivo de regeneración y en medio de cultivo de elongación se midió la altura de las plantas. Se determinó que el empleo de estos compuestos en el medio de cultivo incrementaron el número de brotes por callos. Con la adición de sulfato de adenina al medio de cultivo se lograron los mayores valores en el número de brotes así como la mayor altura de las plantas. En el presente trabajo se demostró que la adición de sulfato de adenina y la adenina estimularon la formación y elongación de brotes de frijol común del cultivar 'CIAP 7247F'.

Palabras clave: callos, cultivo de tejidos, frijol común, regeneración *in vitro*

Adenine sulfate effect on shoot formation of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'CIAP7247F' via indirect organogenesis

Tissue culture in common bean is a tool in breeding programs in the development of new cultivars adapted to biotic and abiotic stresses. At the Instituto de Biotecnología de las Plantas have developed two protocols of plant regeneration, one via direct organogenesis and another indirect organogenesis. However, it is necessary to optimize them to increase growth and vigor before being taken greenhouse. According to the above, the present study aimed to determine the effect of adenine sulfate on plant regeneration of callus of *P. vulgaris* cultivar 'CIAP 7247F'. To this, was added to the regeneration medium of two concentrations adenine sulfate both as a control adenine to form a total of five treatments. The number of shoots formed was quantified by treatment the regeneration culture medium and elongation medium plant height was measured. It was determined that the use of these compounds in the culture medium increased the number of shoots per callus. With the addition of adenine sulfate to the culture medium the highest values were achieved in the number of shoots and the increased plant height. In the present work it was shown that the addition of adenine sulfate and adenine stimulated the formation and elongation of shoots of common bean cultivar 'CIAP 7247F'.

Keywords: callus, tissue culture, *in vitro* regeneration, common bean

T4.23 Protocolo de regeneración de plantas vía organogénesis indirecta en *Phaseolus vulgaris* L.

Novisel Veitía*, Raúl Collado, Lourdes R García, Idalmis Bermúdez-Carabaloso, Amanda Martirena, Damaris Torres, Carlos Romero. *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: novisel@ibp.co.cu

La regeneración *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. ha sido una limitante dentro de los programas de mejoramiento genético mediante la transformación genética ya que los protocolos existentes son dependientes del genotipo, poco eficientes y reproducibles. Es por ello que el presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un protocolo para la regeneración de plantas vía organogénesis indirecta en *Phaseolus vulgaris* L. en el cultivar cubano 'CIAP 7247F'. Para la formación de callos se definió el tipo y edad del explante. Se estudiaron diferentes concentraciones del regulador del crecimiento para la multiplicación de los callos y la regeneración de plantas. El nudo cotiledonal con uno o dos cotiledones a partir de semillas frescas o almacenadas durante cuatro meses fueron las más efectivas para la formación de callos. El medio de cultivo con 0.04 mg l⁻¹ de TDZ fue óptimo para la proliferación de callos. La frecuencia de regeneración de brotes fue aproximadamente de 3.0 brotes por callo en un medio de cultivo que contenía 2.25 o 4.50 mg l⁻¹ de 6-BAP. Se aplicó el protocolo en los cultivares comerciales de frijol común 'BAT-93', 'BAT-304', 'BAT-482' e 'Ica Pijao' para evaluar el efecto del genotipo. Los brotes enraizados mostraron en la fase de aclimatización un desarrollo normal. Se demostró la reproducibilidad del protocolo en cuatro cultivares de frijol. Este protocolo se aplica en el protocolo de transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* desarrollado en el programa de granos del IBP.

Palabras clave: callos, frijol común, nudos cotiledonales, regeneración de brotes

Plant regeneration protocol via indirect organogenesis *Phaseolus vulgaris* L.

In vitro regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. has been a limiting factor in genetic improvement programs through genetic transformation as existing protocols are dependent on genotype, inefficient and reproducible. That is why, this work was to develop a protocol for plant regeneration via indirect organogenesis in *Phaseolus vulgaris* L. in Cuban cultivar 'CIAP 7247F'. Cotyledonary nodes, cotyledonary nodes with one cotyledon and cotyledonary nodes with two cotyledons dissected from the embryonic axis of three-day-old germinated seeds, were used as primary explants. Seeds of different age were used for callus induction. Different concentrations of thidiazuron (TDZ) and 6-benzylaminopurine (BAP) were assessed for callus proliferation and shoot regeneration. Five cultivars were tested to determine the effect of genotype. Cotyledonary nodes with one and two cotyledons from fresh and four-month-old seeds were the most effective explants for callus formation. Callus proliferation medium containing 0.04 mg l⁻¹ of TDZ was optimum for proliferation of calli. A shoot regeneration frequency of approximately 3.0 shoots per callus was obtained on medium supplemented with 2.25 or 4.50 mg l⁻¹ of BAP. The protocol was applied in the common bean cultivars 'BAT-93', 'BAT-304', 'BAT-482' and 'Ica Pijao' to evaluate the effect of genotype. The rooted shoots showed acclimatization phase a normal development. The reproducibility of the protocol was demonstrated in four bean cultivars. This protocol applies to the protocol via *Agrobacterium tumefaciens* genetic transformation developed in the IBP program grains.

Keywords: callus, common bean, cotyledonary nodes, shoot regeneration

T4.24 Expresión de una proteína de amaranto en frutos de tomate transgénico y evaluación de su potencial antihipertensivo

Gemán-Báez Lourdes Janeth, Reyes-Moreno Cuahtémoc, Milán-Carrillo Jorge, Valdez-Ortiz Angel*, Junio Flores Castaño. *Autor para correspondencia.

Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. De las Américas y Josefa Ortiz, s/n, Ciudad Universitaria, CP 80 010. Culiacán, Sinaloa. e-mail: angelvaldezortiz@yahoo.com.mx

La hipertensión arterial (HTA) es un problema de salud pública a nivel mundial debido a su alta prevalencia y por ser un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y renales. Debido a la

influencia de la alimentación en este tipo de padecimientos, el análisis y desarrollo de compuestos nutraceuticos en la prevención y tratamiento de HTA, ha atraído la atención en las últimas décadas. Expresar la subunidad ácida de la Amaranantina, conteniendo los biopéptidos antihipertensivos VY, en los frutos de plantas de tomate transgénico. Transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Análisis de la expresión y acumulación de la proteína recombinante en frutos transgénicos mediante inmunodotblot, SDS-PAGE y Western blot. Análisis del contenido de proteína total y perfil de aminoácidos en los frutos de transgénicos y determinación del valor de IC₅₀ mediante la cinética de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (I-ECA). La proteína recombinante se acumuló en el fruto en niveles del 12.71%, con respecto al contenido de proteína total. Se incrementó el contenido de proteína total (5-22%), de los frutos de tomate transgénicos comparado con los frutos wt. Para la línea de tomate transgénico de mayor expresión, se detectaron incrementos de aminoácidos esenciales Valina (31-40%), Tirosina (29-34%), Isoleucina (21-31%), Leucina (28-31%) y Fenilalanina (28-29%). Los hidrolizados proteínicos de frutos transgénicos mostraron actividades I-ECA con valores de IC₅₀ de 0.38 a 3.2 µgml⁻¹; siendo de 1.5 a 13 veces mejores que el correspondiente de frutos de wt (4.866 µgml⁻¹). El contenido de proteína total, y buen balance de aminoácidos esenciales, junto a los valores de inhibición de ECA, sugieren el empleo del fruto de tomate transgénico como alimento con elevada calidad nutricional y nutraceutica con potencial empleo en el tratamiento de HTA.

