



## **VII Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal**

**17-21 de abril de 2006**

### **RESÚMENES / ABSTRACTS**



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



# CONFERENCIAS

# **RIESGOS DE FLUJO GENETICO DEL MAIZ TRANSGENICO EN CRIOLLOS DE MEXICO: ESTUDIOS EN SISTEMAS TRADICIONALES**

José Ernesto Cervantes Martínez.

Universidad Autónoma de Tamaulipas. Unidad Académica multidisciplinaria Mante. Blvd. Enrique Cárdenas González # 1202 Pte. Tel. (831) 2-33-81-00. e-mail: [jecervan@uat.edu.mx](mailto:jecervan@uat.edu.mx), [jernes99@yahoo.com](mailto:jernes99@yahoo.com)

## **RESUMEN**

La biotecnología y los productos transgénicos recientemente han revolucionado la agricultura en los países desarrollados; sin embargo, representan riesgos biológicos importantes en las zonas de diversidad genética de especies vegetales debido a que pueden provocar efectos desconocidos. En el caso del maíz, las empresas transnacionales están tratando de introducir maíz a México y argumentan no riesgo para los maíces criollos. El presente estudio tuvo como fundamento conocer algunos factores importantes que influyen en el flujo genético entre maíces criollos en sistemas tradicionales. Se condujeron en Jalisco, México tres estudios: 1. Flujo genético entre parcelas de maíz usando marcadores moleculares; 2. Uso de mezclas de polen para determinar fecundación preferencial; y 3. Análisis de patrones isoenzimáticos para identificar flujo genético acumulado a través del tiempo. De ello se derivó que el flujo genético entre parcelas adyacentes de maíz ocurre en forma exponencial disminuyendo a 1.0% a los 30 m en condiciones normales, y a 2.7% en dirección del viento. Las polinizaciones con mezcla de polen indica que los maíces criollos prefieren al polen propio, aunque en algunos casos el polen extraño o de maíz mejorado logra también fecundar; según el estudio isoenzimático, el flujo genético se acumula lentamente a través del tiempo en las poblaciones cambiando su estructura genética a pesar de fuerzas ambientales y selección por el hombre. En conjunto, tales estudios indican que el flujo genético en maíz está presente a gran distancia y a través del tiempo en proporciones considerables, y no es posible por ahora determinar con exactitud los límites para evitarla; por tanto, la intención de introducir los maíces transgénicos a México para producción comercial debe posponerse hasta no disponer de información suficiente acerca de cómo evitar el flujo genético y determinar los efectos en los maíces criollos.

Palabras clave: criollos, flujo genético, maíz, transgénicos, sistemas tradicionales

## **GENEFLOW RISKS FROM TRANSGENIC CORN TOWARD MEXICAN LANDRACES: STUDIES IN TRADITIONAL SYSTEMS**

### **ABSTRACT**

Recently, biotechnology and transgenic products have been an important role of agriculture successful in developed countries; however, such as products are representing biological risks in regions where genetic diversity is important, because unknown genetic effects could be introduced to crop species. International companies want introduce transgenic corn into Mexico, and they ignore risk about gene flow toward landraces. This study had as object to know some important factors of gene flow among landraces in traditional systems. In Jalisco, Mexico were carried out three different studies: 1. Gene flow estimation among adjacent corn fields measured by molecular markers; 2. Pollen mixtures to determinate preferential pollination; 3. Isozyme analysis to identify gene flow accumulated across time. Studies suggest gene flow among adjacent corn fields occurs in exponential way decreasing until reach 1.0% at 30 m far from the source in normal conditions, and 2.7% on wind direction. Pollination by pollen mixtures showed that corn landraces prefer their own pollen, although in some cases they are pollinated by foreign pollen from modern bred corn; according to isozyme study, gene flow is accumulated slowly across the time changing genetic structure of corn landraces. Global results show that gene flow in corn occurs at long distance at higher level, and it is not possible by now determinate factors to avoid it. That is why, suggests given by companies to use transgenic corn are not appropriate to do it. So, is suggested that introduction of transgenic corn to Mexico must be postponed until enough information is available about gene flow and their risks toward land races.

Key words: Landraces, Gene flow, transgenic, traditional systems

---

# ROLE OF ABSCISIC ACID IN THE SUSCEPTIBLE INTERACTION OF TOMATO WITH NECROTROPHIC PATHOGENS

Asselbergh, B.<sup>2</sup>, Curvers K<sup>1</sup>., Soraya de Carvalho F<sup>2</sup>., Audenaert K<sup>2</sup>., Achuo E.A.<sup>2</sup>, van Breusegem F<sup>1</sup>. and Höfte, M.

<sup>1</sup>Plant Systems Biology, VIB – Ghent University, Belgium.

<sup>2</sup>Lab. Phytopathology, Dept. of Crop Protection, Ghent University, Gent, Belgium.

## ABSTRACT

The plant hormone abscisic acid (ABA) emerges as an important factor affecting disease tolerance in tomato. The ABA deficient sitiens mutant of tomato, blocked in aldehyde oxidase, the last step in the ABA biosynthetic pathway, is resistant to necrotrophic fungi such as *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* and to the necrotrophic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. Application of exogenous ABA during the development of the sitiens mutant restores the disease susceptibility to wild type levels, while a pulse ABA application shortly before infection only leads to partial susceptibility. Sitiens plants show an early oxidative burst with the production of hydrogen peroxide (after staining microscopically detectable after 8h, macroscopically detectable after 12h) after *B. cinerea* infection, while this burst is not present in the wild type. Application of ascorbate and catalase blocks this early oxidative burst and leads again to disease susceptibility. Tom1 tomato arrays were used to compare wild type and sitiens plants at 0 and 8 h after leaf infection with *B. cinerea*. After extensive statistical analysis 240 genes remained significant differentially induced as a result of *B. cinerea* infection. Our microarray data indicate that lysine metabolism and photorespiration in the peroxisomes are important in the early resistance response of tomato to *B. cinerea*. This mechanism is already activated 8 hours after infection, the time point at which *B. cinerea* attempts to penetrate the cell. We are currently testing the hypothesis that resistance in sitiens to *B. cinerea* can be explained by a very early induced pre-invasive defense mechanism in which peroxisomes and active oxygen species (AOS) play an important role. These AOS induce cell wall changes at the point of penetration. Basal ABA levels in wild type tomato appear to repress these defence mechanisms.

Key words: ABA biosynthetic pathway, *Botrytis cinerea*, *Erwinia chrysanthemi*, *Sclerotinia sclerotiorum*

# **SOME MOLECULAR TRAITS IN INCOMPATIBLE AND COMPATIBLE INTERACTIONS IN *PHASEOLUS VULGARIS*/COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM PATHOSYSTEMS**

Saúl Fraire-Velázquez

Biología Molecular de Plantas, Unidad Académica de Biología Experimental, Universidad Autónoma de Zacatecas, Av. Revolución S/N, CP 98600 Guadalupe, Zacatecas, México. e-mail: [sfraire@prodigy.net.mx](mailto:sfraire@prodigy.net.mx)

## **ABSTRACT**

Even the importance of common bean as worldwide crop legume and protein source in the nourishment for people in poor regions, and the great harvest losses because of diseases where the anthracnose is one of the more serious, scarce studies in molecular biology have been done in relation to plant defense response to pathogen. Genes as Phenylalanine amonialyase, Chalcone synthase and others, as well as combinations of cultivars/races of plant and pathogen respectively has been perhaps the more extensive studied. Our focus has been the molecular interaction between *Phaseolus vulgaris* and *Colletotrichum lindemuthianum* fungus, the causal agent of anthracnose, to identify plant defense genes of early response and susceptibility factors. We have searched the plant defense response by means of subtractive hybridization and other standard microscopy and molecular protocols (northern, Southern and reverse Southern blots). In results, five plant genes over-expressed in resistant plant reaction, moreover four genes induced in compatible pathosystem. Sequence characteristics of genes with high induction in resistant plant reaction align with calcium-binding proteins, SUMO, SINA and -glucosidase genes; that is, molecular processes of calcium signaling cascades, protein-tagging for subcellular localization/preservation of substrates, and enzymatic activities for salicylic acid biosynthesis or toward fungal wall components. Cultivar beans of Mesoamerican and Andean pools exhibit differential pattern expression for SUMO gene. The calcium-binding protein is also co-regulated by light/dark (day/night) normal transition, and together with SUMO differentially induced by several abiotic stresses. The genes induced in susceptible interaction align partially with genes of hypothetical or unknown proteins of plant or fungal origin. In conclusion, five genes early over-expressed in resistant reaction, one co-regulated by day/night transition, two induced also in abiotic stress, three possible biological functions, with some differences between Mesoamerican and Andean beans, and four genes of unknown function in susceptible interaction.

Key words: anthracnose, plant defense response, *Phaseolus vulgaris*, abiotic stress, susceptibility factors

## **ALGUNOS RASGOS MOLECULARES DE INTERACCIONES COMPATIBLE E INCOMPATIBLE EN PATOSISTEMAS DE *PHASEOLUS VULGARIS*/COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM**

Saúl Fraire-Velázquez

Biología Molecular de Plantas, Unidad Académica de Biología Experimental, Universidad Autónoma de Zacatecas, Av. Revolución S/N, CP 98600 Guadalupe, Zacatecas, México. e-mail: [sfraire@prodigy.net.mx](mailto:sfraire@prodigy.net.mx)

## **RESUMEN**

Aún dada la importancia del cultivo de frijol a nivel mundial y como fuente de proteína en la dieta para pueblos de regiones pobres, además las grandes pérdidas a causa de enfermedades como la antracnosis, pocos estudios en biología molecular se han realizado en la respuesta de defensa en planta ante el patógeno. Genes como Fenilalanina amonialiasa, Chalcona sintasa entre otros, así como combinaciones de variedades/razas de planta y patógeno respectivamente ha sido los más estudiados. Nuestro objetivo es el estudio de la interacción molecular entre *Phaseolus vulgaris* y el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* causante de la antracnosis, para identificar genes de defensa de

respuesta temprana en planta y genes de susceptibilidad. Se procedió mediante hibridación substractiva y protocolos estándares de microscopía y biología molecular (northern, Southern y Southern en reverso). En resultados, cinco genes de origen vegetal sobre-expresados en reacción de resistencia y cuatro en planta susceptible. Características de las secuencias de estos genes alinean con proteínas de unión a calcio, SUMO, SINA y  $\alpha$ -glucosidasa; esto es, procesos moleculares como cascadas de señalización vía calcio, marcaje de proteínas para localización subcelular o preservación, y actividad enzimática para biosíntesis de ácido salicílico o degradación de pared celular del hongo. La proteína de unión a calcio con expresión co-regulada por transición normal de luz/oscuridad (día/noche), y junto con SUMO, ambos inducidos diferencialmente por estrés abiótico. Frijoles Mesoamericanos y Andinos exhiben patrón de expresión diferencial del gen SUMO. Los genes inducidos en interacción de susceptibilidad alinean parcialmente con genes de proteínas desconocidas de origen vegetal o fúngico. En conclusión, cinco genes de sobre-expresión temprana en reacción de resistencia, uno co-regulado por transición día/noche, dos inducidos también en estrés abiótico, tres posibles funciones biológicas, con algunas diferencias entre frijoles Mesoamericanos y Andinos, y cuatro genes de función desconocida en interacción susceptible.

Palabras clave: antracnosis, respuesta de defensa, *Phaseolus vulgaris*, estrés abiótico, genes de susceptibilidad

# AMINO ACID METABOLISM AND NUTRITIONAL QUALITY IMPROVEMENT IN PLANTS

Geert Angenon\*, Eric Dewaele, Tuong Van Nguyen, Tran Thanh Thu. \*Autor para correspondencia.

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

## ABSTRACT

Plant derived food and feed is a major source of protein for humans and domestic animals; however the level of essential amino acids in plant-derived protein is usually inadequate with respect to dietary needs. The most limiting essential amino acids in crop plants are typically lysine, methionine and threonine, which are synthesized from aspartate through a branched pathway. We aim to understand the regulation of the aspartate pathway, using *Arabidopsis thaliana* as model plant, to study the differences in lysine and methionine biosynthesis in different plant species and to enhance the level of essential amino acids in crops. To better understand aspartate derived amino acid metabolism in *A. thaliana*, insertion mutants for genes encoding enzymes of the aspartate pathway are being analyzed. Preliminary evidence suggests the existence of novel regulatory mechanisms, which influence the interaction between the different branches of the aspartate pathway. A major difference between leguminous plants and non-legumes appears in the lysine branch of the aspartate pathway. The critical enzyme in lysine biosynthesis is dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) that, according to all studies up to now, is strongly feedback inhibited by lysine in plants. In the model legume *Medicago truncatula* however, we found evidence for the presence of two differentially expressed *dhdps* genes, one encoding a lysine sensitive and one encoding a lysine insensitive DHDPS. This may explain the rather high lysine content in seeds of leguminous plants. Finally we aim to enhance the accumulation of essential amino acids in edible parts of various crop plants including sorghum, potato, rice, and beans. This involves overexpression in these plants of genes encoding feedback insensitive forms of the key enzymes of the aspartate pathway and/or genes encoding lysine and methionine rich proteins.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, aspartate pathway, lysine, methionine



# TALLER BIOFÁBRICAS



# BIOFABRICAS PARA LA MICROPROPAGACION DE ESPECIES VEGETALES

Agramonte PD\*, Orellana PP, Suárez CM, María Adela Jiménez, Ignacio Santana Aguilar, Elio Jiménez González. José M Álvarez Acosta, Leyanis García Águila, Manuel de Feria Silva, Robin Triana Gutiérrez, Ramón Santos Bermúdez, Sergio Rodríguez. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara. Villa clara, Cuba CP 54830. e-mail: [agramonte@ibp.co.cu](mailto:agramonte@ibp.co.cu), [daniel\\_agramonte2002@yahoo.es](mailto:daniel_agramonte2002@yahoo.es)

## RESUMEN

Las innovaciones tecnológicas que dan origen a las Biofábricas, a través de su introducción y generalización en la práctica económica y social, son un símbolo de la aplicación de la Biotecnología Vegetal en el desarrollo agrícola y forestal de Cuba. La Biofábrica se constituye en una innovación tecnológica respecto a los sistemas tradicionales de producción de semilla. El análisis comparativo de variables entre los sistemas tradicionales de propagación y la producción en Biofábricas, confirma las ventajas que poseen estas últimas y su valor estratégico. Estas innovaciones tecnológicas se han desarrollado de forma continua en el tiempo, convirtiéndolo en un modelo muy competitivo al nivel nacional e internacional. Ello ha posibilitado alcanzar importantes beneficios e impactos en el país, en ellos se destacan: la producción hasta el año 2004 de 179 191 500 plantas *in vitro* de alta calidad genética y fitosanitaria en especies de interés agrícola, forestal y ornamental; la multiplicación acelerada e introducción al país de nuevos híbridos de plátanos y bananos resistentes a la SigatoKa negra; desarrollo de programas nacionales de producción de semillas certificadas en caña de azúcar y papa; ahorros de alrededor de 54 millones de dólares por reducción de costos y compra de insumos en el exterior y más de 20 millones de pesos en moneda nacional por el incremento de rendimiento en plantaciones, disminución de pérdidas y reducción del costo de mano de obra. Adicionalmente se ingresan al país 1 718 000 USD por la venta de biofábricas y transferencia de tecnologías en el extranjero.

Palabras clave: innovaciones tecnológicas, plantas *in vitro*, semilla certificada

# DESARROLLO DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL EN COLOMBIA. IMPACTO DE LA BIOFÁBRICA DE SEMILLAS DEL PARQUE TECNOLÓGICO DE ANTIOQUIA S.A.

Luz Elena Zabala Jaramillo<sup>1</sup>, José Diego Osorio Chica<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Parque Tecnológico de Antioquia S.A. Carrera 47 Nro. 49-12 oficina 703 Edificio BENEDAN, Medellín Antioquia Colombia. e-mail: [gerenciapta@epm.net.co](mailto:gerenciapta@epm.net.co),

<sup>2</sup>Biofábrica de semillas-PTA. e-mail: [biofabrica@epm.net.co](mailto:biofabrica@epm.net.co)

## RESUMEN

Colombia está urgida de priorizar el desarrollo Biotecnológico, como una verdadera herramienta para el desarrollo agrícola y forestal, la explotación racional de nuestros recursos naturales en pro de la inclusión social y la soberanía nacional. Aunque la tecnología de clonación *in vitro* es conocida y se aplica en algunas especies en Colombia, los costos de las plantas generadas a través de ésta no son competitivos frente a la producción convencional, debido a los costos de producción generados por tecnologías y procesos con baja eficiencia, no contarse con laboratorios de producción con un diseño adecuado al utilizar la luz artificial como fuente de iluminación, empleo de la esterilización con autoclaves, desconocimiento de los productos biotecnológicos por el sector productivo, fracasos en la introducción de algunos productos y los altos costos de algunos insumos empleados en el proceso, entre otros factores. La Biofábrica de semillas del PTA dará solución a estas falencias sobre la base de una alta competitividad en las producciones. Cuba, país pionero en Biofábricas en el nivel Latinoamericano, a través del IBP (Instituto de Biotecnología de las Plantas) transfiere al PTA el desarrollo técnico científico para el diseño técnico, construcción, equipamiento y puesta en marcha de la Biofábrica de Semillas más moderna en la actualidad, y que estará a la vanguardia de los principales centros de producción de material vegetal mejorado en el continente.

Palabras clave: biofábrica, soberanía nacional, integración, productividad, competitividad, reforestación, Vitro-plantas.

# LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *MUSA* SPP. UNA VIA ALTERNATIVA PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO*

Rafael Gómez Kosky, Leyanis García Águila\*, Luis A. Barranco Olivera, Boris Chong, Maritza Reyes, Marisol Freire, Yelenys Alvarado, Manuel de Fera Silva, Laisyn Posada, Jorge Gallardo y Justo Clavero. \*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. [legarcia@ibp.co.cu](mailto:legarcia@ibp.co.cu), [leyanis02@yahoo.es](mailto:leyanis02@yahoo.es)

## RESUMEN

En plátanos y bananos el cultivo de yemas axilares continúa siendo el método de regeneración de plantas más utilizado en la propagación *in vitro*. Sin embargo, a medida que aumentó el conocimiento de las técnicas biotecnológicas se amplió la posibilidad de obtener mayores volúmenes de plantas en menor período de tiempo utilizando la embriogénesis somática. Esta técnica es potencialmente más eficiente por presentar altos índices de multiplicación, todo el proceso puede ser realizado en medios de cultivos líquidos, se puede emplear biorreactores, permite la crioconservación de células embriogénicas y la germinación de embriones somáticos en sistemas de inmersión temporal. Con el objetivo de aumentar el conocimiento y optimización de la embriogénesis somática en *Musa* spp se han alcanzado en el IBP resultados en el incremento de la formación de callos con estructuras embriogénicas para el establecimiento de suspensiones celulares, en la selección de líneas celulares de elevado potencial embriogénico y estables índices de multiplicación de agregados celulares. Todo esto combinado con la crioconservación de líneas celulares de alta capacidad embriogénica y la determinación de medios de cultivo para la maduración de los embriones somáticos. Además, se han establecido las condiciones para el escalado en biorreactores de pequeña capacidad (2 litros) y la germinación de los embriones somáticos en sistemas de inmersión temporal. Por otra parte, las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos han sido transferidas a condiciones *ex vitro* (casa de cultivo y campo) para realizar estudios comparativos con poblaciones de plantas obtenidas a partir de yemas axilares y semilla tradicional (cormos). En ellas se evaluaron las características agronómicas y la presencia de variantes somaclonales. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la propagación, a través de la embriogénesis somática en este cultivo no es fuente o causa de variabilidad somaclonal que limite su empleo en la propagación de plantas.

Palabras clave: biorreactores, germinación de embriones somáticos, línea celular, suspensiones embriogénicas

# **IMPACTOS DE LA BIOFÁBRICA DEL PTMI EN LA PROVINCIA DE MISIONES, ARGENTINA**

José A. Cabral\*

Biofabrica Misiones. Posadas. Argentina.

## **RESUMEN**

La Provincia de Misiones, ubicada en el extremo Noreste de la República Argentina y limitando con los países de Brasil y Paraguay; conforma el corazón geopolítico del MERCOSUR. Su vocación exportadora ha duplicado en diez años su nivel de importancia, indicando que más del 90% de los productos exportados son materias primas o manufacturas de origen vegetal; significando al año 2004 casi el 15% de su Producto Bruto Geográfico. Siendo sus principales sectores, el agrícola y forestal. Su tasa de crecimiento poblacional casi duplica a la media nacional y la distribución de su población indica que un 30% vive en comunidades rurales, el triple que para el país; siendo su extensión una de las tres más pequeñas provincias dentro de la República. Culturalmente las actividades con más de un siglo en la región son la producción de la yerba mate y el aprovechamiento de maderas de la selva paranaense. Las Instituciones asociadas al Parque Tecnológico de Misiones, han recorrido un importante camino en cuanto a Investigación y Desarrollo en estos temas y se asocian hoy para brindar competitividad a los principales sectores productivos de la región. La Universidad Nacional de Misiones, orientada directamente a temas relacionadas a los ámbitos de la producción, tanto desde la transferencia de tecnología para la mejora de la productividad en el sector forestal, la industrialización de la madera y la tecnología de alimentos; como aportes en la gestión de las organizaciones, en las etapas de producción, comercialización y exportación. El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, con la investigación y el desarrollo de especies y variedades comerciales, la transferencia a pequeños y medianos agricultores sobre las tecnologías de manejo sustentable. Junto al estado Provincial, principal impulsor de la actividad cooperativa, donde solo en los dos últimos años se han formado más de 200 cooperativas de producción, principalmente agrícolas; con un aporte estatal que ha superado los 20 millones de pesos. Estas características de visión integral institucional, ha encontrado en un proyecto de Biotecnología Vegetal como la "Biofábrica del PTMi" la posibilidad de brindar tanto al sector productivo agrícola como forestal, las herramientas de escala, uniformidad y calidad a partir de la oferta de plantas obtenidas por micropropagación, para lograr nuevos volúmenes y mercados más exigentes. Esta alianza estratégica, con el apoyo de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas y el Instituto de Biotecnología de las Plantas, aumentará a su vez de manera sinérgica, las investigaciones en desarrollo de protocolos para nuevas especies, trazabilidad, mejora de procesos, etc. en los que centros de investigación regional se encuentran actualmente trabajando.

\* Ingeniero Forestal  
Gerente, Biofábrica Misiones

# EMPLEO DE VITROFURAL® EN LA MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *DENDRATHEMA GRANDIFLORA* (CRISANTEMO) Y *NICOTIANA TABACUM* (TABACO)

Forero, A.\* & Montenegro, I. \*Autor para correspondencia.

Unidad de Biotecnología Vegetal, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. A.A.56710.  
[www.javeriana.edu.co](http://www.javeriana.edu.co)

## RESUMEN

El empleo de calor húmedo es la práctica mas común para garantizar la esterilidad de los medios que son empleados en el cultivo *in vitro* de plantas. No obstante, cuando se esteriliza mediante autoclave, algunos componentes termolábiles como carbohidratos, vitaminas y hormonas se pueden hidrolizar, debido a la temperatura y presión que se requieren. Dada la acción biológica como bactericida y fungicida de amplio espectro del Vitroful® se estudio la factibilidad de su incorporación como inhibidor químico de la contaminación microbiana de los medios de cultivo, en la micropropagación de *Dendranthema grandiflora* variedad White albatross (Crisantemo) y *Nicotiana tabacum* variedad Xanthi (Tabaco), como un proceso alternativo de esterilización. Con este fin, fueron establecidos *in vitro* segmentos nodales de *D. grandiflora* y *N. tabacum* sobre medio MS sin reguladores de crecimiento, en presencia de Vitroful® en concentraciones de 14.5 mg/L a 232 mg/L. Así mismo, se evaluó el efecto del Vitroful® sobre los procesos de regeneración de plantas a partir de discos de hoja vía organogénesis y embriogénesis somática para las dos especies en estudio. Para ello, explantes foliares fueron establecidos sobre medio MS con Vitroful® (14.5 - 232 mg/L) y en presencia de ANA (4.83µM) y BAP (13.32µM). De igual manera, se empleo el medio Mum B en presencia 2,4-D (4.52µM), para la inducción de masas proembrionicas. Por otra parte, una de las condiciones requeridas para el empleo de Vitroful, en medios semisólidos, es la reducción del agente gelificante, razón por la cual fueron evaluadas concentraciones de agar entre 3g/L y 6g/L. Los resultados obtenidos mostraron un bajo impacto del Vitroful sobre el desarrollo de nuevos brotes a partir de segmentos nodales en las dos especies evaluadas, lo que permitió incorporar esta sustancia en procesos de propagación masiva. En contraste, fue evidente que el Vitroful, en concentraciones superiores a 58 mg/L y la reducción del agente gelificante en concentraciones menores a 6 g/L, ejercen un efecto negativo sobre la regeneración de brotes adventicios y masas proembrionicas a partir de discos foliares de crisantemo y tabaco. Las plantas obtenidas fueron individualizadas y endurecidas.

Palabras clave: *Dendrathema grandiflora*, embriogénesis somática, esterilización química, *Nicotiana tabacum*, organogénesis, Vitroful®

## USE OF VITROFURAL® IN CHRYSANTHEMUM (*DENDRATHEMA GRANDIFLORA*) AND TOBACCO (*NICOTIANA TABACUM*) MICROPROPAGATION

### ABSTRACT

Moist steam under pressure is the commonest means employed in plant tissue culture media sterilisation, despite the probability of some thermolabile components resulting hydrolysed due to high pressure and temperatures involved. Given the wide spectrum bactericide and fungicide properties of Vitroful®, the feasibility of incorporating this bacterial inhibitor into culture media as an alternative media sterilisation means was assessed during micropropagation of chrysanthemum (*D. grandiflora*) variety White Albatross and tobacco (*N. tabacum*) variety Xanthi. *Dendrathema grandiflora* and *N. tabacum* node segments were inoculated on MS medium without plant growth regulators containing 14.5 – 232 mg/l Vitroful®. Vitroful® effect on plant regeneration from leaf discs *via* organogenesis and somatic embryogenesis was also evaluated on both species. Leaf explants were cultured on MS medium with 14.5 – 232 mg/l Vitroful® and supplemented with 4.83 µM NAA and 13.32 µM BAP. Mum B medium supplemented with 14.5 – 232 mg/l Vitroful® and 4.52 µM 2,4-D was used to induce proembrionic masses. Since Vitroful® incorporation into semisolid media requires lowering the gelling agent concentration,

experiments were done with 3 and 6 g/l agar. Results show a low negative influence of Vitrofur® on the production of new shoots from node segments of both plant species, allowing the incorporation of this chemical inhibitor of microbial growth into *in vitro* mass propagation processes. On the contrary, Vitrofur® concentrations higher than 58 m/l and agar concentrations lower than 6 g/l have a negative effect on adventitious shoot regeneration and formation of proembryonic masses from leaf discs in both species. Regenerated plants were subsequently hardened.

Key words: *Dendrothema grandiflora*, chemical sterilisation, *Nicotiana tabacum*, organogenesis, somatic embryogenesis, Vitrofur®

# **EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DEL VITROFURAL® PARA EL HOMBRE Y EL AMBIENTE**

Enrique A. Silveira Prado,\* Remigio R. Cortés Rodríguez y Exiquio Gaytán Placeres. \*Autor para correspondencia.

Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ . Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: [esilveira@uclv.edu.cu](mailto:esilveira@uclv.edu.cu)

## **RESUMEN**

Se realizó una evaluación integral de la documentación sobre los estudios químicos y biológicos realizados con el Vitrofur® esterilizante químico de los medios de cultivo utilizados para la micropropagación de plantas y el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, ingrediente farmacéutico activo, con el objetivo de evaluar la seguridad del producto para el hombre y su impacto ambiental. La evaluación comprendió además las recomendaciones del productor como medidas generales de seguridad para el usuario incluyendo los procedimientos en caso de accidentes. El análisis conjunto de toda esta información nos permite afirmar que, el Vitrofur® es un producto de poco riesgo para el hombre según el uso a que está destinado, no existiendo afectación del medio ambiente por su generalización en las biofábricas del país.

Palabras clave: 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. Vitrofur®. Micropropagación de plantas. Seguridad.

## **EVALUATION OF THE SECURITY OF THE VITROFURAL® FOR MAN AND ENVIRONMENT**

### **ABSTRACT**

An integral evaluation of the documentation on the chemical and biological studies was carried out with Vitrofur® chemical sterilizer of culture media used for plant tissue culture and the 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan, active pharmaceutical ingredient, with the objective of evaluating the security of the product for man and their environmental impact. The evaluation also involved the recommendations of the producer as general measures of security for the user including the procedures in case of accidents. The whole analysis of all this information allows us to confirm that, the Vitrofur® is a product of little risk for man according to its use, not existing affectation of the environment for its generalization in plant tissue culture laboratories of the country.

Key words: 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan, Vitrofur®, Plant tissue culture laboratories, Security

# **EVALUACIÓN POSTCOMERCIALIZACIÓN DE LA CALIDAD, SEGURIDAD Y EFICACIA DEL VITROFURAL® EN CUBA**

Raquel Hernández González\*, Huber Guillén Morales, Enrique Silveira Prado, Nilo Castañedo Cancio.  
\*Autor para correspondencia.

Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830. e-mail: [raquelf@uclv.edu.cu](mailto:raquelf@uclv.edu.cu)

## **RESUMEN**

Uno de los principales problemas que afecta la propagación masiva de vitroplantas es la contaminación microbiana de los medios de cultivos. Para dar solución a esta problemática fue desarrollado el Vitrofurul, esterilizante químico de los medios de cultivo, registrado en Cuba en 1999 y que de forma paulatina se ha ido generalizando su empleo en todas las biofábricas del país, sustituyendo el método convencional de esterilización por autoclave. Con el objetivo de evaluar la calidad, seguridad y eficacia del Vitrofurul se realizó una evaluación postcomercialización del producto, mediante la aplicación, en dos períodos diferentes, de encuestas en 11 centros productores de vitroplantas del país, incluyendo en las mismas indicadores cuantitativos y cualitativos. El análisis conjunto de la información reveló ventajas en la aplicación del producto, dadas por una disminución significativa de la contaminación en los medios de cultivo para vitroplantas, disminución del consumo de agente gelificante e incremento en los coeficientes de multiplicación en el 45.5% de los casos. Además, se evidenció un aumento de la productividad y humanización del trabajo así como ahorro de energía eléctrica. En ninguna de las encuestas se registraron informes sobre intoxicación, todo lo cual hace atractivo el producto para su introducción en otros mercados.

Palabras clave: contaminación microbiana, esterilizante químico, propagación masiva, Vitrofurul

## **AFTER SALES EVALUATION OF THE QUALITY, SECURITY AND EFFICACY OF THE VITROFURAL® IN CUBA**

### **ABSTRACT**

The Microbial contamination of culture media is one of the main problems affecting the massive propagation of vitroplants. The Vitrofurul product, a chemical sterilizer for culture media which substitute the sterilization process by autoclave, was created to solve this problem. It was registered in Cuba in 1999 and nowadays is generalized in all biofabrics over the country. An after-sales evaluation of this product was carried out using quantitative and qualitative indicators in order to evaluate its quality, safety and efficacy through surveys in 11 vitroplants producing centers throughout the country. The information analysis revealed several advantages in the product application showing a significant decrease of agar consumption and bacterial contamination in the culture media, an increment of multiplication coefficients in 45.5% of cases, an increase of productivity and humanization of work as well as a considerable electric power saving. No report of intoxication was found in any of surveys, making this product very attractive and safe for being marketed in other countries.

Key words: microbial contamination, chemical sterilizer, massive propagation, Vitrofurul



# CONTROL DE LA CALIDAD EMPLEANDO MUESTREOS MICROBIOLÓGICOS AMBIENTALES EN LAS BIOFÁBRICAS DE CUBA

Daymí Carrazana<sup>1\*</sup>, Arletys Santos<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Facultad de Química - Farmacia, Carretera a Camajuaní, Km 5 ½, CP 20 400, Santa Clara, Cuba. e-mail: [daymic@uclv.edu.cu](mailto:daymic@uclv.edu.cu)

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

## RESUMEN

Una de las principales causas de la disminución de la eficiencia productiva de las Biofábricas es la pérdida de material vegetal por contaminación microbiana, por lo que su prevención posee gran importancia. El objeto de estudio del presente trabajo es el Sistema de Control Microbiológico de la Calidad (SCC) en las Biofábricas pertenecientes al MINAG en Cuba, pretendiendo proponer una estrategia para disminuir tales pérdidas. Se analizaron las orientaciones dadas en el SCC y teniendo en consideración las peculiaridades de cada Biofábrica se sugiere una interpretación particular de los muestreos microbiológicos ambientales (MMA). Se definieron grupos enfocados formados por el director, responsables del control de la calidad, especialistas en medios de cultivo y operarias de experiencia y se realizaron entrevistas semiestructuradas para conocer el procedimiento empleado en la realización e interpretación de MMA comparándolo con la metodología propuesta en el SCC, detectándose numerosas irregularidades. Se revisaron 507 Reportes al Consejo Técnico de MMA encontrándose varias deficiencias. Se proponen las siguientes modificaciones en el punto de control N°20: Realizar MMA bimensuales, colocando cuatro placas de Petri en cada estación de muestreo con un medio de cultivo general para bacterias y otro para hongos; incubar las placas a 32°C o temperatura ambiente; evaluar los resultados contabilizando el número de UFC a las 48 horas (bacterias) y a los cinco días (hongos) y especificar que en la cabinas de flujo laminar el número de UFC aceptable es cero. Para demostrar la conveniencia de evaluar los resultados mediante la construcción de Gráficos de Control (NC-ISO 8258:2002) se ejecutaron 25 muestreos en 24 estaciones en el laboratorio de Biotecnología del INIVIT y se construyeron gráficos de control de Shewhart. Durante el desarrollo de los MMA el índice de contaminación fue inferior al 5%. Los datos fueron procesados mediante el paquete estadístico STATISTICA 6.0.

Palabras clave: Biofábrica, control microbiológico de la calidad, contaminación microbiana

# IMPORTANCIA DE LA SILVICULTURA CLONAL EN ARGENTINA

Luis Carpineti

(Argentina)

## RESUMEN

La clonación es el proceso por el cual se produce la duplicación idéntica de un genotipo. Esta duplicación, potencialmente infinita, permite la multiplicación de un genotipo a partir de un solo individuo original. En este resumen se hace referencia a la situación especial de la forestación clonal en Argentina haciendo referencia a los eucaliptos y a los pinos., que son los campos de aplicación de la biotecnología principales en forestales. Se destaca que la clonación no es un método de mejora genética sino una herramienta por la cual se concretan los avances logrados en los largos procesos de mejoramiento genético en forestales. Se discuten las ventajas de usar clones, sus desventajas y riesgos y los métodos de obtención de los mismos en Argentina. Se espera mucho de esta tecnología en Argentina, , que es una realidad incipiente en nuestro país ya que sólo unas pocos miles de hectáreas han sido plantadas con clones de *Eucalyptus grandis*, de *Eucalyptus globulus* y de Pinos híbridos.

Palabras clave: forestales, mejoramiento genético, multiplicación

# MANUAL PARA EL MONTAJE Y PUESTA EN MARCHA DE ESTANTES PARA LOS SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT)

Jorge L. Montes de Oca<sup>1\*</sup>, Aydiloide Bernal<sup>1</sup>, Pablo E. Machado<sup>1</sup>, Mayra Jiménez Vázquez<sup>1</sup>, Yandi H. Estévez<sup>1</sup>, Odalys Rivera<sup>1</sup>, Zenaida Occeguera Aguila<sup>1</sup>, Carlos F. Reyes Esquirol<sup>1</sup>, Alcides Martínez<sup>1</sup>, Ignacio Santana<sup>2</sup>.  
\*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara – Cienfuegos (ETICA).

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). e-mail: [biofábrica@vc.minaz.cu](mailto:biofábrica@vc.minaz.cu)

## RESUMEN

El presente manual se puede utilizar como herramienta para el montaje y puesta en marcha de estantes para los SIT, donde se relacionan paso a paso cada una de las operaciones a seguir y el diseño del estante con cada una de sus partes y particularidades. La Inmersión Temporal es un procedimiento de la micropropagación que permite incrementos significativos del coeficiente de multiplicación y la automatización. Las investigaciones recientes coinciden en la posibilidad de la utilización de los SIT para la micropropagación de la caña de azúcar, plátanos y bananos y otras especies (piña, papa, ornamentales, flores, frutales). Los SIT disminuyen los costos de producción por mano de obra, ahorran energía, incrementan la eficiencia productiva del proceso de micropropagación y al requerir menor espacio propicia un aumento de las capacidades productivas en las Biofábricas.

Palabras clave: Biofábricas, caña de azúcar, multiplicación



# TALLER PLATANOS Y BANANOS

# MICROPROPAGACIÓN DE PLÁTANO (*MUSA* AAB) EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL (BIT®)

Maritza Escalona<sup>1</sup>, Justo González-Olmedo<sup>1</sup>, Inaudis Cejas<sup>1</sup>, Carlos Aragón<sup>1</sup>, Iris Capote<sup>1</sup>, Roberto Rodríguez<sup>2</sup>, María Jesús Cañal<sup>2</sup>, Jorge Sandoval<sup>3</sup>, Sophie Roels<sup>4</sup>, Pierre Debergh<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila, CP. 69450, Cuba e-mail: [mescalona@bioplantitas.cu](mailto:mescalona@bioplantitas.cu)

<sup>2</sup> Universidad de Oviedo, España.

<sup>3</sup> CORBANA, Costa Rica.

<sup>4</sup>Universidad de Gent, Bélgica.

## RESUMEN

El efecto positivo y las ventajas de la técnica de inmersión temporal en la propagación *in vitro* ha sido evaluada en diferentes especies de plantas y ahora se implementó como una alternativa para el plátano (*Musa* AAB) clon CEMSA ¾. Algunos parámetros de cultivo que afectan la eficiencia biológica del sistema BIT® fueron investigados para aumentar la tasa de multiplicación y la calidad morfológica de los brotes. De todos ellos, el empleo de tres subcultivos sucesivos (cada 28 días) en medio de cultivo suplementado con 4.44 µ mol/L de Metatopolina y con aumento del volumen de medio de cultivo en función del aumento de la biomasa resultó el de mayor incidencia en la tasa de multiplicación y calidad de los brotes. La estabilidad genética de las plantas fue determinada por AFLP y citometría de flujo y en áreas de CORBANA se evaluó el crecimiento y productividad de las mismas por tres generaciones. La integración de estos permiten recomendar esta forma de propagación como muy eficiente y segura para la micropropagación de este clon a escala comercial.

Palabras clave: CEMSA ¾, Metatopolina, tasa de multiplicación

## PLANTAIN (*MUSA* AAB) MICROPROPAGATION USING TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR (BIT®)

### ABSTRACT

The positive and reliable effect of temporary immersion technique on *in vitro* propagation in different plant species has been evaluated and it is now implemented as an alternative for plantain (*Musa* AAB) CEMSA ¾. Some culture parameters affecting the efficiency of the BIT® were investigated to improve multiplication rate and morphological shoot quality. Among them, three successive subculture (28 days per subculture) on medium supplemented with 4.44 µ mol/L Metatopolina and increasing the volume of culture medium in function of biomass was proved to be the most efficient. Genetic stability was evaluated using AFLP and flow cytometric probes and in CORBANA areas, growing, and yield of the plants were evaluated for three generations. The integration of these results suggested this culture method as very efficient and reliable for plantain micropropagation.

Key words: CEMSA ¾, Metatopolina, multiplication house

# **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CULTURAL Y PATOGENICA DE *DEIGHTONIELLA TORULOSA* (SYD.): AGENTE CAUSAL DEL MANCHADO DE LAS HOJAS DE PLANTAS ACLIMATIZADAS DE *MUSA* SPP.**

Michel Leiva Mora,\* Yelenys Alvarado Capó, Mayra Acosta Suárez, Mileidy Cruz Martín, Berkis Roque Morales. \*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.

## **RESUMEN**

*Deightoniella torulosa* (Syd.) M. B. Ellis se conoce como un parásito débil de hojas viejas de banana así como en hojas de plantas jóvenes de *Musa*. Los conidios producidos por este patógeno constituyen las principales estructuras causantes del manchado de las hojas en condiciones naturales. El presente trabajo tuvo como objetivo principal el estudio de los caracteres morfológicos, culturales y patogénicos de *Deightoniella torulosa* (cepa CCibp-Dt1), agente causal del manchado de las hojas de vitroplantas de *Musa* spp. El medio de cultivo PDA inclinado en tubos fue empleado para la inducción de la esporulación, los mismos fueron incubados 20°C durante 20 días con luz fluorescente constante. La prueba de patogenicidad se efectuó en plantas de los cultivares Grande naine (AAA), Yangambi km5 (AAA) y FHIA-18 (AAAB). Los conidióforos midieron 35-70 µm de largo x 13-25µm de ancho, los mismos fueron rectos o ligeramente curvados, subhialinos u oliváceos. Algunos con hasta 13 pseudoseptos. Los conidios fueron obpiriformes a elipsoidales. Las colonias fueron de color pardo o negro en la superficie y reversos negros estromáticos. Numerosos conidios se obtuvieron a los 20 días en el medio de cultivo PDA. En la inoculación artificial los primeros síntomas se observaron como pequeñas lesiones necróticas (1 a 2 mm) acompañadas de un halo amarillo, estas aumentaron de tamaño hasta alcanzar formas ovales con un borde negro necrótico. Los cultivares Grande naine y Yangambi fueron afectados en mayor medida que el cultivar FHIA-18. La caracterización morfológica, cultural y patogénica de este patógeno puede ser útil para garantizar métodos reproducibles de inoculación artificial y servir de modelo para el estudio de la interacción *Musa*-hongo en condiciones controladas.

Palabras clave: *Deightoniella torulosa*, esporulación, enfermedades de bananos, caracteres morfológicos, hongos fitopatógenos

## **MORPHOLOGICAL, CULTURAL AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF *DEIGHTONIELLA TORULOSA* (SYD.): CAUSAL AGENT OF LEAF SPOTTING IN ACCLIMATIZED *MUSA* SPP PLANTS**

### **ABSTRACT**

*Deightoniella torulosa* (Syd.) M. B. Ellis is known a weak parasite of older foliages of banana and has been reported on young leaves of *Musa* seedlings. Conidia produced by this pathogen are the main structures for causing *Musa* leaf spotting in natural condition. *In vitro* conidia production is an important task for identifying and characterize it. In the present work were studied aspects related with cultural, morphological and pathogenic characterization of *Deightoniella torulosa* (strain CCibp-Dt1), causal agent of leaf spotting in acclimatized *Musa* spp plants. For sporulation induction and cultural characterization were used different cultures media (PDA, Water-agar 2%, agar poor synthetic nutrient medium, Saboroud, Mycophil-Agar, V-8). They were incubated with continuous fluorescent light and temperature was maintained at 20°C during 20 days. Pathogenicity test was performed on three-month-acclimatized banana plants (Grande naine (AAA), Yangambi km5 (AAA), FHIA-18 (AAAA) and Pisang Jaribuaya (AAB)). Cultural colonies

characteristics were dark stromatic at mycelia reverse, brown dark colors were predominant on superficial mycelia. Conidiophores were 35-70 µm in large x 13-25µm in width, straight or slightly curved, obpyriform to obclavate, subhyaline to olive in colour with three to 13 pseudosepta. Obpyriform to ellipsoid conidia were produced on all cultures media. Potato Carrot Agar and V-8 were the best culture media for conidia production. By artificial inoculation first symptoms appeared as black necrotic spots between 1 and 2 mm in diameter, they increase in size, becoming oval in shape with a black border. Grande naine and Yangambi were the most affected cultivars. Cultural, morphological and pathogenic characterization of this pathogen could be important for artificial inoculation and dissection of host-pathogen interaction between this pathogen on different banana cultivars in controlled condition.

Key words: *Deightoniella torulosa*, sporulation, Banana diseases, morphological Characteristics, Phytopathogen fungus

# TRANSFORMACIÓN GENÉTICA MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* EN EL CULTIVAR DE PLÁTANO CEMSA ¾ (*MUSA AAB*)

Borys Chong<sup>1</sup>, Rafael Gómez<sup>1</sup>, Idalmis Bermúdez<sup>1</sup>, Jorge López<sup>3</sup>, José M. Machado<sup>1</sup>, Lázaro Hernández<sup>4</sup>, Maritza Reyes<sup>1</sup>, Marisol Tejeda<sup>1</sup>, Nery Montano<sup>3</sup> Bárbara Ocaña<sup>1</sup>, Laszlo Sagi<sup>2</sup> y Ronny Swennen<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. email: [borys\\_chong@yahoo.es](mailto:borys_chong@yahoo.es) o [boris@ibp.co.cu](mailto:boris@ibp.co.cu)

<sup>2</sup>Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven (KUL).

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales

<sup>4</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

## RESUMEN

El CEMSA ¾ es uno de los cultivares más importantes de plátano cultivados en Cuba. Este cultivar fue afectado severamente por la entrada en 1990 de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la enfermedad conocida como Sigatoka negra. La resistencia a esta enfermedad puede incrementarse insertando genes que codifiquen para proteínas antifúngicas a través de la transformación genética. En este trabajo suspensiones celulares embriogénicas del cultivar de plátano CEMSA ¾ (*Musa AAB*) fueron transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Para la transformación, se utilizaron los plasmidios binarios pHCA58 y pHGA91 los cuales portaban los genes que codifican para quitinasa (*Phaseolus vulgaris*) y AP24 (*Nicotiana tabacum*) el primero y glucanasa (*Nicotiana tabacum*) y AP24 el segundo, todas relacionadas con la defensa de plantas ante el ataque de agentes patógenos. Ambos plasmidios portaban como marcador de selección el gen *bar*, el cual codifica para la fosfinotricin acetiltransferasa. Más de 200 plantas posibles transformadas fueron regeneradas después de tres meses en medio de cultivo selectivo. Después de multiplicadas *in vitro* 30 líneas por cada plasmidio fueron aclimatizadas en casa de cultivo. De ellas, nueve líneas posibles transformadas por cada construcción genética fueron analizadas por la reacción en cadena de la polimerasa para comprobar la presencia en el genoma de la planta de los genes de interés, resultando todas positivas al gen *bar*.

Palabras clave: glucanasa, ap24, quitinasa

## AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF PLANTAIN CULTIVAR CEMSA ¾ (*MUSA AAB*)

### ABSTRACT

CEMSA ¾ is one of the most important plantains cultured in Cuba. This cultivar was very affected after the entrance of Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). The resistance behind this pathogen can be increased inserting genes that encoded to antifungal proteins through genetic transformation. In this work, *Agrobacterium*-mediated transformation by was carried out with embryogenic cell suspensions in the CEMSA ¾ (*Musa AAB*) plantain cultivar. For transformation, binary plasmids pHCA58 and pHGA91 were used, which contain the combination of genes that encode for the antifungal chitinase from *Phaseolus vulgaris* and the ap-24 osmotin from *Nicotiana tabacum* the first one and glucanase (*Nicotiana tabacum*) and ap-24 the second one. As a selectable marker gene *bar* was used in both plasmids. It encoded for PPT acetyltransferase. More than 200 putative transformed plants were regenerated after three months on selection medium. After *in vitro* multiplication 30 lines of each construct were acclimatized in the greenhouse. Nine lines of each one were checked by PCR to confirm the insertion of the genes of interest. All of them were positive to *bar* gene

Keywords: glucanase, ap24, chitinase



# **METODOLOGÍA PARA EL DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL CULTIVAR DE PLÁTANO VIANDA 'NAVOLEAN' (*MUSA* SPP., GRUPO AAB)**

López, J.<sup>1\*</sup>, R. Gómez<sup>2</sup>, R. Trujillo<sup>3</sup>, N. Montano<sup>1</sup>, D. Reinaldo<sup>1</sup>, A. Rayas<sup>1</sup>, Ml. Roman<sup>1</sup>, M. Cabrera<sup>1</sup>, A. Santos<sup>1</sup>, J. Ventura<sup>1</sup>, V. Medero<sup>1</sup>, M. García<sup>1</sup>, M. Basail<sup>1</sup> y H. Toledo<sup>1</sup> y A. Cantero<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo 6, Sto Dgo., Villa Clara, CP 53000. Cuba. e-mail: [jlopez@inivit.co.cu](mailto:jlopez@inivit.co.cu)

<sup>2</sup>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.

<sup>3</sup>Centro de Bioplantillas (UNICA).

## **RESUMEN**

El desarrollo de la embriogénesis somática, posibilita disponer de un sistema celular útil para la mejora genética y una vía alternativa para la propagación de plantas. El presente trabajo se realizó con el objetivo de desarrollar una metodología de embriogénesis somática en el cv. 'Navolean' (*Musa* spp., Grupo AAB) a partir de domos meristemáticos de yemas axilares. Se demostró que es posible la obtención de suspensiones celulares embriogénicas homogéneas a partir del explante antes mencionado y se logró los mayores volúmenes de multiplicación celular a la densidad de 3.0% del volumen de células sedimentadas. La mayor cantidad de embriones somáticos se alcanzó a la densidad de 12.0% del volumen de células sedimentadas. La inoculación de 0.5 gMF de embriones somáticos en etapa globular en el medio de cultivo suplementado con zeatina, durante 30 días, permitió mejorar la maduración de los embriones somáticos. El uso del Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA con 0.5 gMF de embriones somáticos maduros, incrementó los valores de germinación a un 83.0%. Transcurridos dos ciclos de producción, las plantas provenientes de la metodología desarrollada mostraron un comportamiento agronómico similar a las plantas obtenidas por organogénesis y cormos.

Palabras clave: domos meristemáticos, embriones somáticos, yemas axilares

# OBTENCIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE BANANO Y PLÁTANO (*MUSA* SPP CV. GRAN ENANO AAA Y NAVOLEAN AAB) TOLERANTES A LA ENFERMEDAD SIGATOKA NEGRA (*MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET) EN CAMPO

Rafael Gómez Kosky,<sup>\*1</sup> Idalmis Bermúdez Caraballos<sup>1</sup>, Borys Chong Pérez<sup>1</sup>, Jorge Lopez Torres<sup>2</sup>, Maritza Reyes Vega<sup>1</sup>, Nery Montalvo Martín<sup>2</sup>, José M. Machado Rodríguez<sup>1</sup>, Bárbara Ocaña Díaz<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado Capo<sup>1</sup>, Michel Leiva Mora<sup>1</sup>, Mayra Acosta Suarez<sup>1</sup>, Mileidy Cruz Pérez<sup>1</sup>, Belkis Roque<sup>1</sup>, Rony Swennen<sup>3</sup>, Laszlo Sagi<sup>3</sup> and Lázaro Hernández<sup>4</sup>.

\*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830  
e- mail: [koskyrg@yahoo.es](mailto:koskyrg@yahoo.es) Tel: 53 (42) 281693/ 281257, Fax: 53 (42) 281329

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Ministerio de la Agricultura. Santo Domingo, Villa Clara. Cuba.

<sup>3</sup>Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven (KUL). Kasteelpark Arenberg 13. B-3001, Leuven, Belgium.

<sup>4</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Ciudad de La Habana. Cuba.

## RESUMEN

La enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) ha sido en los últimos años, la enfermedad foliar más destructiva que afecta la producción de bananas y plátanos a nivel mundial. El presente trabajo tuvo como objetivo la obtención de plantas transgénicas de banano cultivar Gran Enano (AAA) y plátano cultivar Navolean (AAB) tolerantes a esta enfermedad, con el uso de la transformación genética. Suspensiones celulares embriogénicas obtenidas desde embriones somáticos formados a partir de flores masculinas inmaduras y yemas *in vitro* fueron utilizadas para la transformación por *Agrobacterium tumefaciens*. La cepa de bacteria fue la EHA-105 con los plásmidos binarios pHCA-58, pHCG-59 y pHGA-91, los cuales contienen diferentes combinaciones de genes que codifican para las proteínas antifúngicas, quitinasa clase 1,  $\beta$ -1,3 glucanasa y la osmotina ap24. El herbicida comercial BASTA® fue usado como agente selectivo. Un total de 95 putativas líneas transformadas de las tres construcciones del cultivar Gran Enano y 43 putativas líneas transformadas de dos construcciones del cultivar Navolean fueron plantadas en campo. La evaluación durante 3 ciclos de cultivo permitió la selección de un total de 21 líneas putativa tolerantes a la enfermedad Sigatoka negra. Los eventos transgénicos en las líneas seleccionadas fueron verificados por medio de los análisis de PCR, *Dot Blot* y *Southern blot* y estos confirmaron la integración estable de los transgenes en las plantas transgénicas que fueron seleccionadas en campo.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*, BASTA®, proteínas antifúngicas

# POTENCIAL PARA LA PROPAGACIÓN A GRAN ESCALA DE CULTIVARES DE *MUSA* SP. DE CONSUMO LOCAL, A PARTIR DE SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS: OBSERVACIONES AGRONÓMICAS DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA DE LAS PLANTAS EN EL CAMPO

M.E. Aguilar<sup>1\*</sup>; J.L.Ortiz<sup>1</sup>; J.A. Sandoval<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. CATIE 7170, Turrialba, Costa Rica, C.A. e-mail [aguilarm@catie.ac.cr](mailto:aguilarm@catie.ac.cr)

<sup>2</sup>Cooperación Bananera Nacional, CORBANA. 390-7210, Pococí Limón, Costa Rica.

## RESUMEN

Los bananos y plátanos de consumo local representan uno de los cultivos agrícolas más importantes para pequeños productores por lo que juegan un papel socio-económico relevante en muchos países tropicales. La poca disponibilidad de material sano para plantación y las barreras impuestas al mejoramiento genético por la vía de hibridación convencional, aumentan la presión ejercida por el agricultor. La biotecnología ofrece alternativas para superar estas limitaciones, facilitar el manejo y mejoramiento del cultivo. En respuesta, el CATIE trabaja en la optimización de la regeneración celular de estos cultivos para utilizar la técnica de manera confiable satisfaciendo la demanda por semilla de calidad y como plataforma para el mejoramiento genético no convencional. Estudios sobre variación *in vitro* sugieren que altas concentraciones de 2,4-D y tiempo prolongado en cultivo, aumenta la posibilidad de variación. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales no se observó dicha tendencia. Los cv. 'Dátil', 'Gros Michel' y 'Dominico', presentaron alta estabilidad morfológica, independientemente de la concentración de 2,4-D utilizada durante la inducción embriogénica y la edad de la suspensión. En contraste, el cv. 'Gran enano' es muy susceptible a sufrir cambios en su morfología, que afectan inclusive la producción. En este cultivar se identificó el enanismo, en plantas provenientes de callos obtenidos de diferente concentración de 2,4-D. Esta es una de las variaciones más frecuentes obtenida mediante el cultivo de ápices vegetativos. Asimismo, el cultivo en inmersión temporal, permitió la germinación de embriones, desarrollo de plantas en tiempo más corto y una rápida aclimatación al ambiente *ex vitro*, con valores superiores al 85% de sobrevivencia. Estos resultados, permiten sugerir la regeneración celular de suspensiones celulares embriogénicas como una vía apropiada para la multiplicación masal y la transformación genética de los cultivares estudiados de *Musa* sp.

Palabras clave: *Musa* sp., regeneración celular, variación genética

# REGENERACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS DE PLÁTANO CV. 'CURRARÉ' (AAB) BOMBARDEADAS CON GENES ANTIFÚNGICOS PARA INTRODUCIR RESISTENCIA A LA SIGATOKA NEGRA (*MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*)

J.L.Ortiz<sup>1</sup>; M. Gómez-Lim<sup>2</sup>; M.E. Aguilar<sup>\*1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE 7170, Turrialba, Costa Rica, C.A.  
e-mail: [aguilarm@catie.ac.cr](mailto:aguilarm@catie.ac.cr)

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV, 629 Irapuato, Gto México.

## RESUMEN

Las musáceas de interés comercial son seriamente afectadas por la Sigatoka negra, la cual causa disminución de la producción y rendimiento con la pérdida de plantaciones y cosechas. El control de la enfermedad obliga al uso excesivo de productos químicos provocando la resistencia del patógeno a los mismos. El presente trabajo pretende informar sobre la regeneración de plantas a partir de cultivos celulares embriogénicos de plátano, bombardeados con genes antifúngicos con miras al control de la Sigatoka negra. Se utilizó una suspensión celular embriogénica del cv 'Curraré' (AAB) de 6 meses de edad. La transferencia de genes se hizo mediante bombardeo de partículas utilizando microproyectiles de tungsteno. Se evaluaron tres vectores de transformación: G/Q (glucanasa/quitinasa), pKYLX80/J1 (J1 /0.462 kb) y pKYLX80/AFP (AFP/ 0.402 kb) que codifican para proteínas antifúngicas. Todos incluyen el gen reportero GUS, marcador *nptII*, y el promotor constitutivo 35S (CaMV). La expresión GUS se evaluó 48 horas después del bombardeo. El material se sometió a selección con el antibiótico kanamicina (100 mg/l. Los embriones se subcultivaron en los medios M4 y M5 para germinación y desarrollo respectivamente. La regeneración de embriones somáticos fue lograda en los diferentes tratamientos utilizados; sin embargo hubo mayor cantidad de embriones para la relación vector 2:2:2 (G/Q:J1:AFP), esto coincidió con una mayor expresión del gen GUS (315 puntos azules) para ese mismo tratamiento. Numerosos embriones germinados en el medio M4 con selección, fueron transferidos al medio M5, obteniéndose más de 90 plantas en estado óptimo para su aclimatación. La obtención de embriones y la conversión de éstos en plantas después del bombardeo no es una limitante en nuestro sistema de regeneración. La respuesta obtenida en términos de resistencia de estas suspensiones al agente selectivo (kanamicina) también fue exitosa para algunos tratamientos. Estas plantas fueron llevadas a invernadero para su evaluación en presencia del agente patogénico.

Palabras clave: *Musa* sp., Transformación genética, plátano, suspensiones celulares

# EVALUACIÓN TEMPRANA DE LA RESISTENCIA DE CULTIVARES DE *MUSA* SPP FRENTE A *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET

Yelenys Alvarado Capó\*, Michel Leiva Mora, Mayra Acosta Suárez, Mileidy Cruz Martín, Nayanci Portal González, Berkis Roque Morales. \*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 [yelenys05@ibp.co.cu](mailto:yelenys05@ibp.co.cu)

## RESUMEN

La evaluación temprana de la resistencia a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) como herramienta en los programas de mejoramiento genético de *Musa* spp, requiere de procedimientos que permitan diferenciar cultivares resistentes y susceptibles. El presente trabajo tuvo como objetivo principal, estandarizar un método para la evaluación temprana de la respuesta de plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp. frente a *Mycosphaerella fijiensis*, mediante la inoculación artificial de estructuras del patógeno (conidios y micelio). Se obtuvieron síntomas uniformes y homogéneos en las hojas inoculadas de similares características tanto para conidios como para micelio los cuales fueron semejantes a los observados en plantas jóvenes en condiciones naturales. Se confeccionó una escala cualitativa para facilitar la evaluación de la respuesta de genotipos de *Musa* spp. Esta y las variables cuantitativas (tiempo de evolución de los síntomas y tiempo de desarrollo de la enfermedad) permitieron diferenciar los cultivares. Todos con excepción del Yangambí km 5, tuvieron un comportamiento frente al patógeno similar al observado en condiciones naturales. La resistencia parcial expresada en los cultivares FHIA, se caracterizó por una lenta evolución en el desarrollo de los síntomas. El cultivar Calcutta 4 mostró el período más lento del desarrollo de los síntomas. Los cultivares Grade naine y Niyarma Yik mantuvieron su respuesta susceptible al alcanzar los mayores grados de afectación. La inoculación artificial de plantas de *Musa* sp. procedentes del cultivo *in vitro* resultó un método fácil, rápido y reproducible para conocer la expresión de la resistencia frente a *M. fijiensis* a este nivel. Los resultados de este trabajo constituyen una valiosa herramienta para la evaluación temprana de diferentes cultivares procedentes de los programas de mejoramiento genético que se han desarrollado frente a *M. fijiensis*.

Palabras clave: Palabras clave: conidios, inoculación artificial, micelio, Sigatoka negra

# **CAMBIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS ASOCIADOS A LA TRANSICIÓN *IN VITRO-EX VITRO* DE PLANTAS DE PLÁTANO (CEMSA ¾). DIFERENCIAS FUNCIONALES ENTRE HOJAS Y TALLOS**

Aragón, Carlos E\*, M. Escalona, I. Capote, D. Pina, I. Cejas, R. Rodríguez, M.J. Cañal, J. Sandoval, S. Roels, P. Debergh, J. González-Olmedo. \* Autor para correspondencia.

Centro de Bioplantas. Carretera a Morón km 9 ½. UNICA. Ciego de Ávila. Cuba.

## **RESUMEN**

La propagación del plátano (CEMSA ¾) en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) presenta una serie de ventajas ya que aumenta el número de plantas en cortos periodos de tiempo con alta estabilidad genética. El crecimiento de las mismas en los BIT y ulterior aclimatación transcurre a través de cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que permiten un uso más eficaz del medio interno. La investigación se desarrolló con el objetivo de mejorar el protocolo de propagación *in vitro* en BIT de plantas de plátano (CEMSA ¾) y aumentar el conocimiento bioquímico y fisiológico en estos sistemas y durante la posterior aclimatación. Los experimentos se realizaron en plantas provenientes de BIT y durante la aclimatación. Se caracterizó la fisiológica y el metabolismo del carbono. La fase de aclimatación quedó reducida a cinco semanas. Las altas exposiciones de luz desarrollaron mayor actividad PQ con respecto al control de condiciones ambientales (1.4 veces), lo cual durante los primeros días de la aclimatación puede agotar las reservas almacenadas por las plantas. La enzima FEPC aumentó su actividad 1.6 veces en altas condiciones de luz y CO<sub>2</sub>. El almidón constituyó la fundamental fuente de azúcar de reserva con 340 veces mayor cantidad que la sacarosa. Estas condiciones posibilitaron la recuperación más rápida de la cantidad de almidón en los tallos al final de la aclimatación (2.74 veces), lo que facilitó la mejor calidad de plantas con un 99.8 % de supervivencia. Además las condiciones en los BIT le confirieron a las plantas de plátano un mayor desarrollo funcional en cuanto a altura, expansión foliar, calidad de raíces, masa fresca y masa seca, se favoreció un balance compensado de las enzimas del metabolismo del carbono favorable al anabolismo y una mejor movilización de almidón de reserva en los tallos durante la aclimatación.

Palabras clave: aclimatación, almidón, biorreactores de inmersión temporal

## **ABSTRACT**

The micro propagation of plantain plants (CEMSA ¾) in Temporary Immersion Bioreactors (TIB) has a lot of advances because of the multiplication rate and genetic stability is increases. During the transition of the plants from *in vitro* conditions to *ex vitro* environmental atmospheric is better with metabolic function induced by TIB. The present research were carried out in order to get a better micro propagation plantain system and to know the real metabolic and physiological changes of plants in TIB and during the posterior acclimatization phase. The plant materials was plantain plants during the elongation phase in TIB and during the posterior acclimatization. The metabolically and physiological behaviour were described through phosphoenol pyruvate carboxylase (PEPC) and pyruvate kinase (PK) activities. The light intensity induces the PK activity (1.4 times) that can consume the carbohydrates storage reserves during the first days of the acclimatization phase. In other hand the PEPC activity increases too at 1.6 times by the high exposition to light and CO<sub>2</sub> concentration. These environmental conditions permit the starch accumulation in the plantain, 340 times higher than sucrose and 2.74 times in stem compared with plantain leaves. The survival rate in the acclimatization reaches at 99.8 %. The plant high, foliar expansion, rooting process, fresh weigh and dry matter weigh. The most important effects were the induction of anabolic pathways and the rapid recuperation of starch concentration in stem at 28 days of the acclimation phase.

Key words: acclimatization, starch, Temporary Immersion Bioreactors

# **EVALUACIÓN EN INVERNADERO DE LA RESISTENCIA AL RAYADO NEGRO DE LA HOJA EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *MUSA***

Michel Leiva Mora\*, Yelenys Alvarado Capó, Mayra Acosta Suárez, Mileydi Cruz Martín, Berkis Roque, Rafael Gómez Kosky, Borys Chong, Idalmis Bermúdez, Maritza Reyes. \*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.

## **RESUMEN**

La evaluación temprana de la resistencia como herramienta en los programas de mejoramiento genético de *Musa* sp frente a *Mycosphaerella fijiensis*, requiere de procedimientos que permitan diferenciar cultivares resistentes y susceptibles. El presente trabajo tuvo como objetivo principal, evaluar la respuesta de varias líneas transgénicas de *Musa* spp frente a *M.fijiensis* en comparación con los cultivares controles Grande naine, Navolean y FHIA-18. Se utilizó una suspensión micelial la cual fue aplicada mediante un pincel a la superficie adaxial de las primeras 3 hojas abiertas de plantas aclimatizadas durante 12 semanas, utilizando gelatina al 1% como adherente. Se obtuvieron síntomas uniformes y homogéneos en las hojas inoculadas de todos las líneas de los cultivares inoculados. Se lograron observar diferencias entre la respuesta de varias líneas transgénicas y sus respectivos controles, siendo estos últimos los más afectados. Algunas líneas del cv Grande naine en la evaluación final tuvieron un mejor comportamiento que el cv parcialmente resistente FHIA-18. Los resultados de este trabajo constituyen la primera aplicación de la evaluación temprana de líneas transgénicas de *Musa* spp frente a *M. fijiensis*.

Palabras clave: líneas transgénicas, *Musa* spp, selección temprana

## **GREENHOUSE EVALUATION OF MUSA TRANSGENIC PLANTS FOR ITS RESISTANCE TO BLACK LEAF STREAK**

### **ABSTRACT**

Early screening to differentiate *Musa* cultivars respect Black leaf streak is basic for assist *Musa* breeding programs. The aim of the present work was to evaluate the response of *Musa* transgenic lines of *Musa* spp to *M.fijiensis* in comparison to Grande naine, Navolean y FHIA-18 not transgenic controls. Mycelial suspension was applied by brushing the 3 first open leaves by abaxial leaf surface of plants acclimatized during 12 week, using gelatin 1% as adherent. Homogeneous symptoms were obtained in the inoculated leaves of *Musa* transgenic lines and controls. It was possible to differentiate the reaction of some transgenic *Musa* lines respect their controls. Controls were more affected than transgenic lines in most of case. Some Grande naine transgenic lines had less symptoms at the last evaluation than the partial resistance cultivar FHIA-18. These results are the first application of early screening in Greenhouse to differentiate *Musa* transgenic lines respect their response to *M. fijiensis*.

Keywords: Transgenic lines, *Musa* spp, Early screening

# CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE SOMACLONES EN EL GÉNERO *MUSA*

Maria Isabel Román<sup>1\*</sup>, Clara González<sup>2</sup>, Xonia Xiqués<sup>2</sup>, , Miguel Hernández<sup>1</sup>, Lianet González<sup>1</sup>, Teresa Ramírez<sup>1</sup>, Francisco Dueñas<sup>2</sup>, Maruchi Alonso<sup>2</sup>, Marlyn Valdés<sup>2</sup>, Alejandro Rojas<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo 6, Sto. Dgo., Villa Clara, CP 53000, Cuba. e-mail: [roman@fbio.uh.cu](mailto:roman@fbio.uh.cu)

<sup>2</sup>Facultad de Biología Universidad de la Habana

## RESUMEN

En Cuba en el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) se han realizado numerosos estudios de detección de la variabilidad genética en variantes somaclonales y clones donantes empleando marcadores morfoagronómicos, citogenéticos, genético-bioquímicos y moleculares. En los clones de bananos 'SH-3436' y la variante somaclonal SH-3436L-9, el clon 'FHIA 18' y las variantes somaclonales S1, S2, S3, S4, S7, S8, Sr, en los clones de plátanos 'Saba' y el Somaclon de Saba, el clon FHIA 21 y las variantes 1 y 2. De acuerdo a la evaluación morfoagronómica se pudo establecer que los somaclones aventajaron a los clones donantes en las variables relacionadas con las componentes del rendimiento. El estudio citogenético del material analizado mostró para los bananos la presencia en los somaclones S1, S2, S3, S4 y Sr de  $2n=3x=33$  cromosomas; en el somaclon S8 y SH 3436 L-9 se mantuvo el número cromosómico de  $2n=4x=44$  de sus clones donantes 'FHIA 18' y SH 3436. El somaclon S7 presentó un mosaico cromosómico, pues se detectaron células con  $2n=2x=22$  y células con  $2n=3x=33$  cromosomas, respectivamente.. Para los plátanos pudo observarse que sólo el somaclon 1 mantuvo el número de cromosomas de  $2n=4x=44$  de su clon donante 'FHIA 21' y en el somaclon 2 se determinó la presencia de células con  $2n=3x=33$  cromosomas, para Saba y su Somaclon con  $2n=4x=44$  cromosomas, se pudo comprobar en algunas de las variantes somaclonales fluctuaciones en el número cromosómico de la planta que le dio origen. Los resultados obtenidos en los sistemas isoenzimáticos empleados en este estudio han revelado diferencias entre los clones donantes y sus somaclones para algunos sistemas y bandas propias que denotan las diferencias en esos materiales. Existen bandas que identifican a los bananos y a los plátanos, se observa que en el material tetraploide hay un mayor número de bandas. Se empleó un marcador de ADN ISTR (Repeticiones de Secuencias Inversas Marcadas) el que permitió la diferenciación de los clones donantes y sus variantes somaclonales. La combinación F3/B5A permitió diferenciar al clon donante de bananos y sus variantes y la combinación F2/B2B diferenció al clon donante y sus variantes. Los estudios realizados demuestran la existencia de nuevos materiales que pueden ser incluidos en la colección de bananos y plátanos (*Musa spp*) de nuestro país.

Palabras clave: citogenéticos, sistemas isoenzimáticos, variabilidad genética



# **CRIOCONSERVACIÓN DE SUSPENSIONES EMBRIOGÉNICAS DE NAVOLEAN (*MUSA AAB*)**

Leyanis García Águila<sup>1\*</sup>, Rafael Gómez Kosky<sup>1</sup>, \*Jorge López<sup>2</sup>, Boris Chong<sup>1</sup>, Maritza Reyes<sup>1</sup>, Marisol Freire<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado<sup>1</sup>, Marisol Tejeda<sup>1</sup>, Laisyn Posada<sup>1</sup>, Jorge Luis Gallardo<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>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: [leyanis02@yahoo.es](mailto:leyanis02@yahoo.es)

<sup>2</sup>INIVIT

## **RESUMEN**

Con el objetivo de conservar suspensiones celulares embriogénicas de plátano cultivar Navolean se utilizó el método de crioconservación. Para ello, se evaluó la influencia del precultivo con alta concentración de sacarosa y la crioprotección del Dimetilsulfóxido (DMSO), sobre la vitalidad de suspensiones celulares embriogénicas crioconservadas. El precultivo con alta concentración de sacarosa durante 24 horas afectó considerablemente la vitalidad de los agregados celulares después de dos semanas en nitrógeno líquido. Los tratamientos no precultivados con sacarosa y crioprotegidos con concentraciones de 10 y 15% de DMSO mostraron los mejores porcentajes de vitalidad de los agregados celulares (96.2 y 95.2 %). Después de 15 días de cultivo en medio de cultivo líquido se observó el oscurecimiento de las suspensiones pertenecientes a los tratamientos precultivados con alta concentración de sacarosa. El resto de las suspensiones celulares presentaron apariencia similar al control no crioconservado.

Palabras clave: crioconservación, Navolean, nitrógeno líquido suspensiones celulares embriogénicas

Key words: cryopreservation, Navolean, embryogenic cells suspension, liquid nitrogen

# **CULTIVO DE FLORES MASCULINAS INMADURAS DIRECTAMENTE EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES DEL CULTIVAR HÍBRIDO 'FHIA 21' (*MUSA* AABB)**

Leyanis García Águila\*, Rafael Gómez Kosky, Boris Chong, Maritza Reyes, Marisol Freire, Yelenys Alvarado, Marisol Tejeda, Laisyn Posada, Jorge Gallardo y Justo Clavero. \*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 54830. e-mail. [legarcia@ibp.uclv.edu.cu](mailto:legarcia@ibp.uclv.edu.cu), [leyanis02@yahoo.es](mailto:leyanis02@yahoo.es)

## **RESUMEN**

Con el objetivo de establecer suspensiones celulares del cultivar híbrido FHIA 21 se colocaron flores masculinas inmaduras en medio de cultivo líquido. Para ello se establecieron las condiciones para la colecta de la inflorescencia masculina y el control de la oxidación fenólica de las flores. Se colectaron inflorescencias masculinas después de emitidas las 10 primeras brácteas, de la 10 a la 20 y de la 20 a la 30. Las flores extraídas se sumergieron en una gota de solución de ácido cítrico. Se estudiaron diferentes concentraciones del mismo (50, 100 y 200 mg/l) para evaluar su efecto sobre el control de la oxidación fenólica de las flores. Se comprobó que el estado de desarrollo de la inflorescencia masculina (medida a partir del número de brácteas emitidas después de la última mano) influyó sobre el comportamiento morfológico de las flores masculinas inmaduras en medio de cultivo líquido y, por consiguiente, en el establecimiento de las suspensiones celulares. La colecta de la inflorescencia masculina debe realizarse después de emitidas las primeras 10 brácteas para obtener mayor formación de estructuras globulares de color amarillo a partir de las flores. Estas estructuras liberaron pequeños agregados de células meristemáticas de citoplasma denso y rico en gránulos de almidón. La oxidación fenólica de las flores fue atenuada con el empleo de soluciones de ácido cítrico entre 100 y 200 mg/l, en el momento su la extracción.

Palabras clave: embriogénesis somática, *Musa*, oxidación fenólica

Key words: embryogenic somatic, fenolica oxidation, *Musa*

## **EMPLEO DEL BIOSTAN EN LA FASE DE MULTIPLICACION *IN VITRO* DEL PLATANO, CV. FHIA-18 GRUPO AAAB**

Maugly Cabañas\*; AntonioTorres; Eduardo H. Ardisana; Milagros Ginebra. \*Autor para correspondencia.

Universidad Agraria de la Habana. Carretera a Tapaste km 23 1/2 . Autopista Nacional, San José de las Lajas. Habana Cuba.

### **RESUMEN**

Los reguladores del crecimiento son utilizados en la gran mayoría de los protocolos de micropropagación existentes en la biotecnología vegetal; sin embargo su empleo constituye generalmente un brusco incremento en el costo de dicha técnica. En nuestro laboratorio se desarrolló un experimento en el que se añadieron concentraciones de 1, 3 y 5 mg de Biostan al medio de cultivo con el objetivo de estudiar su efecto como posible sustituto o potenciador de las hormonas tradicionalmente empleadas (AIA y 6-BAP) y el efecto fisiológico de este bioestimulante sobre los explantes del plátano cv. FHIA-18 en la fase de multiplicación *in vitro*. De manera general se observa un efecto favorable del bioproducto en el crecimiento y calidad de los explantes, alcanzándose los mejores resultados en los tratamientos que contenían Biostan sin las hormonas. Este resultado sugiere la posibilidad de la sustitución de las hormonas empleadas tradicionalmente; constituyendo una valiosa alternativa en las Biofábricas del país.

Palabras clave: bioestimulante, micropropagación, reguladores del crecimiento



# TALLER INTERACCIÓN PLANTA PATÓGENO

# **INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO A NIVEL MOLECULAR: ASPECTOS BÁSICOS PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO**

Ramón Santos Bermúdez

Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Avila. Carr. a Morón km 9. Ciego de Avila. CP 69450. Cuba.  
email: [rsantos@bioplantas.cu](mailto:rsantos@bioplantas.cu), [www.bioplantas.cu](http://www.bioplantas.cu)

## **RESUMEN**

Las plantas poseen múltiples mecanismos para protegerse por si mismas frente al ataque de patógenos. Mecanismos específicos de reconocimiento del patógeno, gobernados por productos de genes de resistencia que interactúan con productos de genes de avirulencia del patógeno, usualmente conduce a una respuesta hipersensitiva en el sitio de invasión del patógeno, manteniendo al patógeno aislado del resto de la planta y dispara una secuencia de eventos que involucra diferentes sendas metabólicas en plantas. En la actualidad, se han conducido varios proyectos de investigación relacionados con el aislamiento de genes de resistencia y de avirulencia, así como estudios de diferentes sendas de traducción de señales. Nuestro tema estará focalizado en las interacciones planta-hongo a nivel bioquímico y molecular, varias estrategias desarrolladas por una masa crítica de investigadores y algunos resultados que proporcionan una mejor comprensión de las interacciones planta-patógeno para el mejoramiento genético, con énfasis en los principales resultados de los proyectos de investigación desarrollados en el Centro de Bioplantas y particularmente en el aislamiento de metabolitos microbianos útiles para desarrollar estrategias de mejoramiento genético.

Palabras clave: genes de avirulencia, genes de resistencia, metabolitos microbianos, traducción de señales

## **MOLECULAR PLANT-PATHOGEN INTERACTION: BASIC ASPECTS FOR PLANT BREEDING**

### **ABSTRACT**

Plants possess multiple mechanisms to protect themselves against pathogen attack. Specific pathogen recognition mechanisms, governed by resistance gene products that interact with matching avirulence gene products from the pathogen, usually lead to a hypersensitive response at the site of pathogen invasion, keeping the pathogen isolated from the rest of the plant and trigger a sequence of events involving different metabolic pathway in plant. Nowadays, various research project has been carry out related with the isolation of both resistance and avirulence genes as well as the study of different signal traduction pathway. Our topic focus on plant-fungus interaction at biochemical and molecular level, several approaches developed by a critical mass of researchers and some results to provide a better understanding of basic host-pathogen interaction for plant breeding will be reviewed with emphasis on the main results of projects developed at Centro de Bioplantas and particularly about the isolation of microbial metabolites usefull for plant breeding strategies.

Key words: avirulence gene, resistance gene, microbial metabolites, signal traduction

# ESTUDIO MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN NO COMPATIBLE ENTRE *PUCCINIA MELANOCEPHA* H. & P. SYD. Y *SACCHARUM* SP.

María I. Oloriz<sup>1\*</sup>, Luis Rojas<sup>1</sup>, Víctor Gil<sup>2</sup>, Aminaél Sánchez<sup>1</sup>, Elio Jiménez<sup>1</sup> y Orelvis Portal<sup>1</sup>.

\*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54830. e-mail: [maria@ibp.co.cu](mailto:maria@ibp.co.cu)

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Agropecuarias Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54830.

## RESUMEN

La roya de la caña de azúcar es una de las enfermedades que más daños ha ocasionado en la producción azucarera mundial. Las pérdidas estimadas en los rendimientos dependen de las condiciones medioambientales, en Australia se estimaron entre un 10 y 20% y en Estados Unidos entre 20-40%. En nuestro país al hacer su entrada en 1978, las pérdidas ascendieron a 1 000 000 T de azúcar. El único modo de control de este patógeno biotrófico, a escala de producción, es el empleo de variedades resistentes. Con el objetivo de conocer las bases moleculares que rigen la interacción no compatible entre *P. melanocephala* y un mutante de caña de azúcar var. B4362 (IBP 8518), se aislaron los genes diferencialmente expresados por la planta durante los eventos de la respuesta defensiva. Para ello se realizó una hibridación sustractiva por supresión generándose una biblioteca con los genes diferencialmente expresados por el mutante IBP 8518 durante los primeros 7 días de interacción con el patógeno. Los fragmentos de genes aislados fueron secuenciados y comparados con bases de datos mediante el algoritmo BLAST disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, se consideró  $E=e^{-10^{-3}}$  como valor de corte de significación. Según estos resultados fueron identificadas y agrupadas estas secuencias en los diferentes niveles de la respuesta de defensa inducida, así como secuencias que supuestamente regulan la duración y extensión de esta respuesta en mutante IBP 8518. Otro grupo de las secuencias aisladas no fue posible su identificación por carecer de homología en base de datos o en otros casos ser homólogas genes inducidos por estrés pero sin función definida.

Palabras clave: caña de azúcar, enfermedades, interacción planta patógeno, roya

# **INTERACCIÓN *SOLANUM TUBEROSUM*-*ALTERNARIA SOLANI*. APLICACIONES Y RESULTADOS EN EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PAPA EN EL IBP**

Novisel Veitía Rodríguez\*, Lourdes García Rodríguez, Idalmis Bermúdez Caraballos, Mayra Acosta Suárez, Pedro Orellana Pérez, Yenny Padrón Montesinos, Michel Leiva Mora, Carlos Romero Quintana y Niurka Hernández. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de La Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830. e-mail: [novisel@ibp.co.cu](mailto:novisel@ibp.co.cu), [noviselvr@yahoo.es](mailto:noviselvr@yahoo.es)

## **RESUMEN**

El tizón temprano, causado por el hongo *Alternaria solani* (Sor.), es una de las principales enfermedades fúngicas de la papa en climas cálidos. Este patógeno puede provocar daños foliares severos al cultivo tanto por la colonización del tejido como a través de la producción de fitotoxinas. Basados en el modelo de interacción anteriormente mencionado, en el presente trabajo se realizó la caracterización de aislados monospóricos de *Alternaria solani* (Sor.). Se estudiaron diferentes medios de cultivo para la producción de fitotoxinas, se determinó el tiempo óptimo de incubación del hongo, se estableció el método de aplicación del filtrado de cultivo sobre plantas cultivadas *in vitro* y se determinó la concentración óptima del filtrado de cultivo para la selección *in vitro* de callos y plantas procedentes del cultivo de tejidos. Posteriormente, se realizó la selección masiva del material vegetal con variabilidad inducida y se evaluó el comportamiento frente al tizón temprano de los genotipos seleccionados *in vitro* en casa de cultivo y campo. Como resultado se logró obtener genotipos que han presentado niveles de afectación inferiores a la variedad original "Desirée" frente al tizón temprano durante varios ciclos de evaluación en campo.

Palabras clave: callos, fitotoxinas, selección *in vitro*

# IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF GENES INVOLVED IN PLANT RESISTANCE TO BIOTIC AND ABIOTIC FACTORS USING FUNCTIONAL GENOMIC TOOLS

Osmany Chacón<sup>1</sup>; Roxana Portieles<sup>2</sup>; Ingrid Hernández<sup>2</sup>; Carlos J. Borroto<sup>2</sup>; Yunior López<sup>2</sup>; Mayra Rodríguez<sup>2</sup>; Eduardo Canales<sup>2</sup>; Orlando Borrás - Hidalgo<sup>2\*</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera Tumbadero km 8, San Antonio de los Baños, Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Center for Genetic Engineering and Biotechnology. P. O. Box 6162, 10600 La Habana, Cuba.  
e-mail: [orlando.borras@cigb.edu.cu](mailto:orlando.borras@cigb.edu.cu)

## ABSTRACT

Modern-day plants are products of eons of evolution from primal living organisms in response to abiotic and biotic environmental changes. Plants, in nature, are generally resistant to most pathogens. The ability of a pathogen to cause disease in a host plant is usually the exception, not the rule. The interactions between plants and pathogens are specific, complex and dynamic. On the other hand, in the natural environment, plants often grow under unfavorable conditions, such as drought, salinity, chilling, freezing, high temperature, flooding, or strong light. These conditions are known collectively as abiotic stresses, and any of them can delay growth and development, reduce productivity and, in extreme cases, cause the plant to die. Our group carried out several strategies to the identification, characterization and functional analysis of plant genes involved in trigger, signalling and response to biotic and abiotic factors. We use suppression subtractive hybridization (SSH) and cDNA - AFLP to generate cDNA libraries highly enriched for sequences up - regulated and transcript derived fragment (TDFs) up and down regulated. Moreover, the clones are sequenced and compared to sequences international databases using BLAST searches. The expression of genes is investigated using Northern analyses and RT - PCR under several conditions. On the other hand, candidate genes are cloned either into a virus vector for virus induced gene silencing (VIGS) or gain function vector to detect function.



# INTERACCIÓN *MUSA- MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*. AVANCES Y APLICACIONES EN EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE *MUSA* EN EL IBP

Yelenys Alvarado\*, Michel Leiva, Mayra Acosta, Mileidy Cruz, Rafael Gómez Kosky, Idalmis Bermúdez, Lourdes García, Pedro Orellana, Jeny Padrón, Maritza Reyes, Boris Chong, Miladys Mendoza, Orelvis Portal, Aminaél Sánchez, Bárbara Ocaña, 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 [yelenys05@ibp.co.cu](mailto:yelenys05@ibp.co.cu)

## RESUMEN

El patosistema *Musa-Mycosphaerella fijiensis* ha sido estudiado por numerosos autores con el propósito de encontrar vías y herramientas para el control de la enfermedad conocida como Sigatoka negra que causa daños severos tanto a plátanos como a bananos. El control químico y la obtención de plantas resistentes se encuentran entre las principales alternativas de solución. El programa de mejoramiento genético del IBP comenzó en la década del 90 (siglo XX) con la aplicación de radiaciones Gamma al material vegetal obtenido por cultivo *in vitro*, la regeneración y plantación en campo de más de 10 000 plantas, sin resultados satisfactorios en la búsqueda de mutantes resistentes. Posteriormente se han continuado las investigaciones con el aislamiento y caracterización de cepas de *Mycosphaerella fijiensis*, el establecimiento de protocolos de trabajo para la selección *in vitro* con el uso del filtrado de cultivo del patógeno, la evaluación de la respuesta de diferentes cultivares a la inoculación artificial con diferentes estructuras del patógeno, la localización de genes de interés del patógeno y la planta durante la interacción. Entre los principales resultados se destacan la creación de una colección de aislados del patógeno de diferentes regiones del país, su caracterización y conservación a -80 °C, la creación de bibliotecas de ADN complementario (ADNc) en las cuales se han identificado genes del hongo y el desarrollo y aplicación de una metodología para la evaluación temprana de la resistencia al patógeno en casa de cultivo. Esta última ha sido aplicada con resultados satisfactorios en la evaluación de mutantes y plantas transgénicas, así como en la elaboración de las bibliotecas de ADNc. De igual forma se estandarizó una metodología para la transformación genética del patógeno con una construcción genética que porta el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP). Las herramientas de trabajo desarrolladas y su aplicación en el programa de mejoramiento genético de *Musa* contribuyen a la obtención de nuevos genotipos con resistencia a la enfermedad.