Palabras clave: amarantina, hipertensión, inhibición de ECA, tomate transgénico, Val-Tyr

Expression of an amaranth protein in transgenic tomato fruits and evaluation of its antihypertensive potential

Hypertension is a worldwide public-health challenge because of its high prevalence and concomitant risks of cardiovascular and kidney diseases. The influence of nutritive compounds on prevention and treatment of hypertension has attracted considerable attention over the last decade, so that, the development of nutraceutical compounds is very important. Express the acidic subunit of Amaranthin, containing antihypertensive biopeptides VY, in the fruit of transgenic tomato plants. Genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. Expression and accumulation

analysis of recombinant protein by immunodotblot, SDS-PAGE y Western blot. Total protein content and Amino acid analysis in transgenic tomato fruits and IC₅₀ determination by a kinetic of Angiotensin Converting Enzyme inhibition (ACE-I). Immunoblot analyses of total protein extracts indicated that the expressed recombinant protein was accumulated stably at levels up to 12.71% with respect to total protein content of the transgenic fruits. There was a remarkable increase in total protein content (5–22%) of transgenic tomato fruits compared to non-transformed ones. Specific increases of the essential amino acids valine (31-40%), tyrosine (29-34%), isoleucine (21-31%), leucine (28-31%) and phenylalanine (28-29%), were also detected in the transgenic line showing the highest expression of the recombinant protein. Protein hydrolysates from transgenic tomato fruits showed high *in vitro* ACE-I activities, with IC₅₀ values ranging from 0.38 to 3.2 µgml⁻¹; these values were 1.5 to 13 times lower than those of the protein extracts from non-transformed fruits (4.866 µgml⁻¹). The total protein content, and the good balance of essential amino acid, add to ACE inhibition values, suggest that transgenic tomato fruits could be used as functional food, with potential for prevention and treating of hypertension.

Key word: ACE inhibition, amarantin, hypertension, transgenic tomato, Val-Tyr

T4.25 Desarrollo de un nuevo diseño para la extracción y purificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) en productos biotecnológicos

Lázaro Núñez Cárdenas^{1*}, Dianelis Mondejar Álvarez¹, Alberto Villalobos Hernández¹, Anisley Gourriel Goicochea¹, Lianet Rodríguez Cabrera², Ivis Morán Bertot². e-mail: lanuca35@yahoo.com

¹Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos.

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Con el desarrollo de la biotecnología y mediante el uso de la ingeniería genética, se ha logrado la manipulación y transferencia de genes entre organismos vivos de diferentes especies. Uno de estos propósitos, está dirigido a mejorar la composición nutricional de los organismos genéticamente modificados respecto a su contraparte no transgénica en cuanto a su composición química, en términos de: carbohidratos, aceites y otras sustancias. Paralelo a este proceso y para garantizar la inocuidad y trazabilidad de los alimentos

obtenidos por medios biotecnológicos, se hace necesario la aplicación de diversos procedimientos y técnicas analíticas; que permitan determinar los eventos transgénicos, que han sido insertados en estos productos alimenticios. Estas son: el ensayo inmuno enzimático ligado a enzima (ELISA) que permite la detección de la nueva proteína expresada o, por evaluación del ADN recombinante; usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. En ambos casos es necesaria la extracción de la proteína y/o del ADN de interés con elevada pureza y calidad. En el presente trabajo se compara la calidad del ADN extraído de diferentes matrices, mediante el uso del kit comercial bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) y las nuevas soluciones químicas, diseñadas en nuestro laboratorio. Los resultados demuestran, que se obtienen concentraciones similares de ADN de calidad amplificable, en los métodos diseñados, respecto al método CTAB. Sin embargo, al realizar un análisis económico, se determinó que con la aplicación de uno de los nuevos diseños, se obtiene un ahorro económico del 48.3% solamente en costo de reactivos; equivalente a € 1.93 por cada 100 mg de muestra analizada.

Palabras clave: ADN, biotecnología, separación, OGM, transgénico

Develop of new methods to isolate deoxyribonucleic acid (DNA) from biotechnical products

Nowadays, with the application of Genetic Engineering and Biotechnology, it has been possible to carry out genes manipulation among organisms from different living species. Some goals of this new technology are focus to improve nutritional composition (in terms of protein quality, carbohydrates and oils/fats) of genetically modified organisms compared with their non transgenic counterpart. At the same time, to achieve the foods safety of these new products, obtained by biotechnological processes, it is necessary the development and application of several procedures and analytical techniques that allow us to detect gene modifications at the holder organisms. Some of these methods consist on detecting the new expressed protein in holder species using the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) or on the evaluation of the recombinant Deoxyribonucleic Acid (DNA) by Polymerase Chain Reaction, respectively. The second of these are increasingly used for the detection and quantification of DNA sequences associated with GMOs, allowing the traceability throughout the

supply chain. For these types of analysis, a minimum amount of intact DNA comprising the target gene is required. In the present work, we compared the quality of DNA extracted by different protocols based on new solutions made in our laboratory, with the commonly used cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-based method. The results showed that it is possible to obtain similar quantities of DNA isolated, by using two of the new methods, regarding the CTAB method. Besides, a budget analysis between CTAB and one of new developed methods shows an economic save of about 48.3 % (€ 1.93) per 100 mg of sample, in favor of the new technological design.

Keywords: DNA, biotechnology, isolation, GMO, transgenic

T4.26 Comparative analysis of receptor like kinases and receptor like proteins in *Arabidopsis* and tomato

Ermis Yanes-Paz^{1,2}, Gioser María Ramos-Echazabal³, Glay China⁴, Roney De Jonge, Orlando Borrás-Hidalgo⁵, Ramón Santos Bermúdez¹, Bart PHJ Thomma²*Autor para correspondencia.

¹Plant-Pathogen Interaction Laboratory, Bioplants Center. PO Box 69 450, Cuba.

²Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 1, 6 708 PB Wageningen, The Netherlands.