Palabras clave: inoculación artificial, bibliotecas de ADN complementario, Sigatoka negra, transformación

# USING *PIPER TUBERCULATUM* AS A MODEL SYSTEM TO IDENTIFY PUTATIVE GENES IMPLICATED IN *NECTRIA HAEMATOCOCCA F. SP. PIPERIS* RESISTANCE

Ilmarina Campos de Menezes<sup>1</sup>, Alessandra de Rezende Ramos<sup>2</sup>, Maria de Lourdes Reis Duarte<sup>1</sup>, Sylvain Darnet<sup>2</sup>, Cláudia Regina Batista de Souza<sup>2\*</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Caixa Postal 48, 66095-100 Belém, Pará, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas/Departamento de Genética, Rua Augusto Corrêa, número 01, Guamá, 66075-110 - Belém, Pará, Brasil. e-mail: [bsouza@ufpa.br](mailto:bsouza@ufpa.br)

## ABSTRACT

The Amazon Brazilian state of Pará is one the major world's producer of pepper, *Piper nigrum* (65.800 Ton, IBGE 2004). The cultivated area is about 22.000 hectares and sustains thousand of small farmer families. The last years, instead a constant increase of cultivated area, the production is decreasing due to epidemic propagation of *Nectria haematococca f. sp. piperis*. In the aim to obtain resistant *Piper nigrum* cultivar, our study is focalized on host-pathogen molecular interactions and plant defenses during the fungus infection. Our new study model is constituted by the pathogen *N. haematococca f. sp. piperis* and the host *Piper tuberculatum*. This *Piper* specie is endemical of the amazon region and tolerant to the pathogen infection. To identify specific genes implicated in the pathogen resistance, leafs and roots total mRNA are extracted from control plants and infected plants, 7 and 15 days after inoculation. This period represents the maximum fungus accumulation and mycotoxins secretion. The gene expression comparison is based on a subtracted cDNA library screening approach. The result of this screening will be define genes expression pattern, specific of the pathogen resistance. Northern blot and real-time PCR quantification experiments will confirm an implication of the identified genes in the process of plant defense in *P. tuberculatum* resistance.

Key words: pepper, fusarium, pathogen, resistance, subtractive hybridization

# CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE ADNC A PARTIR DE HOJAS DE LOS CULTIVARES DE BANANO CALCUTTA 4 Y NIYARMA YIK INOCULADOS CON *PSEUDOCERCOSPORA FIJIENSIS* MORELET

Milady F. Mendoza Rodríguez<sup>1\*</sup>, Elio Jiménez<sup>1</sup>, Frank Maier<sup>2</sup>, Wilhelm Schäfer<sup>2</sup>, Idalmis Bermúdez<sup>1</sup>, Yennys Padrón<sup>1</sup>, Michel Leyva<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado<sup>1</sup>, Mayra Acosta<sup>1</sup> y Orelvis Portal<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> 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: [milady@ibp.co.cu](mailto:milady@ibp.co.cu), [milady04@yahoo.es](mailto:milady04@yahoo.es)

<sup>2</sup> University of Hamburg. Center of Applied Molecular Biology of Plants. Institute of General Botany and Botanical Garden. Germany.

## RESUMEN

Los estudios moleculares de la interacción planta-patógeno, son de gran importancia para la identificación de genes relacionados tanto con el proceso patogénico, como con la defensa de la planta. Estos genes podrán ser utilizados en los programas de mejoramiento genético, para la obtención de plantas con resistencia a enfermedades. El objetivo de este trabajo fue la construcción de bibliotecas de ADN complementario (ADNc), a partir de dos cultivares de banano (uno resistente: Calcutta 4 y otro susceptible: Niyarma Yik) a la enfermedad de la Sigatoka negra, infectados artificialmente con el aislado de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet CCIBP-Pf1. La síntesis de la primera cadena de ADNc, fue a partir de 1 µg de ARN total con el oligonucleótido dT y la calidad de la misma fue comprobada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-del inglés Polimerase chain reaction), con los oligonucleótidos específicos para el gen del *citocromo b*. La síntesis de la segunda cadena de ADNc, fue realizada por marcaje homopolimérico con la combinación dCBamH I + dTNot I. Fueron obtenidas cuatro bibliotecas de ADNc a partir de plantas, en dos períodos de tiempo después de la infección con el patógeno. Fue realizada la secuenciación nucleotídica de 41 clones de una de las bibliotecas de Niyarma Yik y la información obtenida de las mismas se corresponde con genes relacionados con hongos.

Palabras clave: Interacción Banano-*Mycosphaerella fijiensis*, *Musa* spp., Sigatoka negra

## CONSTRUCTION OF CDNA LIBRARIES FROM *PSEUDOCERCOSPORA FIJIENSIS* MORELET INFECTED LEAVES OF THE CULTIVARS CALCUTTA 4 AND NIYARMA YIK

### ABSTRACT

Molecular studies of plant-pathogen interaction are very important for the identification of gene (s) related with the pathogenic process, as well as with the plant resistance. These gene (s) could be use for the genetic improvement programs in order to obtain resistant cultivars. The aim of this work was to construct complementary DNA (cDNA) libraries from infected leaves with *Pseudocercospora fijiensis* CCIBP-Pf1 isolated of two banana cultivars (a resistant one Calcutta4 and another one susceptible Niyarma Yik). First-strand cDNA synthesis, was made beginning with one microgram of total RNA by using oligo dT primer and cDNA quality was checked by Polimerase chain reaction (PCR) with *cytochrome b* specific primers. Second-strand cDNA synthesis was performed by using the homopolymeric tailing with dC-BamH I + dT-Not I primer combination. Four cDNA libraries of infected plants at different times of infection with the pathogen were obtained. Forty one clones of one of the libraries of Niyarma Yik were sequenced and the obtained sequences correspond with genes related to fungi.

Key words: Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interaction, *Musa* spp., Black Sigatoka

# CONSTRUCCIÓN DE UNA BILIOTECA DE ADNC COMPLETA A PARTIR DE PLANTAS DE 'GRANDE NAINE' INFECTADAS CON *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*, EN UN ESTADIO TARDÍO DE DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

Orelvis Portal<sup>1\*</sup>, Aminaél Sánchez<sup>1</sup>, Mayra Acosta<sup>1</sup>, Milady Mendoza<sup>1</sup>, Luis Rojas<sup>1</sup>, Ana Luisa Darías<sup>1</sup>, Barbara Ocaña, Berkis Roque<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado<sup>1</sup>, Monica Höfte<sup>2</sup> y Elio Jiménez<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> 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: [oportal@ibp.co.cu](mailto:oportal@ibp.co.cu); [villaport@gmail.com](mailto:villaport@gmail.com)

<sup>2</sup> Facultad de Bioingeniería. Universidad de Gante. Coupure Links 653, Gante, Bélgica.

## RESUMEN

*Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamórfo *Pseudocercospora fijiensis*) es el agente causal de la Sigatoka negra. Esta enfermedad se ha expandido por más de 20 años y actualmente es reportada en muchas partes del mundo. La Sigatoka negra es considerada la enfermedad más devastadora en bananos y plátanos. *M. fijiensis* produce síntomas en las hojas las cuales, en cultivares susceptibles, contribuyen al colapso total de la planta. Para un mejor entendimiento de la interacción hospedante-patógeno cada vez se hacen más necesarios la realización de estudios moleculares. El objetivo de este trabajo fue la construcción de una biblioteca de ADNc completa a partir de hojas del cultivar susceptible 'Grande Naine' infectado con *M. fijiensis*. Para la inoculación fueron utilizadas plantas de banano 'Grande Naine' de 20 cm de altura y cuatro hojas activas. La infección fue realizada siguiendo una metodología desarrollada en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (Cuba), en la cual, el aislado CCIBP-Pf-83, caracterizado como altamente patogénico fue utilizado como inóculo. El ARN fue purificado a partir de hojas infectadas después de 45-55 días de infección. Se obtuvo una biblioteca de ADNc completa usando la metodología no radiactiva del sistema comercial CloneMiner (Invitrogen). Se determinó que el título promedio de la biblioteca de ADNc fue de  $8.1 \times 10^4$  cfu ml<sup>-1</sup> y el total de unidades formadoras de colonias fue de  $9.7 \times 10^5$  cfu. EL análisis por PCR de 30 colonias seleccionadas al azar mostró que el tamaño promedio de los insertos fue de 1.37 kb, oscilando desde 0.4 kb hasta 4.0 kb. El análisis de secuencia de 22 de estos insertos evidenció una alta homología entre 16 de dichas secuencias y las registradas en bases de datos, aunque no se pudo adjudicar función alguna en cuatro casos, donde las secuencias de los seis insertos restantes mostraron una baja homología con las existentes en bases de datos. EL resultado del análisis de secuencia de los insertos es presentado en detalles.

Palabras clave: bananos, EST, genómica, hongos, Sigatoka negra

## CONSTRUCTION OF A FULL-LENGTH CDNA LIBRARY FROM 'GRANDE NAINE' INFECTED PLANTS WITH *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* AT THE LATE STAGE OF THE DISEASE DEVELOPMENT

### ABSTRACT

*Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorph *Pseudocercospora fijiensis*) is the causal agent of the Black Leaf Streak Disease (BLSD) or black Sigatoka of bananas. The disease has been spreading for more than 20 years and it is reported in most parts of the world. Black Sigatoka is considered as the major devastating disease of bananas and plantains. *M. fijiensis* induces foliar leaf streaks which, in highly susceptible cultivars, lead to the total collapse of the plant. Molecular studies are necessary for a better understanding of host-pathogen interactions. In the present work, we have attempted to construct a full-length cDNA library from leaves of a susceptible banana cultivar 'Grande Naine' infected with *M. fijiensis*. 'Grande Naine' banana plants, 20 cm height and four active leaves, were used for artificial inoculation. CCIBP-Pf-83 isolate, characterized as highly pathogenic, was used as inoculum for the infection process, which was conducted following a methodology developed at the Institute of Plant Biotechnology (Cuba). Total RNA was isolated from infected leaves 45-55 days post inoculation. Full-length cDNA library was obtained using the CloneMiner non-radiolabel cDNA construction methodology (Invitrogen). After plating assay, we concluded that the average titer of the cDNA library was  $8.1 \times 10^4$  cfu ml<sup>-1</sup> and the total number of colony-forming units was  $9.7 \times 10^5$  cfu.

Colony PCR analysis of 30 random clones showed that average insert size is approximately 1.37 kb, in a range from 0.4 kb to 4.0 kb. Sequence analysis of 22 of these clones indicated high homology between 16 of them and the sequences registered in the database, although not function were assigned in four cases, whereas the six remaining showed low homology with those in the database. The results of EST analysis will be presented.

Key words: banana, black Sigatoka, EST, fungi, genomics

# DESARROLLO DE UN NOVEDOSO SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA PARA *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET

Orelvis Portal<sup>1\*</sup>, Mileidy Cruz<sup>1</sup>, Frank J. Maier<sup>2</sup>, Mayra Acosta<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado<sup>1</sup>, Wilhelm Schäfer<sup>2</sup> y Elio Jiménez<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 51/2 Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830. e-mail: [oport@ibp.uclv.edu.cu](mailto:oport@ibp.uclv.edu.cu), [villaport@yahoo.com](mailto:villaport@yahoo.com)

<sup>2</sup> Center of Applied Molecular Biology to the Plants, General Institute of Botany. University of Hamburg. Germany.

## RESUMEN

El hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*) es el agente causal de la enfermedad foliar más destructiva de bananos y plátanos a nivel mundial, conocida como la Raya Negra de la Hoja o Sigatoka negra. Los estudios moleculares sobre la interacción hospedante-patógeno son necesarios para un mejor entendimiento de los procesos de patogénesis y la búsqueda de genes que puedan ser usados en la implementación de nuevos fungicidas para el control de este patógeno. En este trabajo se describe una metodología novedosa para la transformación genética para *M. fijiensis* que puede ser utilizada en estudios para la identificación de factores de virulencia y la caracterización de la patogenicidad en este hongo. Para los ensayos de transformación fue utilizado el aislado CCIBP-Pf-83, caracterizado como altamente patogénico y el plasmidio pIG-PAPA, que porta el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP). Los protoplastos fueron obtenidos a partir de una suspensión micelial tratada con una mezcla de las enzimas Driselasa y Celulasa Onuzuka R-10. La transformación se realizó siguiendo una nueva metodología en la cual se varió el procedimiento para la mezcla de los protoplastos con el ADN plasmídico, así como las condiciones y tiempos de incubación en comparación con un método anteriormente descrito en la literatura científica. Después de tres días en medio de cultivo de regeneración e incubación a 28 °C y oscuridad, las placas de Petri fueron recubiertas con medio de cultivo agar agua con higromicina B (*hygB*) para una concentración final de 20 µg mL<sup>-1</sup>. El 90 % de los mutantes de *M. fijiensis* analizados mostraron el fenotipo esperado de acuerdo con la expresión de la GFP. Se demostró, además, la funcionalidad del promotor *icl* de *Neurospora crassa* utilizado por primera vez en la transformación genética de *M. fijiensis*.

Palabras clave: hongos, PEG, protoplastos, REMI, Sigatoka negra

## DEVELOP OF A NOVEL SYSTEM FOR THE GENETIC TRANSFORMATION OF *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET

### ABSTRACT

The fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorph *Pseudocercospora fijiensis*) is the causal agent of the foliar disease more destructive of bananas and plantains at the world level, well-known as Black Leaf Streak Disease or black Sigatoka. The molecular studies on the interaction host-pathogen are necessary for a better knowledge of the processes of pathogenesis and the search of genes that can be used in the implementation of new fungicides for the control of this pathogen. In this work a novel methodology is described for the genetic transformation of *M. fijiensis* that can be used in studies for the identification of virulence factors and the characterization of the pathogenesis in this fungus. For the transformation assay the isolated CCIBP-Pf-83 was used, characterized as highly pathogenic and the plasmid pIG-PAPA, that carries the genes that encodes for the fluorescent green protein (GFP). The protoplasts were obtained starting from a micelial suspension tried with a mixture of the enzymes Driselasa and Celulasa Onuzuka R-10. The transformation was carried out following a new methodology, in which the procedure was varied for the mixture of the protoplasts with the plasmid DNA, as well as the conditions and times of incubation in comparison with the method described in the scientific literature. After three days in regeneration media culture and incubation at 28 °C and darkness, the Petri dishes were recovered with water agar media culture with hygromycin B (*hygB*) for a final concentration of 20 µg mL<sup>-1</sup>. Mutants of *M. fijiensis* were obtained, where ninety percent of the analyzed colonies showed the prospective phenotype of agreement with the expression of the GFP. The functionality of the *icl* promoter of *Neurospora crassa* used for the first time in the genetic transformation of *M. fijiensis* was also demonstrated.

Key words: black Sigatoka, fungi, PEG, protoplasts, REMI

# ENHANCED *IN VITRO* SPORULATION OF *PSEUDOCERCOSPORA FIJIENSIS* FOR ARTIFICIAL INOCULATION OF *MUSA* PLANTS

Michel Leiva Mora\*, Mayra Acosta Suárez, Yelenys Alvarado Capó, Mileidy Cruz Martín, Berkis Roque Morales. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Cuba. Carretera a Camajuaní Km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: [lmichel@ibp.uclv.edu.cu](mailto:lmichel@ibp.uclv.edu.cu)  
Fax: 53 (42) 281329, Tel : 281257.

## RESUMEN

La producción *in vitro* de conidios de *Pseudocercospora fijiensis* constituye una de las principales dificultades en los estudios en condiciones controladas que sobre este patógeno se efectúan. El presente trabajo tuvo como objetivo principal mejorar la esporulación de *P.fijiensis* así como caracterizar morfológica, cultural y patogénicamente la cepa CCIBP-39. Para inducir la esporulación de *P.fijiensis* se utilizaron nueve medios de cultivo sólido. A su vez se seleccionaron los cuatro mejores medios de cultivo (PDA, V8, Sabouraud dextrosa agar, Agar extracto de malta) para la esporulación en tubos. El mejor medio de cultivo fue seleccionado para estudiar la influencia de la temperatura de incubación en la producción de conidios. Para determinar la patogenicidad de la cepa se obtuvo una suspensión conidial la cual fue inoculada en plantas de 8 semanas de aclimatación de los cultivares gran enano y FHIA-18. Las colonias observadas fueron elevadas, velvéticas, con micelio estromático oscuro y compactas con colores verde olivo, rosado y gris. Se obtuvieron conidios del tipo *Pseudocercospora* en todos los medios de cultivos, aunque los medios Agar Papa Zanahoria y V-8 fueron los que mayor cantidad produjeron. La expresión de los síntomas en el cultivar Grande naine fue mucho más rápida que en el FHIA-18, en correspondencia con lo observado en condiciones naturales. Los resultados de este trabajo permitieron obtener *in vitro* numerosos conidios que pueden servir para evaluar en condiciones controladas el comportamiento de genotipos de interés en los programas de mejoramiento genético de *musa* spp.

Palabras clave: *Pseudocercospora fijiensis*, esporulación, Sigatoka negra, cultivo de banano, caracterización morfológica, hongos patógenos

## ABSTRACT

Conidia produced by *Pseudocercospora fijiensis* are one of the main structures for dissemination in natural condition. However, the production of them is a hazardous task. Enhanced sporulation, morphological and pathogenic characterization of *Pseudocercospora fijiensis* (CCIBP-39) strains were done in the present work. For *in vitro* conidia production on Petri dishes were used nine culture media. Conidia induction on assays tubes were done by selecting the best 4 culture media from Petri dishes and were included Dextrosa Sabouraud Agar, and Malt extract. The best culture medium was chosen for studying the influence of incubation temperatures and incubation time on conidia production. Five millilitres of sterile distilled water with Tween 80 at 0.05% were added and vortexed to remove conidia from each tubes. Eight-week-acclimatized plants from cultivars Grande naine (AAA) and FHIA-18 (AAAB) were used to determine host pathogenicity, inoculation was realized by brushing abaxial leaf surface. Cultural colonies characteristics were raised, velvety, dark stromatic mycelia and compact. Green, pink and grey colors were predominant on superficial mycelia. *Pseudocercospora* conidia types were produced on all cultures media. Potato Carrot Agar and V-8 showed the maximum values. The symptoms evolution on FHIA-18 were slower and it was not observed necrotic spot with dry centre of grey colour, while in Grande naine at 63<sup>th</sup> had necrosed all the inoculated leaves. This behaviour in both banana cultivars was in correspondence with symptoms evolution in natural conditions. By another hands, *in vitro* conidia production of *P.fijiensis* could mimic the natural infection process of this pathogen in controlled condition and with large amount of this structures, different banana cultivars could be evaluated onto *Musa* breeding programs.

Keywords: *Pseudocercospora fijiensis*, sporulation, Black leaf streak, Banana breeding Morphological Characteristics, Pathogen fungus

# EVALUACION DE LA RESISTENCIA DE *XYLELLA FASTIDIOSA* EN DIVERSOS GENOTIPOS DE CITRICOS UTILIZANDO PCR Y ELISA

Elena Paola González Jaimes<sup>\*1</sup>, Ester Wickert<sup>2</sup>, Paulo Sergio de Souza<sup>3</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Politécnico Colombiano JIC, Cra 48 N. 7-151 Medellín-Colombia. e-mail: [epgonzalez@elpoli.edu.co](mailto:epgonzalez@elpoli.edu.co)

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista/ FCAV, Campus de Jaboticabal, CEP 14884-900 Jaboticabal-SP, Brasil. e-mail: [ewickert@fcav.unesp.br](mailto:ewickert@fcav.unesp.br)

<sup>3</sup>APTA – Regional Nordeste Paulista, CEP 13730-972 Mococa-SP, Brasil. e-mail: [pas\\_souza@yahoo.com.br](mailto:pas_souza@yahoo.com.br)

## RESUMEN

La Clorosis Variegada de los Citricos (CVC), causada por la bacteria *Xylella fastidiosa*, es una de las enfermedades que más afecta la citricultura brasileña, con una incidencia de 43.28% en 2005. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar bajo condiciones de invernadero en la Estação Experimental de Bebedouro (EECB), 54 genotipos en relación a la resistencia a CVC y el efecto de los portainjertos en su respuesta a la inoculación de la bacteria. Los genotipos fueron introducidos por la EECB, Fundecitrus y CENARGEN. Adicionalmente se evaluó como testigo la variedad naranja Pera por su alta susceptibilidad. Se instalaron dos experimentos con cuatro repeticiones, el primero utilizando varios portainjertos y el segundo utilizando como portainjerto citrumelo Swingle. La inoculación de la bacteria sobre el portainjerto se hizo por medio de un injerto lateral de una rama de la última brotación de aprox. 4 cm, proveniente de una planta infectada naturalmente. La inoculación de la bacteria y el injerto de la copa se hicieron al mismo tiempo, a una altura aproximada de 10 cm injertando primero la rama infectada y un poco más arriba la yema del genotipo. La detección de la bacteria se hizo mediante observación visual de los síntomas, por la prueba de ELISA y por PCR. En total se encontraron 35 genótipos positivos en la prueba de PCR, 11 correspondieron al primer experimento y 24 al segundo, con una coincidencia de 9 genotipos en los dos experimentos. Del total de positivos 9 presentaron síntomas y 26 fueron asintomáticos. Los genótipos en los cuales se detectó la bacteria con la prueba de ELISA pero que su resultado no se confirmó con la PCR se considerarán como falsos positivos, dada la mayor sensibilidad de la prueba PCR. En 19 de los 55 genotipos evaluados no fue encontrado ningún indicio de la bacteria.

Palabras clave: CVC, inoculación por rama, bacteria

## *XYLELLA FASTIDIOSA* RESISTANCE EVALUATION IN DIVERSE CITRUS GENOTYPES USING PCR AND ELISA

### ABSTRACT

The Citrus Variegated Chlorosis (CVC), caused by the *Xylella fastidiosa* bacteria is one of the most important disease affecting the Brazilian citriculture, having in 2005 a 43.08% of incidence. The objective of these experiment carried out in the Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB) in greenhouse conditions, was the evaluation of the 54 citrus materials behavior introduced by the EECB, Fundecitrus and Cenargen, in relation with the CVC and the rootstock effect in the inoculation response. In addition a Pera orange was evaluated as susceptible. There was made two experiments with four replications, the plants were multiplied in the first experiment on several rootstock and in the second one on Swingle citrumelo; the grafting of the materials and the bacteria inoculation by grafting of disease stem were made at the same time. The plants were evaluated by symptoms presence, ELISA and PCR test. 35 were found positives in the PCR test, 11 from the first experiment and 24 from the second one, with a 9 coincidence genotypes among both experiments. From all positives 9 showing symptoms of the disease and 26 were asymptomatic. Instead, the materials where the bacteria was reported by the ELISA but not by the PCR test were grouped like false positives and do not were accepted as susceptible. In 19 genotypes there were not found any evidence of the bacteria.

Key words: CVC, grafting inoculation, bacteria



# EVALUACIÓN TEMPRANA DE LA RESPUESTA A SIGATOKA NEGRA CON EL EMPLEO DE SUSPENSIONES CONIDIALES DE *PSEUDOCERCOSPORA FIJIENSIS* (MORELET) DEIGHTON

Mayra Acosta Suárez\*, Yelenys Alvarado Capó, Mileidy Cruz Martín, Michel Leiva Mora y Berkis Roque Morales. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½ . Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail: [mayra01a@yahoo.es](mailto:mayra01a@yahoo.es), [yelenys05@ibp.co.cu](mailto:yelenys05@ibp.co.cu)

## RESUMEN

La evaluación temprana de la respuesta a la Sigatoka negra en los programas de mejoramiento genético de *Musa* spp frente a *Mycosphaerella fijiensis*, requiere de procedimientos que permitan diferenciar cultivares resistentes y susceptibles. Los objetivos de este trabajo fueron: evaluar diferentes medios de cultivo para la obtención de conidios de *Pseudocercospora fijiensis* así como la respuesta de dos genotipos de *Musa* mediante la inoculación artificial de suspensiones conidiales. Se utilizaron los medios de cultivo Agar Mycophil, Agar Papa y Dextrosa, Agar Dextrosa de Sabouraud, Agar V-8 modificado, Agar Extracto de Malta y Agar Papa Zanahoria los que fueron inoculados con una suspensión micelial del patógeno y se incubaron a 20°C y luz constante durante 10 días. La concentración de conidios se determinó en cámara de Neubauer por observación al microscopio óptico *Olympus*. Además, se inocularon 10 plantas de Grande naine y FHIA-18 de tres meses de edad con suspensiones conidiales ( $10^5$  conidios.ml<sup>-1</sup>) y gelatina al 1% y se incluyeron 10 plantas sin inocular para ser utilizadas como controles. La inoculación se realizó con un pincel sobre el envés de las tres hojas más jóvenes totalmente extendidas. Hasta los 63 días de inoculadas las plantas, en cada cultivar, se evaluó el período de incubación, el tiempo de evolución de los síntomas y el desarrollo de la enfermedad en el tiempo. La mayor concentración de conidios se logró en los medios de cultivo Agar Papa y Dextrosa, Agar Papa Zanahoria y Agar V-8 modificado. Fue posible obtener síntomas sobre los cultivares Grande naine y FHIA-18 a partir de la inoculación artificial de suspensiones conidiales de *P. fijiensis* en casa de cultivo. Se observó la reacción susceptible del cultivar Grande naine con respecto a la resistencia parcial manifestada por el cultivar FHIA-18. La inoculación artificial de plantas procedentes del cultivo de tejidos mediante el empleo de suspensiones conidiales de *P. fijiensis* resulta ser un método fácil, rápido y reproducible para conocer la respuesta de diferentes cultivares frente a la Sigatoka negra que puede ser utilizado en los programas de mejoramiento genético de *Musa*.

Palabras clave: Rayado negro de la hoja, conidios, inoculación artificial

## ABSTRACT

Early evaluation of black Sigatoka in *Musa* breeding programs, requires a set of procedures to differentiate resistant and susceptible cultivars. The present work was focused in: to evaluate different culture media for conidia production and the behaviour of two *Musa* genotypes by artificial inoculation using conidia suspension. Different culture media were used (Mycophil Agar, Potato dextrose Agar, Sabouraud dextrose Agar, V-8 modified Agar, Malt Extract Agar and Carrot Potato Agar. Inoculated Petri dishes were incubated at 20°C, with continuous fluorescent light for 10 days. Conidia concentration was determined by Neubauer haematocytometer under *Olympus* microscope. Ten Grande naine and FHIA-18 plants with 3 month of acclimatization were inoculated with conidia suspension ( $10^5$  conidia.ml<sup>-1</sup>) with gelatin 1%. Other 10 plants without inoculation were used as control. Inoculation was done by brushing the first three open leaves in the abaxial leaf surface with the prepared inoculum. Until 63 days after inoculation the inoculated plants were evaluated recording: incubation period, symptoms evolution time, disease development time. A greater conidia production was observed in Potato dextrose Agar, Carrot Potato Agar and V-8 modified Agar. Typical symptoms of young infected plants were obtained in the inoculated cultivars, Grande naine and FHIA-18 using conidia suspension as inoculum. Grande naine cultivar was more susceptible than FHIA-18 in the last evaluation. Artificial inoculation techniques of acclimatized vitroplants using conidia suspension of *P.fijiensis* result a very easy, practical, rapid and reproducible method for early screening of *Musa* cultivars to assist *Musa*-black Sigatoka breeding Programs.

# **NUEVO MÉTODO PARA LA DIFERENCIACIÓN A NIVEL FOLIAR DE LA RESISTENCIA A *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE***

Companioni B.<sup>1\*</sup>, N. Mora<sup>1</sup>, L. Díaz<sup>1</sup>, A. Pérez<sup>1</sup>, M. Arzola<sup>1</sup>, P. Espinosa<sup>1</sup>, M. Hernández<sup>1</sup>, J. Ventura<sup>2</sup>, M. C. Pérez<sup>3</sup>, R. Santos<sup>1</sup> y J. C. Lorenzo<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Laboratorio de Mejoramiento Genético, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.  
e-mail: [bcompanioni@bioplantascu](mailto:bcompanioni@bioplantascu)

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

<sup>3</sup>GEPROP, Centro de Gerencia de Programas y Proyectos Priorizados, Ciudad de La Habana, Cuba.

## **RESUMEN**

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. El presente trabajo incluye evaluaciones de otros indicadores tales como componentes bioquímicos. La utilización del análisis del discriminante para la diferenciación de la resistencia y susceptibilidad de cultivares de banano en el programa de mejoramiento genético constituye un aspecto novedoso en este trabajo. Tal estimación se realizó a partir de una matriz de datos que incluyó el efecto del filtrado del cultivo del hongo (área de la lesión y niveles de fenoles libres y ligados a las paredes celulares, aldehídos excepto malondialdehído, y proteínas) en hojas de siete cultivares de banano.

Palabras clave: Análisis discriminantes, enfermedad Mal de Panamá, selección

## **NEW METHOD FOR THE DIFFERENTIATION OF RESISTANCE TO *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE* OF LEAF LEVEL**

### **SUMMARY**

We previously developed an easy-to-do procedure to differentiate field-grown resistant and susceptible banana cultivars of *Fusarium wilt* at leaf level. The present report includes measurements of other indicators such as biochemical compounds. The use of discriminant analysis to differentiate resistant and susceptible banana cultivars in breeding programmes is also a novel aspect of this report. Such estimation was performed from a data matrix that included the effects of the fungal metabolites (leaf lesion area and levels of free and cell wall-linked phenolics, aldehydes, except malondialdehyde, and proteins) over banana leaves of seven cultivars.

key words: discriminant analysis, early selection, Panama disease

# ACTIVIDAD FITOTÓXICA Y PROTEÍNAS MICROBIANAS EN FILTRADOS DE CULTIVO DE *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE* RAZA 1

Nayanci Portal González<sup>1\*</sup>, Bárbara Companioni<sup>2</sup>, Christelle Achade<sup>1</sup>, Beaufray Mvila<sup>1</sup>, Mayda Arzola<sup>2</sup>, Mayra Acosta Suárez<sup>3</sup>, Cinthia<sup>3</sup>, Michel Leiva Mora<sup>3</sup>, Belkis Roque<sup>3</sup>, Yelenys Alvarado Capó<sup>3</sup>, Ramón Santos Bermúdez<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 1/2. Ciego de Ávila. e-mail: [nayanci@agronomia.unica.cu](mailto:nayanci@agronomia.unica.cu), [nayansi@bioplantillas.cu](mailto:nayansi@bioplantillas.cu)

<sup>2</sup> Centro de Bioplantillas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 1/2. Ciego de Ávila.

<sup>3</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantillas. Carretera a Camajuaní km 51/2. Santa Clara. Villa Clara.

## RESUMEN

Los bananos y los plátanos son dos de los cultivos más importantes a nivel mundial. La enfermedad conocida como Mal de Panamá, provocada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, está considerada como una de las enfermedades que causan mayores problemas en este cultivo a nivel global. Una importante vía para obtener plantas resistentes a esta enfermedad lo constituye el uso de herramientas biotecnológicas desarrolladas a partir de estudios de la interacción hospedero-patógeno. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar la actividad fitotóxica y las proteínas totales del filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. Se utilizó la cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 perteneciente al grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) 01210, y los cultivares Gros Michel y FHIA -01, susceptibles y resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza1. Se determinó la actividad fitotóxica de los filtrados de cultivo del microorganismo concentrados al 80% de su volumen inicial y la masa fresca del micelio en cada momento de evaluación. Se cuantificó la concentración de proteínas totales presente en el filtrado crudo de cultivo y la absorbancia en un rango de 200- 300 nm. Se evidenció que *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza1 (GCV 01210) produce los mayores niveles de actividad fitotóxica extracelular en la fase logarítmica de su crecimiento. La máxima actividad fitotóxica se obtuvo a los 15 días de crecido el hongo filamentoso, con una respuesta genotípica diferencial de los cultivares susceptibles y resistentes frente a los filtrados de cultivos concentrados al 80 % de su volumen inicial, mientras que el microorganismo fue capaz de excretar los mayores tenores de proteínas luego de 13 días de la inoculación y alcanzó niveles de 1.698 mg.mL<sup>-1</sup>. El máximo crecimiento del microorganismo se registró a los 21 días posteriores a la inoculación. Las principales moléculas excretadas al medio de cultivo registraron sus mayores absorbancias a los 270 nm

Palabras clave: *Fusarium oxysporum*, Mal de Panamá, plátanos y bananos.

Key words: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* wilt, bananas and plantains.

# **APLICACIÓN DE RIZOBACTERIAS COMO AGENTES DE BIOCONTROL EN EL SISTEMA PLANTA – PATÓGENO MAÍZ - *FUSARIUM VERTICILLIOIDES***

Acela Díaz\*, Ivan Trujillo y Annia Hernández. \*Autor para correspondencia.

Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 #455 e/ J e I. Vedado. Plaza, Ciudad Habana, Cuba. e-mail: [annia@fbio.uh.cu](mailto:annia@fbio.uh.cu)

## **RESUMEN**

El empleo de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB) como agentes de biocontrol resulta una tecnología que ha cobrado mucha fuerza dado su carácter ecológico, bajo costo y eficiencia. Teniendo en cuenta que las enfermedades de origen fúngico son las mayormente asociadas al cultivo del el maíz (*Zea mays*), se escogieron 2 fitopatógenos de esta gramínea pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Alternaria*, con los cuales se realizaron ensayos *in vitro* estudiando la inhibición del crecimiento de los hongos en presencia de dos cepas de referencia y de un grupo de rizobacterias previamente aisladas del cultivo del maíz. También se desarrollaron bioensayos *in vivo* con las cepas seleccionadas y el patógeno *Fusarium verticillioides* utilizando la variedad de maíz Francisco mejorado. Los resultados mostraron que las rizobacterias seleccionadas tienen la capacidad de producir metabolitos del tipo sideróforos y ácido salicílico e inhiben de forma parcial o total el crecimiento de los fitopatógenos estudiados. También se demostró su efectividad en el biocontrol de patógenos que atacan al cultivo y en la inducción de resistencia en el sistema maíz-*Fusarium verticillioides*. Estos resultados muestran las potencialidades de las cepas de referencia y autóctonas estudiadas para ser utilizadas como agentes de biocontrol en nuestra agricultura.

Palabras clave: ácido salicílico, enfermedades, hongos

# **APLICACIÓN DE RIZOBACTERIAS PARA INDUCIR RESISTENCIA EN LOS SISTEMAS FRIJOL (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) – *COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM* (SACC. AND MAGNUS) LAMS.-SCRIB. Y TOMATE (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) - *BOTRYTIS CINEREA* PERS.:FR.**

Annia Hernández-Rodríguez<sup>1</sup>, Ana Niurka Hernández-Lauzardo<sup>2</sup>, Miguel Gerardo Velázquez-Del Valle<sup>2</sup> y Mónica Hofte<sup>3</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Universidad de la Habana, Departamento de Microbiología, Calle 25 esquina J, Ciudad Habana, Cuba CP 10347.

<sup>2</sup> Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (IPN), Departamento de Biotecnología, km 8.5 Carr. Yautepec-Jojutla, Morelos, México CP 62731.

<sup>3</sup> Universidad de Gent, Departamento de Protección Vegetal, Coupure Links 653, Gent, Bélgica CP B-9000.

## **RESUMEN**

En este estudio se evaluaron diferentes rizobacterias en la elicitación de resistencia sistémica inducida (RSI) en los sistemas frijol (*Phaseolus vulgaris*) - *Colletotrichum lindemuthianum* y tomate (*Lycopersicon esculentum*) - *Botrytis cinerea*. Como inductores se utilizaron las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-562, KMPCH y 7NSK2, *Pseudomonas fluorescens* WCS 417 y J-143, *Burkholderia cepacia* 0057, y el producto químico Benzothiadiazole (BTH). Para la elaboración de los inóculos fúngicos se utilizaron las cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* 06/038 y *Botrytis cinerea* R16. Los resultados demostraron que en el cultivo del frijol las cepas de *P. aeruginosa* 7NSK2 y KMPCH, *P. fluorescens* WCS 417 y J-143, *B. cepacia* 0057 y el BTH, inducen resistencia en plantas contra *C. lindemuthianum*. Se destacaron por el mejor comportamiento las cepas de *P. aeruginosa* KMPCH y *P. fluorescens* J-143. En el cultivo del tomate todas las rizobacterias estudiadas y el BTH inducen resistencia contra *B. cinerea*. Las cepas de *B. cepacia* 0057, *P. fluorescens* J-143 y *P. aeruginosa* KMPCH manifestaron las mejores respuestas, demostrándose un grado de inducción de resistencia en dependencia de la especie vegetal donde fueron aplicadas.

Palabras clave: *Burkholderia*, *Pseudomonas*, resistencia sistémica inducida

# ENSAYO EN FRAGMENTOS DE HOJAS DE BANANOS Y PLÁTANOS (*MUSA* SPP.) PARA EL ESTUDIO A NIVEL MONOCÍCLICO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS SÍNTOMAS DE LA SIGATOKA NEGRA CAUSADA POR *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET

Luis Pérez-Vicente<sup>1\*</sup>, Michel Pérez-Miranda<sup>1</sup>, María Isabel Jiménez<sup>2</sup>, Maria Jama<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura de Cuba.

<sup>2</sup>Investigadores del Centro biotecnológico del Ecuador (CIBE) de la Escuela Politécnica del Litoral en Guayaquil, Ecuador.

## RESUMEN

Se describe el desarrollo de un ensayo de inoculación artificial sobre fragmentos de hojas de clones de bananos y plátanos con diferentes niveles conocidos de resistencia parcial a Sigatoka negra mantenidos *in vitro*. Se colectaron fragmentos de hojas de 3.5 x 3.5 cm de la primera hoja completamente expandida (10 fragmentos/clon), se lavaron con agua estéril y se colocaron en una placa de Petri de 10 cm con agar agua + benzimidazol (20 g agar.L<sup>-1</sup> + 40 µg.mL<sup>-1</sup> de benzimidazol). Se inocularon con diferentes concentraciones de conidios de *M. fijiensis* obtenidos de cultivos *in vitro* del patógeno y se incubaron bajo luz fluorescente. Se determinó en días consecutivos la cantidad de lesiones y su evolución por estados durante un ciclo infeccioso. Se determinó la concentración óptima de inóculo para el desarrollo del ensayo. Existió una fuerte correspondencia entre las curvas de aparición de lesiones en relación al tiempo en los fragmentos de hoja *in vitro* a nivel monocíclico y las curvas de desarrollo de la enfermedad en el campo a nivel policíclico en los clones respectivos, por lo que el método es aplicable para estimar el nivel de resistencia parcial de los clones frente a Sigatoka negra y para comparar la agresividad de los aislamientos bajo condiciones controladas. La duración de la vida verde de las hojas en el ensayo no permitió determinar la intensidad de la reproducción sexual del patógeno. Se requiere continuar estudiando las condiciones que permitan alargar la vida verde de los fragmentos de hojas hasta lograr el desarrollo de los cuerpos fructíferos sexuales en las manchas.

Palabras clave: conidios, condiciones controladas, resistencia, Sigatoka negra

# DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE LAS CEPAS DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* J-143 Y *BURKHOLDERIA CEPACIA* 0054 ANTE PATÓGENOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR

Yanelis Acebo\*, Iván Trujillo, Annia Hernández y Mayra Heydrich. \*Autor para correspondencia.

Universidad de la Habana, Departamento de Microbiología, Calle 25 esquina J, Ciudad Habana, Cuba CP 10347. e-mail: [acebo@fbio.uh.cu](mailto:acebo@fbio.uh.cu)

## RESUMEN

La utilización de antagonistas microbianos para el control de fitopatógenos se ha catalogado como un importante complemento en el manejo integrado de las enfermedades de las plantas. Las rizobacterias de las especies *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* constituyen de los grupos más estudiados, debido a su capacidad de colonizar un amplio rango de cultivos y ser antagonistas de varios patógenos que se encuentran asociados a las raíces de las plantas. Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto antagónico de cepas de rizobacterias ante los hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Curvularia sp.* Para ello se realizaron 3 experimentos *in vivo* con el objetivo de determinar el efecto antagónico de las cepas y el inhibitorio de los metabolitos activos producidos por ellas. Se utilizaron las cepas de *Pseudomonas fluorescens* J-143 y *Burkholderia cepacia* 0054, procedentes de la Colección de Cultivos de la Facultad de Biología de La Universidad de La Habana. Los hongos fitopatógenos utilizados proceden de la Colección de Cultivos del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Se utilizaron los medios de cultivo King B y Papa Dextrosa Agar (PDA). En todos los casos se siguió la metodología descrita por Bashan y colaboradores en 1996. Los resultados demostraron que tanto los antagonistas como los hongos fitopatógenos crecen satisfactoriamente en ambos medios de cultivo, manifestando un óptimo crecimiento en el medio PDA y conservando sus características micromorfológico - culturales. La cepa de *Pseudomonas fluorescens* J-143 inhibió casi totalmente el crecimiento de los dos hongos, mientras que *Burkholderia cepacia* 0054 solo logró una inhibición parcial de los dos patógenos utilizados. Esta cepa mostró la mayor inhibición frente a *Fusarium sp.* Se demostró que los metabolitos producidos por las bacterias desempeñan un papel rector en el biocontrol de patógenos fúngicos en los sistemas planta – patógeno estudiados, corroborándose los resultados obtenidos en otras gramíneas como el maíz y el arroz.

Palabras clave: antagonistas, bacterias, *Fusarium*, *Curvulari*, metabolitos

# VARIABILIDAD DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET. ESTABILIDAD DE LA RESISTENCIA A SIGATOKA NEGRA DE LOS CLONES HÍBRIDOS DE LA FHIA

Michel Pérez-Miranda<sup>1</sup>, Luis Pérez-Vicente<sup>1\*</sup>, Roberto Trujillo<sup>2</sup> y Dulce M. Betancourt<sup>3</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ministerio de Agricultura. e-mail: lperezvicente@hotmail.com.

<sup>2</sup>LAPROSAV Ciego de Avila, Provincia Ciego de Avila.

<sup>3</sup>ETPP Baracoa, Baracoa, Provincia de Guantánamo.

## RESUMEN

La Sigatoka negra (SN) causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Mf) es la enfermedad más importante de los bananos y plátanos. La medida más eficaz de control de la enfermedad, es el uso de clones con resistencia parcial. En Cuba existen más de 14 mil ha de clones con resistencia parcial por lo que la presión de selección de patotipos con mayor agresividad es por tanto elevada. Se establecieron parcelas en La Habana; Ciego de Ávila y Guantánamo de clones susceptibles y con resistencia parcial. Se determinó la severidad del ataque y la velocidad de evolución de la enfermedad así como la formación de fructificaciones en las manchas en parcelas de fincas situadas en Guira de Melena y Alquizar en la Provincia de La Habana, La Cuba en Ciego de Avila y en las localidades de San Luis y Mosquitero en Baracoa, provincia Guantánamo. Se comparó la agresividad de aislamientos monoascospóricos pertenecientes a poblaciones de *M.fijiensis* de Cavendish de zonas donde nunca se cultivaron clones con resistencia parcial y de clones con resistencia parcial fuertemente afectados de SN en ensayos in vitro en fragmentos de hojas colocados en agar con benzimidazol incubados a la luz a 27 °C. Los clones de la FHIA en La Habana y Baracoa mostraron una resistencia elevada a la enfermedad, mientras que los niveles de ataques y la producción de peritecios en Ciego de Avila, fue similar a la de los clones susceptibles y mucho más intensa que la observada en 1994/95, cuando los clones con resistencia parcial fueron introducidos en Cuba por primera vez. Las inoculaciones sobre fragmentos de hojas del clon Gran enano (susceptible) y FHIA 18 con resistencia parcial, con aislados salvajes (procedentes de clones Cavendish de zonas libres de clones con resistencia parcial) y de plantas de FHIA 18 de Ciego de Avila fuertemente afectadas, demostró la mayor agresividad de los aislamientos de Ciego de Avila sobre el clon FHIA 18, que el procedente de una población salvaje del patógeno. Este constituye el primer informe de cambios de la agresividad de las poblaciones del patógeno o de erosión de la resistencia parcial a Sigatoka negra del clon FHIA 18.

Palabras clave: Variabilidad patogénica, Sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*; durabilidad de la resistencia parcial



# CHARACTERIZATION OF *PSEUDOCERCOSPORA FIJIENSIS* MORELET ISOLATED TO BE USED IN MUSA SP IMPROVEMENTS PROGRAMS

Mileidy Cruz Martín\*, Yelenys Alvarado Capó, Mayra Acosta Suárez, Michel Leiva and Berkis Roque. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: [mcruz@ibp.uclv.edu.cu](mailto:mcruz@ibp.uclv.edu.cu), [mileidycruz@yahoo.es](mailto:mileidycruz@yahoo.es)

## ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objectives of isolating and identifying *Pseudocercospora fijiensis* Morelet isolates of different regions of Villa Clara and Ciego de Ávila provinces, to characterize them culturally, morphologically and physiologically as well as to evaluate their pathogenicity and virulence on four *Musa* cultivars. The growth in solid and liquid cultures media was evaluated, the structures of asexual reproduction were characterized and the subculture number effect on the conidia production was determined, and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Higromycin B and Carbendazim was determined in front of these. Nine *P. fijiensis* isolates were obtained and their cultural and morphological characteristic coincided with those referred in the scientific literature for this specie. It was demonstrated that the *P. fijiensis* isolates growth in liquid cultures media was influenced by the composition of them. It was also proven, that the *in vitro* conidia production by the isolates diminished with the increment of the subcultures number and that it was independent of the isolates. It was possible to determine the MIC of Higromycin B and Carbendazim against the assayed isolates with the agar dilution method using mycelia suspensions as inoculums. The obtained results evidenced the variability of the *P. fijiensis* isolates taking into account speed of growth in PDA and M1-D medium, morphological characteristic of the asexual reproduction structures, susceptibility to Higromycin B and Carbendazim. It was demonstrated their pathogenicity on *Musa* genotypes artificially inoculated with mycelia suspensions and there were differences in respect their virulence.

# CARACTERIZACIÓN DE REGIÓN ITS - 5.8S ARNR EN ESPECIES DE *PIPER* MEDIANTE COMPARACIÓN DE SECUENCIAS Y PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA

Cleonilde da Conceição Silva Queiroz<sup>1</sup>, Ilmarina Campos de Menezes<sup>2</sup>, Natália Florêncio Martins<sup>3</sup>, Cláudia Regina Batista de Souza<sup>1\*</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas/Departamento de Genética, Rua Augusto Corrêa, número 01, Guamá, 66075-110 - Belém, Pará, Brasil. e-mail: [bsouza@ufpa.br](mailto:bsouza@ufpa.br)

<sup>2</sup>Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Caixa Postal 48, 66095-100 Belém, Pará, Brasil.

<sup>3</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Caixa Postal 02372, Asa norte, 70770-900, Brasília-DF, Brasil

## RESUMEN

El genero *Piper* incluí mas de 1000 especies y cerca de 450 ocurren en Brasil. Coletas y trabajos de identificación taxonómica de plantas de *Piper* ten sido sendo realizados por diferentes grupos, todavía estudios de caracterización molecular das especies que ocurren en Brasil son escasos. En este trabajo fue hecha la caracterización de región ITS de la secuencia de DNA do ARNr 5.8S de especies de *Piper*. Cerca de 20 especies de *Piper* colectadas en norte del Brasil (Estado do Pará), fueron utilizadas en esto trabajo, entre estas, *Piper hispidinervium*, *Piper columbrinum* y *Piper roxeminianum*. Dos cultivares de *Piper nigrum*, especie originada del continente asiático, también fueron incluidas en esto estudio. Muestras de DNA genómico fueron extraídas de hojas de diferentes plantas y utilizadas en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con primers para las regiones ITS. Los fragmentos amplificados fueron clonados en vectores bacterianos y secuenciados. Las secuencias amplificadas contienen 107 pb de la región ITS I, 167 pb del gene 5.8S del ARN ribosomal y 270 pb de la región ITS II. Los análisis de similaridad con Blast muestran que las secuencias obtenidas presentan cerca de 98% de identidad con secuencias ITS de *Piper* depositadas en Genbank. Los programas utilizados en esto estudio fueron PAUP para análisis filogenético y MFOLD para predicción de estructura secundaria. Nuestros resultados muestran distancias genéticas significativas entre las diferentes especies estudiadas, que forman dos grupos filogenéticamente distintos.

Palabras clave: estructura secundaria, filogenia, ITS, *Piper*

# MARCADORES MOLECULARES DE TIPO INDELS EN LA DETERMINACIÓN DE RELACIONES EVOLUTIVAS EN PROTEOBACTERIAS

Ania Margarita Cutiño Jiménez<sup>1\*</sup>, Alexander Martin Tornet. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Cuba.  
e-mail: [ania@amcj.uo.edu.cu](mailto:ania@amcj.uo.edu.cu); [aniac@cnt.uo.edu.cu](mailto:aniac@cnt.uo.edu.cu)

<sup>2</sup>Departamento de Informática, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Cuba.

## RESUMEN

La división proteobacterias incluye la mayoría de las bacterias Gram-negativas conocidas. Especies de este grupo, como las pertenecientes al género *Xanthomonas*, presentan gran interés investigativo por su carácter fitopatogénico en cultivos de importancia económica como el arroz, algodón, los cítricos y la uva. Las singularidades de los miembros del grupo *Xanthomonadales* y los resultados controvertidos que cuestionan su posición dentro de las proteobacterias, motivan al mejor conocimiento de su biología y origen evolutivo. El estudio se basó en el análisis de secuencias de proteínas conservadas en proteobacterias. Se consideraron enzimas involucradas en procesos de replicación y reparación del DNA, provenientes de bases de datos públicas e identificaron marcadores moleculares. Se utilizó la Metodología de Gupta (2001), basada en el estudio de INDELS como criterio filogenético (inserciones y deleciones presentes en conjuntos de proteínas homólogas), con el objetivo de determinar la posición evolutiva del grupo *Xanthomonadales* que incluye los géneros *Xanthomonas* y *Xylella*. Se seleccionaron las proteínas DNA polimerasa III (subunidad alfa), DNA ligasa NAD dependiente y DNA Topoisomerasa I, con la obtención de algunos marcadores INDELS considerados útiles para inferir relaciones evolutivas en proteobacterias. El alineamiento de las proteínas DNA Topoisomerasa I y DNA polimerasa III (cadena alfa), mostró inserciones propias de los miembros de proteobacterias gamma y que excluyen al grupo *Xanthomonadales*. Resultado soportado por los hallazgos en las proteínas DNA polimerasa y DNA ligasa NAD dependiente. El alineamiento de éstas, reveló inserciones exclusivas para los miembros del grupo *Xanthomonadales*. Los marcadores moleculares hallados, corroboran estudios previos que cuestionan la posición basal del grupo *Xanthomonadales* dentro de las proteobacterias gamma.

Palabras clave: INDELS (inserciones y deleciones), Marcadores moleculares, Secuencias de proteínas, Subdivisión Proteobacterias, *Xanthomonadales*

# **AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE CEPAS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA ENDÓFITA DE TRES GENOTIPOS DE CAÑA DE AZÚCAR**

Marcia Rojas\*, Anar J. Rodríguez, Yaremis Felipe, Mayra Heydrich. \*Autor para correspondencia.

Universidad de la Habana Facultad de Biología, Dpto. de Microbiología, Calle 25 #455 e/ J e I Vedado, CP 10400 Ciudad Habana. e-mail: [marcia@fbio.uh.cu](mailto:marcia@fbio.uh.cu)

## **RESUMEN**

Muchas rizobacterias se han estudiado con el fin de ser utilizadas en el biocontrol de fitopatógenos, pero en los últimos años los endófitos y su interacción con la planta, han despertado el interés de muchos investigadores. Entre las posibles vías de beneficio a la planta está la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, el estudio de cepas nativas con potencialidades como biocontroladoras resulta de gran importancia en la sostenibilidad agrícola. En el presente trabajo se aislaron e identificaron por métodos moleculares miembros de la comunidad endófito de tres genotipos de caña de azúcar. Se estudió la potencialidad *in vitro* de estas cepas de inhibir el crecimiento de la bacteria *Xanthomonas albilineans* y los hongos *Fusarium* y *Dreschlera* en los medios Agar Nutriente y Agar Malta, respectivamente. Los aislados de los tres genotipos de caña de azúcar pertenecen a los géneros *Gluconacetobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Comamonas* fundamentalmente. De ellos dos cepas mostraron efecto antagónico contra los patógenos utilizados, lo cual pudiera ser de especial interés en el biocontrol de estas enfermedades en el cultivo de la caña de azúcar.

Palabras clave: biocontrol, cepas nativas, microorganismos patógenos



# TALLER LEÑOSAS

# AVANCES EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE ESPECIES LEÑOSAS Y FORESTALES EN EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS

Raúl Barbón\*, Daniel Agramonte, Raúl Collado, Felipe Jiménez, Elisa Quiala, Marta Pérez, Odalys Gutiérrez, Elio Jiménez, Manuel de Deferia, Maite Chavez, Ana Trocones, Luis Delgado, Alina Capote, José Enrique Salas. \*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. Teléfono 281268-281257. Fax: 53-422-281329. e-mail: [raulb05@ibp.co.cu](mailto:raulb05@ibp.co.cu)

## RESUMEN

El Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) en su tarea de implementar y promover la sostenibilidad de los recursos forestales y agroforestales, ha desarrollado numerosos estudios para la caracterización, propagación y conservación de estos recursos genéticos, apoyándose en la biotecnología. El cultivo *in vitro* es una herramienta bien justificada para la micropropagación y la conservación de especies de difícil propagación, e individuos élite seleccionados que ya posee una serie de ventajas comparativas (altas tasas de multiplicación, automatización, clonación y rejuvenecimiento progresivo) con respecto a otros sistemas de propagación. Las actividades de micropropagación de especies leñosas y forestales se iniciaron con estudios de la organogénesis y la embriogénesis de diferentes especies tales como, cafeto (*Coffea arabica* cv. Caturra rojo, *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, *Coffea canephora* var. Robusta), guayaba (*Psidium guajava* L.), teca (*Tectona grandis* L.), pino (*Pinus caribaea*), caoba (*Swietenia macrophylla*), majagua (*Hibiscus elatus* L.), morera (*Morus alba* L.) y *Eucaliptus* spp. La principal limitante del cultivo de estos materiales vegetales es la alta incidencia de contaminantes microbianos durante la introducción *in vitro*. Sin embargo, la aplicación de fuertes tratamientos de desinfección superficial ha permitido en parte resolver el problema. Durante las investigaciones realizadas se logró el establecimiento en condiciones de cultivo *in vitro* de segmentos nodales y ápices de las diferentes especies leñosas y forestales provenientes de brotes epicórmicos de plantas de campo o bancos de explantes en condiciones semicontroladas. El material vegetal establecido *in vitro* sirvió como fuente de explantes para las investigaciones de la organogénesis y la embriogénesis somática. Las investigaciones desarrolladas en la micropropagación de estas especies han permitido ampliar la información existente sobre el comportamiento *in vitro* de especies de difícil propagación como son las leñosas tropicales y forestales. Lo cual ha generado material para enseñanza y capacitación. La micropropagación tiene muchas ventajas si se cuenta con protocolos repetibles, puede ser una herramienta muy valiosa en las diferentes etapas del mejoramiento genético forestal implicando una ganancia en tiempo y recursos durante la multiplicación clonal.

Palabras clave: agroforestales, micropropagación, recursos forestales

## ADVANCE IN THE *IN VITRO* CULTURE OF WOODY AND FOREST SPECIES IN THE INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS

### ABSTRACT

El Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) in their task of to implement and to promote the sustainability of the forest resources and agroforest, it has developed numerous studies for the characterization, propagation and conservation of these genetic resources, leaning on in the biotechnology. The cultivation *in vitro* is a very justified tool for the micropropagation and the conservation of species of difficult propagation, and selected individuals elite. The micropropagation represents a series of comparative advantages (discharges multiplication rates, automation, clonation and progressive reinvigorating) with regard to other propagation systems. The activities of micropropagation of woody and forest species began with studies of the organogenesis and somatic embryogenesis of different species like, coffee (*Coffea arabica* cv. Caturra rojo, *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, *Coffea canephora* var. Robust), guava (*Psidium guajava* L.), teak (*Tectona grandis* L.), pine (*Pinus caribaea*), mahogany (*Swietenia macrophylla*), majagua (*Hibiscus elatus* L.), morera (*Morus alba* L.) and *Eucaliptus* spp. The main obstacle of the cultivation of these materials is the high incidence of microbial pollutants during the introduction *in vitro*. However, the application of strong treatments of superficial disinfection has allowed partly solving the problem. During the carried out investigations the sprouting was achieved under cultivation *in vitro* conditions of nodal segments and apexes of the different woody and forest species coming from epicormics shoots of field plants or plants under controlled conditions. The established material *in vitro* was good as explantes source for the investigations of the organogenesis and the somatic embryogenesis. The investigations

developed in the micropropagación of these species they have allowed to enlarge the existent information on the behavior *in vitro* of species of difficult propagation like they are the woody ones tropical and forest. This has generated material for teaching and training. The micropropagación has many advantages if it is had protocols repeatable, it can be a very valuable tool in the different stages of the forest genetic improvement implying a gain in time and resources during the multiplication clonal

Key words: agroforest, forest resources, micropropagation

# EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA EN *SWIETENIA MACROPHYLLA* KING

Raúl Collado\*, Raúl Barbón, Daniel Agramonte, Felipe Jiménez, Martha Pérez, Odalys Gutiérrez. \* 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. CP 54 830. Cuba. e-mail: [raulc05@ibp.co.cu](mailto:raulc05@ibp.co.cu)

## RESUMEN

En la *Swietenia macrophylla* King, la propagación por vías tradicionales no resuelve la necesidad de material vegetal para fomentar nuevas plantaciones. Esta especie es difícil de propagar mediante el cultivo de tejidos y no se cuenta con un sistema vía organogénesis repetible, debido básicamente a problemas de contaminación microbiana, oxidación fenólica y muerte de los tejidos en la fase de establecimiento de los explantes *in vitro*. Lo que hace necesario la búsqueda de un nuevo método de propagación. Con el objetivo de establecer la embriogénesis somática directa de *Swietenia macrophylla* King en medios de cultivo semisólidos se empleó como material vegetal inicial embriones cigóticos inmaduros. Se estudiaron tres concentraciones de 2,4-D (2.0, 4.0 y 6.0 mg.l<sup>-1</sup>) combinado con 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de kinetina, para lograr la formación de embriones somáticos. Se determinó a las seis semanas de cultivo, el número de explantes con embriogénesis somática de alta frecuencia y baja frecuencia. Para que los embriones somáticos en etapa globular alcanzaran las etapas finales de torpedo y cotiledonal, estos se colocaron en tres tratamientos con 6-BAP (0.2, 0.4 y 0.6 mg.l<sup>-1</sup>) y un control sin reguladores de crecimiento. A los 30 días de cultivo se evaluaron el número de embriones somáticos que alcanzaron las etapas de torpedo y cotiledonal. Los mayores porcentajes de embriones cigóticos que desarrollaron embriogénesis somática de alta frecuencia y de baja frecuencia (41.02 y 20.51%), se obtuvieron con 4.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de kinetina. Con 0.4 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP se obtienen porcentajes de embriones somáticos en etapas de torpedo y cotiledonal (7.4 y 91.7 %) superiores al resto de los tratamientos. Los resultados demostraron el efecto positivo de la combinación del 2,4-D con la kinetina sobre la inducción de la embriogénesis somática directa. El 6-BAP estimuló el desarrollo de los embriones somáticos.

Palabras clave: embriones somáticos, reguladores de crecimiento, *Swietenia macrophylla*

## ABSTRACT

In the *Swietenia macrophylla* King, the propagation by traditional routes does not solve the necessity of vegetal material to foment new plantations. This species is difficult to propagate by means of the tissue culture and it is not counted on a system via replicate organogenesis, had to problems of microbial contamination, phenolic oxidation basically and death of weaves in the phase of establishment of the explantes *in vitro*. What the search makes necessary of a new method of propagation. With the objective of establish the direct somatic embryogenesis of *Swietenia macrophylla* King in semisolid culture medium were used like explants zygotic embryos. Three concentrations of 2,4-D (2.0, 4.0 and 6.0 mg.l<sup>-1</sup>) combined with 1.0 mg.l<sup>-1</sup> of kinetin were studied, to obtain formation of somatic embryos. From week six of culture the number of explants with high frequency somatic embryogenesis, low frequency somatic embryogenesis were evaluated. So that the somatic embryos in globular stage reached the final stages of torpedo and cotyledonal, these were placed in three treatments with 6-BAP (0.2, 0.4 y 0.6 mg.l<sup>-1</sup>) and they were compared with a culture medium without the growth regulators. To the 30 days of culture the number of somatic embryos what reached the stages of torpedo and cotyledonal were evaluated. The best percentages of zygotic embryos what development high frequency somatic embryogenesis and low frequency (41.02 y 20.51%), were obtained with a 4.0 mg.l<sup>-1</sup> of 2,4-D and 1.0 mg.l<sup>-1</sup> of kinetin. With 0.4 mg.l<sup>-1</sup> of 6-BAP were obtained percentages of somatic embryos at stages of torpedo and cotyledonal (7.4 y 91.7 %) superior to the rest of the treatments. The results demonstrated the positive effect of the combination of 2,4-D with the kinetin on the induction of the direct somatic embryogenesis. The 6-BAP stimulated the development of the somatic embryos.

Key words: growth regulators, somatic embryos, *Swietenia macrophylla*



# OBTENCIÓN *IN VITRO* Y ACLIMATIZACIÓN DE BROTES AXILARES DE LA ESPECIE *PINUS CUBENSIS* GRISEB

Raima Cantillo Ardebol\*, Luis Rodríguez de Francisco, Omar Guadalupe Alvarado, Yamila Rosales, Janet Igarza, Argelio Pifferrer, Ana M. Ochoa. \* Autor para correspondencia.

\*Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT), Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Gaveta Postal # 41. Código Postal # 80 100.  
e-mail: [rayma@cbv.holguin.inf.cu](mailto:rayma@cbv.holguin.inf.cu)

## RESUMEN

La Meseta Pinares de Mayarí es el hábitat de la especie *Pinus cubensis* Griseb., endémica de la región, amenazada por minería y explotación maderera. Comenzando los sesenta se desarrolló una técnica para la reproducción de plantas por cultivos de tejidos, que se fue modificando para numerosas especies. Una de las técnicas de micropropagación más comunes, y la más recurridas para iniciar trabajos con alguna nueva especie, es la formación de brotes axilares seguido del enraizamiento de los mismos. Al no existir una metodología para la micropropagación de *Pinus cubensis*, que satisfaga la demanda de semillas en el país para planes de reforestación en áreas minadas y de explotación forestal, se establece como objetivo de este trabajo: "Lograr la multiplicación de *Pinus cubensis* mediante la formación de brotes axilares y su aclimatización." Como explante se utilizaron plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de embriones escindidos. El medio basal empleado fue MS, suplementado con 30g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 7g.L<sup>-1</sup> Agar. Previo a la siembra se les realizó una herida en la base apical para estimular la formación de brotes axilares. Se probaron diferentes combinaciones de distintos tipos de reguladores del crecimiento. Para el enraizamiento y aclimatización se aislaron los vástagos obtenidos en la inducción de brotes y se les aplicó un golpe auxínico. Luego, con el objetivo de enraizarlos *ex vitro*, se les aplicó polvo enraizador y se sembraron en Peat Moss y Perlita (2:1) y se mantuvieron en caseta de adaptación. Todos los tratamientos produjeron brotes siendo el mejor la combinación de 22.5 µM de 6-BAP + 5.4 µM. Se logró un 50% de supervivencia, considerado adecuado para una conífera. De esta forma se logra por primera la obtención *in vitro* de brotes de *Pinus cubensis* y se logra la aclimatización exitosa de los mismos.

Palabras clave: aclimatización, brotes axilares, forestales, multiplicación

## IN VITRO OBTENTION AND ACCLIMATIZATION OF AXILARY SHOOTS OF *PINUS CUBENSIS* GRISEB. SP.

### ABSTRACT

The Plain of Pinares de Mayarí is the habitat of *Pinus cubensis* Griseb. specie, endemic from the region, threatened by mining and wood industry. In the beginning of 60's a tissue culture technique for plant reproduction was developed. It was modified for several species. One of the micropropagation techniques most common, and most used to initiate works with new species, is the axillary shoots formation with rooting. Not existing a methodology to *Pinus cubensis* micropropagation, that satisfy the needs of seeds for reforestation in mining and wood exploitation areas, the following goal is set: "to achieve *Pinus cubensis* multiplication by axillary shoots formation and their acclimatization." As explant it was used plantulas obtained from excised embryos germinated *in vitro*. Basal medium was MS, supported with saccharose 30 g.L<sup>-1</sup> and Agar 7g.L<sup>-1</sup>. Before the planting a cut in explant apical base was made, to stimulate axillary shoots formation. It was tested several combinations and different kinds of plant growth regulators. To rooting and acclimatization, cuttings from shoots induction were isolated and put into auxinic shock. Then, to achieve *ex vitro* rooting, it was used rooting powder and planted in Peat Moss and Perlita (2:1) and then placed into adaptation room. Shoots were produced in all treatments, being the best 22.5 µM de 6-BAP + 5.4 µM combination. It was achieve a 50 % of surviving, considered accurate to a conifer. Thus, for first time *in vitro* shoots from *Pinus cubensis* and their successful acclimatization are obtained.

Key words: acclimatization, axillary shoots, forestry, multiplication

# PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *HIBISCUS ELATUS* SW

Felipe Alberto Jiménez Terry\*, Daniel Agramonte Peñalver, Ana Trocones Boggiano, Luis Delgado Martínez, Martha Pérez Peralta, Odalis Gutiérrez Martínez, Raúl Collado López, Raúl Barbón Rodríguez. \* 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: [felipe05@ibp.co.cu](mailto:felipe05@ibp.co.cu)

## RESUMEN

Entre las especies forestales más explotadas se encuentra *Hibiscus elatus*. La propagación de esta especie ha sido muy engorrosa; debido a la poca disponibilidad y viabilidad de las semillas. En los trabajos relacionados con la micropropagación de la majagua solo se han logrado resultados preliminares. Con el objetivo de desarrollar una metodología para la propagación *in vitro* de *Hibiscus elatus* se emplearon como explantes iniciales yemas axilares. En el establecimiento *in vitro* se estudiaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio y tres tiempos de desinfección de los explantes. Se evaluó el efecto de diferentes combinaciones de 6-BAP con ácido indolacético (AIA). Se determinó la supervivencia y el número de explantes brotados. Para determinar el coeficiente de multiplicación de los explantes se estudió la influencia de combinaciones de 6-BAP con ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y Biobras-6. En la fase de enraizamiento se evaluó la influencia de ANA y AIB y se cuantificó el número de plantas enraizadas. Posteriormente se estudiaron diferentes sustratos durante la aclimatización de las plantas propagadas *in vitro*. Las variables evaluadas fueron, supervivencia, longitud del tallo y número de entrenudos. Se logró un 65% de supervivencia cuando se empleó NaOCl al 1.5% durante 10 minutos, con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> 6-BAP y 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de AIA se alcanzó un 85% de brotación de los explantes. Cuando se combinaron 0.25 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP y 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, se obtuvo un coeficiente de multiplicación de 3.5. El 80% de las plantas *in vitro* enraizaron cuando se adicionó al medio de cultivo 1.5 mg. L<sup>-1</sup> de ANA. Las plantas transferidas a un sustrato compuesto por Casting (85%) y Zeolita (15%) presentaron un 90% de supervivencia. Se logró desarrollar una metodología para la propagación *in vitro* de *Hibiscus elatus* desde el establecimiento *in vitro* de los explantes hasta la fase de aclimatización.

Palabras clave: *Hibiscus elatus*, micropropagación, reguladores de crecimiento

## IN VITRO PROPAGATION OF *HIBISCUS ELATUS* SW

### ABSTRACT

Between the important forest species more is *Hibiscus elatus*. The propagation of this species has been very troublesome; due to the little availability and viability of the seeds. In the works related to the micropropagation of majagua single preliminary results have been obtained. With the objective to develop to a methodology for the propagation *in vitro* of *Hibiscus elatus*, axillary yolks were used like initial explantes. In the establishment *in vitro* three concentrations of hypochlorite of sodium and three times of disinfection of the explantes studied. The effect of different combinations from 6-bap with indolacetic acid (AIA) was evaluated. The survival and the number of appeared explantes were determined. In order to determine the coefficient of multiplication of the explantes the influence of combinations of 6-BAP with naftalenacetic acid (ANA), indolbutiric acid (AIB) and Biobras-6 studied. In the phase of rooting the influence of ANA and AIB was evaluated and quantified the number of plants with root. Later different substrates studied during the phase of acclimatization from the plants propagated *in vitro*. The variables, survival, length of the stem and number of internodes were evaluated. A 65 % of survival was obtained when NaOCl to the 1,5% was used during 10 minutes, with 0,5 mg.L<sup>-1</sup> of 6-bap and 1,0 mg.L<sup>-1</sup> of AIA was reached a 85% of appeared of the explantes. When were combined 0,25 mg.L<sup>-1</sup> of 6-bap and 1,0 mg.L<sup>-1</sup> of ANA, a coefficient of multiplication of 3.5 was obtained. The 80% of the plants *in vitro* presented root when was added to culture medium 1,5 mg.L<sup>-1</sup> of ANA. The plants transferred to a substrate composed by Casting (85%) and Zeolite (15%) presented a 90% of survival. It was possible to develop a methodology for the propagation *in vitro* of *Hibiscus elatus* from the establishment *in vitro* of the explantes to the phase of acclimatization.

Key words: growth regulators, *Hibiscus elatus*, micropropagation

# PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE MORERA (*MORUS ALBA* L.) EN MEDIO DE CULTIVO SEMISÓLIDO

Salas, BJE<sup>1\*</sup>, D. Agramonte<sup>2</sup>, R. Barbón<sup>2</sup>, F. Jiménez<sup>2</sup>, R. Collado<sup>2</sup>, M. Pérez<sup>2</sup>, O. Gutiérrez<sup>2</sup>. \* Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados. Campus Tabasco. Km 3 carretera Cárdenas-Huimanguillo. C.P. 86500. H. Cárdenas, Tabasco. México. Tel: 937 372 40 99. Fax: 937 372 22 97.  
e-mail: [salas2001mx@yahoo.com.mx](mailto:salas2001mx@yahoo.com.mx), [salasj@colpos.mx](mailto:salasj@colpos.mx)

<sup>2</sup>Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Carretera a Camajuaní km 5.5. C.P. 54830. Villa Clara. Santa Clara, Cuba. Tel: 42 281257 y 42 281268. Fax: 42 28 13 29.

## RESUMEN

Se utilizaron yemas apicales como explantes con el objetivo de propagar *in vitro* la morera en medio de cultivo MS semisólido suplementado con 6-BAP y KIN en su establecimiento y con diferentes combinaciones de 6-BAP con ANA en la multiplicación. Las plantas *in vitro* fueron evaluadas en fase de aclimatización y condiciones de campo. Es necesario suplementar el medio de cultivo MS basal con 0.5 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP para inducir la brotación, y multiplicar la morera vía segmentos nodales adicionando al medio de cultivo 0.5 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de ANA. Se observó un 95% de supervivencia, 30.2 cm de altura, 9.8 hojas y 2.02 g planta<sup>-1</sup> de masa seca en la fase de aclimatización. En condiciones de campo se obtuvo un 97.5% de supervivencia 30 días después del trasplante y 233.1 cm de altura, 521.3 hojas, 19.2 tallos y 216.38 g de masa seca por planta en la última evaluación. Se logró la propagación *in vitro* de la morera como una alternativa para la producción de semilla.

Palabras clave: morera, propagación *in vitro*, yemas apicales

## IN VITRO PROPAGATION OF MORERA (*MORUS ALBA* L.) IN SEMISOLID CULTURE MEDIUM

### ABSTRACT

Apical buds like explantes were used with the objective to *in vitro* propagated the mulberry semisolid MS medium supplemented with 6-BAP and KIN in their establishment and, with different combinations of 6-BAP with ANA in the multiplication phase. *In vitro* plants were evaluated under acclimatization phase and field conditions. It is necessary to add the basal MS culture media with 0.5 mg l<sup>-1</sup> of 6-BAP to induce the sprouting and, 0.5 mg l<sup>-1</sup> of 6-BAP and 0.5 mg l<sup>-1</sup> of ANA to multiply the mulberry by nodal segments. 95% of survival, 30.2 cm of height, 9.8 leaves and 2.02 g plant<sup>-1</sup> of dry mass in the acclimatization phase was observed. Under field conditions 97.5% of survival 30 days after the transplant and 233.1 cm of height, 521.3 leaves, 19.2 stems and 216.38 g of dry mass per plant was obtained. *In vitro* propagation of mulberry was achieved like an alternative for plants production.

Key words: apical buds, morera, *in vitro* propagation

# EMPLEO DE MARCADORES GENÉTICO- BIOQUÍMICOS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE MANDARINA CLEOPATRA (*CITRUS RESHNI* HORT. EX TAN.) TRATADOS CON PECTIMORF

Reina Margarita Hernández Ortiz<sup>\*1</sup>, Mercedes Lara<sup>2</sup>, Esther Diosdado Salces<sup>3</sup>, Clara González<sup>3</sup>, María Isabel Román Gutierrez<sup>4</sup>, Marlyn Valdés de la Cruz<sup>3</sup> y Xonia Xiques<sup>3</sup>. \* Autor para correspondencia.

<sup>\*1</sup> Centro Universitario Isla de la Juventud. Carretera Aeropuerto Km 3 ½, Nueva Gerona, Isla de la Juventud. e-mail: [rmargarita21@hotmail.com](mailto:rmargarita21@hotmail.com)

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

<sup>3</sup> Facultad de Biología, Departamento de Biología Vegetal.

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales.

## RESUMEN

El Pectimorf es un regulador del crecimiento no tradicional, se produce por la degradación parcial de la pared celular; presenta la característica de elicitar mecanismos de defensa propios de las plantas y/o actuar modificando los procesos de crecimiento y desarrollo de las mismas. Es sintetizado por el Laboratorio de Oligosacarinas del Departamento de Fisiología Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Este producto ha demostrado que no solo puede sustituir, de forma parcial o total, a los reguladores del crecimiento tradicionales, sino que, en la mayoría de los casos, se obtienen resultados superiores (Cabrera, 2000). El presente trabajo tiene como objetivo determinar cambios en el material vegetal bajo la acción del Pectimorf, por el empleo de seis sistemas isoenzimáticos. Se utilizaron: óvulos, proembriones, embriones en los distintos estadios de desarrollo (globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar) y callos embriogénicos; tratados o no con Pectimorf a la concentración de 10 mg/L. Se realizó la caracterización genético-bioquímica de los materiales empleados, mediante los sistemas isoenzimáticos: Peroxidasas, Polifenoloxidasas, Esterasas, Anhidrasa Carbónica, Fosfatasas Ácidas y Superoxidodismutasa. El estudio genético-bioquímico mostró un 84.04 % de polimorfismo en los sistemas isoenzimáticos estudiados; donde Anhidrasa Carbónica resultó ser el sistema más polimórfico (90.04 %). El análisis de Conglomerados (*cluster*) según el coeficiente de DICE, permitió formar tres grupos, en el primero aparecen los óvulos, que es el material de partida; mientras que en los restantes grupos aparecen los tratamientos de acuerdo con las diferentes etapas del desarrollo morfogénico del material vegetal y a la expresión diferencial de los genotipos, en respuesta al empleo de este biorregulador del crecimiento.

Palabras clave: *Citrus*, Isoenzimas, Pectimorf y Oligogalacturonidos

Key Word: *Citrus*, Isozymes, Pectimorf and oligogalacturonates

# PROPAGACIÓN CLONAL DE ÁRBOLES DE TECA A TRAVÉS DEL CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO*

Elisa Quiala\*, Raúl Barbón, Manuel de Feria, Maité Chávez, Alfonso Pérez, Rafael Padrón, Mariana La O. \*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: [equiala05@ibp.uclv.edu.cu](mailto:equiala05@ibp.uclv.edu.cu)

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo para la propagación clonal de árboles de teca con más de 30 años de edad, seleccionados del banco de semillas "Las Tecas" (Empresa Forestal de Villa Clara). Para la propagación *in vitro* se emplearon medios de cultivo semisólidos y sistemas de inmersión temporal (SIT). Se estableció en fase de aclimatización un banco de plantas donantes obtenidas a partir de acodos aéreos realizados en ramas de plantas adultas y brotes epicórmicos de árboles, que sufrieron una poda severa a la altura de 50-70 cm, estos brotes fueron enraizados y mantenidos en condiciones de casa de cultivo. Para el establecimiento *in vitro* se evaluó la eficiencia de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) en la desinfección de los brotes. Los explantes establecidos fueron seccionados y multiplicados durante cinco subcultivos, con una frecuencia de 28 días, en un medio de cultivo semisólido MS complementado con  $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-BAP. Para la multiplicación de los brotes en los SIT, se estudiaron diferentes parámetros como el tipo de explante, la frecuencia de inmersión y la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo. Las plantas fueron enraizadas *ex vitro* y plantadas en fase de aclimatización en cinco tipos de sustratos. El establecimiento del banco de plantas donantes solo se logró a partir de brotes epicórmicos con una y dos semanas de edad y de acodos con cuatro meses de edad, los cuales fueron asperjados con solución enraizadora. Fue posible el establecimiento *in vitro* del 90% de los brotes cuando estos fueron sumergidos durante un minuto en etanol al 70% y posteriormente desinfectados con una solución de NaOCl al 2.0% durante 10 minutos. Los ápices fueron los explantes, que mostraron mejor comportamiento en los SIT, el número de brotes se incrementó a medida que la frecuencia de inmersión diaria aumentó; sin embargo el número de plantas hiperhidricas también se incrementó en la misma medida. En los SIT el número de brotes por plantas fue menor a medida que disminuyó la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo, sin embargo hubo una mayor calidad de las plantas expresada en un incremento de la altura, el área foliar y el número de raíces, así como una disminución de la hiperhidricidad de las plantas. Se logró la aclimatización de los brotes obtenidos en los SIT.

Palabras clave: *Tectona grandis*, micropropagación, especies leñosas, sistemas de inmersión temporal

# AVANCES EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE MANAJU (*GARCINIA ARISTATA*)

Sagarra, Fernando\*, M. Daquinta, O. Concepción, L. Nápoles, D. Pina. \* Autor para correspondencia.

Laboratorio de Células y Tejidos Vegetales. Centro de Bioplantas, UNICA, Carretera a Morón, Km. 9, CP 69450, Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: [fsagarra@bioplantass.cu](mailto:fsagarra@bioplantass.cu)

## RESUMEN

El manajú (*Garcinia aristata*) es una especie leñosa endémica de Cuba muy utilizada en la medicina tradicional y considerada en peligro de extinción actualmente. Con el objetivo de establecer el cultivo *in vitro* de la misma, se evaluó el efecto de las concentraciones 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3% (m/v) de bicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) y de diferentes tiempos de aplicación, sobre la desinfección y supervivencia de hojas y ápices de árboles maduros tomados directamente del campo. Posteriormente se evaluó el comportamiento de ápices durante su establecimiento en medio de cultivo MS (1962) semisólido, suplementado con varias concentraciones de  $\text{N}^6$ -benciladenina (BA) sola y combinada con ácido indol-butírico (AIB) o ácido naftalen-acético (ANA), en un rango de concentraciones. Con el objetivo de lograr un método de rejuvenecimiento eficiente para obtener material vegetal de partida con condiciones fisiológicas más adecuadas para próximos estudios, se realizó un experimento de brotación forzada de ramas en cámara húmeda. Se realizaron dos tratamientos en los que las ramas se colocaron en zeolita saturada en agua destilada o en una solución de BA (222  $\mu\text{M}$ ). Los mejores resultados se obtuvieron con 5 minutos de desinfección en  $\text{HgCl}_2$  0.05% para ambos tipos de explantes. El mayor porcentaje de brotación (16.67%) durante el establecimiento se obtuvo con 4.44  $\mu\text{M}$  de BA, entre todas las variantes evaluadas de la citoquinina, sola o combinada con auxinas. Todos los tratamientos con BA, excepto el de menor concentración (2.22  $\mu\text{M}$ ), provocaron la formación de callos alrededor de las yemas. Los porcentajes de formación de los callos aumentaron con la concentración de la citoquinina y disminuyeron al combinarla con ambos tipos de auxinas. La aparición de estos callos estuvo siempre asociada a la muerte del explante. La brotación de yemas axilares de estacas en cámara húmeda fue significativamente mayor con la aplicación de BA.

Palabras clave: brotación, citoquinina, desinfección, endémica

# ADVANCES ON THE *IN VITRO* CULTURE OF MANAJU (*GARCINIA ARISTATA*)

## ABSTRACT

Manajú (*Garcinia aristata*) is a threatened tree endemic to Cuba, commonly used for the traditional medicine. With the aim of establishing its *in vitro* culture, leaves and apical buds, used as explants, were taken from field-growing mature trees and treated with different concentrations (0.05, 0.1, 0.2 and 0.3% w/v) of mercuric chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) and for various durations. The percentage of contamination and survival were evaluated. On a second experiment, the behaviour of apical buds was evaluated during its establishment on semisolid MS (1962) basal medium supplemented first, with a range of concentrations of  $\text{N}^6$ -benzyladenine (BA) and then, with the best treatment of BA in combination with different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA) or  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA). An experiment for forcing branches to sprout was done, in order to achieve an efficient rejuvenation method for obtaining plant material in better physiological conditions for next studies. Branches were placed within a humid chamber under two treatments: in zeolite saturated in distilled water or in a 222  $\mu\text{M}$  BA solution. The best results in surface sterilization were obtained with 0.05%  $\text{HgCl}_2$  for 5 minutes in both explants type. The major percentage of explants producing shoots was obtained with BA 4.44  $\mu\text{M}$  among all the concentrations of the cytokinin evaluated, either single or in combination with auxins. Only in the treatment of 2.22  $\mu\text{M}$  BA (lowest concentration) was not observed the formation of callus around the bud. The percentage of formation of this kind of callus increased with the concentration of the cytokinin and decreased when combined with both type of auxins. The presence of the callus was always associated to the death of the explant. On the other hand, the outgrowth within humid chambers was significantly higher for the branches treated with BA.

Key words: cytokinin, endemic, shoots, sterilization

# **EFFECTO DEL AMBIENTE *IN VITRO* SOBRE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CAFETO (*COFFEA ARABICA* CV. CATURRA ROJO.)**

Raúl Barbón-Rodríguez<sup>\*1</sup>, Walter Preil<sup>2</sup>, Elio Jiménez González<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. CP 54 830. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: [raulb05@ibp.co.cu](mailto:raulb05@ibp.co.cu)

<sup>2</sup>Inst. Zierpflanzenzüchtung, Ahrensburg, Germany.

## **RESUMEN**

Las investigaciones para el establecimiento de sistemas de regeneración vía embriogénesis somática y el aumento de la eficiencia de los mismos se ha centrado tradicionalmente en el estudio de los componentes del medio de cultivo, prestándosele poca atención a otros factores del ambiente *in vitro* como la composición de la atmósfera gaseosa. La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar el efecto del dióxido de carbono sobre la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo. Los resultados demostraron que en los biorreactores, la configuración del vaso de cultivo y específicamente el sistema de aireación, influyó sobre la acumulación de CO<sub>2</sub>. En los biorreactores control sin ventilación forzada donde el CO<sub>2</sub> se acumuló hasta niveles de 2.8% en café, se alcanzó una producción mayor de embriones somáticos (74x10<sup>3</sup> ES.L<sup>-1</sup>) que en los biorreactores con ventilación forzada (56x10<sup>3</sup> ES.L<sup>-1</sup>). En el tratamiento de biorreactor con 5.0% de CO<sub>2</sub> se obtuvieron los mayores rendimientos (119.10<sup>3</sup> ES.L<sup>-1</sup>), aunque al emplearse ventilación forzada los resultados fueron superiores con diferencias estadísticas a la variante sin ventilación forzada. Al incrementar la concentración de CO<sub>2</sub> (2.5%) hubo una mayor síntesis de AGPs que coincidió con los valores más altos de producción de embriones somáticos, este hecho unido al efecto inhibitorio del proceso embriogénico en presencia del reactivo de Yariv demostraron el papel de las AGPs en la morfogénesis vía embriogénesis somática.

Palabras clave: embrión somático, dióxido de carbono, suspensión celular

## **EFFECT OF THE ENVIRONMENT *IN VITRO* ON THE SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COFFEE-TREE (*COFFEA ARABICA* CV. CATURRA ROJO)**

### **ABSTRACT**

The investigations for the establishment of plants regeneration system route somatic embryogenesis and the increment of the efficiency of the same ones has been centred traditionally on the study of the components of the culture medium, but a few attention to other factors such as the environment *in vitro* and the composition of the gaseous atmosphere. The present investigation was carried out to determine the effect of the dioxide of carbon on *Coffea arabica* L. cv. Caturra Rojo somatic embryogenesis. The results demonstrated that in the bioreactors the configuration of the glass of culture and specifically the system of air supply influenced in the accumulation of CO<sub>2</sub>. In the bioreactors without forced ventilation (control) where CO<sub>2</sub> was accumulated up to levels of 2.8 %, a major production of somatic embryos (74x10<sup>3</sup> ES.l<sup>-1</sup>) was reached in comparison with the bioreactors with forced ventilation (56x10<sup>3</sup> ES.l<sup>-1</sup>). The major yields (119.10<sup>3</sup> ES.l<sup>-1</sup>) were obtained in the treatment of bioreactor with 5.0 % of CO<sub>2</sub>, although when forced ventilation was applied the results were superior with statistical differences to the variant without forced ventilation. Increasing the concentration of CO<sub>2</sub> (2,5 %) the synthesis of Arabinogalactanoproteins (AGPs) increased too and it is coincided with the highest values of production of somatic embryos, this fact joined the inhibitory effect of the process embryogenic in presence of Yariv's reagent they demonstrated the role of the AGPs in the morphogenesis by somatic embryogenesis.