³Department of Animal and Human Biology, Faculty of Biology, Havana University, Havana 10 400, Cuba.

⁴Biomedical Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, PO Box 6162, Havana 10 600, Cuba.

⁵Laboratory of Plant Functional Genomics, Center for Genetic Engineering and Biotechnology. PO Box 6162, Havana, 10 600, Cuba.

All living organisms, including plants, utilize various classes of cell-surface receptors to sense signals from their extracellular environment. The extracellular leucine-rich repeat containing receptor-like kinases (eLRR-RLKs) and receptor-like proteins (eLRR-RLPs) are two major classes of such receptors. These receptors have been found to play roles in a variety of processes including development, defense, response to abiotic stress and control of flowering. In this study, we used a combination of iterative blast searches with protein domain analysis to identify all the eLRR-RLKs and eLRR-RLPs in the tomato genome. We also used a phylogeny-based approach to predict homologs in tomato of previously characterized proteins in *Arabidopsis*

and other species. To predict putative homologs in tomato of functionally characterized proteins from *Arabidopsis* or other species we followed the following criteria: (1) the characterized and the predicted homolog must be in the same phylogenetic clade and this must have a high bootstrap support. (2) there must be support from bidirectional BLAST (i.e. each is the other's top-scoring hit in BLAST search of its genome and (3) both proteins must have significant sequence identity (>30% overall identity). This procedure allowed us the identification of 37 putative homologs in tomato of previously characterized proteins in other species which provides a shortcut to the functional characterization of these proteins in tomato. We also analyzed the number of proteins in every RLK subfamily in tomato and compared it to *Arabidopsis*. We additionally analyzed the conservation of eLRR-RLKs and eLRR-RLPs between these species in relation to their functional category i.e. development, development and defense, general defense mechanisms or response to specific pathogens. Our analysis show that those eLRR-RLKs and eLRR-RLPs involved in development, in development and defense or in general defense mechanisms are more conserved between species than those involved in the response to specific pathogens.

Key words: phylogeny, RLK, RLP

Análisis comparativo de proteínas receptoras kinasas y proteínas tipo receptoras en *Arabidopsis* y tomate

Todos los organismos vivos, incluyendo a las plantas, utilizan varios tipos de receptores situados en la superficie de las células para sentir señales del ambiente extracelular. Los receptores tipo kinasas extracelulares que contienen dominios ricos en (eLRR-RLKs) y las proteínas tipo receptoras sin dominios quinasa (eLRR-RLPs) son las dos clases más importantes de esos receptores. Se ha demostrado que estos receptores juegan papeles importantes en el desarrollo, la defensa, la respuesta al estrés abiótico y el control de la floración. En este estudio se empleó una combinación de búsquedas BLAST iterativas con el análisis de la estructura de dominio de las proteínas para identificar todas las eLRR-RLKs and eLRR-RLPs presentes en el genoma de tomate. Además se empleó un enfoque basado en la filogenia para predecir homólogos en tomate de proteínas previamente caracterizadas en *Arabidopsis* y otras especies. Para predecir homólogos putativos en tomate de proteínas

previamente caracterizadas en *Arabidopsis* u otras especies se siguieron los siguientes criterios: (1) la proteína caracterizada y su probable homólogo debe estar en la misma rama del árbol y ésta debe tener un alto soporte de bootstrap. (2) Debe haber soporte para BLAST bidireccional. (i.e. cuando se hace un BLAST de la caracterizada contra el genoma de la no caracterizada, ésta es el mejor hit y viceversa. (3) ambas proteínas tiene alto porcentaje de similitud (>30% de identidad). Este procedimiento permitió la identificación de 37 homólogos putativos en tomate de proteínas previamente caracterizadas en otras especies lo que brinda un acceso directo a su caracterización funcional en tomate. También se analizó el número de proteínas de cada subfamilia de las RLK y se comparó con *Arabidopsis*. Adicionalmente analizamos la conservación de las eLRR-RLKs y las eLRR-RLPs entre estas especies en relación a su categoría funcional i.e. desarrollo, desarrollo y defensa, mecanismos generales de defensa, o respuesta a patógenos específicos. Nuestro análisis muestra que las eLRR-RLKs y las eLRR-RLPs involucradas en el desarrollo, en desarrollo y defensa o en mecanismos generales de defensa son más conservadas entre especies que aquellas involucradas en la defensa a patógenos específicos.

Palabras clave: filogenia, RLK, RLP

T4.27 Effects of abiotic stress on the expression of phenolics, aldehydes and chlorophylls in maize and common bean plantlets

Lourdes Yabor^{1*}, José Carlos Lorenzo^{1,*}, Arnaldo Trujillo¹, Bárbara Valle¹, Julia Martínez¹, Leyanes Díaz-López¹, Oscar Vicente², Jutta Papenbrock³, Richard Trethowan⁴. *Autor para correspondencia.

¹Laboratory for Plant Breeding, Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila 69 450, Cuba. e-mail: jclorenzo@bioplantitas.cu

²Institute of Plant Molecular and Cellular Biology (IBMCP), CPI, Building 8E, Polytechnic University of Valencia, Camino de Vera s/n. e-mail: ovicente@ibmcp.upv.es

³Institute of Botany, Leibniz University Hannover, Herrenhaeuser Str. 230419, Hannover, Germany. e-mail: Jutta.Papenbrock@botanik.uni-hannover.de

⁴Plant Breeding Institute, Faculty of Agriculture and Environment, The University of Sydney, Australia. e-mail: richard.trethowan@sydney.edu.au

Adverse environmental conditions limit crop yield and better understanding of plant response to stress will assist the development of more tolerant cultivars. Maize and common bean plantlets were evaluated under salinity, high temperature, drought and waterlogged conditions to identify biochemical markers which could be useful for rapid identification of putative stress tolerant plants. The levels of phenolics (free, cell wall-linked, total), aldehydes including malondialdehyde and chlorophylls (a, b, total) were measured on stressed plantlets. Only two indicators were statistically non-significant: chlorophyll b in maize plantlets stressed with sodium chloride and malondialdehyde content in drought stressed maize. The most remarkable effects of abiotic stresses can be summarized as follows: sodium chloride stress increased levels of free phenolics in maize plantlets and chlorophylls (a, b, total) in common bean. High temperature (40°C) elevated levels of chlorophylls (a, b, total) in maize but decreased chlorophylls (a, b, total) and free phenolics in common bean. In contrast, drought increased phenolics and decreased chlorophylls (a, b, total) in maize and increased chlorophyll pigments (a, b, total) in common bean. Waterlogging increased free phenolics and decreased chlorophylls (a, b, total) in maize whereas chlorophyll (a, total) increased in common bean. Free phenolics and chlorophylls, especially a, were the most responsive indicators to stress and can, therefore, be considered putative biochemical markers for abiotic stress tolerance in maize and common bean.