Key words: somatic embryo, carbon dioxide, cell suspension

# EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE ALTA FRECUENCIA EN CALLOS DE GUAYABA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.) VAR. ENANA ROJA CUBANA EEA 18-40, CULTIVADOS EN MEDIO LÍQUIDO

Oscar Concepción Laffitte<sup>1\*</sup>, Lelurlys Nápoles Borrero<sup>1</sup>, Ninel Peralta Ballbé<sup>2</sup>, Aurora Pérez Martínez<sup>2</sup>, Reinaldo Trujillo Sánchez<sup>2</sup>. \* Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos; <sup>2</sup>Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Avila. Carretera a Morón, km 9, CP 69450. Ciego de Avila. Cuba. e-mail: [ooncepcion@bioplantassu.com](mailto:ooncepcion@bioplantassu.com)

## RESUMEN

Se indujo embriogénesis somática de alta frecuencia en callos embriogénicos de guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 cultivados en medio líquido. Para la iniciación del cultivo se utilizaron embriones zigóticos inmaduros como explante inicial. En la inducción del callo embriogénico se evaluó el efecto de diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) de 2,4-D, Picloram o Dicamba, como suplemento del medio WPM. Para establecer el mantenimiento y/o proliferación del callo embriogénico se desarrolló un experimento en el cual los callos inducidos en dos concentraciones de 2,4-D (A=1.0 y B=1.5  $\text{mg.L}^{-1}$ ) se transfirieron a tres concentraciones diferentes del mismo regulador (A=1.0, B=1.5 y C=0.1  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Se realizaron tres subcultivos consecutivos cada 30 días en iguales condiciones. Dos grupos de callos inducidos en una y otra concentración de 2,4-D (A y B) no se subcultivaron durante todo el experimento. Callos embriogénicos se transfirieron a erlenmeyers de 50 mL con medio líquido WPM suplementado con 1.5  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D a razón de 100 mg de callo/mL. Luego de tres subcultivos por renovación total del medio sobrenadante cada 7 días, se realizó el cribado de los cultivos dando lugar a cuatro fracciones de acuerdo con el tamaño de los agregados: I (0-250 $\mu\text{m}$ ), II (250-500 $\mu\text{m}$ ), III (500-1000 $\mu\text{m}$ ) y IV (>1000 $\mu\text{m}$ ). Estas fracciones se subcultivaron cada 7 días durante 21 días, en medio MS sin reguladores del crecimiento. El 2,4-D y el Picloram (5 y 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) promovieron los mayores porcentajes de formación de callo embriogénico (84 y 80%), mientras que el Dicamba mostró resultados desfavorables. Durante el mantenimiento de los callos embriogénicos se describió el desarrollo morfológico del proceso y se determinó que los callos requieren ser mantenidos en medios de cultivo donde las concentraciones de la auxina se incrementen o se mantengan iguales a las utilizadas para la inducción. Para los tratamientos donde se realizó subcultivo de mantenimiento, la formación de ES, y en especial el número de ES/explante, fue bajo. En los tratamientos donde el 2,4-D fue disminuido de manera intensa durante el mantenimiento y en los que no se realizaron subcultivos de mantenimiento, los valores promedio del porcentaje de formación de ES y el número de ES/explantes fueron significativamente los más altos. El cultivo de los callos en medio líquido, permitió obtener un desarrollo morfológico de ES con alta frecuencia. Se observó que los ES en diversos estadios se mantenían sujetos por la región basal o radicular a un centro común que poseía una alta competencia embriogénica, el cual se denominó "matriz" dando lugar a estructuras semejantes a "estrellas". Al analizar la densidad de ES/mL de los diferentes tratamientos de acuerdo al tamaño del agregado se pudo observar que las fracciones I y II alcanzaron el mayor valor (233 y 226 ES/mL, respectivamente) y lograron también la mayor cantidad de ES en estadios avanzados. Los ES poseen más de un 95% de viabilidad en todas sus fases de desarrollo, mientras que la "matriz" no mostró viabilidad en ninguno de los casos muestreados. Los ES cosechados mostraron una excelente capacidad de germinación y conversión *in vitro*.

Palabras clave: auxinas, embriogénesis somática, guayaba, inducción de callos, mantenimiento de callos, medio de cultivo líquido

## HIGH FREQUENCY SOMATIC EMBRYOGENESIS ON CALLUS OF GUAVA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.) VAR. ENANA ROJA CUBANA EEA 18-40, CULTURED IN LIQUID MEDIUM

### ABSTRACT

High frequency somatic embryogenesis was induced in guava (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 calluses *in vitro* cultured in liquid medium. Immature zygotic embryos were used for callus induction as explant source and different concentrations (0, 5, 10, 15 and 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) of 2,4-D, Picloram or Dicamba as supplement of WPM medium. For establishment the maintenance or proliferation cultures condition, calluses induced with two concentrations of 2,4-D (A=1.0 y B=1.5  $\text{mg.L}^{-1}$ ) were subcultured for three times with 30 days frequency to the same medium WPM but supplemented with three different



concentrations of 2,4-D ( $A=1.0$ ,  $B=1.5$  y  $C=0.1\text{mg.L}^{-1}$ ). A callus group, induced in both concentrations, was not subcultured during every times of experiment. In order to achieve a high regeneration frequency of somatic embryos (SE), the callus were transferred to 50 mL Erlenmeyer's vessels contained 10 mL of WPM liquid medium with 2,4-D  $1.5\text{ mg.L}^{-1}$  to 100 mg of callus per mL rate. After three subcultures each 7 days by removing the old media and addition of analogous freshly medium, during 21 days, the liquid cells cultured were sieved by three different meshes. Four fractions were obtained: I ( $0-250\mu\text{m}$ ), II ( $250-500\mu\text{m}$ ), III ( $500-1000\mu\text{m}$ ) y IV ( $>1000\mu\text{m}$ ). Each fraction was subcultured to MS basal medium without growth regulators, during 21 days with 7days frequency of subculture. Somatic embryos (SE) density was evaluated and a viability analysis was preformed using the excitation by UV light and FDA. The best embryogenic callus formation (84 y 80%) was promoted by 2,4-D and Picloram ( $5$  and  $10\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), while the Dicamba showed unfavorable results. By the increase of mass fresh weight was determined that the best conditions for subculturing of embryogenic callus during maintenance phase was using either bigger concentrations or similar to used for the induction. Also the morphological develop of callus was described. When the 2,4-D was strong lowered for maintenance of callus or initial callus was not subcultured during experiment, were reached the higher SE formation percentage and the number of SE per explant. Callus cultures in liquid medium allowed to reach a morphological develop of SE with high frequency. These SE stilled joined by basal or radicle region to a central tissue with a high embryogenic competence, which was called "matrix", forming a structure alike to a "star". The higher somatic embryos densities per milliliters ( $233$  y  $226\text{ ES/mL}$ ) were achieved with the: I and II fractions, respectively. Also in these fractions was harvested the more quantity of mature somatic embryos. On the other hand was determined that the somatic embryos have more than 95% of viability in all develop stages, while the "matrix" tissue was not alive for any sampled case. The mature somatic embryos were harvested and germinated successfully in solidified MS medium without growth regulators.

Key Words: Somatic embryogenesis, guava, auxin, callus induction, callus maintenance, liquid medium

# ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE CALLOS DE *COFFEA CANEPHORA* P. VAR. ROBUSTA

María Esther González<sup>1\*</sup>, María Margarita Hernández<sup>1</sup>, Luis Miguel Mazorra<sup>1</sup>, Yohana Rodríguez<sup>2</sup>, Mireya Cabrera<sup>2</sup>. \* Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). San José de Las Lajas, Gaveta Postal 1. C.P.: 32700. La Habana, Cuba. e-mail: [esther@inca.edu.cu](mailto:esther@inca.edu.cu)

<sup>2</sup>Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao (ECICC). Tercer Frente. Santiago de Cuba, Cuba.

## RESUMEN

Diversos son los factores que influyen en el comportamiento diferenciado de las plantas ante la aplicación de las diferentes técnicas de cultivo *in vitro*, es por ello que la respuesta inicial del cultivo y su capacidad embriogénica van a depender del genotipo, el estado fisiológico de la planta y el explante, la edad de la planta donante, los factores físicos, los reguladores del crecimiento y las condiciones nutricionales, así como el cambio estacional. De aquí que el presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar la influencia de la época del año en que fue tomada la fuente de los explantes en la respuesta *in vitro* de genotipos de Robusta. Se realizaron muestreos durante todos los meses del año, los explantes foliares fueron cultivados en un medio contentivo de las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) y 0.5 y 2.0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D y kinetina, respectivamente. Se observó que la época del año en que se tomó la muestra ejerció un marcado efecto en la respuesta de los explantes de los genotipos evaluados. Para las condiciones estudiadas resultó favorable la toma de las muestras foliares en los periodos mayo - junio, enero - febrero y noviembre- diciembre, dado los bajos índices de actividad enzimática peroxidasa, oxidación fenólica y contaminación fúngica, así como un elevado porcentaje de formación de callos y mayor contenido de proteínas totales presentes en los mismos. Durante la etapa inicial de selección de las muestras se determinó que la actividad enzimática peroxidasa pudiera constituir un importante marcador, siendo este aspecto de gran utilidad práctica en el cultivo *in vitro* del café.

Palabras clave: actividad peroxidasa, callos, contaminación, época del año, oxidación

## *COFFEA CANEPHORA* P. VAR. ROBUSTA CALLUS *IN VITRO* ESTABLISHMENT

### ABSTRACT

Diverse are the factors that influence in the differentiated behavior of the plants during the application of the different techniques *in vitro* culture, the initial answer of the cultivation and their embryogenic capacity will depend on the genotype, the physiologic state of the plant and the explant, the age of the donating plant, the physical factors, the regulators of the growth and the nutritional conditions, as well as the seasonal change. The present study was carried out with the objective of evaluating the influence of the time of the year in that the source of the explants was taken in the answer *in vitro* of genotypes of Robusta. The samplings were carried out during every month of the year, the leaves explants were cultivated in a culture media with the mineral salts of Murashige and Skoog (1962) and 0.5 and 2.0 mg.L<sup>-1</sup> of 2,4-D and kinetina, respectively. Was observed that the time of the year in that took the sample exercised a marked effect in the answer of the explants of the evaluated genotypes. For the studied conditions was favorable the taking of the samples in the periods May - June, January - February and November - December, given the index floor of activity enzymatic peroxidases, phenolic oxidation and fungous contamination, as well as a high percentage of formation of callus and bigger content of present total proteins in the same ones. During the initial stage of selection of the leaves samples was determined that the activity enzymatic peroxidases could constitute an important marker, being this aspect of great practical utility in the *in vitro* culture of the coffee.

Key words: activity peroxidases, callus, contamination, time of the year, oxidation

# ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE LA CAOBA (*SWIETENIA MACROPHYLLA* KING)

Raúl Collado\*, Raúl Barbón, Daniel Agramonte, Felipe Jiménez, Martha Pérez, Odalys Gutiérrez.  
\*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. CP 54 830. Cuba. e-mail: [raulc05@ibp.co.cu](mailto:raulc05@ibp.co.cu)

## RESUMEN

La aplicación de técnicas de cultivo de tejido en plantas leñosas, ofrece una alternativa valiosa para la propagación de árboles elite. La caoba *Swietenia macrophylla* King es difícil de propagar mediante el cultivo de tejidos. No se cuenta con un sistema de regeneración de plantas vía organogénesis repetible para esta especie, debido básicamente a problemas de contaminación microbiana, oxidación fenólica y muerte de los tejidos en la fase de establecimiento de los explantes *in vitro*. Con el objetivo de lograr el establecimiento *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King), se partió de brotes jóvenes tomados de plantas en condiciones de campo. En la desinfección del material vegetal fueron estudiadas dos concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) combinadas con tres tiempos de exposición. Se cuantificaron el número de explantes contaminados, explantes necrosados y la supervivencia. Para lograr la brotación de los segmentos nodales y ápices *in vitro*. Se estudiaron cinco concentraciones de 6-BAP (0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 1.0 mg.l<sup>-1</sup>) y un control sin reguladores del crecimiento. A los 28 días de cultivo se evaluaron el número de explantes brotados y la longitud promedio del brote (cm). El tratamiento con NaClO al 3.0 % durante 20 minutos mostró el valor máximo de supervivencia y presentó bajos porcentajes de explantes contaminados y necrosados. El número de explantes brotados manifestó un aumento significativo de los valores en el tratamiento donde se adicionaron al medio de cultivo 0.2 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP. La longitud de los brotes mostraron un incremento en los valores según disminuyó o se eliminó la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo. Se logró el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de caoba vía organogénesis a partir de plantas seleccionadas en campo con el empleo de un medio de cultivo MS con los nitratos reducidos a la mitad, suplementado con 0.2 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP, paso inicial de una propagación directa.

Palabras clave: desinfección, forestales, micropropagación, segmento nodal

## ABSTRACT

The application of tissue culture techniques in ligneous plants offers a valuable alternative for the propagation of elite trees. *Swietenia macrophylla* King is difficult to propagate by means of the tissue culture and it is not counted on a system via replicate organogenesis, had to problems of microbial contamination, phenolic oxidation basically and death of weaves in the phase of establishment of the explantes *in vitro*. With the objective of obtaining the *in vitro* establishment of mahogany (*Swietenia macrophylla* King), the starting material were young buds taken from plants in field conditions. Disinfection of the vegetal material two concentrations of hypochlorite of sodium (NaClO) combined with three times of exposition were studied. The number of contaminated explants, necrotic explants and survival, were quantified. In order to obtain emission of buds the nodal segments and apices. Five concentrations of 6-BAP (0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 1.0 mg.l<sup>-1</sup>) were studied. After 28 days the number explants sprouted and average length of the bud in (cm) were evaluated. Treatment with 3.0 % concentration NaClO during 20 minute showed maximum value of survival and presented low percentage of contaminated and necrosed explants. Number explants sprouted presented increase significant of values when in the culture medium 0.2 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP was added. The length of the buds showed an increase in the values according to diminished or the concentration of 6-bap in culture means was eliminated. The establishment of vigorous shoots of mahogany was obtained with a concentration of 0,2 mg.l<sup>-1</sup> 6-BAP with the use of nodal segments as explants, initial step of a direct propagation.

Key words: disinfection, explants, forest, micropropagation, nodal segments

# ESTUDIOS FISIOLÓGICOS SOBRE EL DESARROLLO Y ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS ARBÓREAS DEL GÉNERO *PAULOWNIA* SPP. EN ZONAS ÁRIDAS Y SEMI-ÁRIDAS

Lilia Alcaraz Meléndez<sup>1\*</sup>, Sergio Real Cosío<sup>1</sup>, Gloria Ayala Astorga<sup>2</sup>, José Manuel Llano Sotelo<sup>2</sup>, Jesús Meza Valenzuela<sup>2</sup>, Maximina Suárez Hernández<sup>1</sup>. \* Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Programa Agricultura de Zonas Áridas, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, Baja California Sur, México. e-mail: [lalcaraz04@cibnor.mx](mailto:lalcaraz04@cibnor.mx)

<sup>2</sup>Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Blvd.. Luis Encinas y Rosales, Hermosillo, Sonora, México.

## RESUMEN

*Paulownia* es un árbol de rápido crecimiento, comparado con otros maderables, es fuerte y resistente; se emplea para la obtención de madera, la cual es ligera y resistente, gracias a estas cualidades en muchos lugares se le conoce como el aluminio de las maderas, además de ser resistente, es inalterable, rígida, indeformable, inastillable, no se pudre, impermeable, sin olor, aislante térmico, aislante acústico, fácil de trabajar, teñible y además económica. Debido a la necesidad en las zonas áridas y semi-áridas de resolver los problemas de producción forestal, se espera solucionar un problema prioritario para la región desarrollando biotecnologías para el aprovechamiento de una especie de interés forestal, promoviendo sistemas de producción de cultivos alternativos. El presente trabajo esta enfocado hacia la propagación mediante cultivo de tejidos de cuatro especies de *Paulownia*, que son *P. elongata*, *P. fortunei*, *P. imperialis* y *P. catalpifolia*. Se emplearon técnicas *in vitro* para la regeneración siguiendo las estrategias de brotación, proliferación de yemas y organogénesis empleando el medio Wood Plant Wood combinado con 6-bencilaminopurina. Posteriormente se llevaron a cabo estudios fisiológicos con respecto a tolerancia, a salinidad por medio de aplicación de cloruro de sodio, tolerancia a sequía y respuesta morfológica y bioquímica. Los resultados obtenidos nos mostraron que cada especie tiene diferente grado de tolerancia a salinidad y sequía y se observó que tienen una gran capacidad de adaptación por lo que con los estudios realizados se puede considerar como una especie de interés forestal para promover sistemas de producción de cultivos alternativos en las zonas áridas y semi-áridas.

Palabras clave: cultivo de tejidos, *Paulownia*, salinidad, sequía

## PHYSIOLOGICAL STUDIES FOR ADAPTATION AND DEVELOPMENT OF *PAULOWNIA* SPP. IN ARID AND SEMI-ARID REGIONS

### ABSTRACT

*Paulownia* is fast-growing, compared to other forest trees. The wood is strong, resistant, light, and used for high-value furniture. Because of these qualities, *Paulownia* is known as the aluminum of woods. Additionally, it is rigid, shatterproof, rot resistant, water proof, without scent, easily worked, easy to dye, relatively inexpensive and has low thermal and sound transmission properties. In arid and semi-arid regions, there is a pressing need to solve forest production. This investigation attempts to solve forestry environmental and economic problems by developing biotechnological strategies for improving forest production by promoting systems of alternative production. In particular, we focused on propagation by tissue culture of four species of *Paulownia* (*P. elongata*, *P. fortunei*, *P. imperialis*, and *P. catalpifolia*). In vitro techniques for regeneration followed bud production and proliferation strategies. Organogenesis required wood plant medium combined with 6-benzilaminopurine. Physiological studies of salt tolerance were tested with application of sodium chloride. Drought tolerance and morphological, and biochemical analyses were performed. Our results showed that the several species have different degrees of tolerance for salt and drought and all species had great capacity of adaptation to stress conditions. Therefore, *Paulownia* should be considered as a plantation tree that will grow quickly under semi-arid conditions. Agencies should promote production systems involving *Paulownia* as an alternative silviculture in arid and semi-arid ecosystems.

Key words: drought, *Paulownia*, salinity, tissues culture

# EVALUACIÓN DE LA ESTIMULACIÓN ELECTROMAGNÉTICA EN LA MULTIPLICACIÓN DE *COFFEA ARABICA* POR CULTIVO *IN VITRO*

Elizabeth Isaac Aleman<sup>1</sup>, Yalina Perez Portero<sup>2\*</sup>, Anmarli O. Rodríguez. \* Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado.

<sup>2</sup>Departamento de Biología. Universidad de Oriente. Patricio Lumumba S/N codigo postal 90 500. e-mail: [yalyfpp@gmail.com](mailto:yalyfpp@gmail.com), [yalyfpp@yahoo.es](mailto:yalyfpp@yahoo.es), [yalinapn@cnt.uo.edu.cu](mailto:yalinapn@cnt.uo.edu.cu)

## RESUMEN

Resultado de varias investigaciones confirman la existencia de una relación significativa entre el campo electromagnético y una amplia variedad de procesos biológicos a escala celular, actualmente se realizan numerosas investigaciones sobre la estimulación electromagnética en la agricultura. Con el objetivo, de determinar los tiempos de exposición y niveles de inducción electromagnética que mayor efecto estimulador producen en la multiplicación de plántulas de *Coffea arabica* L. var. Isla 5-15 (café) por cultivo *in vitro* y de medir algunos parámetros morfológicos de las plántulas estimuladas se realizó este trabajo, en el cual se empleó la Metodología de Micropropagación e Identificación Bioquímica de variedades de cafeto (*Coffea* sp.) De la Cruz *et al.* (1990) y se utilizó el dispositivo electromagnético BioNak-03. Se realizaron tratamientos crónicos variando el nivel de inducción electromagnética a 20, 40 y 60 Gauss además del tiempo de exposición a 3 y 9 minutos en la etapa de multiplicación. Se determinó la mejor inducción y el mejor tiempo de exposición, los parámetros morfológicos evaluados (la longitud del tallo y la raíz, número de pares de hoja; área foliar) se tomaron como medidas para determinar la mejor inducción y el mejor tiempo de exposición. Los resultados demuestran que este tratamiento electromagnético es adecuado para acelerar la multiplicación de plántulas *Coffea arabica* L. var. Isla 5-15, aumentando por tanto el número de plántulas en el tiempo y el desarrollo de las mismas.

Palabras clave: electromagnética, estimulación, inducción, multiplicación

## ABSTRACT

Result of several investigations confirms the existence of a significant relationship between the electromagnetic field and a wide variety of biological processes to cellular scale, at the moment they are carried out numerous investigations on the electromagnetic stimulation in the agriculture. With the objective, of determining the times of exhibition and levels of electromagnetic induction that bigger stimulant effect takes place in the multiplication of plants of *Coffea arabica* L. var. Isla 5-15 (coffee) for cultivation *in vitro* and of measuring some morphological parameters of the stimulated plants it was carried out this work, in which was used the Methodology of Micropropagation and Biochemical Identification of coffee varieties (*Coffea* sp.) De la Cruz *et al.*, (1990) and was used the electromagnetic device BioNak-03. They were carried out chronic treatments varying the level of electromagnetic induction to 20, 40 and 60 Gauss besides the time of exhibition to 3 and 9 minutes in the multiplication stage. It was determined the best induction and the best time of exhibition, the morphological parameters evaluated (the longitude of the shaft and the root, number of even of leaf; foliate surface) they took as measures to determine the best induction and the best time of exhibition. The results demonstrate that this electromagnetic treatment is adapted to accelerate the plants multiplication of *Coffea arabica* L. var. Isla 5-15, increasing the plants number therefore in the time and the development of the same ones.

Key words: electromagnetic, induction, multiplication, stimulation

# FORMACIÓN DE CALLOS EN LA ESPECIE *PINUS CUBENSIS* GRISEB

Raima Cantillo Ardebol\*, Luis Rodríguez de Francisco, Omar Guadalupe Alvarado, Yamila Rosales, Janet Igarza, Argelio Pifferrer, Ana M. Ochoa. \* Autor para correspondencia.

\*Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT), Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Gaveta Postal # 41. Código Postal # 80 100.  
e-mail: [rayma@cbv.holguin.inf.cu](mailto:rayma@cbv.holguin.inf.cu)

## RESUMEN

La Meseta Pinares de Mayarí es el hábitat de la especie *Pinus cubensis* Griseb., endémica de la región, amenazada por minería y explotación maderera. Comenzando los sesenta se desarrolló una técnica para la reproducción de plantas por cultivos de tejido, que se fue modificando para numerosas especies. Una de las técnicas de micropropagación más comunes, y la más recurridas para iniciar trabajos con alguna nueva especie, es la formación de brotes axilares seguido del enraizamiento de los mismos. Además es la que presenta mayores garantías de estabilidad genética. Teniendo en cuenta lo ya analizado se presenta el problema de que no existe una metodología para la micropropagación de *Pinus cubensis* capaz de satisfacer la demanda de semillas en el país para planes de reforestación en áreas minadas y de explotación forestal. Por este motivo se establece como objetivo para el presente trabajo: "Lograr la formación de callos en *Pinus cubensis* para iniciar trabajos sobre embriogénesis somática." Como explante inicial se utilizaron plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de embriones escindidos de semillas de *Pinus cubensis*. Como medio de cultivo basal se empleó el planteado por Murashige y Skoog en 1962, suplementado con 30g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 7g.L<sup>-1</sup> Agar. Se probaron cuatro combinaciones de diferentes tipos de reguladores del crecimiento para seis tipos de explantes, para un total de 24 tratamientos. Todos los tratamientos produjeron callos, siendo los mejores Kin (18 µM) + ANA (5.4 µM) y 2ip (18 µM) + ANA (5.4 µM), independientemente del tipo de explante, con porcentajes de formación de 86.2 y 85% respectivamente. De esta forma se logra por primera vez la formación de callos para esta especie.

Palabras clave: forestales, formación de callos, micropropagación

## CALLUS FORMATION IN *PINUS CUBENSIS* GRISEB. SP.

### ABSTRACT

The Plain of Pinares de Mayarí is the habitat of *Pinus cubensis* Griseb. specie, endemic from the region, threatened by mining and wood industry. In the beginning of 60's a tissue culture technique for plant reproduction was developed. It was modified for several species. One of the micropropagation techniques most common, and most used to initiate works with new species, is the axillary shoots formation with rooting. Not existing a methodology to *Pinus cubensis* micropropagation, that satisfy the needs of seeds for reforestation in mining and wood exploitation areas, the following goal is set: "To achieve *Pinus cubensis* callus formation to initiate somatic embryogenesis procedures." As inicial explant it was used plantulas obtained from excised embryos germinated *in vitro*. Basal medium was MS, supported with sacarose 30 g.L<sup>-1</sup> and Agar 7g.L<sup>-1</sup>. Four combinations of different kinds of plants growth regulators for six types of explants are tested, to 24 total treatments. Callus were produced by all treatments, being the best Kin (18 µM) + ANA (5.4 µM) and 2ip (18 µM) + ANA (5.4 µM) combinations, independently of explant type, with 6.2 y 8.5 formation averages respectively. Thus, for first time callus from *Pinus cubensis* are successfully obtained.

Key words: callus formation, forestals, micropropagation

# GERMINACIÓN *IN VITRO* DE *PINUS CUBENSIS* GRISEB

Raima Cantillo Ardebol\*, Luis Rodríguez de Francisco, Omar Guadalupe Alvarado, Yamila Rosales, Janet Igarza, Argelio Pifferrer, Ana M. Ochoa. \*Autor para correspondencia.

\*Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT), Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Gaveta Postal # 41. Código Postal # 80 100.

e-mail: [rayma@cbv.holquin.inf.cu](mailto:rayma@cbv.holquin.inf.cu)

## RESUMEN

La Meseta Pinares de Mayarí es el hábitat de la especie *Pinus cubensis* Griseb., endémica de la región, amenazada por minería y explotación maderera. Comenzando los sesenta se desarrolló una técnica para la reproducción de plantas por cultivos de tejidos, que se fue modificando para numerosas especies. Una de las técnicas de micropropagación más comunes, y la más recurridas para iniciar trabajos con alguna nueva especie, es la formación de brotes axilares seguido del enraizamiento de los mismos. Además es la que presenta mayores garantías de estabilidad genética. Teniendo en cuenta lo ya analizado se presenta el problema de que no existe una metodología para la micropropagación de *Pinus cubensis* capaz de satisfacer la demanda de semillas en el país para planes de reforestación en áreas minadas y de explotación forestal. Por este motivo se establece como objetivo para el presente trabajo: "Lograr la germinación *in vitro* de la especie *Pinus cubensis*." Para ello se utilizaron semillas, sometidas a un pre-tratamiento de inmersión en agua durante 72, luego se desinfectaron lavándolas con detergente comercial más unas gotas de Tween 20 en agitación constante durante 20 minutos y aplicándoles Cloralex (cloro comercial al 6%) a diferentes concentraciones y tiempos. Como medio basal se empleó el Murashige y Skoog (1962). Se evaluó la germinación de semillas en medio de cultivo con diferentes composiciones de reguladores del crecimiento y se determinó la influencia de la presencia o ausencia de la cubierta de la semilla en el proceso, implantando semillas con y sin testa en el mejor medio obtenido en el experimento anterior. Los mejores resultados se lograron desinfectando el material con Cloralex al 15% en 15 minutos de inmersión e implantando semillas sin testa en medio MS libre de reguladores del crecimiento. Con este método se logró la germinación de la especie.

Palabras clave: forestales, germinación, micropropagación

## IN VITRO GERMINATION OF *PINUS CUBENSIS* GRISEB

### ABSTRACT

The Plain of Pinares de Mayarí is the habitat of *Pinus cubensis* Griseb. specie, endemic from the region, threatened by mining and wood industry. In the beginning of 60's a tissue culture technique for plant reproduction was developed. It was modified for several species. One of the micropropagation techniques most common, and most used to initiate works with new species, is the axillary shoots formation with rooting. Not existing a methodology to *Pinus cubensis* micropropagation, that satisfy the needs of seeds for reforestation in mining and wood exploitation areas, the following goal is set: "To achieve *in vitro* germination from *Pinus cubensis*." As initial explant it was used seeds previously pre-treated with 72 h water immersion. Disinfected started with a wash with commercial detergent plus three drops of Tween 20 in permanent agitation during 20 minutes. Then, Cloralex (commercial bleach at 6%) at different concentrations and time were tested. As basal medium Murashige y Skoog (1962) was used. Germinations of seeds in medias with different plant growth regulators compositions were evaluated, and the influence on germination of the presence or absence of seminal cover was determined, planting seeds with or without seminal cover in best media obtained in former experiment. Best results were achieved disinfecting material with Cloralex at 15% in 15 minutes of immersion then planting seeds without seminal cover in MS media free of plant growth regulators. Thus, germination of the specie was achieved for first time.

Key words: forestals, germination, micropropagation

# HISTOLOGÍA DE LA REGENERACIÓN DE BROTES ADVENTICIOS EN HOJAS DE GUAYABA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.) VAR. ENANA ROJA CUBANA EEA 18-40, CULTIVADAS *IN VITRO*

Lelurlys Nápoles Borrero<sup>1</sup>, Oscar Concepción Laffitte<sup>1</sup>, Pedro Marrero Suárez<sup>3</sup>, Ninel Peralta Ballbé<sup>2</sup>, Aurora T. Pérez Martínez<sup>2</sup>, Reinaldo Trujillo Sánchez<sup>2</sup>. \* Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos; <sup>2</sup>Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Avila. Carretera a Morón, Km 9. CP 69450. Ciego de Avila. Cuba. e-mail: [lnapoles@bioplantass.cu](mailto:lnapoles@bioplantass.cu)

<sup>3</sup>Departamento de Botánica, Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Avila. Carretera a Morón, Km 9. CP 69450. Ciego de Avila. Cuba.

## RESUMEN

Se realizó un estudio histológico del proceso de regeneración de brotes adventicios en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas *in vitro* con el objetivo de determinar el mecanismo morfogénico que da lugar a los brotes regenerados, así como demostrar el papel de la herida en este proceso. Luego de un período de cultivo *in vitro*, las hojas de los brotes apicales se separaron por el pecíolo, se le realizaron varios pinchazos a lo largo del nervio central y se colocaron con polaridad axial en frascos de cultivo que contenían 25 ml de medio de regeneración de brotes MS suplementado con 0.75 mg.L<sup>-1</sup> de BAP y 0.1 mg.L<sup>-1</sup> de AIA. Estos explantes se muestrearon con una frecuencia de 11 días hasta hacer los 44 días de cultivo. Las muestras fueron procesadas y teñidas con la técnica de doble tinción Safranina-Fast Green de acuerdo con Johansen (1940). Se pudo observar que las denominadas protuberancias o pequeños nódulos meristemáticos tienen un origen pluri-tisular. Se evidenció que en algunos casos la proliferación de pequeños grupos de células meristemáticas se inició a partir del tejido epidérmico y sub-epidérmico, mientras que en otros el tejido parenquimático perivascular comenzó a desarrollar una serie de divisiones anticlinales y periclinales que dieron lugar a deformaciones en el nervio central hasta formar estructuras nodulares. Se demostró que en las hojas de guayaba la principal actividad morfogénica ocurre en los tejidos que conforman el nervio central y está asociada fundamentalmente a las zonas donde se produjo una herida. Por otro lado se comprobó que las protuberancias son estructuras nodulares organizadas en centros meristemáticos que alcanzan en ocasiones un estado de diferenciación que le permite independencia y con ello la organización de un meristemo caulinar el cual da lugar a un brote. Con estos resultados se pudo verificar que los brotes originados a partir de las hojas de guayaba cultivadas *in vitro* tienen un origen organogénico indirecto.

Palabras clave: Histología, regeneración de brotes, guayaba, cultivo de tejidos, organogénesis

## HISTOLOGY OF ADVENTITIOUS SHOOT REGENERATION FROM *IN VITRO* CULTURED LEAVES OF GUAVA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.) VAR. ENANA ROJA CUBANA EEA 18-40

### ABSTRACT

A histological study was performed for adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of guava (*Psidium guajava* L.) in order to determine the morphogenetic mechanism that allows the shoot regeneration and to show the role of wound in this process. After an adequate *in vitro* culture period the leaves were removed from apical shoot and were wounded at the main vein. The leaves were inoculated in 25 ml of regeneration medium MS supplemented with BAP 0.75 mg.L<sup>-1</sup> and AIA 0.1 mg.L<sup>-1</sup>. The explants were sampling with a frequency of 11 day during 44 days of culture. The samples were processed and tinted with Safranin-Fast Green according to Johansen (1940). In different slides was observed that the protuberances or "little meristematic nodules" formed have a pluri-tissular origin. In several cases meristematic cellular divisions were beginning from epidermal and sub-epidermal tissues, while in other cases the vascular parenchymatic tissues began to develop with continued anticlinal and periclinal cell divisions until forming the nodular structures. Also, was demonstrated that the most important morphogenic ability of guava leaf was carry out at the main vein and it was generally associated with the wounded region. On the other hand was confirmed that the protuberances are nodular structures organized in meristematic centres which achieve a high differentiation stage that allows independence and the reorganization of a new caulinar meristem. With these results was possible verify that the adventitious regenerated shoots from *in vitro* cultured leaves of guava have an indirect organogenic origin.

Key words: Histology, shoot regeneration, guava, tissues culture, organogenesis





# TALLER BAMBÚ

# ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA *GUADUA* SPP EN COLOMBIA EMPLEANDO MICROSATÉLITES DE ARROZ Y CAÑA DE AZÚCAR

Marta Leonor Marulanda Angel\*, José Luis Claroz V, Ana María López Gutiérrez. \*Autor para correspondencia.

Grupo de Biodiversidad y Biotecnología - Facultad de Ciencias Ambientales - Universidad Tecnológica de Pereira, La Julita, Pereira, Colombia, Telefax: 3212443, ubioteve@utp.edu.co

## RESUMEN

El género *Guadua* es uno de los 77 géneros pertenecientes a la subfamilia *Bambusoideae*, la cual está dividida en tribus donde se han identificado 1030 especies en el mundo, 500 de ellas encontradas en América. La especie *Guadua angustifolia* Kunth se distribuye en Colombia, Ecuador y Venezuela y ha sido introducida con éxito en algunos países de Centroamérica, el Caribe y Asia, esta especie es el tercer bambú más grande del mundo superado únicamente por dos especies asiáticas. *Guadua angustifolia*, posee un grado de variabilidad genética importante expresada a nivel fenotípico, la cual ha sido posible diferenciar de acuerdo con características morfológicas, taxonómicas y observaciones de comunidades locales. Se estudió la diversidad genética de la *Guadua* en un grupo de 55 accesiones utilizando secuencias microsatélites de cultivos genéticamente cercanos a la *guadua* como arroz y caña de azúcar, obteniendo amplificaciones positivas con 27 microsatélites de arroz, 3 de ellos con bandas polimórficas y 10 microsatélites de caña de azúcar, 1 de ellos con bandas polimórficas. Según el índice de Dice, se distinguen de dos a tres grupos de similitud, uno de ellos, separa la especie *G. amplexifolia*, entre tanto, los biotipos "Castilla", "Cebolla", "Cotuda", "Criolla" y "Grandicaula" se reúnen en otro grupo. El análisis de correspondencia múltiple permite evidenciar 8 grupos, en donde uno de ellos, el más grande, reúne casi todas las accesiones de la especie *G. angustifolia* y sus biotipos, así mismo, este análisis separa las especies *G. amplexifolia* y *G. superba*, pero no las especies *G. uncinata* y *G. macrospiculata*.

Palabras clave: Bambú, Biodiversidad, *Guadua angustifolia*, Marcadores moleculares, Microsatélites

## ANALYZING THE GENETIC DIVERSITY OF *GUADUA* SPP. IN COLOMBIA USING RICE AND SUGARCANE MICROSATELLITES

### ABSTRACT

The *Guadua* genus is one of the 77 genera of the *Bambusoideae* subfamily, with 1030 species identified worldwide, 500 of which are found in the Americas. *Guadua angustifolia* Kunth—the third largest bamboo species—is distributed throughout Colombia, Ecuador, and Venezuela, and has been successfully introduced into Central America, the Caribbean, and Asia. To study its genetic diversity, 55 accessions were evaluated using microsatellite sequences of rice and sugarcane, crops genetically related to this species. Positive amplifications were obtained with 27 rice microsatellites and 10 sugarcane microsatellites. Three groups of similarity were distinguished using the Dice index. The first is formed mainly by individuals of *G. angustifolia* and biotypes 'macana' and 'criolla', but also includes *G. uncinata* and *G. superba*. The second is formed by other *G. angustifolia* accessions and biotypes 'cebolla', 'cotuda', and 'castilla'. The third, with 60% similarity, gathers all individuals of *G. amplexifolia* and one of *G. angustifolia*.

Key words: biodiversity, giant bamboo, molecular markers, microsatellites

# BAMBÚES CON MARCADOS EFECTOS ALELOPÁTICOS

Cristóbal Ríos<sup>1\*</sup>, Misael Rosales<sup>2</sup>, Rafael Sosa<sup>3</sup>, Sinesio Torres<sup>2</sup> y Patrick Van Danne<sup>4</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Jardín Botánico Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½ . Santa Clara Villa Clara. Cuba.

<sup>2</sup> Grupo de Alelopatía, Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Central de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½ . Santa Clara Villa Clara. Cuba.

<sup>3</sup> Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½ . Santa Clara Villa Clara. Cuba.

<sup>4</sup> University of Ghent, Department of Plant Production, Belgium. e-mail: [rios.cristobal@gmail.com](mailto:rios.cristobal@gmail.com), [crios@uclv.edu.cu](mailto:crios@uclv.edu.cu)

## RESUMEN

Extractos acuosos provenientes de hojarascas de *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland, *Guadua angustifolia* Kunth y *Dendrocalamus strictus* Nees, fueron probados sobre la germinación y crecimiento de las semillas de: frijoles (*Phaseolus vulgaris* L.), calabaza (*Cucurbita moschata* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) lechuga (*Lactuca sativa* L.), maíz (*Zea mays*, L.), arroz (*Oryza sativa* L.), entre otras. Las hojarascas provenían de bambúes de la colección del Jardín Botánico de Cienfuegos. El potencial redox (mV) 24.5, 61.1 y 55.2; pH 6.72, 6.11 y 6.22 y la conductividad (μS/cm) 550, 684 y 598 fueron obtenidos de sus respectivos licores. Altos tenores de microelementos fueron encontrados especialmente de Fe (587.88 ppm) de las hojarascas de *D. strictus*. Comprobamos la eficacia de los bambúes frente a las malezas presentes en un suelo Pardo con carbonatos. Con el uso de los extractos la germinación fue inhibida en un (60%) para la calabaza; (70%), en el rábano (57.5%), tomate (87.5%), lechuga (72%), arroz (85%), melón de agua (80%) quimbombó (60%), berenjena (90%), rábano (57.5%) y millo (55%), incrementándose la germinación del ajonjolí (+15%) y no hubo influencia sobre la germinación del frijol y el maíz. Hubo reducción del crecimiento de los epicotilos y de las radículas de maíz, tomate, melón, lechuga, calabaza y frijol. Los cepellones que mayor cantidad de malezas presentaron corresponden al testigo. El fraccionamiento del extracto y la caracterización del mismo se basaron en el empleo de la cromatografía de gel filtración con (Sephadex G-10) y su combinación con técnicas espectrofotométricas UV- visible utilizando el SP-8 UV/VIS. Se obtuvieron 4 fracciones de un extracto de *B. vulgaris*, las cuales mostraron un marcado efecto alelopático en arroz (*Oryza sativa*, L.) y maíz (*Zea mays*, L.). Se comprueba por primera vez en Cuba el efecto alelopático de *Guadua angustifolia*, *Bambusa vulgaris* y *Dendrocalamus strictus* frente a diferentes cultivos tropicales.

Palabras clave: Alelopatía, bambúes, *Bambusa vulgaris*, cultivos tropicales

## ALLELOPATHIC POTENCIAL OF SOME BAMBOO SPECIES

### ABSTRACT

Effects of *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland, *Guadua angustifolia* Kunth and *Dendrocalamus strictus* Nees leaves extracts on seed germination and grow of beans (*Phaseolus vulgaris* L.), squash (*Cucurbita moschata* L.), carrot (*Daucus carota* L.), tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) lettuce (*Lactuca sativa* L.), maize (*Zea mays*, L.), rice (*Oryza sativa* L.) gourd melon (*Cucumis melo* L.); sesame (*Sesamum indicum* L.) okra (*Abelmoscus sculentus* Moench.) eggplant (*Solanum melongena* L.) turnip (*Brassica napus* L.) and millet (*Sorghum bicolor* Kuntze), seeds were studied. Aqueous extracts were prepared from the dry leaves clinging on adult bamboo culms and applied to the seeds. Redox potential (mV) 24.5, 61.1, and 55.2; pH 6.72, 6.11 and 6.22 and conductivity (μS/cm) 684, 550, and 598 were obtained from its respectively extracts. High microelements tenors stand out especially of Fe (587.88 ppm) for the fallen lives of *D. strictus*. All bamboo species tested showed an allelopathic effect. With use of bamboo extracts germination was inhibited in squash (60%) carrot (70%), radish (57.5%), tomato (87.5%), lettuce (72%), rice (85%), gourd melon (80%) okra (60%), eggplant (90%), turnip (57.5%) and millet (55%), increasing sesame germination (+15%), and there was not influence on bean and maize germination; and reducing the stem and root growth of maize, tomato, gourd melon, lettuce, squash and bean. The strongest allelopathic effect was observed for *G. angustifolia* and *B.*

*vulgaris*. between the determined concentrations and the observed. It is the first report of allelopathic effects of *Guadua angustifolia*, *Bambusa vulgaris*, and *Dendrocalamus strictus* in different tropical crops in Cuba.

Key words: Allelopathic potencial, bamboo, *Bambusa vulgaris*, tropical crops

# ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *GUADUA ANGUSTIFOLIA* KUNTH

Marisol Freire Seijo\*, Lillien Fajardo Rosabal y Yudith García Ramírez. \*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. CP 54 830. Cuba. e-mail: [marisolf05@ibp.co.cu](mailto:marisolf05@ibp.co.cu)

## RESUMEN

Para la propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia* se han descrito varias dificultades entre las que podemos citar, la contaminación endógena y la necrosis de los explantes, como las más importantes. Estas dificultades han limitado la posibilidad de emplear de manera eficiente y repetible los protocolos de propagación *in vitro* desarrollados. Para el establecimiento *in vitro* se emplearon yemas axilares de plantas rejuvenecidas en casa de cultivo. La colecta del material vegetal se realizó en período lluvioso y de seca. Se emplearon varias estrategias de desinfección de los explantes y medios de cultivo. Con el empleo de dos ciclos de aplicaciones de fungicidas sistémicos y de contacto en fase 0 a plantas rejuvenecidas en casa de cultivo se logró el establecimiento *in vitro* de yemas axilares. Durante el período de seca fue posible reducir la contaminación microbiana entre un 18.8 y un 23.2% y se obtuvo 2.4 yemas brotadas por explante, al emplear para la desinfección el hipoclorito de sodio al 1.0% durante 5 minutos. El medio de cultivo semisólido (2.5 g.L<sup>-1</sup>) de Gelrite permitió alcanzar un 91.97% de brotación de las yemas y 75% de supervivencia. En período de lluvia fue necesario utilizar el hipoclorito de sodio al 2.0% durante 20 minutos para disminuir el porcentaje de contaminación a 35.90% sin afectar la brotación de las yemas axilares, unido a la adición al medio de cultivo de 2.5 mg.L<sup>-1</sup> de 6 BAP. Bajo estas condiciones fue posible obtener plantas de 2.33cm de altura.

Palabras clave: brotación, fungicidas, yemas axilares

## *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF *GUADUA ANGUSTIPHOLIA* KUNTH

### ABSTRACT

For the propagation *in vitro* of *Guadua angustifolia* several difficulties have been described between which we can mention, the endogenous contamination and the necrosis of the explants, like most important. These difficulties have limited the possibility of using a efficient and repeatedly way the protocols of propagation *in vitro* developed. For the establishment *in vitro* auxiliary buds of rejuvenated plants in culture house were used. It collects it of the yolks as made in rainy period and of drought. Several strategies of disinfection and means of culture were used. With the use of two cycles of applications of systemic fungicides and contact in phase 0 to rejuvenated plants in culture house the establishment *in vitro* of auxiliary buds was obtained. During the period of drought it was possible to reduce the microbial contamination between a 18,8 and 23,2% and one obtained 2,4 buds brought forth by explant, when using for the disinfection the hypochlorite of sodium to the 1,0% during 5 minutes. The culture means semisolid (2,5 g.L<sup>-1</sup>) of Gelrite allowed to reach 91,97% of sprouting of yolks and 75% of survival. In period of rain it was necessary to use the hypochlorite of sodium to the 2,0% during 20 minutes to diminish the percentage of contamination to 35,90% without affecting the sprouting of the auxiliary yolks, together with the addition to means of culture of 2,5 mg.L<sup>-1</sup> of 6 BAP. Under these conditions it was possible to obtain plants of 2.33cm of height.