Keywords: *Phaseolus*, *Zea mays*, biochemical markers

T4.28 La aplicación de condiciones ambientales estresantes en plantas de piña *ex vitro* (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) definieron la fisiología del metabolismo CAM o C3: perfiles proteómicos y transcriptómicos asociados

Carlos Aragón*, P Pascual, J González, M Escalona, L Carvalho, S. Amancio. *Autor para correspondencia.

Laboratory for Plant Cell and Tissue Culture, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: eduardo@bioplasmas.cu

Universidade de Lisboa, DRAT, CBAA, ISA, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisbon, Portugal, e-mail: samport@isa.utl.pt

El cultivo de la piña es uno de los cultivos tropicales más representativos en el mercado

mundial. El uso de los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) en las fases iniciales de la propagación de la piña permite un buen control del crecimiento de las plantas, incrementa el coeficiente de multiplicación, disminuye el espacio, la energía y los requerimientos laborales para la micropropagación comercial de plantas de piña. Una vez que las plantas tienen la calidad necesaria y son transferidas de los BITs a la fase de aclimatización, presentan un metabolismo C3/CAM facultativo en los dos primeros meses dependiendo de las condiciones ambientales. Se implementaron dos condiciones ambientales inductoras de condiciones C3 ó CAM para las plantas procedentes de la micropropagación, condiciones que estuvieron determinadas por la luz y la humedad relativa (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (85%) y 260 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (50%)), respectivamente. Las plantas crecidas en condiciones CAM presentaron hojas, cutículas y tejidos hipodérmicos más gruesos. Se determinó además el perfil proteómico de diferentes proteínas, patrones enzimáticos y perfiles transcriptómicos. Cinco manchas diferenciales en las electroforesis bidimensionales fueron aisladas e identificadas, dos de ellas por primera vez en *Ananas Comosus* (OEE 1; OEE 2) y las otras tres correspondientes a pequeños fragmentos de la subunidad mayor de la RubisCO (LSU). Las enzimas PEPC y PEPCK se detectaron por técnicas de inmunoblot aplicadas a geles bidimensionales al final de ambos tratamientos en la fase *ex vitro* (C3/CAM) durante el periodo oscuro. Las isoenzimas SOD y CAT se identificaron por electroforesis y los niveles de transcritos de OEE 1 y CAT con las plantas de piña con metabolismo CAM. En publicaciones previas se demostró el metabolismo C3 y CAM de las plantas de piña bajo condiciones ambientales estresantes que propiciaron los respectivos metabolismos.

Palabras clave: CAM, metabolismo del carbón, OEE, estrés oxidativo, PEPC, PEPCK, RT-qPCR, RubisCO

Stressing environmental conditions applied on *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) define CAM or C3 physiology: proteomic and transcriptomic profiles

Pineapple is one of the most important tropical crops worldwide. The use of temporary immersion bioreactors (TIB) for the first stages of pineapple propagation enables precise control of plant growth, increases the rate of plant multiplication, decreases space, energy and labor requirements for pineapple plants in commercial

micropropagation. Once the plantlets are ready to be taken from the reactors, they are carefully acclimatized to natural environmental conditions, and a facultative C3/CAM metabolism in the first 2 months of growth is characteristic of pineapple plants, depending on environmental conditions. Micropropagated pineapple plants were subjected to C3 and CAM-inducing environmental conditions, determined by light intensity/relative humidity (respectively $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (85%) and $260 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (50%). Leaves of pineapple plants grown under CAM inducing conditions showed higher leaf thickness and more developed cuticles and hypodermic tissue. Proteomic profiles of several proteins, isoenzyme patterns and transcriptomic profiles were also measured. Five major spots were isolated and identified, two of them for the first time in *Ananas comosus* (OEE 1; OEE 2) and the other three corresponding to small fragments of the large subunit of Rubisco (LSU). PEPC and PEPCK were also detected by immunoblotting of 2DE at the end of both *ex vitro* treatments (C3/CAM) during the dark period. Isoenzymes of SOD and CAT were identified by electrophoresis and the transcript levels of OEE 1 and CAT were associated with CAM metabolism in pineapple plants. In previous report was demonstrated a C3 and CAM metabolism under *ex vitro* environmental inducing conditions.

Keywords: CAM, Carbon metabolism, OEE, Oxidative stress, PEPC, PEPCK, RT-qPCR, Rubisco

T4.29 Teoría cuantitativa de la habitabilidad aplicada a la biotecnología vegetal

¹Rolando Cárdenas*, ¹Dailé Avila-Alonso, ²Michel Leiva-Mora, ²Eilyn Mena Méndez. *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Ciencia Planetaria, Dpto. Física, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km. 5, Santa Clara, Cuba. rcardenas@uclv.edu.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km. 5, Santa Clara, Cuba. michel@ibp.co.cu; eilyn@ibp.co.cu

La predicción de la productividad biológica en diversos entornos naturales es un área de la ciencia relativamente joven, especialmente cuando se trata de vincular a una cadena productiva. Con base en la Teoría Cuantitativa de la Habitabilidad, se presenta una propuesta de índice de habitabilidad lo más general posible,

que permite pronosticar la productividad primaria neta de las plantas durante diversas etapas de su vida. Este índice incluye seis funciones de variables ambientales y tiene potencial para ser aplicado a entornos artificiales (ecosistema *in vitro*). Se presenta un caso de estudio preliminar relacionado con la optimización en la selección de variedades de frijol resistentes ante los estreses hídrico y salino.

Palabras clave: estrés hídrico y salino, índice de habitabilidad, productividad primaria

T4.30 Use of the coefficient of variation to identify the most relevant effects of experimental treatments

José Carlos Lorenzo*, Lourdes Yabor. *Autor para correspondencia.

Laboratory for Plant Breeding, Bioplant Centre, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km 9.5, CP 69 450, Cuba. e-mail: jclorenzo@bioplantillas.cu

Most of agricultural experiments involve evaluation of multiple variables and sometimes it is difficult to identify the relevant effects of the experimental treatments. We believe the coefficient of variation could be an important tool to focus Result and Discussion sections only on the most important changes. The present short report is intended to exemplify the use of the coefficient of variation in a plant physiology experiment. The experimental data showed here deal with the effects of common bean plantlet exposure to high temperature under controlled conditions. Two temperatures (treatments) were compared: 28 and 40°C. Levels of phenolics (free, cell wall-linked, total), malondialdehyde, other aldehydes and chlorophylls (a, b, total) were determined at 9.3 hours of stress. Although t-tests revealed statistically significant differences between treatments in every single biochemical indicator evaluated, the overall coefficient of variation showed that the most remarkable effects of high temperature were recorded in free phenolics and chlorophylls (a, b, total). We therefore would suggest plant physiologists to focus their attention on these four biochemical indicators.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, abiotic stress, biochemical markers, biostatistics, OCV

T4.31 Physiological and morphological effects of sodium chloride, high temperature, lack of irrigation and flooding on maize and common bean plantlets under controlled conditions

Arnaldo Trujillo¹, Orleans González¹, Ricardo Valdés¹, Bárbara Valle¹, Julia Martínez¹, Leyanes Díaz-López¹, Lourdes Yabor¹, José Carlos Lorenzo¹. *Autor para correspondencia.

Laboratory for Plant Breeding, Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila 69 450, Cuba. e-mail: jclorenzo@bioplantitas.cu

Adverse environmental conditions limit crop yield and better understanding of plant response to stress will assist the development of more tolerant cultivars. We are focused on maize and common bean performances under salinity, high temperature, drought and flooding conditions. The objective in this work was to investigate physiological and morphological mechanisms which could be useful for rapid identification of putative stress tolerant plants. The experiment consisted of five treatments with different concentrations of NaCl in the irrigation water: 0 (control), 200, 400, 600 and 800 mM. Heat stress treatments were applied by exposing the plantlets to 40°C for 12 hours. Finally, to assess the effect of flooding the pots were immersed into 350 ml water for additional 10 days, and survival rates were determined every 24 hours during this period. Sap pH; plant fresh mass; stem weight, leaf weight and root weight ratios; and stoma characteristics were measured. Potential stress markers were identified.

Keywords: abiotic stress, genetic improvement, *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*

T4.32 Efectos de la salinidad en productividad y calidad interna del Chile Piquín (*Capsicum annum* var *Glabriusculum*)

Vaingerl Iván*, Valiente B. Juan I. *Autor para correspondencia.

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Centro de Agrobiotecnología, Monterrey, NL., 64 849, México. e-mail: ivanvaingerl@gmail.com

La salinidad de los suelos es el resultado de procesos naturales y/o antrópicos que conducen a la acumulación de sales afectando fertilidad y producción de cultivos. El Chile piquín es una especie semidomesticada altamente apreciada en el noreste de México, cuyos suelos son susceptibles a la salinización. Aun y cuando no existen reportes completos relacionados con los efectos de salinidad sobre chile piquín, se supone que elevadas concentraciones limitarían su desarrollo aunque en menor grado que otras especies del género *Capsicum*. El objetivo de este proyecto consistió en evaluar el efecto de diferentes concentraciones de sales en el agua

de riego sobre el desarrollo vegetativo, producción y calidad del chile piquín. Para realizar esta evaluación se aplicaron seis tratamientos con diferentes concentraciones salinas en el agua de riego y se evaluaron niveles fotosintéticos, productividad, biomasa y contenidos de capsaicinoides. Los resultados indican que mayor salinidad redujo la productividad y se aceleró la maduración de los frutos. La relación peso/número frutos fue similar en casi todos los tratamientos. El efecto sobre fotosíntesis tuvo mayor impacto en las plantas expuestas a salinidades mayores de 200 mM. En comparación con el testigo, el área foliar, el peso fresco y seco de la parte aérea mostraron diferencias significativas en todos los tratamientos. Se observaron diferencias significativas en peso fresco y seco de las raíces en salinidades mayores a 100 y 50 mM, respectivamente. La relación raíz:tallo fue afectada entre el testigo y la mayor concentración. El contenido de capsaicinoides no presentó diferencias significativas en la primera cosecha y sólo se observaron diferencias en frutos verdes de la segunda cosecha posiblemente debido a la acumulación de sales en el tejido. El desarrollo del chile piquín se afecta a medida que la salinidad aumenta. La producción disminuye a partir de concentraciones >200 mM, sin afectar capsaicinoides.

Palabras clave: *Capsicum*, salinidad, producción, fotosíntesis

OTRAS TEMÁTICAS / Others thematic

T5.1 Standardization of production process bioethanol from the evaluation of different substrates (waste banana and mango) and its relation to the number and percentage of produce ethanol

Melissa Del Castillo Cabrales, Carlos Domínguez Pallares. *Autor para correspondencia.

Departamento de investigación: Grupo de investigación en desarrollo empresarial (GIDE). Universidad libre de Barranquilla. e-mail: mdelcastillo@unilibrebaq.edu.co, e-mail: carlosjosedominguezp@gmail.com

The production of ethanol from raw materials has gained popularity mainly because it is used as raw material in various industrial processes, or directly as a fuel. For this reason, we conducted the adequacy of the bioethanol plant in the

laboratory of the University with the following equipment shown in figure: The industrial kitchen and the evaporator tank industrial kitchen used to vaporize the liquid and remove heat from the product; the distillation column attached to the wall and connected to the evaporator tank through a conduit is used to separate, by heat, various liquid components of a mixture (ethanol/water). The vapor emerging from the top stage of the rectification section is condensed by the condenser also fixed to the wall and connected to the distillation column through a conduit. At the bottom of the condenser a container receiver of the distillate was observed, clearing and drainage of water takes place in the blue tank, the cooling pump is green next to the tank and connecting pipes that connect to the radiator, it is used as cooling water system. We used 9 samples of each of the substrates so as to handle banana, where the proportion of the alcohol obtained according to the time and temperature utilized filling is determined. In turn, the use of bioethanol produced in this laboratory would reduce emissions of carbon dioxide emitted by the vehicle fleet.

Key words: Alcohol, bioethanol, laboratory, product, waste

Estandarización del proceso de producción de bioetanol a partir de la evaluación de los diferentes sustratos (residuos de mango y banano) y su relación con la cantidad y porcentaje de etanol producido

La producción de etanol a partir de materias primas ha ganado popularidad principalmente porque se utiliza como materia prima en diversos procesos industriales, o directamente como combustible. Por esta razón, se realizó la adecuación de la planta de bioetanol en el laboratorio de la Universidad con el siguiente equipo se muestra en la figura: La cocina industrial y el tanque evaporador de la cocina industrial utilizado para vaporizar el líquido y eliminar el calor del producto, la columna de destilación unido a la pared y conectado al tanque evaporador a través de un conducto que se utiliza para separar por calor los diversos componentes líquidos de una mezcla (etanol/agua). El vapor que sale de la tapa superior de la sección de rectificación es condensado por el condensador también fijado a la pared y conectado a la columna de destilación a través de un conducto. En la parte inferior del condensador se observó un recipiente receptor del destilado, de compensación y de drenaje de agua que se lleva a cabo en el tanque de azul, la

bomba de refrigeración al lado del tanque y las tuberías de conexión que conectan al radiador son de color verde y se utilizan como refrigeración para el sistema de agua. Se utilizaron 9 muestras de cada uno de los sustratos con el fin de manejar de plátano, donde se determina la proporción del alcohol obtenido de acuerdo con el tiempo y la temperatura utilizada de llenado. A su vez, el uso del bioetanol producido en este laboratorio reduciría las emisiones de dióxido de carbono emitidas por la flota de vehículos.