Key words: auxiliary sprouting, fungicide, buds

# MICROPROPAGACIÓN DE *GUADUA ANGUSTIFOLIA* KUNTH

Marta L. Marulanda, Luis G. Gutiérrez\*, Marcela Uribe Lastra, Ma. del Pilar Márquez. \*Autor para correspondencia.

Grupo en Biodiversidad y Biotecnología, Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Tecnológica de Pereira, La Julita, telefax: (6)- 3212443, Colombia, e-mail: [ubioteve@utp.edu.co](mailto:ubioteve@utp.edu.co)

## RESUMEN

La *Guadua angustifolia* se encuentra dentro de los siete géneros de bambú leñosos registrados, adicionalmente es el más grande y económicamente más importante de América Tropical. En Colombia, los guaduales se encuentran concentrados en la región central de los Andes (Cordillera Central) generalmente entre los 1000-1500 m.s.n.m. Desafortunadamente, la tala indiscriminada y la destrucción general del hábitat ha afectado los guaduales y su extensión se está disminuyendo. En este trabajo se investigaron métodos de propagación *in vitro* en *G. angustifolia* (brotación axilar y embriogénesis somática), con el fin de obtener, a partir de material seleccionado, producción a gran escala de plántulas para la reforestación y el establecimiento de plantaciones comerciales. Se obtuvieron plantas a partir de chusquines de *Guadua angustifolia* mediante regeneración *in vitro* de yemas axilares. En la fase de desinfección, se evaluaron, el bicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) y el hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) con distintos tiempos de aplicación. El medio de cultivo en el que se presentaron mejores respuestas estaba compuesto por las sales y vitaminas MS suplementado con 2.5 mg/l de 6 BAP, 10 mg/l de mio-inositol, 30 g/l de sacarosa y gelificado con 2.5 g/l gelrite. A la cuarta semana de cultivo se evaluó el número de yemas contaminadas por hongos y bacterias, así como el número final de yemas establecidas y la influencia de la edad fisiológica de las yemas. En la micropropagación de *G. angustifolia*, se lograron además resultados en embriogénesis somática. Se obtuvieron callos proembriogénicos a partir de yemas axilares en un medio suplementado con 6 mg/l de 2,4-D. Los callos obtenidos fueron transferidos a medios sin auxinas donde se observó la aparición de estructuras embriogénicas. Los resultados obtenidos sugieren la presencia de un proceso de regeneración vía embriogénesis somática en *G. angustifolia*, el cual no ha sido descrito hasta el momento.

Palabras clave: bambusas, cultivo de tejidos *in vitro*, embriogénesis somática, organogénesis, *Poaceae*

## MICROPROPAGATION OF *GUADUA ANGUSTIFOLIA* KUNTH

### ABSTRACT

Giant bamboo (*Guadua angustifolia*) is one of the seven genera of woody bamboo recorded and, economically, the most important of tropical America. In Colombia, the stands of giant bamboo—the tallest of all bamboos—are usually found in the central Andes (Central Cordillera) at altitudes ranging from 1000 to 1500 meters above sea level. Unfortunately, the indiscriminate felling and general destruction of the habitat have affected the bamboo stands and their extension is shrinking. This study addresses the use of two *in vitro* propagation methods in selected materials of *G. angustifolia*, axillary budding and somatic embryogenesis, for the large-scale production of seedlings for reforestation and establishment of commercial plantations. Plants were obtained *in vitro* from bamboo culms through the regeneration of axillary buds. The use of mercury bichloride ( $\text{HgCl}_2$ ) and sodium hypochlorite ( $\text{NaOCl}$ ), with different application times, was evaluated during the disinfection phase. The best response was observed in culture media containing MS salts and vitamins supplemented with 2.5 mg/l 6-BAP, 10 mg/l myoinositol, and 30 g/l sucrose and gellified with 2.5 g/l Gelrite. The number of buds contaminated by fungi and bacteria was evaluated after 4 weeks of culture, as were the final number of buds established and the influence of the physiological age of the buds. In addition to the micropropagation of *G. angustifolia*, results were obtained through somatic embryogenesis. Proembryogenic calluses were obtained from axillary buds in a medium supplemented with 6 mg/l 2-4D. The calluses obtained were transferred to media without auxins where the appearance of embryogenic structures was observed. The results obtained suggest the presence of a regeneration process via somatic embryogenesis in *G. angustifolia*, which has not been described to date.

Key words: Bamboos, *in vitro* tissue culture, somatic embryogenesis, organogenesis, *Poaceae*

# **BOTÁNICA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *GUADUA* Y OTRAS *BAMBUSOIDEAE* DE AMÉRICA**

Ximena Londoño

## **RESUMEN**

Los bambúes son un elemento común en el continente americano. Se registran bambúes nativos en todos los países de América con excepción de Canadá. Por su rápido crecimiento, gran versatilidad y resistencia, esta maravillosa gramínea ha sido de gran utilidad para el hombre a lo largo de su historia. Se conocen como las gramíneas más grandes del mundo y se distinguen del resto de ellas por una serie de caracteres entre los que sobresalen su hábito perenne, sus rizomas y culmos bien desarrollados y lignificados y las láminas foliares pecioladas. Los bambúes pertenecen a la familia *Poaceae* y a la subfamilia *Bambusoideae*, y se han dividido en dos grandes tribus: 1) *Olyreae* o de los bambúes herbáceos, y 2) *Bambuseae* o de los bambúes leñosos. Los bambúes leñosos por ser renovables, sostenibles en el tiempo, de rápido crecimiento, y por tener tejidos lignificados y fuertes, se consideran una gran alternativa para sustituir la madera. Con esta conferencia se pretende dar un conocimiento amplio de la biología, anatomía, preferencias de usos y potencial de los bambúes americanos con especial énfasis en el género *Guadua* y en la especie *Guadua angustifolia* Kunth.

**Objetivo.** Brindar un panorama general sobre las *Bambusoideae* de América, haciendo especial énfasis en el género *Guadua*.

## MANEJO BIOTECNOLOGICO DE LA *GUADUA ANGUSTIFOLIA*

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

Laboratorio de Células y Tejidos. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Avila. Carretera a Morón Km 9. CP 69450. Cuba. e-mail: [mdaquinta@bioplasmas.cu](mailto:mdaquinta@bioplasmas.cu)

### RESUMEN

Los bambúes son de vital importancia para los programas de construcción y de fabricación de muebles, entre otras aplicaciones. La *Guadua angustifolia* conocido como el acero vegetal, es un bambú originario de Ecuador y Colombia con ciertas características particulares, lo cual es de gran interés para los programas de reforestación. Las vías de propagación vegetativas son limitadas, más cuando se desea introducir la especie a escala masiva. El objetivo del presente trabajo fue lograr la formación de callos a partir de tejido intercalar de ramas de plantas adultas de *Guadua* y el establecimiento de yemas con vistas a establecer un protocolo de propagación *in vitro*. Se utilizaron ramas laterales en activo crecimiento. Se realizó un proceso de lavado con detergente comercial y la desinfección con bicloruro de mercurio al 0.2% durante 10 minutos. Los segmentos de tejido intercalar se establecieron en el medio de cultivo Murashige y Skoog suplementado con picloram, se logró la formación de callos a partir de estos explantes. Las yemas brotaron con 50 y 100 mg/L de cefotaxima en el medio de cultivo.

Palabras clave: antibiótico, Bambú, callo, picloram



# TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE YEMAS AXILARES Y CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN EL MEDIO DE CULTIVO DE ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *GUADUA ANGUSTIFOLIA* KUNTH

Lillien Fajardo Rosabal<sup>1\*</sup>, Marisol Freire Seijo<sup>1</sup>, Arelis López Sacerio<sup>2</sup>. \* Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto 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.

<sup>2</sup>Facultad de Química-Farmacia. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.

## RESUMEN

La propagación *in vitro* de bambú se ha logrado en especies asiáticas. Sin embargo en especies americanas como la *Guadua angustifolia* Kunth aún no se cuenta con protocolos eficientes de micropropagación, debido a la complejidad de su establecimiento *in vitro*. Uno de los principales problemas que se presentan y que limita en muchos casos el éxito de su establecimiento vía organogénesis, es la necrosis de los explantes. Esta investigación se desarrolló en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, con el objetivo de determinar algunas de las causas de la muerte de los explantes, para su posterior control o eliminación mediante técnicas biotecnológicas y bioquímicas. Se realizó la identificación cualitativa de compuestos orgánicos presentes en yemas axilares *ex vitro* y en yemas axilares necrosadas durante el establecimiento *in vitro*; mediante tamizaje fitoquímico. Se realizó la cuantificación de polifenoles en el medio de cultivo donde se encontraban las yemas axilares necrosadas, mediante técnicas de espectrofotometría de absorción y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se determinó que una de las posibles causas de la mortalidad de los explantes es la presencia de polifenoles, dada por activación del metabolismo secundario como respuesta a condiciones de estrés en los explantes durante su establecimiento *in vitro*. Al demostrarse por primera vez la presencia de polifenoles tanto en yemas axilares muertas establecidas *in vitro* como en el medio de cultivo donde se encontraban en un 0.077% y concentraciones de 0.182 y 0.187 mg.ml<sup>-1</sup> para fenoles de bajo y alto peso molecular respectivamente.

Palabras clave: yemas axilares, medio de cultivo, polifenoles

# **EMPLEO DE SUSTRATOS ALTERNATIVOS EN LA ACLIMATIZACIÓN DE VITROPLANTAS DE *ESCOBARIA CUBENSIS* (BRITTON & ROSE) HUNT**

Luis Enrique Rodríguez de Francisco<sup>1\*</sup>; Argelio Piferrer Escalona<sup>1</sup>; Rayma Cantillo Ardeból<sup>1</sup>; Yamila Rosales Simonot<sup>1</sup>; Yerina Santiago Bardón<sup>1</sup>; Omar Guadalupe Alvarado Gómez<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. CITMA. Holguín.

<sup>2</sup> Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León. Jardín Botánico en Carretera a Mayabe. Teléfono: 425342. e-mail. [luis@cbv.holguin.inf.cu](mailto:luis@cbv.holguin.inf.cu) ; [luisenrique95mx@yahoo.com](mailto:luisenrique95mx@yahoo.com)

## **RESUMEN**

La fase de climatización es trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de esta, dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso de micropropagación. Con el objetivo de lograr altos porcentajes de supervivencia y encontrar un material como sustrato que resulte económicamente factible, se realizó un estudio de sustratos, utilizando desechos de hojas de bambú descompuestas ya que este presenta excelentes características físicas como nutricionales. En el trabajo se muestran los ensayos realizados con fibra de bambú en combinación con diferentes materiales, en función de la obtención de un sustrato adecuado y rentable para el manejo de las plantas en esta fase. La respuesta positiva que se obtuvo, nos permite plantear la factibilidad del empleo de este material en el proceso.

Palabras clave: micropropagación, propagación comercial, supervivencia

## **ABSTRACT**

The acclimatization phase is transcendental for the commercial propagation, cause of the results of this phase depends in a big measured the final quality of the plants and the total micropropagation process efficiency. With the objective of reaching high percents of surviving and to find a material as a support which results economically feasible, was realized a support study using decompost bamboo leaves because they present excellent physical characteristics as foods. In this work is showed the assays realized with bamboo fibres mixtured with different materials to obtain an adequate and rentable support for the plants management on this phase. A positive answer was obtained and it allows to make the feasibility of the employment of this material in the process.

Key words: micropropagation, commercial propagation, surviving

# ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *BAMBUSA VULGARIS* VAR. *STRIATA*

Yudith Y. García\*, Marisol Freire, Lillien Fajardo y Marisol Tejeda. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54830 Fax: 53-422-81329. e-mail: [yudithyanet@yahoo.es](mailto:yudithyanet@yahoo.es)

## RESUMEN

Para la propagación *in vitro* de bambúes se han empleado la embriogénesis somática y la organogénesis por yemas axilares y microestacas. En el mundo se utiliza la micropropagación como la principal biotécnica aplicada a varias especies de bambú. Es reconocida la importancia del desarrollo de la biotecnología en Bambúes con el fin de aprovechar el potencial que este tipo de plantas poseen para la construcción, desarrollo de artesanías y protección de suelos. La presente investigación se desarrolló con los objetivos de lograr el establecimiento *in vitro* a partir de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var. *Striata*. Para la desinfección de las yemas axilares se emplearon tres concentraciones de Hipoclorito de Sodio al 1.0 %, 2.0 % y 3.0 % y tres tiempos de desinfección (10, 15, 20 minutos) para establecer *in vitro* el material vegetal. Fue posible lograr el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var. *Striata*. Los mayores porcentajes de yemas establecidas se obtuvieron al emplear hipoclorito de sodio al 2.0% durante 20 minutos para la desinfección de las yemas. Entre el 88% y el 100% de las yemas brotaron y fue posible reducir la contaminación microbiana a un 6.2%.

Palabras clave: desinfección, hipoclorito de sodio, yemas axilares

## ABSTRACT

For the propagation *in vitro* of bamboo the somatic embryogenesis and the organogenesis have been used by buds axillaries and microstake. In the world the micropropagation is in use as the principal biotechnology biotechnique applied to several species of bamboo. Is recognized the importance of development of the biotechnology in Bamboo in order to take advantage of the potential that this type of plants possess for the construction, development of crafts and protection of soils. The present investigation developed with the objective of achieving the establishment *in vitro* from buds axillaries of *Bambusa vulgaris* var. *Striata*. For disinfection of the buds axillaries three hypochlorite of sodium concentrations of were used to 1.0 %, 2.0 % y 3.0 % and three times of disinfections (10, 15, 20 minutes) to establish *in vitro* the vegetative material. It was possible to achieve the establishment *in vitro* of buds axillaries of *Bambusa vulgaris* var. *Striata*. The major percentages of established buds were obtained on having used hypochlorite of sodium to 2.0 % during 20 minutes for the disinfection of the buds.

Keywords: buds axillaries, disinfection, hypochlorite of sodium

# EL BAMBÚ COMO ALIMENTO ANIMAL

Luis Catasús Guerra, UNAICC, Granma.

## RESUMEN

Se realiza el estudio bromatológico de *Bambusa vulgaris* en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", a solicitud del Grupo de Desarrollo del Bambú UNAICC, Granma, el cual muestra valores muy similares y a veces superiores a los encontrados en pastos y forrajes de conocido valor y ampliamente utilizados en la ganadería de Cuba. La literatura consultada sobre usos y aplicaciones del bambú no hace referencia sobre el valor de esta planta como alimento animal, aunque sí se menciona su palatibilidad cuando es comida por los animales herbívoros, sin embargo, el análisis bromatológico hecho en *Bambusa vulgaris*, en un suelo arenoso – arcilloso lixiviado, muestra alto contenido de Proteína Bruta, el cual no difiere en lo absoluto de la presente en forrajes valiosos como *Digitaria decumbens* (Pangola), *Panicum maximum* (Hierba de Guinea) y *Pennisetum purpureum* (Hierba de elefante). Otros contenidos minerales, aunque en dependencia de la calidad de los suelos, también están presentes en valores nada desechables, aunque el suelo donde crece la plantación en la que se realiza el examen es escaso en nutrientes minerales y orgánicos y nunca ha sido fertilizado. En el estudio bromatológico se obtuvieron los siguientes resultados: MSR 99.22, CZA 9.78, Ca 0.66, P 0.12, PB 14.37, Mg 0.18, FB 27.99, (MSR: Materia seca residual; CZA: Ceniza; Ca: Calcio; P: Fósforo; PB: Proteína bruta; Mg: Magnecio; FB: Fibra bruta. (Análisis realizado en *Bambusa vulgaris*, en el Inst. Invest. Agrop. "J. Dimitrov). Según reportes de la Estación de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" sobre los Pastos de Cuba, el valor de PB de *Panicum maximum*, a los cuatro meses de cultivado es similar al de *Bambusa vulgaris*, y los valores de *Pennisetum purpureum* y *Digitaria decumbens* se encuentran por debajo.

Palabras clave: *Bambusa vulgaris*, *Panicum maximum*, pastos

# **EFFECTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DESINFECCIÓN EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *GUADUA ANGUSTIFOLIA KUNTH***

Misterbino Borges García<sup>1\*</sup>, Carlos Ros Araluce<sup>1</sup>, Yaritza Castellanos Rubio<sup>1</sup>, Silvio Milanes Rodríguez<sup>2</sup> y Roberto Velásquez Fera<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Centro de Estudios de Biotecnología y Medio Ambiente.

<sup>2</sup>Departamento Agroforestal, Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma. Carretera Bayamo-Manzanillo Km 17, Apdo 21, Bayamo 85 100, Granma, Cuba. e-mail:[borges@udg.co.cu](mailto:borges@udg.co.cu)

## **RESUMEN**

El bambú es una planta que posee múltiples usos con un enorme impacto económico, social, cultural y ambiental. El presente trabajo de investigación se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto de distintos métodos de desinfección en el establecimiento y crecimiento *in vitro* de Bambú (*Guadua angustifolia Kunth*). Se utilizaron dos métodos de desinfección: uno simple basado en el uso de hipoclorito de sodio al 1.0%, 2.0% y 3.0% durante 25 minutos, y uno doble en el cual se utilizó hipoclorito de sodio al 2.0% a 5, 10 y 15 minutos con repetición de la desinfección a las 24 horas. Al cabo de 1, 2 y 3 semanas se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de contaminación, fenolización, muerte y brotación, número y longitud de los brotes por explante. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con análisis de varianza de clasificación simple y prueba de comparación de medias de mínima diferencia significativa. Los resultados demostraron que el método de desinfección doble basado en la utilización de hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos con repetición a las 24 horas fue el más adecuado para el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de *Guadua angustifolia Kunth*.

Palabras clave: Bambú, cultivo *in vitro*, hipoclorito de sodio, contaminación, explantes primarios

## **EFFECT OF DIFFERENT DISINFECTION METHODS IN THE *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF *GUADUA ANGUSTIFOLIA KUNTH***

### **ABSTRACT**

The bamboo is a plant that possesses multiple uses with an enormous economic, social, cultural and environmental impact. The present research work was developed with the objective of determining the effect of different disinfection methods in the establishment and growth *in vitro* of Bamboo (*Guadua angustifolia Kunth*). Two disinfection methods were applied: a simple method based on the use of sodium hypochlorite at 1.0%, 2.0% and 3.0% during 25 minutes, and a double method in which sodium hypochlorite was employed at 2.0% during 5, 10 and 15 minutes with repetition from the disinfection at 24 hours. At 1, 2 and 3 weeks the following variables were evaluated: percentage of contamination, phenolization, death and budding, number and length of the buds for explant. A design totally randomized with one way analysis of variance and means comparison test of minimum significance difference were applied. The results demonstrated that the method of double disinfection based on the use of sodium hypochlorite at 2% during 5 minutes with repetition at 24 hours is the most appropriate for the *in vitro* establishment and growth of primary explants of *Guadua angustifolia Kunth*.

Key words: bamboo, plant tissue culture, sodium hypochlorite, contamination, primary explants



# TALLER PLANTAS COMO BIOREACTORES

# ANTRAQUINONAS A PARTIR DE RAÍCES DE *MORINDA ROYOC* L.

Janetsy Borroto<sup>1\*</sup>, Reinaldo Trujillo<sup>1</sup>, Yudelsy Tandrón<sup>2</sup>, María de los Angeles Blanco<sup>1</sup>, Maribel Rivas<sup>1</sup>, Josep Coll<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplasmas. UNICA. Carretera a Morón Km. 9. CP 69450. Ciego de Ávila. Cuba e-mail: [jborroto@bioplasmas.cu](mailto:jborroto@bioplasmas.cu)

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones químicas y Ambientales de Barcelona "Josep Pascual Vila, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Jordi Girona 18-26, 08034-Barcelona, Spain.

## RESUMEN

Las antraquinonas son un importante grupo de productos naturales que se han aislado a partir de bacterias, hongos, líquenes y plantas superiores. Estos compuestos presentan diversas actividades biológicas: antimicrobiana, antifúngica, antimalarial, antitumoral y antimutagénica. En plantas superiores se encuentran en un gran número de familias. Las plantas que pertenecen a la familia *Rubiaceae* contienen grandes cantidades de antraquinonas principalmente en sus raíces. *Morinda royoc* L. (*Rubiaceae*) conocida en Cuba como Garañón se emplea en la elaboración de un producto que tiene acción estimulante, revitalizadora, antiestrés e incrementa la libido. Este producto se emplea en Cuba como suplemento dietético y se produce a partir de sus raíces. El objetivo de este estudio fue aislar, purificar y elucidar la estructura química de las antraquinonas presentes en las raíces de *Morinda royoc* L. Las mismas se aislaron a partir de un extracto diclorometánico y se purificaron por columna de sílica gel y cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa con detector de arreglo de diodo (HPLC-DAD). La estructura de las antraquinonas se estableció basada en estudios espectrales (RMN-<sup>1</sup>H). Se aislaron e identificaron seis antraquinonas, dos de ellas por primera vez descritas en esta planta: Lucidina -1- metiléter and Lucidina -1,3- dimetiléter. Además se aislaron e identificaron el nordamnacantal, damnacantal, morindona y rubiadina -1 ó 3- metiléter. Se identificó el nordamnacantal como antraquinona mayoritaria en el extracto.

Palabras clave: Antraquinonas, *Morinda royoc* L., productos naturales

## ANTHRAQUINONES FROM *MORINDA ROYOC* L. ROOTS

### ABSTRACT

Anthraquinones are an important group of natural products occurring in bacteria, fungi, lichens and higher plants. These compounds have been reported to exhibit some interesting *in vitro* biological activities: antimicrobial, antifungal, antimalarial, antitumour and antimutagenic. In higher plants, they are found in a large number of plant families. Plants belonging to the family *Rubiaceae* are known to contain substantial amounts of anthraquinones, especially in the roots. *Morinda royoc* L. (*Rubiaceae*) known in Cuba as Garañón, is used to make a product with stimulating, revitalizing and antistress activity that also increases the libidum. This product is produced from roots and used in Cuba as a diet supplement. The objective of this study was to isolate, purificate and elucidate chemical structures of anthraquinones from roots of *Morinda royoc* L. The anthraquinones were isolated from the dichloromethane extract and purified by silica gel column and using a reverse phase high performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection (HPLC-DAD). The structures of the anthraquinones were established based on spectral studies (<sup>1</sup>H-NMR). From roots of *Morinda royoc* L. six anthraquinones were isolated and identified. Two of them, namely Lucidin -1- methylether and Lucidin -1,3- dimethylether, constitute the first report of their occurrence from *Morinda royoc* L. and four known anthraquinones: nordamnacanthal, damnacanthal, morindone, rubiadin -1 ó 3- methylether. Nordamnacanthal was identified as a major anthraquinone in the extract.

Key words: Anthraquinones, *Morinda royoc* L., natural products

# EFFECTO DE LA FRECUENCIA DE INMERSIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y EL CONTENIDO DE GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS EN BROTES DE *DIGITALIS PURPUREA* L. CULTIVADOS EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

Naivy Pérez<sup>1\*</sup>, Elio Jiménez<sup>1</sup>, Dirk Wilken<sup>2</sup>, André Gerth<sup>2</sup>, Annett Jähn<sup>3</sup>, Horst-Michael Nitzsche<sup>3</sup>, Gerd Kerns<sup>4</sup>, Alina Capote<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½ . Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830. e-mail: [naivy@ibp.co.cu](mailto:naivy@ibp.co.cu), [naivylisbet@yahoo.es](mailto:naivylisbet@yahoo.es)

<sup>2</sup> BioPlanta GmbH. Deutscher Platz 5. 04103 Leipzig, Germany.

<sup>3</sup> Instituto de Química No Clásica (INC). Permosestraße 5, Leipzig, Germany.

<sup>4</sup> Instituto de Sajonia de Biotecnología Aplicada. Permosestraße 5, Leipzig, Germany.

## RESUMEN

*Digitalis purpurea*, es un ejemplo de droga cardio-activa o cardiotónica. La digoxina y digitoxina son glicósidos producidos por esta planta, los cuales ejercen una acción muy eficaz en músculos cardíacos y han sido usados ampliamente en tratamientos del corazón. El propósito de esta investigación fue estudiar el efecto de diferentes frecuencias de inmersión (cada 12, 6, 4, 3 y 2 horas), en la producción de biomasa así como en el contenido de glicósidos cardiotónicos (digitoxina y digoxina) como metabolitos secundarios de gran interés en la industria farmacéutica, determinados mediante Cromatografía Líquida. La producción de biomasa se vio favorecida a medida que se incrementó la frecuencia de inmersiones, obteniéndose los mayores valores cuando se emplean inmersiones de 2 minutos de duración cada 4 horas, con un promedio de 6 brotes por planta, con 11 cm de altura y un incremento de biomasa de 92.1g. La calidad de los brotes fue también superior al emplear inmersiones cada 4 horas, donde se observó un 27% de brotes hiperhídricos, mientras que en el tratamiento con inmersiones cada 2 horas hubo un 60% brotes hiperhídricos. El contenido de digoxina fue siempre menor que el de digitoxina. No obstante, la concentración de este metabolito aumentó con el empleo de inmersiones cada 4 y 3 horas, mientras la producción de digitoxina fue muy estable en todos los tratamientos evaluados. El efecto de la inmersión temporal sobre la acumulación de glicósidos no había sido descrito hasta el momento.

Palabras clave: inmersión temporal, metabolitos secundarios, digitoxina, digoxina

## EFFECT OF FREQUENCY IMMERSION ON BIOMASA PRODUCTION AND CONTENT OF CARDIOTONIC GLYCOSIDES IN SHOOTS OF *DIGITALIS PURPUREA* L. CULTIVATED IN TEMPORARY IMMERSION SYSTEMS

### ABSTRACT

*Digitalis purpurea*, is an example of cardiotonic or cardio-active drug. Digoxin and digitoxin are glucosides produced by this plant which are cardiac stimulants with a wide use in the treatment of heart problems. The objective of this investigation was to study the effect of different immersion frequencies (every 12, 6, 4, 3 and 2 hours) on biomass production and the content of cardiotonic glycosides (digitoxin and digoxin), determined by Liquid Chromatography. Biomass production was favoured by increasing the frequency of immersions. The highest values were obtained with 2 immersions of 2 minutes every 4 hours, with an average production of 6 shoots per explant, 11 cm in length and 92.1 g biomass increase. Quality of the shoots was affected by immersion frequency, with immersions every 4 hours 27 % of hyperhydric shoots were observed, while with immersions every 2 hours 60 % of the shoots showed hyperhydricity. The content of digoxin was always lower than digitoxin. However, the concentration of digoxin increases with immersions every 4 and 3 hours, while the accumulation of digitoxin was stable in all treatments. The effect of temporary immersion on glycosides accumulation in shoots of *Digitalis* presented in this paper has not been described in the literature till now.

Keywords: temporary immersion, secondary metabolites, digitoxin, digoxin



# MUPLICACIÓN *IN VITRO* DE LA PLANTA MEDICINAL *MORINDA ROYOC* L.

Elio Jiménez<sup>1\*</sup>, Carlos Reyes<sup>2</sup>, Pablo Peña<sup>2</sup>, Naivy Pérez<sup>1</sup>, Alina Capote<sup>1</sup>, Anabel Pérez<sup>1</sup>.  
\*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Martir Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830

<sup>2</sup>Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Villa Clara.

## RESUMEN

*Morinda royoc* L. es una planta que pertenece a la familia de las rubiáceas y es reconocida por sus propiedades medicinales. El presente trabajo describe el desarrollo de protocolos para la regeneración de plantas vía organogénesis en *Morinda royoc* L. y su multiplicación en sistemas de inmersión temporal. Se logró el establecimiento *in vitro* de brotes de *M. royoc* a partir de yemas apicales y axilares de plantas cultivadas en invernadero. Los mayores coeficientes de multiplicación (6.8) se obtuvieron en un medio de cultivo MS suplementado con 1mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5mg.L<sup>-1</sup> de AIA. Se logró un 71% de brotes enraizados *in vitro* con una altura promedio de 2.8 cm y 4.2 entrenudos en un medio de cultivo MS suplementado con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Las plantas regeneradas alcanzaron un 100% de supervivencia cuando se transfirieron a la fase de aclimatización. Se demostraron las ventajas de los sistemas de inmersión temporal (SIT) para la multiplicación de brotes *in vitro*, al obtenerse un incremento promedio en la producción de biomasa de 49.7 g por frasco de 1 litro de capacidad y un coeficiente de multiplicación de 5.4 en comparación con 2.1 g de incremento de biomasa y 3.3 de coeficiente de multiplicación que se logra en medios de cultivo semisólidos. No se observaron síntomas de hiperhidricidad en las plantas propagadas en los SIT. Los resultados obtenidos permiten definir un protocolo de regeneración vía organogénesis de *M. royoc* que podrá emplearse para la propagación comercial de la especie y como base de futuros trabajos para la obtención de metabolitos secundarios de uso farmacológico.

Palabras clave: inmersión temporal, propagación comercial, regeneración

## *IN VITRO* MULTIPLICATION OF THE MEDICINAL PLANT *MORINDA ROYOC* L.

### ABSTRACT

*Morinda royoc* L. is a plant species belonging to the *Rubiaceae* family with demonstrated medicinal properties. The present work describes the development of a regeneration protocol via organogenesis in *Morinda royoc* and the multiplication in temporary immersion systems. *In vitro* shoot cultures of *M. royoc* were established from apical and axillary buds of greenhouse grown plants. Best multiplication rate (6.8) was obtained when shoots were cultured in modified MS medium supplemented with 1mg.L<sup>-1</sup> 6-BAP and 0.5mg.L<sup>-1</sup> of AIA. Rooting was induced in 71% of the shoots with an average of 2.8 cm in height and 4.2 internodes per plant when 0.5 mg.L<sup>-1</sup> AIB was added to the culture medium. Regenerated plants showed 100% survival when transferred to acclimatization phase. The advantages of temporary immersion systems (TIS) for *in vitro* multiplication of shoots were demonstrated, with an average increase in biomass production of 49.7 g per TIS (1 liter capacity) and 5.4 multiplication rate, compared with 2.1 g biomass increase and 3.3 multiplication rate in semisolid culture medium. No symptoms of hyperhydricity

were observed in the plants multiplied in TIS. A regeneration protocol for *M. royoc* was developed, this protocol could be used either for the commercial propagation of the species and as a base for future studies on the production of secondary metabolites for pharmaceutical use given by the medicinal properties of the species.

Key words: commercial propagation, regeneration, temporary immersion

# PINEAPPLE PROTEASE OBTAINED AND PURIFIED FROM DIFFERENT SOURCES

Martha Hernández<sup>1\*</sup>, Carol Carvajal<sup>1</sup>, Aurora Pérez<sup>1</sup>, Ramón Santos<sup>1</sup>, María Chávez<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Bioplantas Centre, UNICA, CP 69450, Cuba. e-mail: [mhernandez@bioplantas.cu](mailto:mhernandez@bioplantas.cu).

<sup>2</sup> Proteins Studies Centre. Havana University, Cuba.

## ABSTRACT

Pineapple plants (*Ananas comosus*) contain several cysteine proteinases, of which the major component in stem extracts is the so-called "stem bromelain" (EC 3.4.22.32). In recent years, industrial applications of plant proteases have reached high levels. Bromelain, in particular, exhibits different therapeutic effects: anti-inflammatory, digestive, anti-metastases and anti-tumoral activities. It is including in the drug group modifiers of the biological answer. Therefore, considerable attention has been focused on the possibility of applying efficient plant tissue culture methods to physiologically active enzymes isolation. Bromelain crude extract was obtained through an original procedure. The isolated product was afterward purified by using Sephadex G-100 gel filtration chromatography (yields ranging 87.81%, 3.1 pure). Alternative purification procedure based on Carboxymethyl cellulose (CMC-52) cationic exchanger provided similar results as well as higher yields (50%). The purification until homogeneity by combination of chromatographic methods made possible the molecular characterization of the enzyme. These results were verified through a SDS- PAGE electrophoresis band close to 25 000 Da. The enzymatic product partially purified by ion exchange chromatography (IEC) in CMC-52, was submitted to toxicological and pharmacological studies. Other bromelain isolation schedule was carried out, consisting of enzyme precipitation from liquid media used as temporary immersion bioreactors (TIB) for pineapple plant propagation, leading to specific activity values of 0.590 U/mg proteins. In addition, electrophoresis studies and HPLC chromatograms showed few protein contaminants in liquid media. The obtained enzyme by this procedure have a similar isolated enzyme has a similar purity than former chromatographically obtained sample. The optimization proteases production as metabolites in TIB can be used for cellular level studies to relate bromelain with defense mechanisms in plants.

Key words: bromelain, temporary immersion bioreactors, metabolites, liquid media

## PROTEASAS DE PIÑA OBTENIDAS Y PURIFICADAS A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES

### RESUMEN

Las plantas de piña (*Ananas comosus*) contienen varias cisteino proteasas, el mayor componente proteolítico en extractos de tallos se llama "bromelina de tallo" (EC 3.4.22.32). Los niveles de aplicaciones industriales de las proteasas de plantas se han incrementado considerablemente en años recientes. En particular, la bromelina exhibe diferentes efectos terapéuticos: actividad anti-inflamatoria, digestiva, anti-metástasis y anti-tumoral. Está incluida entre las drogas modificadoras de la respuesta biológica. Por eso, se presta considerable atención a la posibilidad de aplicar métodos eficientes de cultivo de tejidos de plantas para aislar enzimas fisiológicamente activas. Se obtuvo extracto crudo de bromelina a través de un proceso original. El producto aislado fue purificado por cromatografía de filtración en geles de Sephadex G-100 (87.81% de rendimiento, 3.1 grado de pureza). Un proceso alternativo de purificación por intercambio catiónico en carboximetil celulosa (CMC-52) rindió resultados similares y más bajos rendimientos (50%). La purificación hasta homogeneidad por la combinación de métodos cromatográficos posibilitó la caracterización molecular de la enzima. La verificación de los resultados por electroforesis (SDS- PAGE) mostraron una banda cercana a 25 000 Da. El producto enzimático parcialmente purificado por intercambio iónico en CMC-52 fue utilizado en estudios toxicológicos y farmacológicos. Se usó otro esquema de aislamiento de bromelina, precipitando la enzima a partir del medio de cultivo líquido empleado para la propagación de piña en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT), los valores de

actividad específica fueron de 0.590 U/mg de proteínas. Los estudios electroforéticos y los cromatogramas de HPLC mostraron pocos contaminantes proteicos en el medio líquido. La enzima obtenida por este procedimiento tiene una pureza similar a la cromatográficamente purificada. La optimización de la producción de proteasas como metabolito en los BIT puede ser usada para estudios a nivel celular que relacionen la bromelina con los mecanismos de defensa en plantas.

Palabras clave: bromelina, biorreactores de inmersión temporal, metabolitos, medio de cultivo líquido

# **SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE LA EXPRESIÓN EN PLANTAS DE MOLÉCULAS DE INTERÉS FARMACÉUTICO**

Gil A. Enríquez\*, Merardo Pujol y Carlos Borroto. \*Autor para correspondencia.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31/158 y 190, Playa, PO Box 6162, Havana 1600, Cuba.  
e-mail: [gil.enriquez@cigb.edu.cu](mailto:gil.enriquez@cigb.edu.cu)

## **RESUMEN**

Las plantas son una alternativa potencial para la expresión de proteínas de interés, tales como anticuerpos, antígenos y un gran número de otras moléculas de uso farmacéutico e industrial. Varias compañías han derivado su trabajo hacia el tema de expresión de este tipo de moléculas, desarrollando sus propias plataformas y estrategias para potenciar esta nueva alternativa. Dentro de las variantes que más se han explorado están: tipo de cultivo, moléculas, condiciones de cultivo, localización celular de las proteínas, entre otras. En estos momentos existen varios resultados interesantes, los cuales reafirman las reales posibilidades de esta tecnología para resolver problemas que existen en la obtención de moléculas de alto valor agregado, por ejemplo anticuerpos. Se presenta un resumen de los resultados obtenidos por el CIGB, así como las perspectivas y potencialidades que se avizoran para el desarrollo de esta tecnología.

Palabras clave: Anticuerpos, antígenos, expresión en plantas

## **ABSTRACT**

Plants are a potential alternative for the expression of a large number of different proteins like antibodies, antigens and some other pharmaceutical and industrial molecules of interest. There are several companies are working in the expression of these kind of molecules, developing its own platform in order to validate this alternative. Some of the variants which are presently been explored are: plant specie, molecule, conditions of culture, protein cellular compartments, and so on. At this moment, there are several interesting results, showing the real possibilities of this technology to solve part of the presents problems in the current technology to obtain highly valuable molecules, for example the monoclonal antibodies. We are presenting a summary of the results obtained by the CIGB, as well as the perspectives and potentials foreseen for the new developments of this technology.

Key words: antibodies, antigen, plant expression

# BIOTECHNICAL METHODS FOR THE PRODUCTION OF PLANT SECONDARY METABOLITES

André Gerth<sup>1</sup>, Elio Jimenez<sup>2</sup> and Dirk Wilken<sup>1</sup>

<sup>1</sup>BioPlanta GmbH, Deutscher Platz 5, D-04103, Leipzig, Germany.

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara, Cuba.

## ABSTRACT

A wide range of pharmaceutically used compounds are derived from plants. Usually, these compounds are extracted from plants grown in the field or collected in nature. However, the concentration of the desired metabolites varies according to environmental factors. Infestation, diseases and the application of pesticides additionally decrease the quality of the raw materials. Thus, much research has been done to establish plant cell and suspension cultures for metabolite production. Most of these attempts failed due to very low concentrations of the desired metabolites in undifferentiated cells. On the other hand, *in vitro* cultured fully differentiated plant organs exhibit a high and reliable production capacity for plant secondary metabolites. *In vitro* propagation of whole plants and plant organs using Temporary Immersion Systems allows optimization and automation of gas and nutrients exchange. A low cost bioreactor system based on this principle has been developed that allows automated large scale *in vitro* culture of differentiated plant organs. These bioreactors have been used to propagate various plant organs, e.g. shoots, roots and tubers of different plant species. It was demonstrated, that the production capacity of secondary metabolites in these systems was much higher compared to undifferentiated cell cultures. Moreover, the control of environmental parameters *in vitro* has been used successfully to modify the content as well as the spectrum of the produced metabolites. This is a very promising strategy for production of pharmaceutically highly active plant biomass *in vitro*.

# **DETECTION IN PROGENIES OF TRANSGENIC TOBACCO PLANTS A MURINE MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST THE HEPATITIS B VIRUS SURFACE ANTIGEN (ANTI-HBSAG)**

Meilyn Rodríguez\*, Alejandro Fuentes, Fidel Corrales, Maribel Espino, Marta Ayala, Jorge V. Gavilondo, Marlene Pérez, Osmany Ramos, Rudy Peral, Osvaldo Oliva, Margarita Simón, Carlos Borroto and Merardo Pujol. \*Autor para correspondencia.

Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB). P.O. Box 6162, Havana 10600, Cuba. \*e-mail: [meilyn.rodriguez@cigb.edu.cu](mailto:meilyn.rodriguez@cigb.edu.cu).

## **ABSTRACT**

The instability of transgene expression in genetically engineered plants is often claimed as a constraint to deal with for the practical use of this technology. It's particularly important in the case of transgenic plants for the expression of pharmaceutical, veterinary and industrial compounds. A line of transgenic tobacco plants expressing a murine monoclonal antibody against the hepatitis B virus surface antigen under the constitutive CaMV 35 promoter, using the sporamin prepeptide and KDEL retention signal was generated. The stability of the transgenes was demonstrated by Southern blot and protein accumulation levels in the progenies from HCLC-23 transgenic tobacco clone were assessed. Similar pattern in the segregation tests of the transgenic seed progenies indicated that silencing has not occurred in the HCLC-23 clone. All analyzed generations from anti-HBsAg expressing transgenic tobacco plants produce active antibodies, as interpreted from their positive recognition of the recombinant antigen in ELISA. This result confirms that potential limitations of transgenic plants for plant-made pharmaceuticals could be properly addressed. Besides, it complies with one of the requirements for sanitary registration and practical use of this transgenic event in large-scale production.

Key words: Antibody against the hepatitis b virus surface antigen (anti-HBsAg), Bioreactors, transgenic plants

Palabras clave: Anticuerpo anti-antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, Biorreactor, Plantas transgénicas

# **IN VITRO PROPAGATION AND GENETIC TRANSFORMATION STUDIES IN MEDICINAL TREE *TERMINALIA CHEBULA* RETZ**

Barampudur Shyamkumar

Centre for Plant Molecular Biology (CPMB) Osmania University, Hyderabad –500076 Andhra Pradesh, India. e-mail: [shyambaram@yahoo.co.in](mailto:shyambaram@yahoo.co.in) Tel : +91-40-2709808, (Lab). +91-40-27174931(Res.)

## **ABSTRACT**

*Terminalia chebula* Retz. of the family Combretaceae is an important tree of pharmaceutical and trade value. In Indian pharmacopoeia, fruit of *T. chebula* is extensively used as adjuvant to other medicines for almost all diseases. It contains anti-cancer, anti-HIV, anti-bacterial activity. The natural regeneration in *Terminalia chebula* is very poor due to low germinating capacity of seed. Survey of forest resources and identification of elite clone of *T. chebula* was done based on agronomic characteristics like seed yield, quality, disease resistance and height of the plant. Recently it is found that it contains anti-cancer, anti-HIV properties and remedial effect against arthritis. A protocol for multiple shoot induction from cotyledonary node explants of *T. chebula* has been developed for the first time. The shoots were rooted, acclimatized and transferred to the field conditions. Study was carried out to identify specific organogenic proteins during multiple shoot formation by SDS-PAGE analysis. Characterization of micropropagated plants for testing clonal fidelity was done using protein isozyme marker (esterase). Besides this the further work has been carried out for induction of transgenic hairy roots and shooty teratomas using wild strains of *Agrobacterium rhizogenes* and specialized strains of *Agrobacterium tumefaciens*. The transformed roots induced were used as starting explants for plant regeneration. The transformed callus induced on cotyledon explants subsequent to infection with C58 was confirmed for nopaline by paper electrophoresis. The induced transformed callus was used to study the secondary metabolite production in *T. chebula*. The callus was analyzed for the presence of tannic acid as its presence in the pulp of the seed. In addition to my Ph.D work, hairy roots and shooty teratomas were induced in important medicinal plants like *Withania somnifera* and *Hyoscyamus muticus*. Secondary metabolites were also isolated from such transformed cultures. Further the protocol for the multiple shoot induction in *T. chebula* is being used for genetic transformation studies for transforming chimeric genes like *gus* and *bar* using disarmed strains of *Agrobacterium tumefaciens*. Presently, I am working on tannin biosynthetic pathway in *T. chebula* using C-58 induced transformed callus.