Palabras clave: Alcohol, bioetanol, laboratorio, producto, residuo

T5.2 Principales afectaciones del cultivo de la papa ante los efectos del cambio climático en Cuba

Juan G Castillo Hernández^{1*}, Francisco Soto Carreño¹, Jorge Luis Salomón Díaz¹, Aymara Pérez¹, Jorge Luis Román Quesada². *Autor para correspondencia.

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas

²Ministerio de la Agricultura

El cultivo de la papa es uno de los más afectados por los cambios del clima que se están produciendo desde hace ya bastante tiempo. Unido a ello, el incremento del precio de la semilla importada y del paquete tecnológico, han producido una disminución sensible en las áreas a plantar en el país en las últimas campañas. En la actualidad la producción de papa se concentra fundamentalmente en cuatro provincias del país donde existen condiciones ambientales adecuadas para obtener altos volúmenes de producción; sin embargo las afectaciones del clima continúan y se incrementan cada año y por tanto la disminución de los rendimientos. El objetivo de este trabajo está dirigido esencialmente a conocer cuales son las principales afectaciones que se producen en el cultivo de la papa, por los cambios del clima bajo las condiciones de producción y las medidas de adaptación ante las mismas. Los resultados son parte del informe realizado a nivel de país para la Segunda Comunicación sobre los efectos del Cambio Climático. Se exponen ejemplos de las afectaciones del clima a nivel nacional, en diferentes formas productivas y de manera particular se presenta el caso del sur de la antigua provincia La Habana, ahora Artemisa y Mayabeque, como caso típico de estos efectos. Se proponen medidas de adaptación para cada uno de los cambios que tienen mayor incidencia

a nivel productivo y medidas para reducir las vulnerabilidades.

Palabras clave: *Solanum tuberosum* L., medidas de adaptación

T5.3 Efecto del ácido abscísico y el manitol en el crecimiento mínimo en cultivares de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam)

Aymé Rayas*, Jorge López, Víctor Medero, Milagros Basail, Yoel Beovides, Arletys Santos, Yenisey Gutiérrez, Valentina Gutiérrez, Marilín Martínez, Marisel Bauta. *Autor para correspondencia. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Finca 'Tres Carolinas', Apdo. 6, Santo Domingo CP 53 000, Villa Clara. e-mail: conserv.biotec@inivit.cu

La biotecnología brinda grandes posibilidades para el manejo y utilización de los recursos genéticos de plantas, facilita la colección, introducción, conservación *in vitro*, multiplicación, caracterización y distribución del germoplasma; además de incrementar la disponibilidad de variabilidad genética necesaria en el fitomejoramiento. Se han realizado estudios anteriores de medios de cultivo pero la mayoría de las accesiones no disminuyen su crecimiento al utilizar los medios de cultivo recomendados por lo que ha sido necesario continuar las investigaciones al respecto. Con el objetivo de determinar la composición de medio de cultivo que permita las condiciones de crecimiento mínimo para la conservación a mediano plazo del germoplasma de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), se realizó el presente trabajo. Se estudiaron diez tratamientos que consistieron en combinaciones de las concentraciones de Acido Abscísico y Manitol, incluyendo un testigo con medio de cultivo Basal y el medio de cultivo utilizado actualmente. En los dos clones estudiados se obtuvieron los mejores resultados de sobrevivencia, disminución del crecimiento y hojas verdes y pequeñas en los tratamientos que contienen el medio de cultivo basal con Manitol (10, 15 y 20 mg l⁻¹), los medios de cultivo que contienen Acido abscísico no permitieron crecimiento del explante, por lo que se recomienda extender al resto de las accesiones de la colección el uso del medio de cultivo con 15 mg l⁻¹ de Manitol, donde se apreció el menor número de hojas secas y las características típicas requeridas en el crecimiento mínimo.

Palabras clave: cultivo de tejidos, conservación *in vitro*

Influence of abscisic acid and mannitol in the minimal growth in potato cultivars (*Ipomoea batatas* (L.) Lam)

Biotechnology offers great possibilities for the management and use of plant genetic resources, facilitates the collection, introduction, *in vitro* conservation, multiplication, germplasm characterization and distribution in addition to increasing the availability of necessary genetic variability in plant breeding. There have been previous studies of culture media but most accessions do not reduce their growth by using culture media recommended by what has been necessary to continue the investigations. In order to determine the composition of the culture medium that allows minimal growth conditions for medium-term conservation of germplasm of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), this study was conducted. Ten treatments which consisted of combinations of concentrations of abscisic acid and mannitol were studied, including a control with Basal Medium and the medium currently used. In the two clones studied the best results for survival, reduced growth and green and small leaves in treatments containing basal medium with mannitol (10, 15 and 20 mg l⁻¹) were obtained, the culture media containing abscisic acid did not allow growth of the explant, so it is recommended to extend to the rest of the accessions in the collection using the culture medium with 15 mg l⁻¹ of Mannitol, where fewer leaves and appreciated features typical minimum required in the growth.

Keywords: tissue culture, *in vitro* conservation

T5.4 Efecto de reguladores de crecimiento en la germinación de semillas conservadas de *Clitoria ternatea*

Maribel Quintana^{1*}, Amelia Capote², JA Nápoles¹, Orquidia Álvarez¹, Yamilka Ramos¹, C Bécquer¹, Yaldreisy Galdo¹. *Autor para correspondencia.

¹UCTB Pastos y Forrajes Sancti Spíritus. Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes. Carretera Central km 395, Sancti Spíritus, Cuba. CP 60 100. e-mail: pastosp@yayabo.inf.cu

²Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical 'Alejandro de Humboldt'. Calle 188 No. 38 754 e/ 397 y Lindero, Santiago de las Vegas, Boteros, La Habana, Cuba. e-mail: dircientifica@inifat.co.cu

Pérdidas en la viabilidad de semillas conservadas por más de 15 años en el banco de germoplasma de leguminosas forrajeras del Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes motivaron la

realización del presente trabajo, cuyo objetivo fue: aplicar estímulos a la germinación de dichas simientes a través de reguladores de crecimiento vegetal (AG₃: ácido giberélico y ANA: ácido naftalen acético) y la incidencia de luz, para recuperar la utilidad de las mismas. Se midió el porcentaje de germinación total (PGT) y su transformación angular. Se calculó: días hasta el 50% del PGT (G₅₀) y días entre el 10 y 90% del PGT (G₁₀₋₉₀). A los 21 días se evaluaron caracteres morfológicos de las plantas germinadas. El diseño fue completamente aleatorizado con cuatro replicas, se utilizó análisis de varianza bifactorial para comprobar el efecto de la combinación de reguladores de crecimiento y la variación en la incidencia de luz. Las dosis de reguladores de crecimiento mostraron diferencias significativas respecto al control, potenciando las variables relacionadas con la germinación de las semillas. Se logró una tasa de crecimiento adecuada y no hubo diferencias en cuanto a la sincronía de la emergencia de la semilla. Todo lo anterior permite brindar leguminosas promisorias que puedan elevar la oferta alimenticia a la esfera ganadera de nuestro país.

Palabras clave: leguminosa, fitohormonas, banco de germoplasma

T5.5 Morphological and molecular based diversity studies of some cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm in Cuba

Yoel Beovides García^{1*}, Orlando Coto Arbelo,² Rosa Acosta,³ Marilys Milián Jiménez¹, Daniel Rodríguez Pérez¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Sto. Domingo, V. C, Cuba. e-mail: biomol.biotec@inivit.cu

²Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical (IIFT), La Habana, Cuba.

³Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important food crop in Cuba as in many tropical countries in South America, Africa and Asia. Cuba has a wide cassava germplasm collection held at 'Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales' (INIVIT). However, it is very little studied, that which is important to promote their accessions' use and correct conservation. The current study therefore investigated genetic diversity among some Cuban accessions from the germplasm collection. Genetic diversity of 50 cassava accessions was determined using 39

morphological and agronomical descriptors, and 36 microsatellite (SSR) primer pairs. As a result of morph-agronomic characterization, two cultivars with high yield potential and desirable traits for growers were identified: 'CPA Victoria de Girón' (39.4 t.ha⁻¹) and 'Crema-1' (34.0 t.ha⁻¹). Other cultivars with acceptable yield and high dry matter content (DM) were also observed: 'Yema de Huevo' (45.84% DM) and 'Clon-14' (43.98% DM). Thirty four SSR markers were used for the genetic diversity study based on their higher polymorphism. The Cuban cultivars showed a high average allele number per loci with 5.8 and 100% of the loci were polymorphic. The average proportion of individual heterozygosity observed (H_o) was high (0.6016). Genetic differentiation was also high and seventeen unique alleles with low frequency were found in Cuban cultivars. Both, morphological descriptors and SSRs markers were able to distinguish all cultivars as different accessions but the wider genetic diversity was observed using SSR markers. The results provide the first molecular characterization of Cuban cassava genotypes and showed a wide diversity among landraces from Cuba. Application of this valuable information can be used for genetic diversity conservation and genotype identification studies for the genetic improvement program of cassava.

Key words: Cassava germplasm, SSR markers, morphological descriptors, genetic diversity

T5.6 Conservación *in vitro* y caracterización anatómico foliar de germoplasma de cafeto (*Coffea arabica* L.)

María Esther González^{1*}, Yanelis Castilla¹, José Ángel Lacerra², Merardo Ferrer². Autor para correspondencia.

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Carretera San José-Tapaste Km 3.5 San José de Las Lajas. Mayabeque. e-mail: esther@inca.edu.cu

El café, rubro de significación para la nación cubana es de los productos que requieren incrementos en su productividad y rendimiento, por ello la importancia de preservar el germoplasma de *Coffea* sp. actualmente disponible y de acometer acciones para su caracterización. El trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la sacarosa, manitol y sorbitol como fuentes de carbono y reguladores osmóticos, así como el efecto del ácido abscísico, como regulador de crecimiento durante la conservación *in vitro* de germoplasma de cafeto. Para ello se utilizó como material vegetal, yemas apicales de plantas de 24 meses

de edad del banco de germoplasma *in vivo* del cultivo, en áreas del Departamento de Genética y Mejoramiento de Plantas del INCA. Se desarrollaron cuatro experimentos para lo cual se emplearon brotes procedentes del tercer subcultivo de los genotipos T-8660 y T-9036-21 de *Coffea arabica* L., durante el proceso de multiplicación *in vitro*. Se obtuvo efecto positivo sobre la viabilidad de los explantes sometidos al proceso de conservación *in vitro*, al utilizar la sacarosa como fuente de carbono y regulador osmótico. Se logró mantener a los explantes en crecimiento mínimo por un período de 18 meses con el empleo de 0.5 mg l⁻¹ de ácido abscísico. Se demostró que los brotes permanecieron viables, sin necesidad de ser subcultivados, por un período de un año y medio con el empleo de 0.5 mg l⁻¹ de ácido abscísico, 15 mg l⁻¹ de sacarosa y reducción de la temperatura a 22°C. Los estudios anatómicos foliar no mostraron cambios en las propiedades anatómicas y morfológicas de los explantes conservados.

Palabras clave: café, ácido abscísico, conservación

***In vitro* conservation and anatomical characterization of coffee germplasm (*Coffea arabica* L.)**

The objective of this paper was to evaluate the effect sucrose, sorbitol and manitol, as carbon source and osmotic regulator, and of abscisic acid, as growth regulator, on *in vitro* germplasm conservation of coffee. Stem tips of 24 month old plants collected from the coffee germplasm bank of the Department of Genetics and Improvement of plants the INCA were introduced *in vitro* and secondary shoots were produced in a multiplication medium. New shoots of T-8660 and T-9036-21 genotypes of *Coffea arabica* L. collected after third subcultures were used in the conservation experiments. There was a positive effect of the sucrose as an osmotic regulator and carbon source in maintaining the viability of the explants cultured *in vitro*. Was demonstrated that the Abscisic acid (0.5 mg l⁻¹) was essential to maintain the explants in a reduced growth condition for 78 weeks without subculture. The explants of the two genotypes promptly returned to normal growth *in vitro* or were efficiently acclimatized after 78 weeks of conservation, in the medium with 0.5 mg l⁻¹ of abscisic acid, 15 g l⁻¹ of sucrose at 22°C. The anatomical studies didn't show changes in the anatomical and morphological properties of the conserved explants.

Key words: coffee, abscisic acid, conservation

T5.7 Biochemical changes produced in maize, common bean and soybean seeds after different times of exposure to liquid nitrogen

Orleans González^{2*}, Melissa Arguedas¹, Aurora Pérez², Ana Abdelnour¹, Martha Hernández², Florent Engelman³, Marcos Edel Martínez², Lourdes Yabor², José Carlos Lorenzo². *Autor para correspondencia.