# **AISLAMIENTO DE FITOPROTEASAS A PARTIR NUEVAS FUENTES DE PLANTAS DE LA FAMILIA *BROMELIACEAE***

Aurora Pérez,<sup>1\*</sup> Carol Carvajal,<sup>1</sup> Reinaldo Trujillo,<sup>1</sup> Danilo Pina,<sup>2</sup> Oscar Concepción,<sup>2</sup> Fernando Sagarra,<sup>2</sup> Martha Hernández.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ing. Metabólica. Centro de Bioplantas. UNICA. Carretera a Morón Km. 9. Ciego de Ávila. Cuba. TEL: 053-33 224016, Fax: 053-33 266340. e-mail: [aperez@bioplantas.cu](mailto:aperez@bioplantas.cu)

<sup>2</sup>Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplantas. UNICA. Carretera a Morón Km. 9. Ciego de Ávila. Cuba. TEL: 053-33 224016, Fax: 053-33 266340.

## **RESUMEN**

Las cisteino proteasas están presentes en todos los organismos vivos y constituyen el grupo enzimático mejor caracterizado dentro de las proteasas. Las plantas de la familia *Bromeliaceae* son una fuente natural de cisteino proteasas. Estas enzimas son frecuentemente utilizadas en la industria alimentaria, biotecnológica y medico-farmacéutica. Estudios recientes informan del efecto antiinflamatorio, antimetastizante, antitrombótico y antitumoral de las cisteino proteasas. Sin embargo, el número de proteasas vegetales que se han aislado y caracterizado es aún muy bajo, ya que hasta la fecha solo se han estudiado en este sentido menos del 1% de las especies vegetales conocidas. De ahí el marcado interés en la búsqueda de nuevas fuentes naturales y vías alternativas para la obtención de fitoproteasas. El presente trabajo tuvo como objetivos determinar la actividad proteolítica de extractos crudos obtenidos a partir de diferentes órganos de plantas de la familia *Bromeliaceae* y establecer el pH adecuado para la extracción de estas enzimas. Se identificaron seis grupos de plantas de la familia *Bromeliaceae*: cuatro grupos son del género *Tillandsia*, uno es del género *Guzmania* y otro del género *Hohenbergia*. Los mayores índices de actividad específica (1.33 U/mg de proteínas) se obtuvieron para los preparados obtenidos de tallos de *Hohenbergia penduliflora* Mez al realizar la extracción a pH 3.

Palabras clave: *Bromeliaceae*, pH de extracción, proteasas.

## **PHYTOPROTEASES ISOLATION FROM NEW SOURCE OF *BROMELIACEAE* FAMILY PLANTS**

### **ABSTRACT**

Cysteine proteases are present in all living organisms and they are the best characterized of all proteases. Plants of *Bromeliaceae* family are a natural source of cysteine proteases. These enzyme are frequently used in pharmaceutical, biotechnological and food industries. In recent years, their effect as anti-inflammatory, antimetastatic, antithrombotic and anti-tumoral have been reported. However, the number of plant proteases isolated and characterized is still very low. To date, proteases have been studied in less than 1% of the already known plant species. We hoped to evaluate proteolytic activity of crude extract obtained from different *Bromeliaceae* plants source and to establish adequate enzymes extraction pH. We identificate six plants group of *Bromeliaceae* family: Four group are *Tillandsia* genera, one group is *Guzmania* genera and another is of *Hohenbergia* genera. Specific protease activity was highest (1.33 U/mg of protein) with *Hohenbergia penduliflora* Mez. stems and pH 3 for extraction.

Key words: *Bromeliaceae*, extraction pH, proteases

# DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS EN PLANTAS DE *MORINDA ROYOC* L: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

<sup>1</sup> Maribel Rivas, Aurora Pérez, Martha Hernández, Janetsy Borroto, Reinaldo Trujillo, María A. Blanco.

<sup>1</sup>Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplantas. UNICA. Carretera a Morón Km. 9. CP 69450. Ciego de Ávila. Cuba. e-mail: [mrivas@bioplantass.cu](mailto:mrivas@bioplantass.cu)

## RESUMEN

Las plantas producen una amplia variedad de los llamados metabolitos secundarios. Los compuestos secundarios de las plantas se clasifican usualmente por sus vías biosintéticas. Hay tres grandes familias que se consideran generalmente: fenólicos, terpenos y esteroides y alcaloides. Debido a su gran actividad biológica, los metabolitos secundarios se han usado por siglos en la medicina tradicional. La actividad oxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, la cual juega un papel importante en la adsorción y neutralización de radicales. El propósito de este estudio fue determinar el contenido fenólico (equivalentes de ácido clorogénico), antraquinonas y actividad antioxidante (ensayo del ácido tiobarbitúrico) a partir de raíces, tallos, ramas y hojas de plantas de *Morinda royoc* L. Se llevaron a cabo análisis de regresión de actividad antioxidante contra el contenido de fenólicos y antraquinonas. Los resultados obtenidos mostraron que el contenido de fenoles fue mayor en las hojas, con diferencias significativas con el resto de los órganos analizados (ramas, tallos y raíces). Se demostró que el metabolito mayoritario (de los evaluados) son las antraquinonas y el órgano en el que se acumula en mayores concentraciones son las raíces de plantas adultas. Los coeficientes de correlación de los compuestos fenólicos (midiendo su carácter antioxidante) resultaron entre (0.61-0.74 unidad) para el malondialdehído (MDA). Las correlaciones con otros aldehídos (OAD) se ajustaron perfectamente al modelo de regresión cuadrática con coeficientes de correlación ( $R^2$ ) entre 0.85-0.98.

Palabras clave: fenoles, antraquinonas, *Morinda royoc*, radicales libres

## ABSTRACT

Plants produce a wide variety of so called secondary metabolites. Plant secondary compounds are usually classified according to their biosynthesis pathways. Three large molecule families are generally considered: phenolics, terpenes and steroids, and alkaloids. Due to their large biological activities, plant secondary metabolites have been used for centuries in traditional medicine. The antioxidant activity of phenolic compounds is mainly due to their redox properties, which can play an important role in adsorbing and neutralizing free radicals. The purpose of this study was to determine the phenolic content (chlorogenic acid equivalent), anthraquinones and antioxidant activity (thiobarbituric acid test) from roots, stem, branch and leaves of plant *Morinda royoc* L. Regression analyses of antioxidant activity versus the content phenolic and anthraquinones were carried out. Results reveal that the levels phenolic compounds (chlorogenic acid equivalent), were higher in leaves with differences significantly. However, the roots extract contained the most anthraquinone compounds which is significantly more than that found in the other organs of the same plant. The correlation coefficients of phenolic compounds for the malondialdehyde (MDA) (non-oxidative character) were between 0.61 and 0.74 unit. In other hand the correlations with other aldehydes (OAD) were adjusted perfectly to the quadratic regression model with correlation coefficients ( $R^2$ ) between 0.85 and 0.98.

Key words: anthraquinones, *Morinda royoc*, phenolics, free radicals

# EFFECTO DE ELICITORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS SOBRE EL CONTENIDO DE DIGOXINA Y DIGITOXINA EN BROTES DE *DIGITALIS PURPUREA* L. CULTIVADOS *IN VITRO*

Franklyn Arana<sup>1\*</sup>, Naivy Pérez<sup>2</sup>, Alina Capote<sup>2</sup>, Anabel Pérez<sup>2</sup>, Rafael Sosa<sup>3</sup>, Angel Mollineda<sup>4</sup> y Elio Jiménez<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Centro Universitario de Las Tunas, Las Tunas. Cuba. e-mail:

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

<sup>3</sup>Centro de Bioactivos Químicos. Universidad "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de las Villas.

## RESUMEN

*Digitalis purpurea* L. contiene metabolitos secundarios de interés farmacológico, entre los más importantes se destacan la digitoxina y la digoxina de marcada actividad cardiotónica. Los rendimientos de glicósidos obtenidos mediante el cultivo de células son muy bajos y durante las sucesivas transferencias de cultivos celulares la cantidad de cardenólidos ha disminuido o desaparecido completamente. El presente trabajo tuvo como objetivos evaluar la influencia de elicitores bióticos y abióticos en la multiplicación *in vitro* de brotes de *D. purpurea* en medio de cultivo semisólido así como cuantificar, mediante HPLC, el contenido de digoxina y digitoxina en la biomasa producida. Los elicitores evaluados fueron: ChitoPlant (0.001; 0.01; 0.1 g.L<sup>-1</sup>); SilioPlant (0.01; 0.1; 1.0 g.L<sup>-1</sup>) y Metil Jasmonato (0.014; 0.018; 0.022 g.L<sup>-1</sup>). La adición de ChitoPlant provocó una disminución en la altura de los brotes y no produjo afectaciones en las demás variables evaluadas, a excepción de la concentración de 0.1 g.L<sup>-1</sup> que indujo un incremento significativo de la masa seca. El SilioPlant, a medida que se incrementó su concentración en el medio de cultivo, provocó disminuciones en la altura, número de brotes y la masa fresca con respecto al control; mientras que el Metil Jasmonato provocó disminuciones en todas las variables evaluadas, excepto en la masa seca donde las concentraciones de 0.018 g.L<sup>-1</sup> y 0.022 g.L<sup>-1</sup> no mostraron diferencias con el control. Con respecto al contenido de metabolitos, el ChitoPlant incrementó el contenido de digoxina y digitoxina. Se logró con 0.1 g.L<sup>-1</sup> triplicar el contenido de digoxina e incrementar en 2.4 veces el contenido de digitoxina, en comparación con el control. El SilioPlant incrementó el contenido de glicósidos en los brotes, las mayores concentraciones se lograron en el tratamiento con 0.01 g.L<sup>-1</sup> con incrementos de 3.3 y 6.9 veces en el contenido de digoxina y digitoxina respectivamente, en comparación con el control. Los mejores resultados integrales se alcanzaron en el tratamiento con 0.01 g.L<sup>-1</sup> de SilioPlant, en el cual se logra un rendimiento neto por frasco de cultivo de 4.7 µg de digoxina y 87.9 µg de digitoxina, seguido del tratamiento con 0.1 g.L<sup>-1</sup> de ChitoPlant, que alcanzó una producción neta por frasco de cultivo de 4.9 µg de digoxina y 35.6 µg de digitoxina.

Palabras clave: ChitoPlant, metabolitos secundarios, SilioPlant

## EFFECT OF BIOTIC AND ABIOTIC ELICITORS ON CONTENT OF DIGOXIN AND DIGITOXIN IN SHOOTS OF *DIGITALIS PURPUREA* L CULTIVATED *IN VITRO*

### ABSTRACT

*Digitalis purpurea* L. has secondary metabolites of pharmacological interest, such as digitoxin and digoxin of cardiotonic activity. The yields of glycosides in plant cell cultures are very low and during the successive subcultures the quantity of cardenolides has decreased or disappeared completely. The aim of this study was to evaluate the influence of the biotic and abiotic elicitors on multiplication *in vitro*

of shoots of *Digitalis purpurea* on semisolid media, as well as the content of digoxin and digitoxin determined by HPLC. The elicitors evaluated were: ChitoPlant (0.001; 0.01; 0.1 g.L<sup>-1</sup>); SilioPlant (0.01; 0.1; 1.0 g.L<sup>-1</sup>) and Metyl jasmonate (0.014; 0.018; 0.022 g.L<sup>-1</sup>). ChitoPlant induced a decrease in the shoots length and did not produce affectations in the rest of variables evaluated, but 0.1 g.L<sup>-1</sup> induced a significant increase of the dry weight. The increase of the concentration of SilioPlant, caused decrease in the number and length of shoots and the fresh weight comparing with control; while the Metyl jasmonate favored only the dry weight, the concentrations of 0.018 g.L<sup>-1</sup> and 0.022 g.L<sup>-1</sup> did not show statistical significant differences with control. Respect of content of metabolites, the yields of digoxin and digitoxin in shoots treated with ChitoPlant were enhanced. The increase in digoxin and digitoxin contents with ChitoPlant (0.1 g.L<sup>-1</sup>) were about 3-fold and 2.4-fold, respectively, compared to control culture. The content of glycosides in shoots increased 3.3-fold (digoxin) and 6.9-fold (digitoxin) when 0.01 g.L<sup>-1</sup> of SilioPlant was used. The best integral results were reached with 0.01 g.L<sup>-1</sup> of SilioPlant, which induced the highest net yields per culture flask (4.7 µg of digoxin and 87.9 µg of digitoxin), followed by the treatment with 0.1 g.L<sup>-1</sup> of ChitoPlant (4.9 µg of digoxin and 35.6 µg of digitoxin).

Key words: ChitoPlant, secondary metabolites, SilioPlant

# ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *ARTEMISIA LUDOVICIANA* SUB. MEXICANA, ESPECIE MEDICINAL DEL CENTRO-NORTE DE MÉXICO

Escareño Piña Ernesto\*<sup>1</sup> Capote Pérez Alina<sup>2</sup> Jiménez Gonzáles Elio<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Área Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Zacatecas, México. e-mail: [escareno@uaz.edu.mx](mailto:escareno@uaz.edu.mx)

<sup>2</sup>Laboratorio de Metabolitos Secundarios, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Martha Abreu" de las Villas, carretera a Camajuani Km. 5 ½ Santa Clara Villa Clara, Cuba. C.P.54830.

## RESUMEN

La especie de *Artemisia ludoviciana* sub.*Mexicana*, es una planta medicinal de tipo silvestre, dicotiledónea, con amplio uso por la población mexicana en diversos padecimientos, como: antidiarreico, antiemética, antiespasmódica, artritis, diurética, laxante, antimalaria, psoriasis y anticancerígeno. El objetivo de este trabajo fue lograr el establecimiento *in vitro* y la multiplicación de brotes de *A. ludoviciana* sub. *Mexicana* a partir de semillas. Las semillas se lavaron con jabón líquido por 10 min., luego en etanol al 70% por 5 min., y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% por 7 min. Posteriormente se enjugaron tres veces con agua destilada estéril y se sembraron en medio de cultivo base Murashige y Skoog con 3% de sacarosa, y 3.5g de gelrite a pH de 5.6. La tasa de contaminación microbiana osciló entre 0 y 16.2 % en los diferentes experimentos realizados. A los 45 días se logró el desarrollo de brotes completos los cuales fueron transferidos a medio de multiplicación Murashige y Skoog con 0.50 mg/l. de 6-BAP. Los brotes obtenidos fueron empleados para estudiar el efecto de las diversas concentraciones de 6-BAP (0.0, 0.25, 0.50, 1.0, y 2.0 mg/l) sobre la multiplicación de los brotes, evaluándose la altura y número de brotes por explante, el peso fresco y el peso seco.

Palabras clave: desinfección dicotiledónea, establecimiento

## *IN VITRO* ESTABLISHMENT AND MULTIPLICATION OF *ARTEMISIA LUDOVICIANA* SUB. MEXICAN, MEDICINAL SPECIES FROM THE CENTER-NORTH OF MEXICO

### ABSTRACT

The species of *Artemisia Ludoviciana* sub. Mexican is a wild type medicinal plant, dicotyledonous, widely use by Mexican population to attack several sufferings, such as: diarrheas, emetic, spasms, arthritis, diuretics, laxative, malaria, psoriasis and cancer. The objective of this work was to achieve the *in vitro* establishment and the multiplication of buds of *A. ludoviciana* sub.*Mexican* from seeds. Seeds were washed with soap during 10 min., then in ethanol (70%) 5min. and after disinfected with hypochlorite of sodium to 2% during 7 min. Later, they were rinsed three times with distilled sterile water and were seeded in base culture medium Murashige and Skoog with 3% of sucrose, 3.5 g of gelrite and pH of 5.6. The rate of microbe contamination oscillated between 0 and 16.2 % in the different experiments carried out. The complete development of buds was obtained to the 45 days and then they were transferred to the Murashige and Skoog multiplication medium with 0.5 mg/l. of 6-BAP. The obtained buds were used to study the effect of the different concentrations of 6-BAP (0.0, 0.25, 0.50, 1.0, and 2.0 mg/l.) on the multiplication of the buds, evaluating the height and number of buds by explants, and the fresh and dry weight.

Key words: dicotyledonous, disinfestation, establishment

# PERFIL METABÓLICO DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE CULTIVOS *IN VITRO* DE *MORINDA ROYOC* L., *PSIDIUM GUAJAVA* L. VAR “EEA18-40” Y *MORUS ALBA* L. VAR “CRIOLLA”

Alina Capote<sup>1\*</sup>, Naivy Pérez<sup>1</sup>, Anabel Pérez<sup>1</sup>, Raúl Barbón<sup>1</sup>, Enrique Salas<sup>1</sup>, Dirk Wilken<sup>2</sup>, André Gerth<sup>2</sup>, Lutz Müller-Kuhrt<sup>3</sup> y Elio Jiménez<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Martín Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830.

<sup>2</sup>BioPlanta GmbH, Leipzig, Alemania.

<sup>3</sup>AnalytiCon Discoveries GmbH, Potsdam, Alemania.

## RESUMEN

El cultivo de células y tejidos *in vitro*, es una de las alternativas para la identificación de nuevos compuestos o para incrementar la producción de compuestos ya conocidos que sean de utilidad para la humanidad. El objetivo del trabajo fue producir biomasa de las especies *Morinda royoc* L., *Psidium guajava* L var “EEA18-40” y *Morus alba* L var “Criolla” empleando distintos sistemas de regeneración *in vitro* para determinar el perfil de producción de metabolitos en la biomasa producida *in vitro* y plantas en campo mediante la técnica combinada de cromatografía líquida-espectrofotometría de masa. Se pudo comprobar en todas las especies en estudio que el contenido de agua es mayor en el material vegetal obtenido en los sistemas de cultivo *in vitro* en relación con las muestras obtenidas de plantas cultivadas en campo o invernadero. En la especie *Morinda royoc* el cultivo de brotes es el sistema de cultivo *in vitro* más factible para la producción de biomasa con mayor contenido de materia seca comparado con el cultivo de callos y células. Los rendimientos de los extractos en todas las especies en estudio fueron siempre mayores en los sistemas de cultivo *in vitro* en comparación con los obtenidos en plantas en campo o invernadero y fueron mayores a medida que la diferenciación fue menor (brotes, callos y suspensiones celulares en ese orden). En la especie *Morinda royoc* se obtuvo el más amplio espectro de compuestos en el cultivo de callos y suspensiones celulares, en comparación con las muestras de hojas de plantas en invernadero y brotes multiplicados *in vitro*. En esta especie los perfiles de compuestos detectados en plantas de invernadero y brotes *in vitro* fueron similares, mientras que en *Psidium guajava* y *Morus alba* los perfiles de expresión entre muestras de hojas de campo y brotes *in vitro* fueron distintos, lo que demuestra que cada genotipo reacciona de forma distinta al cultivo *in vitro* y por tanto los compuestos que se sintetizan como respuesta a estas condiciones “anormales” de crecimiento es distinta. Se pudo demostrar que el cultivo *in vitro* es una fuente potencial para la identificación y producción de nuevos compuestos.

Palabras clave: metabolitos secundarios, biomasa, cultivo de tejidos, cromatografía líquida, espectrofotometría de masa

## METABOLIC PROFILE OF EXTRACTS OBTAINED FROM *IN VITRO* CULTURE OF *MORINDA ROYOC* L., *PSIDIUM GUAJAVA* L. VAR “EEA18-40” Y *MORUS ALBA* L. VAR “CRIOLLA”

### ABSTRACT

The plants cell and tissue *in vitro* culture are one of the alternatives for the identification of new compounds or to already increase the production of compound well-known that are utility for the humanity. The aim of this work was to produce biomass of *Morinda royoc* L., *Psidium guajava* L var “EEA18-40” and *Morus alba* L var “Criolla” species using different regeneration systems to determine the profile of metabolites production in the biomass cultivated *in vitro* and plants in field by means of the combined techniques of liquid chromatography and mass spectrophotometer. In all the species the content of water was bigger in the vegetable material obtained in the *in vitro* culture systems compare with the biomass obtained from fields and green house plants. In *Morinda royoc* the shoots culture was the *in vitro* culture system more feasible for the production of biomass with bigger content of dry matter compared with cells and callus system. In all the species the yields

of the extracts were always bigger in the *in vitro* culture systems in comparison with those obtained from field or green house plants. It was bigger as the differentiation was smaller (shoots, callus and cells suspension). In *Morinda royoc* the widest spectrum of compound was obtained in the callus and cells suspension in comparison with the samples of leaves of green house plants and shoots *in vitro* culture. In this species the profiles of compounds detected in green house plants and shoots *in vitro* culture were similar, while in *Psidium guajava* and *Morus alba* the expression profiles between samples of leaves from field plants and shoots *in vitro* culture were different, which demonstrate that each genotype reacts in way different to the *in vitro* culture and therefore the compounds that are synthesized as answer to these abnormally conditions of growth are different. It was demonstrated that the *in vitro* culture is a potential source for the identification and production of new compounds.

Key word: Secondary metabolites, biomass, tissue culture, liquid chromatography, mass spectrophotometer

# PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *CYMBOPOGON CITRATUS* STAPF., UNA PLANTA MEDICINAL, MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS

Elisa Quiala\*, Raúl Barbón, Elio Jiménez, Manuel de Fera, Maité Chávez, Alina Capote, Naivy Pérez y Lester Morejón. \*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 54830.  
e-mail: [equiala05@ibp.uclv.edu.cu](mailto:equiala05@ibp.uclv.edu.cu)

## RESUMEN

La Caña Santa (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf.) es una planta medicinal, la cual es cultivada para la obtención de citral. El objetivo de este trabajo consistió en desarrollar una metodología para propagar y producir biomasa *in vitro*. A partir de ápices meristemáticos de plantas cultivadas en condiciones de campo se establecieron *in vitro* plantas y callos. Con posterioridad se establecieron suspensiones celulares y se evaluó a escala de agitador orbital el efecto de la densidad de inóculo (20, 40 y 60 gMF l<sup>-1</sup>) sobre la masa fresca, la masa seca y el pH. Se evaluó además, la formación o no de raíces en los agregados celulares en dos medios de cultivo, así como la posible multiplicación de dichos agregados celulares a escala de biorreactores. Por otra parte, se determinó el efecto de la frecuencia de inmersión diaria (2, 4 y 6 horas) sobre la producción de biomasa en sistemas de inmersión temporal (SIT). Se determinó el contenido de  $\alpha$  y  $\beta$  citral en la biomasa producida a partir de callos, agregados celulares, brotes producidos en medio de cultivo semisólido, en SIT y en plantas de campo. El mayor incremento tanto de la masa fresca como seca de las suspensiones celulares se obtuvo con una densidad de inóculo de 20 gMF l<sup>-1</sup>. La presencia de raíces solo se apreció en los agregados celulares cultivados en medio de cultivo sin agua de coco. Se logró la multiplicación de los agregados celulares en biorreactores y se alcanzó en nueve días un incremento de 5.6 veces con respecto a la masa fresca y seca inicial (20 gMF l<sup>-1</sup> y 8.0 gMS l<sup>-1</sup>). En los SIT la mayor producción de biomasa se obtuvo cuando se utilizó una frecuencia de cuatro (62.2 gMF) y seis (66.2 gMF) inmersiones por día. La presencia de  $\alpha$  y  $\beta$  citral solo se obtuvo en la biomasa obtenida a partir de brotes, durante el cultivo *in vitro* el contenido de estos metabolitos fue mayor en los brotes obtenidos en SIT, aunque inferiores a los producidos por las plantas de campo.

Palabras clave: Caña santa, cultivo *in vitro*, metabolitos secundarios, citral

## BIOMASS PRODUCTION OF *CYMBOPOGON CITRATUS* (D.C) STAPF., A MEDICINAL PLANT, BY TISSUE CULTURE TECHNIQUES

### ABSTRACT

Lemmon grass (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf.) is a medicinal plant, which is cultivated for the citral obtaining. The objective of this work consisted on the development of a methodology to spread and to produce biomass *in vitro* of this species. Shoot and callus cultures were established from stem apexes from field grown plants. Cell suspensions cultures were established from callus cultivated in a rotary shaker. The effect of the inoculation density (20, 40 and 60 gMF l<sup>-1</sup>) on fresh mass, dry mass and pH variation was evaluated. The presence of roots in the cellular aggregate cultivated in two culture medium, as well as the multiplication of the same ones to biorreactores scale up was also evaluated. On the other hand, the effect of the frequency of daily immersion was determined (each 2, 4 and 6 h) on the production of biomass in temporary immersion systems (TIS). The contents of  $\alpha$  y  $\beta$  citral in the biomass produced from calli, cellular aggregated and shoots cultivated in semisolid culture medium and TIS was determined. The biggest increment so much in the fresh as dry mass of the cell suspensions was



obtained when 20 gMF l<sup>-1</sup> inoculation density was used. The pH in the three densities diminished during the first eight days and it was stable starting from this moment. The presence of roots was appreciated only in the cellular aggregated cultivated in a culture medium without coconut water. The multiplication of the cellular aggregated was achieved in bioreactors and in nine days an increment of 5.6 times was reached with regard to the fresh and dry initial mass (20 gMF l<sup>-1</sup> and 8.0 gMS l<sup>-1</sup>) respectively. In the TIS the biggest production of biomass was obtained when a frequency of four (62.2 gMF) and six (66.2 gMF) immersions per day was used. The presence  $\alpha$  y  $\beta$  citral was obtained only in the biomass obtained starting from buds, during the *in vitro* culture the content of these metabolites was bigger in the buds obtained in SIT, although inferior to those taken place by the field plants.

Key words: Lemmon grass, *in vitro* culture, secondary metabolites, citral

# CUANTIFICACION DE FLAVONOIDES TOTALES PRESENTES EN LAS HOJAS DE *CAPRARIA BIFLORA L.*

Arelys López Sacerio\*, Yanelis Colina. \*Autor para correspondencia.

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní, km 5, 5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: [arelysls@uclv.edu.cu](mailto:arelysls@uclv.edu.cu)

## RESUMEN

La *Capraria biflora* L. es una *Serophulariaceae* utilizada por la población para el tratamiento de diversas afecciones, se encuentra ampliamente distribuida en nuestro archipiélago y presenta un gran número de acciones terapéuticas entre las que se destaca: antiinflamatorio, analgésico y diurético. Por tanto, resulta muy valioso el desarrollo de técnicas analíticas que garanticen la seguridad y eficacia de las formas farmacéuticas que se desarrollen a partir de esta planta. Además la biotecnología constituye una herramienta que permite la obtención de grandes cantidades de material vegetal a partir de una planta seleccionada en corto tiempo. En el presente trabajo se cuantificaron los flavonoides totales en base a quercetina presentes en las hojas de *Capraria biflora* L. a través de Espectrofotometría UV-Vis. Dicha técnica analítica fue previamente validada. La técnica analítica evaluada para la determinación de flavonoides totales en las hojas de la planta resultó lineal, precisa y exacta, bajo las condiciones establecidas. El material vegetal cuenta con un 0.1 % de flavonoides totales calculados en base a quercetina.

Palabras clave: *Capraria biflora* L., espectrofotometría UV-Vis, flavonoides

# DESARROLLO DE TECNICAS ANALITICAS PARA LA CUANTIFICACION DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN EL *ALLIUM SATIVUM L.* (AJO)

Arelys López Sacerio\*, Luis Bravo Sánchez, Mario Sueiro Oyarzún. \*Autor para correspondencia.

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní, km 5, 5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: [arelysls@uclv.edu.cu](mailto:arelysls@uclv.edu.cu)

## RESUMEN

El *Allium sativum* L. (Ajo) constituye una planta de probada actividad farmacológica en patologías comunes asociadas a procesos trombóticos, cardiovasculares e infecciosos. Dichas propiedades se relacionan con su compleja química, especialmente la presencia de tiosulfatos y alicina. Teniendo en cuenta lo anterior, resulta muy valioso el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas a partir de esta planta sobre bases estrictamente científicas. Se obtuvo la droga seca de *Allium sativum* L. en forma de sólidos pulverulentos con la calidad requerida. Fue desarrollada y validada una Técnica semicuantitativa y una cuantitativa por Cromatografía de Capa Fina y Espectrofotometría Ultravioleta-Visible, respectivamente, para la determinación de tiosulfatos totales y el contenido (%) de tiosulfatos en base a alicina en los sólidos pulverulentos de *Allium sativum* L., obteniéndose concentraciones en el rango de 1.98 a 2.21 mM para la Técnica semicuantitativa y 2.14 mM como resultado medio, con la Técnica cuantitativa. Ambas resultaron ser fiables. Se demostró la sensibilidad de la Técnica semicuantitativa; y se obtuvo una medida de la exactitud de ambas por comparación.

Palabras clave: ajo, *Allium sativum* L., tiosulfatos, validación

# **ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA A UNA BIOMASA OBTENIDA POR MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS A PARTIR DE UNA PLANTA DE INTERÉS PARA LA INDUSTRIA DE COSMETICO**

Remigio Cortes Rodríguez<sup>\*1</sup>, Daniel Agramonte Peñalver<sup>2</sup>, Tania Betancourt Purón<sup>1</sup>, Jorge A. Pérez Donato<sup>1</sup>, Roberto Machado Pérez<sup>1</sup>, Ervelio Olazábal Manso<sup>1</sup>. <sup>\*</sup>Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Centro Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní Km 5 ½ . Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830. Teléfonos: 281117. e-mail: [toxivig@capiro.vcl.sld.cu](mailto:toxivig@capiro.vcl.sld.cu)

<sup>2</sup>Instituto Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní Km 5 ½ . Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830.

## **RESUMEN**

Investigadores del Instituto de Biotecnología de las Plantas y el Centro de Bioactivos Químicos, ambos, de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, tienen dentro de sus objetivos desarrollar nuevas tecnologías para la producción de biomasa a partir de órganos y células de plantas de gran demanda en las industrias farmacéuticas, alimentaria y de cosméticos. En este caso se obtuvo una biomasa que fue sometida a ensayos tales como: tamizaje fitoquímico, efectividad, toxicidad, y control de la calidad microbiológica, donde se determinó una correspondencia entre los metabolitos presentes en esta biomasa (flavonoides, taninos, quinonas, triterpenos, aceites esenciales, alcaloides, etc) con los expresados por la planta en su ecosistema natural. A lo anterior debemos agregar que los estudios de bioequivalencia demostraron una elevada eficacia, baja toxicidad y alta estabilidad y calidad microbiológica. En todos los casos los estudios fueron realizados según lo establecido por las principales agencias regulatorias, incluida la Cubana, en lo referente a metodologías empleadas, instalaciones, procedimientos y competencia de los investigadores. Los resultados obtenidos permitieron trazar una estrategia dirigida a registrar y posteriormente comercializar metabolitos con un alto valor agregado y múltiples propósitos.

Palabras clave: calidad microbiológica, metabolitos, tamizaje fitoquímico

# **EVALUACIÓN INSECTICIDA DEL NEEM EN EL SECTOR AGRÍCOLAS DE SINALOA MÉXICO**

Nidia Araiza Lizarde

Universidad Politécnica de Sinaloa. México.

## **RESUMEN**

En la naturaleza existe una gran diversidad de plantas que poseen principios activos que han contribuido de forma importante en los avances de la medicina, cosmetología y agricultura. El sector agrícola constantemente se ve afectado por plagas que atacan a los cultivos en el campo ocasionado con esto grandes pérdidas agrícolas. Una de las plagas que ha causado severos daños en el estado de Sinaloa ha sido la mosquita blanca, la cual si no se controla de manera adecuada puede ocasionar pérdidas totales en las cosechas. Para combatir dichas plagas, se han empleado insecticidas artificiales que contaminan al ambiente y provocan daños a la salud como leucemia. En el sector agrícola de Culiacán, Sin., por ser uno de los más productivos del país en cuanto al sector agrícola se aplican constantemente insecticidas, provocando intoxicación en el ser humano. Debido a dichos inconvenientes con los insecticidas artificiales, se han buscado nuevas alternativas naturales que nos permitan combatir a plagas de impacto agrícola sin ocasionar daños al ambiente y a la salud. Por ello se investigaron las propiedades bioinsecticidas del árbol del neem y venadillo como una alternativa para el control de la mosquita blanca, arrojando como resultado 2 aceites con propiedades bioinsectivas muy eficaces que aun en dosis del 1% fueron eficaces para controlar la mosquita blanca.

Palabras clave: bioinsectivas, mosca blanca, plagas

# HIGH ACCUMULATION OF LEVAN ALTERS LEAVES PHENOTYPE IN TRANSGENIC TOBACCO

Alexander Banguela\*, Juan G. Arrieta, Raisa Rodriguez, Luis E. Trujillo, Margarita Simón, Lázaro Hernández. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio de Interacciones Planta-Microorganismos. División de Plantas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Ciudad Habana, Cuba. e-mail: [alexander.banguela@cigb.edu.cu](mailto:alexander.banguela@cigb.edu.cu)

## ABSTRACT

A limited number of plant species accumulate fructans as a carbohydrate reserve. Plant fructans with polymerization degree (DP) below 100 fructose units are synthesized in the vacuole by the concerted action of at least two fructosyltransferases. Levansucrase (LsdA) from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* synthesizes the polyfructan levan (DP>10000) directly from sucrose. Here we report the production of levan in tobacco, a non-fructan storing plant, by expression of the mature LsdA fused to the putative vacuolar targeting signal of the onion sucrose:sucrose fructosyltransferase. The levan content in leaves increased with age reaching up to 70% (dry weight) in the transgenic plant of the highest expression level. The gradual accumulation of the polyfructan in the leaves led to a proportional bleaching phenotype.

Key words: Levan, levansucrase, LsdA, tobacco

# MOLECULAR STRATEGIES TO USE OF PLANTS SECONDARY METABOLITES ON SKIN DISEASES

Rafael Sosa Martínez<sup>1\*</sup>, Aminael Sánchez Rodríguez<sup>2</sup>, Jorge L. Enríquez González<sup>3</sup>, Elio Jiménez<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Chemical Bioactive Center . Central University of Las Villas Santa Clara. Cuba.

<sup>2</sup>Institute of Plants Biotechnology. Central University. of Las Villas Santa Clara. Cuba.

<sup>3</sup>School of medicine. Central University. Santa Clara. Cuba.

## ABSTRACT

Psoriasis is a very common, non-infectious, inflammatory skin disease characterized by well defined, distinctive erythematous plaques yielding adherent silvery white scales. Psoriasis may affect any cutaneous surface, but the commonest sites are the extensor surfaces of the elbows and knees, scalp and sacral areas. Many factors such as genetic features, immunological disorders, biochemical changes, environmental effects, trauma, infection, endocrine features, stress, drugs and alcohol play an important role in the pathogenesis of psoriasis. New psoriasis treatments aim to correct the body's defective genetic processing, and therefore attack psoriasis at the root of the problem in order to control the inflammation, scaling, flaking and discomfort. To combat these destructive process, a number of herbs which appear to have an antitumoral activity and anti-psoriatic effects can be used. The possibility to combine several plants secondary metabolites agents on tissue distribution of inorganic ion and inhibit of UVB-induced Transcriptional Activator Protein-1 (AP-1) activity offer some improvement by helping to gently exfoliate the plaques without causing an additional irritation. These agents help remove the skin's armor making the skin more available for other anti-psoriasis drugs.



# PROPAGACIÓN MASIVA DE PLANTAS POR BIOTECNOLOGÍA



# ACLIMATIZACIÓN DE VITROPLANTAS DE *ENCYCLIA PHOENICIA* (LDL.) NEUM. (ORCHIDACEAE) EN DIFERENTES SUSTRATOS

Yoannis Domínguez Rodríguez\* y Guillermo Hernández del Valle. \* Autor para correspondencia.

Universidad Agraria de La Habana, Autopista Nacional Km 23, Carretera Jamaica-Tapaste, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba. [yoannisd@isch.edu.cu](mailto:yoannisd@isch.edu.cu)

## RESUMEN

La germinación asimbiótica de semillas de orquídeas, mediante técnicas biotecnológicas es una valiosa herramienta ya que se puede obtener un gran número de plantas. El pobre desarrollo de las plantas y la alta tasa de mortalidad de las mismas ha sido un problema durante la fase de aclimatización. El presente trabajo, realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía, en la Universidad Agraria de la Habana (UNAH), se propuso como objetivo analizar la respuesta de vitroplantas de *Encyclia phoenicia* (Ldl.) Neum. ante cuatro sustratos. La composición de los sustratos fue: corteza de pino, turba, carbón vegetal, fibra de coco y grava, en diferentes proporciones. Las variables evaluadas fueron: 1) Supervivencia de plantas por tratamiento; 2) Número de hojas emitidas por plantas y 3) Número de raíces emitidas por planta. La mejor respuesta se obtuvo con el Tratamiento 2, sustrato compuesto por turba, carbón vegetal y grava (1:1:1); con un 100% de supervivencia y una media de incremento en hojas y raíces de 2.15 y 2.07, respectivamente. La repuesta menos favorable se observó con el tratamiento 3, este sustrato estuvo compuesto por corteza de pino y turba (6:3).

Palabras clave: Aclimatización, *Encyclia*, supervivencia, sustratos

## ABSTRACT

Asymbiotic germination of orchid seeds, by biotechnological techniques, is a valuable tool because it allows obtaining a large number of plants. During the acclimatization phase, difficulties have been observed: the poor development of plants and the high mortality rate. The present work, carried out in the Laboratory of Plant Biotechnology, at the Faculty of Agriculture of the Agrarian University of Havana (UNAH), has as objective to analyse the response of *Encyclia phoenicia* (Ldl.) Neum. vitroplants to four substrata. The experiment was carried out under semi controlled conditions. The substratum compositions were: pine bark, peat, charcoal, coconut fiber and gravel, in different proportions. The variables evaluated were: 1) Survival of plants per treatment; 2) Number of leaves emitted per plant and 3) Number of roots emitted per plant. The best response was obtained with treatment 2, composed by peat, charcoal and gravel (1:1:1); with 100% of survival and an average increase of leaves and roots of 2.15 and 2.07, respectively. Less favourable response was observed with treatment 3; this substratum was composed by pine bark and turf (6:3).

Key words: acclimatization, *Encyclia*, substrata, survival

# ACTIVACIÓN DE AREOLAS DE *ESCOBARIA CUBENSIS* (BRITTON & ROSE) HUNT

<sup>1</sup>Luis Enrique Rodríguez de Francisco\*; <sup>1</sup>Argelio Piferrer Escalona; <sup>1</sup>Rayma Cantillo Ardeból; <sup>1</sup>Yamila Rosales Simonot; <sup>1</sup>Yerina Santiago Bardón; <sup>2</sup>Omar Guadalupe Alvarado Gómez. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. CITMA. Holguín.

<sup>2</sup> Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Jardín Botánico en Carretera a Mayabe. Teléfono: 425342. e-mail. [luis@cbv.holguin.inf.cu](mailto:luis@cbv.holguin.inf.cu); [luisenrique95mx@yahoo.com](mailto:luisenrique95mx@yahoo.com)

## RESUMEN

El cultivo de areolas se ha empleado en muchas especies de cactus con excelentes resultados, en ocasiones partiendo de mamilas y/o costillas y en plántulas germinadas *in vitro*, en el presente trabajo se obtuvo el establecimiento y multiplicación de *Escobaria cubensis* (Britton) a partir de las áreolas de la mamila, logrando establecer un protocolo que permite obtener de 3 a 5 hijos por planta y su posterior enraizamiento y aclimatización, además de introducir en el arial natural de esta especie, vitroplantas obtenidas por esta metodología, lo que demuestra que es eficiente el cultivo *in vitro* de cactáceas.

Palabras clave: aclimatización, cactáceas, enraizamiento, mamila

## ABSTRACT

The areola culture have employed in many species of cacti with excellent results, occasionally from mammillas, axils or *in vitro* germinated plantlets, in this work we obtained the establishment and multiplication of *Escobaria cubensis* (Britton) from areola of the mammillas, achieving a protocol which allows to obtain 3 to 5 shoots for plant and its rooting and acclimatization consequently, further the introduction of these vitroplants in the natural arial of the specie, and that showed that *in vitro* culture of cacti is an efficient method.

Key words: acclimatization, mammillas, rooting

# AMBIENTES FÍSICO Y QUÍMICO DURANTE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PLÁNTULAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM OFFICINARUM* L.) Y SU INFLUENCIA DURANTE LA FASE DE ACLIMATIZACIÓN

Peñate, Liuba\*, C. Aragón, R. Rodríguez, M. Escalona, M. Cid, D. Pina, J. González-Olmedo.

\* Autor para correspondencia.

Centro de Bioplantas. Carretera a Morón km 9 ½. UNICA. Ciego de Ávila. Cuba.

## RESUMEN

Durante el cultivo de vitroplantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) y su subsiguiente aclimatización, fueron investigados los cambios en la capacidad fotosintética y los principales sistemas enzimáticos relacionados con el metabolismo del carbono de plantas sometidas a tres condiciones de cultivo *in vitro* (autotrófico, mixotrófico y heterotrófico). Se estudiaron el comportamiento de variables morfológicas durante la fase elongación en BIT y la fase de aclimatización. Con el desarrollo heterotrófico de los brotes de *S. officinarum* se lograron coeficientes de multiplicación de 14, lo cual supera las tasas convencionales (3.5 ó 4). De igual manera, respondieron positivamente variables morfológicas como altura de las plantas, masa fresca y seca y el número de brotes competentes. Durante los 21 días de elongación en BIT y los 42 días de aclimatización los niveles máximos de fotosíntesis neta, la transpiración y la actividad de enzimas que intervienen en el metabolismo del carbono Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (FEPC), Invertasa neutra (IN), Piruvato Quinasa (PQ) y Sacarosa Sintasa (SS) fueron medidos cada 7 días. Los mejores resultados entre los tres tratamientos se obtuvieron en plántulas sometidas a condiciones heterotróficas. En este tratamiento la actividad de la FEPC aumentó durante todo el período de evaluación y los niveles más altos se obtuvieron a los 42 días. La actividad de la PQ y la SS fue óptima durante las primeras semanas de aclimatización, mientras que la actividad de la IN incrementó al final de la fase de elongación y al final de la aclimatización. Las plantas en condiciones autotróficas no sobrevivieron en la fase de elongación debido al estrés propiciado, por lo que no pudieron llegar a la fase de aclimatización. El tratamiento heterotrófico incrementó el desarrollo y porcentaje de supervivencia de las plantas durante la fase de aclimatización, siendo superiores al 90 %.

Palabras clave: aclimatización, *Saccharum officinarum*, capacidad fotosintética, sistemas enzimáticos, autotrófico, inmersión temporal

## PHYSICAL AND CHEMICAL ATMOSPHERES DURING THE SUGAR CANE *IN VITRO* PROPAGATION (*SACCHARUM OFFICINARUM* L.) AND THEIR INFLUENCE DURING THE ACCLIMATIZATION PHASE

### ABSTRACT

The photosynthetic capacity changes and the main enzymatic systems, related to plant carbon metabolism, were investigated during the sugarcane culture (*Saccharum officinarum* L.) in Temporary Immersion Bioreactor (TIB) and their subsequent acclimatization. The micropropagation was conducted in three culture conditions (autotrophic, mixotrophic and heterotrophic micropropagation). The behaviors of morphological variables were studied during the elongation stage in TIB and the acclimatization phase. The shoot developments under heterotrophic condition increase the multiplication coefficients (14) that overcome the conventional rates (3.5 or 4). In a same way the morphophysiological variables like plants height, dry weight, fresh weight and the number of competent buds support these results. The maximal photosynthetic rate (Pn), transpiration, and carbon metabolism enzymatic activity phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), acid invertase (AI), pyruvate kinase (PK) and sucrose phosphate synthase (SPS) were measured every 7 d during the 21 d of elongation in TIB, and the following 42 d of acclimatization. The best results among the three treatments were obtained in subjected plantlets to heterotrophic conditions. In this treatment PEPC activity increased during the whole evaluation period and the highest level was achieved at 42 d. PK and SPS activities were optimal during the first weeks during the acclimatization, while AI increased at the end of the elongation phase and later at the end of the acclimatization phase. The plants under conditions autotrophic didn't survive in the elongation phase due to the propitiated stress. Because of the plants could not arrive to the acclimatization phase. The heterotrophic treatments increased the development and yields of the survivals plants during the acclimatization, being higher to 90%.