¹Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

²Laboratory for Plant Breeding, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila 69 450, Cuba. e-mail: jclorenzo@bioplasmas.cu

³IRD, UMR DIADE, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France. e-mail: florent.engelmann@ird.fr

In this work, we studied the effects of short-term liquid nitrogen storage of maize, common bean and soybean seeds on their germination, electrolyte leakage, levels of chlorophylls (a, b, total), phenolics (free, cell wall-linked, total), malondialdehyde, other aldehydes, proteins and peroxidase activity. After storage in liquid nitrogen for different time periods (0, 7, 14, 21, 28 days), seeds were retrieved from liquid nitrogen, some were set to germinate and others were analyzed biochemically. No phenotypic changes were observed visually in seedlings recovered from different treatments 5 days after onset of germination. However, several significant effects of seed cryopreservation were recorded at the biochemical level. In maize seeds, reasonable tendencies could not be observed. In common bean seeds, statistically significant changes were observed mainly in the electrolyte leakage and in the levels of chlorophyll pigments and free phenolics. Electrolyte leakage increased along with the time of common bean seed exposure to LN; content of chlorophyll a decreased at 21 and 28 days; chlorophyll b and total chlorophyll levels increased to 14 days and then decreased; and content of free phenolics increased to 21 days and decreased at 28 days. In soybean seeds, a reasonable tendency was only observed in the electrolyte leakage that increased along with the time of exposure to LN. The integral analysis of the results with the use of the Euclidean distance to the control treatment (0 d in LN) showed that common bean and soybean seeds exposed to LN were more susceptible than maize seeds. The effects of LN exposure is significantly higher when the time of exposure reached 28 days. In conclusion, we have shown for the first time that immersion of maize, common bean and soybean

seeds in LN during different periods of time (0-28 days) modified the levels of different biochemicals, indicating that some aging can have occurred beyond the physiological point at which seeds were placed in cryostorage. Further studies are required to clarify the mechanisms underlying the changes recorded here.

Keywords: *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, cryostorage, phenotypic variation

T5.8 ISSR based molecular phylogeny of Sorghum cultivars grown in Saudi Arabia

Mohammed Basahi^{1*}, Turki A Al-Turki². *Autor para correspondencia.

¹Biology Department, college of Science and Arts Qelwah, Al-Baha University, Saudi Arabia. e-mail mbasahi@hotmail.com

²Natural Resource and Environmental Research Institute, King Abdulaziz City for Science and Technology, Saudi Arabia.

Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis was performed to determine phylogenetic relationships and genetic diversity among the 15 different genotypes of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench; $2n = 2x = 20$) grown in Al-Ahsa region of Saudi Arabia. A screening of 20 ISSR primers with di- and tri- nucleotide repeats helped in the selection of 7 ISSR primers that gave polymorphic and informatics profile patterns. The primers with dinucleotide repeats of (AG or GA) gave more polymorphic bands indicating their efficiency in ISSR analysis. A total of 669 DNA fragments were amplified with an average of 11 polymorphic ISSR markers per primer. ISSR primers 4, 6, and 7 produced the highest percentage of polymorphic fragments (100%). All the seven selected primers produced more than 67% polymorphic fragments except SSR 1 (16.66%). Phylogenetic analysis revealed two main clusters of the 15 genotypes used in the present study. Cluster A consisted of five genotypes i.e. 1, 2, 7, 66, and 113 with a similarity coefficient range from 0.818 to 0.527. The genotypes 1 and 2 showed highest similarity of 0.818 among the rest of the genotypes. Cluster B consisted of 10 genotypes and were divided into three sub-clusters (I, II, and III). Sub-cluster I comprised of four genotypes (Code # 8, 129, 197 and 217) with a 0.781–0.563 Nei and Li's similarity range. In this sub-cluster the genotypes 129 and 197 showed maximum similarity value (0.781). Sub-cluster II consisted of three genotypes (Code # 243, 248 and 249) with a range of 0.800–0.454 similarity. One pair of genotypes in this sub-cluster i.e. 248 and 249

gave highest similarity value (0.800). Sub-cluster III consisted of only two genotypes i.e. 215 and 216 with a similarity range of 0.709–0.490. Cluster B also contained a lone genotype code # 242 with a similarity value ranging from 0.672 to 0.563. In the present communication the average similarity among all the 15 individuals was more than 50%. Our results indicate ISSR fingerprints to be powerful and efficient enough in the identification and resolution of genetic diversity between the genotypes of the sorghum varieties grown in Saudi Arabia. This will help in the collection and cataloguing of the germplasm in the form of a germplasm bank.

Key words: Inter-simple sequence repeats (ISSR), *Sorghum bicolor* (L.) Moench, Genetic diversity, phylogeny, DNA fingerprinting

T5.9 Standardization of an efficient method for the extraction of genomic DNA from leaves of strawberry

Argelys Kessel Domini*, María Margarita Hernández Espinosa, Yuniet Hernández Avera y Georvis Téllez Beltrán. *Autor para correspondencia.

National Institute of Agricultural Sciences. La Habana. CP 32 700. e-mail: argelys@inca.edu.cu

In fruit such as strawberry (*Fragaria ananasssa* Duch), the isolation of genomic DNA of sufficient quality for use in analysis of molecular markers based on PCR, has in many cases serious problems in the presence of inhibitors such as polysaccharides that inhibit DNA enzymatic processing or polyphenols inhibit PCR reactions. Two protocols for extraction and purification of DNA in different strawberry cultivars, the CTAB protocol, with modifications, in combination with the kit Core Spin were tested, allowed the obtaining a highly concentrated for different cultivars evaluated and then apply the technique Dialed Reverse Sequence Repeat (ISTR) to evaluate the molecular DNA polymorphism. The results obtained showed that this is a reliable method for the isolation of DNA from tropical fruits that are rich in polysaccharides, tannins and polyphenols.

Keywords: Strawberry, genomic DNA, PCR

Estandarización de una metodología eficiente para la extracción de ADN genómico a partir de hojas de fresa

En frutales como la fresa (*Fragaria ananasssa* Duch), el aislamiento del ADN genómico con suficiente calidad para ser usado en análisis de

marcadores moleculares basados en PCR, posee en muchas ocasiones serios problemas por la presencia de inhibidores, tales como los polisacáridos que inhiben el procesamiento enzimático del ADN o los polifenoles que inhiben las reacciones de la PCR. Se probaron dos protocolos de extracción y purificación de ADN en diferentes cultivares de fresa, el protocolo CTAB, con modificaciones, en combinación con el juego de reactivos Núcleo Spin, permitió la obtención de un ADN altamente concentrado para los diferentes cultivares evaluados y posteriormente aplicar la Técnica de Repetición de Secuencias Inversas Marcadas (ISTR) para evaluar el polimorfismo molecular. Los resultados obtenidos mostraron que este es un método confiable para el aislamiento de ADN de frutales tropicales que sean ricos en polisacáridos, taninos y polifenoles.

Palabra clave: Fresa, ADN genómico, PCR