Key words: acclimatization, *Saccharum officinarum*, photosynthetic capacity, enzymatic systems, autotrophic, temporary immersion

# DIAGNÓSTICO Y SANEAMIENTO DEL DASHEEN MOSAIC VIRUS EN MALANGA (*XANTHOSOMA* SPP. Y *COLOCASIA ESCULENTA*)

Janet Igarza-Castro<sup>1</sup>, Ricardo Hernández-Pérez,<sup>2</sup> José. E. González-Ramírez<sup>3</sup>, Yilian González- Moya<sup>3</sup>, Xiomara Rojas Pérez<sup>3</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos, Laboratorio de Biotecnología Vegetal. e-mail: [janet@cbv.holguin.inf.cu](mailto:janet@cbv.holguin.inf.cu)

<sup>2</sup>Centro de Estudios( CETAS). Universidad Cienfuegos.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT).

## RESUMEN

La propagación acelerada de clones de malanga (*Xanthosoma* spp) y (*Colocasia esculenta* L.) a través de las técnicas biotecnológicas ha generado una gran demanda de líneas saneadas especialmente al *Dasheen Mosaic Virus* (DMV). Entre las técnicas de saneamiento convencionales, la extracción de meristemas ha sido la que mejores resultados ha tenido, sin embargo logra muy baja eficiencia, lo que provoca grandes pérdidas del material de partida. La puesta en práctica de otros métodos de saneamiento con mayor eficiencia en la erradicación de virus ha permitido encontrar una alternativa de gran valor para la micropropagación. Al comparar distintas técnicas en este trabajo, se evidencia la estrecha relación entre el genotipo, la regeneración del material y el saneamiento. Se propone además una metodología a través del uso de la corriente eléctrica (electroterapia) que se complementa con la aplicación de un antiviral (Ribavirín) por tener los mejores resultados en la eliminación de este virus. El diagnóstico inmunoquímico utilizado, con grandes ventajas sobre otro tipo de análisis, tiene también un límite de sensibilidad que puede permitir escape de material enfermo. Con la introducción de técnicas moleculares de diagnóstico se pueden detectar concentraciones virales ínfimas en vitroplantas sanas. Por lo que en el trabajo se realiza la detección del DMV por RT-PCR, la cual servirá de base para la aplicación futura de una técnica confirmativa de mayor sensibilidad durante el saneamiento.

Palabras clave: Malanga, electroterapia, DMV, virus, RT-PCR

## DIAGNOSTIC AND SANITATION TO DASHEEN MOSAIC VIRUS IN MALANGA (*XHANTHOSOMA* SPP. Y *COLOCASIA ESCULENTA* L)

### ABSTRACT

The quick propagation of malanga clones (*Xanthosoma* spp) and (*Colocasia esculenta* L.) through the biotechnical techniques it has generated a great demand of lines cleaned up especially to the Dasheen Mosaic Virus (DMV). Among the conventional reparation techniques, the meristems extraction has been the one that better results have had, however it achieves very low efficiency, what causes big losses of the departure material. The setting in practice of other reparation methods with more efficiency in the virus erradicación has allowed to find an alternative of great value for the micropropagation. When comparing different technical in this work, the narrow relationship is evidenced among the genotype, the regeneration of the material and the reparation. It also intends a methodology through the use of the electric current (electrotherapy) that is supplemented with the application of an antiviral (Ribavirín) to have the best results in the elimination of this virus. The immunochemical diagnosis used, with great advantages upon another analysis type, also has a limit of sensibility that can allow escape of sick material. With the introduction of a molecular technic of diagnosis tiny viral concentrations can be detected in healthy vitroplantas. For what is carried out the detection of the DMV for RT-PCR in the work, which will serve as base for the future application of confirmation technic of more sensibility during the reparation.

Keywords: malanga, electrotherapy, DMV, Virus, RT-PCR

# MODELACIÓN DEL PROCESO DE INACTIVACIÓN DE NUCLEOPROTEÍNAS CON EL EMPLEO DE CORRIENTE ELÉCTRICA DIRECTA

José E. González<sup>1\*</sup>, Robersy Sánchez<sup>2</sup>, Aminaél Sánchez<sup>3</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT, Apartado Postal 6. CP 53 000. Santo Domingo. Cuba.

<sup>2</sup>Grupo de Bioinformática, Centro de Estudios en Informática, Universidad Central de Las Villas. CP 54 830.

<sup>3</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ . Santa Clara Villa Clara Cuba. CP 54830.

## RESUMEN

Es bien conocido el uso de la corriente eléctrica en el saneamiento de enfermedades virales en diversas especies vegetales. Sin embargo, no existe hasta la fecha, un conocimiento profundo de los fenómenos biofísicos que intervienen en este proceso. El Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales tiene establecidos programas de saneamiento de material vegetal que utilizan la corriente eléctrica directa con buenos resultados. Con el uso de la metodología de saneamiento a enfermedades virales del grupo de los Potivirus en ñame (*Dioscorea* spp), 15 volts durante cinco minutos, en 25 segmentos nodales del genotipo "Pacala Duclos" (*D. alata*) se midió la corriente eléctrica individual en cada explante, para determinar la relación entre los valores de absorvancia (VA), obtenidos como salida del ensayo micro-ELISA y las potencia eléctrica (P) aplicada en cada caso. Paralelamente y a partir de la aplicación del concepto de Máquinas Moleculares a las nucleoproteínas virales en el tejido vegetal se realizó un desarrollo teórico de la interacción. Los resultados obtenidos en ambos casos demuestran la existencia de una relación hiperbólica  $VA=f(1/P)$  demostrándose que el efecto de saneamiento es consecuencia del aumento de la temperatura a que son sometidas las partículas virales en el interior del tejido vegetal.

Palabras clave. *Dioscorea* sp, nucleoproteínas, potencia eléctrica, micro-ELISA,

## ABSTRACT

Its well known the use of electric current in the cleaning of viral diseases from vegetal tissues. Nevertheless there is not, still today, a deep knowledge of the biophysical phenomena involve it. The Institute of Tropical Crops Research had developed electric current mediated cleaning program for several vegetal species with good results. Using the cleaning methodology for Potivirus group in yam (*Dioscorea* spp), 15 volts during five minutes, in 25 nodal segments of the genotype "Pacala Duclos" (*D. alata*), we measured the individual electric current in each explant to establish the relationship between Absorbance Values (VA), micro-ELISA output data, and the electric power (P) applied in each explant. By other way, applying the Molecular machines concept to viral nucleoprotein, a theoretical modelation of interaction was developed. Results obtaining from both cases show the existence of a hyperbolic relationship,  $VA=f(1/P)$ , leading to the understanding that cleaning process is meanly a heat effect over viral particles inside vegetal tissue.

Key words. Nucleoproteins, Electric Power, micro-ELISA, *Dioscorea* sp

# MICROPROPAGACIÓN DE *ESCOBARIA CUBENSIS* (BRITTON) A TRAVÉS DE SEMILLAS

<sup>1</sup>Luis Enrique Rodríguez de Francisco\*; <sup>1</sup>Argelio Pifferrer Escalona; <sup>1</sup>Rayma Cantillo Ardeból; <sup>1</sup>Yamila Rosales Simonot; <sup>1</sup>Yerina Santiago Bardón; <sup>2</sup> Omar Guadalupe Alvarado Gómez.  
\*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. CITMA. Holguín.

<sup>2</sup> Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Jardín Botánico en Carretera a Mayabe. Teléfono: 425342. e-mail: [luis@cbv.holguin.inf.cu](mailto:luis@cbv.holguin.inf.cu); [luisenrique95mx@yahoo.com](mailto:luisenrique95mx@yahoo.com)

## RESUMEN

*Escobaria cubensis* (Britton) es una especie endémica de Holguín, Cuba, en peligro de extinción, con escaso número de individuos en su hábitat natural, además de presentar problemas en la germinación de las semillas, por esta razón el objetivo de nuestro trabajo, fue obtener un método para la propagación por métodos biotecnológicos de esta especie, partiendo de semillas botánicas. Para la esterilización de semillas se realizó una inmersión en etanol al 70% durante tres minutos, seguido de una solución de 2 % de hipoclorito de sodio por 10 minutos. Se determinó que semillas iniciadas en el medio Agar-Agua producen un 97% de germinación, después de 13 días de la iniciación. Plántulas de tres meses de edad provenientes de cultivo *in vitro*, fueron iniciadas sobre medio de cultivo con 100% MS con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV). En las plantas obtenidas se logró el enraizamiento *in vitro*.

Palabras clave: desinfección, germinación, reguladores del crecimiento

## ABSTRACT

*Escobaria cubensis* (Britton) is an endemic specie of Holguín, Cuba, in Danger of extinction, with very short number of individuals in their natural habit, and furthermore it presents troubles with the seeds germination, for this reason, the objective of our work was to obtain a method for propagation by means of biotechnological methods of this specie, from botanicals seeds. To disinfection of the seeds they were immersed in 70% Ethanol for 3 minutes and follows with 2% NaClO for 10 minutes. We determined that seeds planted in Agar-Water medium have a 97% of germination, after 13 days of culture. The 3 months age plantlets from *in vitro* culture, was planted on 100% MS medium with different concentrations of plant growth regulators (RCV). The *in vitro* rooting of plants was achieved.

Key words: germination, disinfection, growth regulators

# PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE BROTES DE PLÁTANO HARTÓN (*MUSA AAB*, SUBGRUPO PLÁTANO CV. HARTÓN)

Silva, A.<sup>1</sup>; I. Trujillo<sup>1</sup>, G. Albarrán<sup>2</sup> y E. Salazar<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Centro de Estudios de Agroecología Tropical (CEDAT). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez". Apartado 47925. Caracas 1010. e-mail: [jarn1234@telcel.net.ve](mailto:jarn1234@telcel.net.ve)

<sup>2</sup> Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIA-CENIAP. Apdo 4653. Maracay Venezuela. e-mail: [esalazar@inia.gov.ve](mailto:esalazar@inia.gov.ve)

## RESUMEN

El plátano Hartón (*Musa AAB*, subgrupo plátano cv. Hartón) es una variedad comercial de gran demanda que se cultiva en toda Venezuela por su sabor agradable, fruto de buen porte y buenos rendimientos por hectárea. La ineficiencia de los métodos de propagación *in vivo* para suplir la demanda comercial es uno de los justificativos para haber diseñado metodologías de propagación *in vitro*. Es importante señalar que las metodologías tradicionales de propagación *in vitro*, tampoco han logrado satisfacer completamente la demanda de plantas en el mercado. Sin embargo, la propagación *in vitro* ofrece la ventaja de obtener un gran número de plantas en un tiempo y espacios relativamente cortos, al compararlos con las vías convencionales de propagación asexual y además, posibilita liberar de patógenos a los materiales regenerados. En este trabajo se logró la proliferación de brotes de plátano Hartón al utilizar un medio de cultivo MS suplementado con 0.5 mg/l de BA en la iniciación del cultivo, y dos subcultivos en la etapa de multiplicación, con 2.5 y 5 mg/l. Al utilizar este protocolo se logró obtener un promedio de 6.6 brotes por explante. Se plantea utilizar la proliferación de brotes obtenidos para la inoculación de biorreactores y de esa manera iniciar una multiplicación masiva más eficiente con la posterior regeneración de plantas.

Palabras clave: BA, brotes, *Musa* sp., plátano, proliferación

# PROPAGACIÓN ACELERADA DE CLAVEL CHINO (*DIANTHUS CHINENSIS* L.) CON EL EMPLEO DEL PECTIMORF

Yanelis Castilla\*, Mirtha López, Aymara Pérez. \*Autor para correspondencia.

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carretera a Tapaste, km 3 ½, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Gaveta Postal 1, CP 32700. e-mail: [yanelis@inca.edu.cu](mailto:yanelis@inca.edu.cu)

## RESUMEN

A pesar de la demanda de flores y plantas ornamentales que existe en la población cubana, esta no ha sido satisfecha principalmente debido a la escasez de métodos de propagación económicos que permitan un alto coeficiente de multiplicación, por lo que en el presente trabajo nos propusimos determinar el efecto del Pectimorf (oligogalacturónido de producción nacional) en la propagación *in vitro* de claveles chinos (*Dianthus chinensis* L.). Plántulas previamente cultivadas *in vitro*, se seccionaron en esquejes de 1 cm y se sembraron en tubos de ensayo, utilizando como medio de cultivo control el MS (Murashige-Skoog, 1962) suplementado con AIA, KIN y AG<sub>3</sub>. Se estudió el efecto de tres concentraciones de Pectimorf como sustituto de la auxina. Se empleó un diseño completamente aleatorizado y cada tratamiento fue replicado 20 veces. Cada 10 días se realizaron evaluaciones morfológicas. En caso de diferencias entre las medias, se compararon según la prueba de rangos múltiples de Duncan. En el medio suplementado con 5 mg·L<sup>-1</sup> de Pectimorf se obtuvieron los mayores porcentajes de regeneración, longitud de las plántulas y número de nudos, lo que viabiliza la propagación de esta especie, además de ser el más económico. Se puede considerar que el Pectimorf tuvo un efecto auxínico.

Palabras clave: clavel chino, micropropagación, Pectimorf

## QUICK PROPAGATION OF CHINESE CARNATION (*DIANTHUS CHINENSIS* L.) WITH THE USE OF PECTIMORF

### ABSTRACT

Despite Cuban population demands many flowers and ornamental plants, this demand haven't been satisfied because there is a lack of ship methods of propagation that allow a high multiplication rate. With the objective of evaluate the effect of Pectimorf (oligogalacturonide obtained in Cuba) in the *in vitro* propagation of Chinese carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), it was taken plants and cut into cuttings of 1 cm. The cuttings were sowed in test tubes containing MS medium (Murashige-Skoog, 1962) supplemented with AIA, KIN and AG<sub>3</sub> as a control medium. It was determined the effect of three concentrations of Pectimorf as an auxin substitute. Every 20 days it was made morphologic evaluations. In case of differences between the means, it was compared with the Duncan test. In the medium supplemented with 5 mg·L<sup>-1</sup> of Pectimorf, it was obtained the highest regeneration percentages, length of the plants and number of nodes, which improves the propagation of this specie, besides it is the cheapest medium. It can be considered that Pectimorf had an auxinic effect.

Key words: Chinese carnation, micropropagation, Pectimorf



# **BACILLUS SUBTILIS, CONTAMINANTE BACTERIANO EN LA MICROPROPAGACIÓN DE BANANOS (CV. FHIA-18, AAAB)**

Daymí Carrazana<sup>1\*</sup>, Lidcay Herrera<sup>1</sup>, Carlos M. Franco<sup>2</sup>, José Manuel Miranda<sup>2</sup>, Milagros García<sup>3</sup>, María Soledad Delgado<sup>3</sup>, Nieves Ramos<sup>4</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Facultad de Química - Farmacia, Carretera a Camajuaní, Km 5 ½, CP 20 400, Santa Clara, Cuba. Correo electrónico: [daymic@uclv.edu.cu](mailto:daymic@uclv.edu.cu)

<sup>2</sup>Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, Facultad de Veterinaria, Avda. Carballo Calero, s/n., CP 27 002, Lugo, España.

<sup>3</sup>Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Centro de Bioactivos Químicos, Carretera a Camajuaní, Km 5 ½, CP 20 400, Santa Clara, Cuba.

<sup>4</sup>Biofábrica de Villa Clara, Carretera a Malezas Km 1 ½, CP 20 400, Santa Clara, Cuba.

## **RESUMEN**

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida de la prevención de la contaminación microbiana, siendo este uno de los problemas más frecuentes en laboratorios de investigación y comerciales. En la Biofábrica de Villa Clara se presentó una contaminación microbiana en la etapa de multiplicación que ocasionaba la muerte de las plantas *in vitro*. Con vistas a estudiar dicha problemática se procedió a aislar e identificar el contaminante microbiano, realizar el análisis microbiológico de los frascos de cultivo y tapas desinfectados listos para la dispensación del medio de cultivo y el agua empleada en su preparación y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del G-1 (principio activo del vitrofural) frente a la forma vegetativa y las esporas del contaminante aislado. A partir de frascos con plantas de banano (cv. FHIA- 18) se aisló mediante diseminación en placas e identificó, empleando kits bioquímicos comerciales y técnicas moleculares, a *Bacillus subtilis* y se determinó por el método de microdilución en tubos, que la CMI del G-1 fue de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a la forma vegetativa y de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a las esporas de la bacteria. El análisis microbiológico de los frascos de cultivo y tapas desinfectados arrojó que el 76.66% y el 56.33% respectivamente, presentaban contaminación bacteriana en su superficie interna. De esta, el 69.56% en el primer caso y el 68.75% en el segundo, pertenecía al género *Bacillus*. En el período evaluado el agua empleada en la elaboración del medio de cultivo no fue la fuente de entrada de *Bacillus* spp. al proceso de micropropagación. Considerando que la dosis de G-1 empleada como esterilizante químico es de 35  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  se explica la elevada incidencia de esta contaminación. Se recomienda el cuidadoso lavado y desinfección de los frascos y tapas contaminados para eliminarla.

Palabras clave: bacteria, micropropagación, plantas *in vitro*

# BACTERIAS Y HONGOS FILAMENTOSOS CONTAMINANTES EN LA MICROPROPAGACION VIA ORGANOGENESIS DE *MUSA* SPP.

Daymí Carrazana<sup>1\*</sup>, Lidcay Herrera<sup>1</sup>, Niurka Mollinedo<sup>1</sup>, Carlos M. Franco<sup>2</sup>, José Manuel Miranda<sup>2</sup>, Arletys Santos<sup>3</sup>, Milagros Basail<sup>3</sup>, Manuel Cabrera<sup>3</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Facultad de Química - Farmacia, Carretera a Camajuaní, Km 5 ½, CP 20 400, Santa Clara, Cuba. e-mail: [daymic@uclv.edu.cu](mailto:daymic@uclv.edu.cu)

<sup>2</sup>Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, Facultad de Veterinaria, Avda. Carballo Calero, s/n., CP 27 002, Lugo, España.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

## RESUMEN

Debido a la elevada incidencia de contaminantes microbianos en la micropropagación de *Musa* spp., la novedad científica de su identificación y necesidad de capacitación del personal de las Biofábricas, se realizó esta investigación, evaluando 350 explantes de los cultivares FHIA-18, FHIA-21, FHIA-25, CEMSA ¾ y Gran Enano, procedentes de la Biofábrica de Villa Clara, el IBP y el INIVIT, aislando microorganismos a partir de tubos de ensayo con efectos deletéreos en el vegetal y/o turbidez en el medio de cultivo, y de medios microbiológicos conteniendo tejidos adyacentes al explante. Otro fragmento se fijó en formol e incluyó en parafina, realizándole cortes histológicos teñidos para la determinación de endogenicidad de bacterias (safranina-verde brillante) y hongos (schiff-ácido periódico). Se obtuvieron aislados a partir de 45 y 41 frascos, separados en las Biofábricas durante la multiplicación de banano (cv. FHIA-18) por contaminación bacteriana y fúngica respectivamente. Se registraron las manifestaciones sobre el medio de cultivo y material vegetal. Las bacterias fueron identificadas empleando kits bioquímicos comerciales y técnicas moleculares y los hongos según la morfología de hifas, conidios y esporas. Se aislaron 145 cepas bacterianas en la etapa de establecimiento, 109 endógenas, identificándose a *Pseudomonas* spp., *Serratia fonticola*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pantothenicus*, *B. fastidiosus* y *Streptomyces* spp. Siendo ambientales *Staphylococcus* spp. (*S. epidermidis*). Las seis cepas fúngicas fueron ambientales (*Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium oxysporum*, *Curvularia geniculata*, *Fusarium* sp. y *Phoma* sp.). Se obtuvieron 36 cepas bacterianas de la etapa de multiplicación, entre ellas: *Pseudomonas picketti*, *Klebsiella planticola*, *B. subtilis*, *Streptococcus intermedius*, *Pediococcus* sp. y *Streptomyces* sp. y 45 cepas fúngicas, identificándose a *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Chaenophora cucurbitarum*, *Trichoderma viride*, *Mucor mucedo*, *Monilia sitophila*, *Penicillium* spp., *Colletotrichum gloesporioides*, *Botrytis cinerea*, *Chaetopsis griseus* y *Cladosporium cladosporioides*. Se distribuyeron fichas de los contaminantes identificados conteniendo origen, nombre científico, características morfológicas y culturales, otros nichos ecológicos, etc.

Palabras clave: biofábrica, contaminación microbiana

# **EFFECTO DE UN BIOESTIMULANTE EN EL ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE DOS VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM* SPP.)**

Mayra Jiménez Vázquez, Zenaida Occeguera Aguila, Aydiloide Bernal, Jorge L. Montes de Oca, Odalys Rivera, Yandi H. Estévez, Pablo Machado, Carlos Reyes Esquirol, Nexy Hernández, Marlén Cortés, Idesnel Banguela, Mirelis Alejo, Diamilis Ojeda, Sonia Hernández y Elio Pascual. \*Autor para correspondencia.

Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara – Cienfuegos (ETICA).  
Autopista Nacional Km. 246. Ranchuelo. Villa Clara. e-mail: [biofábrica@vc.minaz.cu](mailto:biofábrica@vc.minaz.cu)

## **RESUMEN**

El Bioindol es un producto obtenido mediante un proceso fermentativo empleando una cepa de *Rhizobium* sp, que contiene AcidoIndol Acético (AIA) que es una de las principales auxinas de amplia aplicación en diferentes cultivos debido a su influencia hormonal en el desarrollo de las plantas. El presente trabajo se realizó en la Biofábrica de Caña de la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara – Cienfuegos, con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Bioindol sobre el enraizamiento *in vitro* de las vitroplantas, para ello se estudiaron 4 concentraciones del producto en dos variedades de caña de azúcar (C88-380 y C86-56). Los resultados mostraron que la aplicación de Bioindol ( $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ejerció un efecto positivo sobre el enraizamiento *in vitro* en las dos variedades estudiadas, se logró una marcada influencia positiva en el número de raíces y el crecimiento de las vitroplantas. La calidad de las vitroplantas obtenidas también influyó de forma significativa en los resultados alcanzados en la fase de aclimatización.

Palabras clave: AcidoIndol Acético, Bioindol, *Rhizobium*

# **EFFECTOS DE CEPAS DE *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* EN PLANTAS *IN VITRO* DE BANANO (*MUSA* SPP. CV FHIA -18) EN LA FASE DE ACLIMATIZACIÓN**

Lydia Galindo Menéndez\*, Juan Angel Corría Santos, Marilis Arias Cabrera, Edgar Acosta Acosta, Neysis Pérez Fernández. \*Autor para correspondencia.

Centro Universitario Las Tunas "Vladimir Ilich Lenin". Facultad Ciencias Agrícolas. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Avenida Carlos J. Finlay. s/n. Reparto Buena Vista. Código postal: 75 200. e-mail: [lgalindo@ult.edu.cu](mailto:lgalindo@ult.edu.cu)

## **RESUMEN**

La investigación se desarrolló en el área de aclimatización del Centro Universitario Vladimir Ilich Lenin de Las Tunas, con el objetivo de evaluar en plantas *in vitro* de banano (*Musa* spp.) cv FHIA-18 los efectos de una cepa comercial de *Azotobacter chroococcum* (INIFAT-17) y tres autóctonas tuneras (Tu 2, Tu-20 y Tu-24) y BIOBRAS-16 con la dosis de 0.01 mg.L<sup>-1</sup> inhibiendo el sistema radical en el momento del trasplante. El sustrato utilizado fue humus de lombriz al 100%. Se evaluaron el porcentaje de supervivencia, altura de la planta, número de hojas activas, largo y ancho de la penúltima hoja, diámetro del pseudotallo, área foliar, número de raíces, longitud máxima y media de las mismas, peso fresco y seco de las hojas y raíces. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. El mejor tratamiento resultó la cepa nativa Tu-24, seguida del BIOBRAS-16 en la mayoría de los parámetros fisiológicos evaluados y con mayores ganancias que el control.

Palabras clave: aclimatización, *Azotobacter chroococcum*, banano, plantas *in vitro*.

# EMPLEO DE LOS SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA MULTIPLICACIÓN DE SEGMENTOS NODALES Y PRODUCCIÓN DE TUBÉRCULOS EN *DIOSCOREA ALATA* L.

Manuel Cabrera Jova<sup>1\*</sup>, Rafael Gómez Kosky<sup>2</sup>, Milagros Basail Pérez<sup>1</sup>, Yadenys Torres Núñez<sup>1</sup>, Ania Robaina Jiménez<sup>1</sup>, Arletys Santos Pino<sup>1</sup>, Víctor Medero Vega<sup>1</sup>, Aymé Rayas Cabrera<sup>1</sup>, Jorge López Torres<sup>1</sup>, Magaly García García<sup>1</sup>, José de la C. Ventura<sup>1</sup> y Alberto Espinosa Cuellar<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP. 53 000, Villa Clara, Cuba.

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: [mcabrera@inivit.co.cu](mailto:mcabrera@inivit.co.cu) ; [malfredocj@yahoo.es](mailto:malfredocj@yahoo.es)

## RESUMEN

Con el propósito de desarrollar protocolos de propagación eficientes se emplearon para la multiplicación de segmentos nodales y producción de microtubérculos en el clon de ñame ‘Pacala Duclos’ sistemas de inmersión temporal conformados por dos frascos de vidrio de 5000 ml de capacidad, se definieron como objetivos de trabajo evaluar el tiempo y frecuencia de inmersión, densidad de inóculo, tiempo y volumen de renovación del medio de cultivo y la duración de la fase de multiplicación sobre el coeficiente de multiplicación de los segmentos nodales y la producción de microtubérculos. Los resultados obtenidos permitieron definir para la multiplicación de segmentos nodales el empleo de 10 minutos de inmersión y frecuencias de inmersión cada tres y seis horas, una densidad de 50 explantes por frasco de cultivo, renovar el medio de cultivo a los 24 días de cultivo con un volumen de 2000 ml del medio de cultivo y realizar el subcultivo a los 49 días de cultivo, bajo estas condiciones de cultivo se obtiene el más alto coeficiente de multiplicación. Para la producción de tubérculos se definió el empleo de 10 minutos de inmersión y frecuencias de inmersión cada 24 horas, una densidad de 50 explantes por frasco de cultivo, renovar el medio de cultivo a las 12 semanas de cultivo con un volumen de 4000 ml del medio de cultivo y realizar la cosecha de los microtubérculos a las 24 semanas de cultivo, bajo estas condiciones de cultivo se obtiene el más alto número de microtubérculos con un peso fresco superior a los 3.0 gMF

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, densidad de inóculo, medio de cultivo

# EMPLEO DE SISTEMAS DE INMERSION TEMPORAL EN LA MULTIPLICACION *IN VITRO* DE *ALOE* SP.

Chacín Pablo<sup>1</sup>; Albany Nilca<sup>1\*</sup>; Vilchez Jorge<sup>2</sup>, Ferrer Orlek<sup>3</sup> y Molina Miguel<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

1 Dpto. Química, Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo ZU. 4005ZU, Venezuela. e-mail: nilca\_albany@cantv.net

2 Dpto. Botánica, Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo ZU. 4005, Venezuela. e-mail: jvilchez@cantv.net

3 Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo ZU. 4005, Venezuela.

## RESUMEN

Una de las nuevas tecnologías para abaratar los costos de producción y automatizar la micropropagación es el empleo de sistemas de inmersión temporal, en los cuales los explantes son sumergidos periódicamente en el medio cultivo y la atmósfera gaseosa es renovada en cada inmersión, lo cual mejora la multiplicación y crecimiento de los brotes cultivados *in vitro*. Para evaluar en la multiplicación *in vitro* de *Aloe* sp el efecto de dos sistemas de cultivo: en sistema de inmersión temporal del tipo RITA® y en medio en estado sólido. Después de seis 6 semanas de cultivo se evaluó el número de brotes emitidos, longitud de los brotes y longitud del explante madre, mediante un diseño y modelo estadístico completamente aleatorizado; donde las repeticiones estuvieron conformadas por cuatro RITA® con ocho explantes cada uno, mientras que el medio sólido se utilizaron diez frascos con cuatro explantes cada uno. El análisis estadístico detectó efectos ( $P > 0.05$ ) para el sistema de cultivo en las variables longitud de brotes (1.14 cm) y longitud del explante madre (6.35 cm) siendo los mayores valores para el cultivo en RITA®. Se concluyó que el cultivo en RITA® aumenta el tamaño del explante madre y de los brotes, no así la multiplicación de los mismos.

Palabras clave: multiplicación *in vitro*, RITA®, sistema de inmersión temporal, sábila.

# EVALUACION DE GELIFICANTES EN LA FASE DE MULTIPLICACION *IN VITRO* DE LA ZÁBILA (*ALOE VERA*.)

Rubén Fuentes<sup>1\*</sup>, Jehan González<sup>1</sup>, Jorge Vilchez<sup>2</sup>, Miguel Molina<sup>3</sup>. \*Autor para correspondencia.

1 Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo ZU. 4005ZU, Venezuela. e-mail: [Rubengfs@gmail.com](mailto:Rubengfs@gmail.com)

2 Dpto. Botánica, Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo ZU. 4005, Venezuela. e-mail: [jvilchez@cantv.net](mailto:jvilchez@cantv.net)

3 Dpto. Química, Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo ZU. 4005ZU, Venezuela.

## RESUMEN

La zábila (*Aloe vera*) es una planta de importancia económica por las propiedades terapéuticas que tiene para su utilización en la medicina natural e industrial. Debido a que su propagación natural es ineficiente para satisfacer el mercado de plantas, la micropropagación brinda una alternativa para subsanar la creciente demanda de esta, generando vitroplantas libres de virus y otras enfermedades. Tomando en cuenta que uno de los elementos más costosos del medio de cultivo es el agar, este trabajo se basó en la búsqueda de una alternativa para este en la fase de multiplicación *in vitro* de la planta. Se utilizaron explantes previamente establecidos para la fase de multiplicación y se colocaron en medio semi-sólido y en medio preparado con hidrogel, en donde se comparó el agar con el hidrogel como medio de soporte de la vitroplanta. Se utilizó un diseño totalmente al azar para evaluar las variables número de brotes, altura de los brotes, altura de la vitroplanta (cm), número de raíces y longitud de la raíz. Después de cuatro semanas el análisis estadístico solo detectó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para la variable número de brotes siendo el tratamiento uno (medio semi-sólido) el más eficiente para la brotación, para las variables longitud de la planta y Longitud de la raíz se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) obteniéndose un mejor desarrollo de la planta y radicular en los medios con hidrogel, los que nos sugiere que este brinda una alternativa para la fase de enraizamiento de esta planta.

Palabras clave: *Aloe vera* L. propagación *in vitro*, medios de cultivo semi-sólidos, hidrogel

# INFLUENCIA DE BAP EN LA PROLIFERACIÓN DE YEMAS *IN VITRO* EN TRES ESPECIES DE *PIPER* (*PIPER ADUNCUM*, *PIPER COLUMBRINUM*, *PIPER TUBERCULATUM*)

Ilmarina Campos de Menezes<sup>1</sup>, Hérica Santos de Oliveira<sup>1</sup>, Oriel Figueira de Lemos<sup>1</sup>, Sergio Augusto Oliveira Alves<sup>1</sup>, Cláudia Regina Batista de Souza<sup>\*2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Caixa Postal 48, 66095-100 Belém, Pará, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas/Departamento de Genética, Rua Augusto Corrêa, número 01, Guamá, 66075-110 - Belém, Pará, Brasil. e-mail: [bsouza@ufpa.br](mailto:bsouza@ufpa.br)

## RESUMEN

Especies de *Piper* contienen una grande diversidad de metabolitos con actividad biológica, entre especies nativas de la región amazónica algunas tienen presentado tolerancia a *Nectria haematococca* f. sp. *Piperis*, hongo causador de la fusariosa en *Piper nigrum*, especie de larga importancia económica para Brasil. El objetivo de este trabajo investigar la influencia de BAP (bencilaminopurina) en la proliferación de yemas *in vitro* en tres especies de *Piper* para establecer un método eficiente de micropropagación. Yemas axilares y apicales de plántulas de *P. tuberculatum* (T1), *P. aduncum* (T2) y *P. colubrinum* (T3), cultivadas *in vitro*, fueron inoculadas en medio de cultivo Murashige & Skoog (MS), con 0,6% de agar y 0,1mg. L<sup>-1</sup> de BAP. Inicialmente los explantes fueron cultivados en cámara de crecimiento oscura por 48 h para disminuir la oxidación, y después mantenidos por seis semanas con foto período de 16h luz y temperatura media de 25±3°C. Fueron utilizadas cinco repeticiones con ocho explantes por cada repetición y la evaluación fue cuanto al número de nuevas yemas formadas por cada explante. Los datos fueron evaluados por ANOVA y método de Tukey a 5%. Los tratamientos T1,T2, T3 presentaron medias de 7,76; 7,92 y 7,82 gemas/explantes, respectivamente, sin diferencia significativa entre si cuando comparadas por el método de Tukey. Los resultados muestran que la concentración de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP fue suficiente para inducir la proliferación de brotaciones en las especies utilizadas sin todavía haber diferencia estadística entre los tratamientos.

Palabras clave: BAP, micropropagación, *Piper*



# INFLUENCIA DE DOS BIOPRODUCTOS (BIOSTAN Y LIPLANT) EN LA FASE DE ACLIMATIZACION DE VITROPLANTAS DE VIOLETA AFRICANA (*SAINTPAULIA SP*)

Evelyn Valera\*, Daymara Rodríguez, Miriam Isidró, Liane Portuondo. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía. Universidad Agraria de La Habana. Autopista Nacional, Carretera a tapaste Km. 23 ½, San José de las Lajas, La Habana. e-mail: [evelyn@isch.edu.cu](mailto:evelyn@isch.edu.cu)

## RESUMEN

La Violeta africana (*Saintpaulia sp*) es una planta utilizada en jardinería, frecuentemente en interiores. Es de tipo carnoso, herbácea, muy decorativa por sus pequeñas flores. Inicialmente se reproducía por semilla o, sobre todo, por esqueje foliar. Hoy la forma más habitual de reproducirla es el cultivo *in vitro* de secciones de pecíolo, pero resulta crítica la etapa de aclimatización. Se conocen las propiedades del Liplant y el Biostan (bioproductos de obtención nacional), para mejorar la capacidad fisiológica de recuperación en vitroplantas en fase IV por lo que se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de estos bioproductos, de manera independiente, con el objetivo de evaluar sus acciones sobre el crecimiento de las vitroplantas de violeta en la fase de aclimatización. Vitroplantas provenientes de medio MS conteniendo AIA ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + 6 BAP ( $0.8 \text{ mg.L}^{-1}$ ), se sembraron en sustratos de suelo ferralítico rojo y vermicompost (2:1), luego de ser embebidas en soluciones de diferentes concentraciones de estos bioproductos. Se realizó además una aplicación de éstas al sustrato donde se sembraron las vitroplantas. Los datos se analizaron utilizando un ANOVA con un 95% de significación (Statgraph, versión 4.0). Se pudo comprobar que el empleo de ambos bioproductos en general favoreció el crecimiento de las vitroplantas tanto en la altura como en el número de hojas nuevas emitidas en relación al control utilizado (agua). El Liplant permitió mayores valores de estas variables cuando se utilizó la dilución 1:80 (v:v), mientras que el Biostan  $0.03 \text{ mg.L}^{-1}$  resultó ser el tratamiento que mejor se comportó para este bioproducto. Se continúan las evaluaciones de los bioproductos hasta el establecimiento de las plantas en macetas para definir si es factible aplicar estos bioproductos en la aclimatización de vitroplantas de violeta africana con las concentraciones que ofrecieron mejores resultados.

Palabras clave: aclimatización, bioproductos, Violeta africana

# INFLUENCIA DE NUEVOS BIORREGULADORES CUBANOS DEL CRECIMIENTO SOBRE DIFERENTES VARIABLES FISIOLÓGICAS DURANTE LA ACLIMATIZACIÓN DE VITROPLANTAS DE BANANO

Humberto Izquierdo Oviedo<sup>1\*</sup>, Eduard F. Pinzón<sup>2</sup>, Miriam Núñez<sup>1</sup>, María C. González<sup>1</sup>, Ramón Iglesias<sup>1</sup>, Marisol Velásquez<sup>1</sup>, Ruth Proenza<sup>3</sup> y Lisbeth Sardiñas<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carretera a Tapaste Km. 3 ½ San José de las Lajas. La Habana. Cuba. C.P. 32700. e-mail: [hioviedo@inca.edu.cu](mailto:hioviedo@inca.edu.cu), [hioviedo@hotmail.com](mailto:hioviedo@hotmail.com), [izquierd2002@yahoo.es](mailto:izquierd2002@yahoo.es), [hioviedo@gmail.com](mailto:hioviedo@gmail.com)

<sup>2</sup> Ingeniero Agrónomo. Estudiante de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Agraria de La Habana. Cuba

<sup>3</sup> Biofábrica de San José de las Lajas. La Habana. Cuba.

## RESUMEN

La aclimatización de las plántulas es la fase final de la micropropagación de los cultivos y las mismas han estado sometidas a un estrés abiótico durante su cultivo *in vitro*, en muchas ocasiones el porcentaje de supervivencia es muy bajo, y hay que acudir al empleo de sustancias bioactivas para mejorar este aspecto. El trabajo se realizó en la Biofábrica Habana, provincia La Habana, Cuba con el objetivo de evaluar la influencia de un oligogalacturónido de origen péctico y dos análogos de brasinoesteroides en la aclimatización de banano (clon FHIA-18). Las plántulas provenientes de la fase de enraizamiento *in vitro*, se imbibieron en soluciones del oligogalacturónido (entre 1 y 10 mg.L<sup>-1</sup>) y de los análogos de brasinoesteroides (entre 0.01 y 0.1 mg.L<sup>-1</sup>) y 15 días después de la plantación se asperjaron con las soluciones anteriores; el sustrato empleado fue una mezcla de materia orgánica (cachaza) y suelo del tipo Ferralítico Rojo compactado en una relación 3:1 v/v. A los 60 días se evaluó el porcentaje de supervivencia, el número de hojas, diámetro del pseudotallo y altura de las plantas y se tomaron muestras de tejidos foliar de ambas caras para realizar un estudio histológico. Se obtuvo como resultado que la imbibición de las vitroplantas antes de su plantación y la aspersión foliar posterior con los bioproductos favoreció su supervivencia y redujo el tiempo aclimatización de las mismas entre 5 y 10 días aproximadamente con respecto al control y los biorreguladores de crecimiento mejoraron el Contenido Relativo de Agua (CRA), de proteínas y de clorofilas, así mismo disminuyeron el Daño Celular.

Palabras clave: aclimatización, cultivo *in vitro*, micropropagación

## MICROPROPAGACION DE *ALOE* SP.

## MICROPROPAGATION OF *ALOE* SP.

Albany Nilca<sup>1\*</sup>; Ramírez Elvis<sup>2</sup>; Villasmil Marisela<sup>2</sup>; Vilchez Jorge<sup>3</sup>; León Silvia<sup>1</sup>; Vilorio Zenaida<sup>3</sup>; Sánchez Adriana<sup>3</sup> y Molina Miguel<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

1 Dpto. Química, Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo ZU. 4005ZU, Venezuela. e-mail: nilca\_albany@cantv.net (Autor para correspondencia)

2 Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo ZU. 4005, Venezuela.

3 Dpto. Botánica, Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo ZU. 4005, Venezuela. e-mail: jvilchez@cantv.net

### RESUMEN

La zábila (*Aloe* sp) es una Liliácea de importancia económica y medicinal. Su propagación por hijuelos es lenta y limita su explotación comercial, sin embargo, la propagación *in vitro* es una alternativa para producirla masivamente. Con la finalidad de micropropagar la zábila se evaluó en la fase establecimiento (FE) el efecto de tres tiempos de desinfección (5; 10 y 15 min.) en solución al 3% de NaClO, sobre los porcentajes de contaminación (%C), explantes fenolizados (%EF) y explantes establecidos (%EE). En la fase multiplicación (FM) se evaluó el efecto de tres dosis (0; 1; 2 y 3 mg L<sup>-1</sup>) de 6-BAP sobre el número de brotes (NB) y la longitud de los brotes (LB). En la Fase de enraizamiento (FE) se evaluó el efecto de tres dosis (0; 0.5 y 1 mg L<sup>-1</sup>) de AIB sobre el número y longitud de las raíces (NR, LR, respectivamente). En la Fase de aclimatación (FA) se evaluó el efecto de dos sustratos (abono de río y humus de lombriz) en una mezcla de 4:2 de viruta de coco: capa vegetal, respectivamente, sobre los porcentajes de sobrevivencia (%S) y acumulación de masa seca (%MS). A los 15 días en la FE se detectaron diferencias ( $P > 0.05$ ) para %C (2.7%) y %E (97.2%) con 15 min. de desinfección. En la FM a los 21 días se detectaron diferencias ( $P > 0.05$ ) sólo para el NB con 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-BAP (3.01 brotes). En la FE a los 21 días se detectaron diferencias ( $P > 0.05$ ) sólo para el NR sin el uso de AIB (4.38 raíces). En la FA a los 45 días se detectaron diferencias ( $P > 0.05$ ) sólo para el %MS obteniéndose 9.5% con humus de lombriz; el %S fue de 100% en ambos sustratos. Con esta metodología es posible micropropagar la zábila.

Palabras clave: aclimatación, enraizamiento, establecimiento, multiplicación, zábila

# MICROPROPAGACION DE CRISANTEMO POR MERISTEMO

Atsushi Saito\*, Nelly Ruth Gerrero Menéndez, José Manuel Cuéllar Zometa. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, La Escuela Nacional de Agricultura "Roberto Quiñón" (ENA), km. 33 1/2, Carretera a Santa Ana, La Libertad, El Salvador, Centro America. e-mail: [toadfrog0510@yahoo.com](mailto:toadfrog0510@yahoo.com)

## RESUMEN

Se utilizaron 5 variedades de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*): Shasta Amarilla (SA), Shasta Blanca (SB), Shasta Morada (SM), Shasta Rosada (SR) y Stand Amarillo (StA). Se analizaron diferentes niveles de: Murashige & Skoog (MS), concentración de fitohormonas y sucrosa. En todos los medios nutritivos se determinó un pH 5.8. En etapa de establecimiento, los 4 medios nutritivos contenían MS basal, sucrosa 30 g/L, phytagel 2.0 g/L; se estudiaron 4 concentraciones de fitohormonas (C1-C4), de estas, las variedades SR y StA respondieron mejor al dosificar BAP 2.0 mg/L y NAA 0.02 mg/L (C4), mostrando mayor producción de brotes múltiples. La etapa de micropropagación se dividió en 2: desarrollo del brote y mantenimiento del brote múltiple, las cuales se realizaron simultáneamente. Para mantenimiento se evaluaron MS basal, sucrosa 30 g/L, BAP 2 mg/L, NAA 0.02 mg/L con 2 nivel de phytagel 2.0 y 3.0 g/L. El mejor resultado fue en 3.0, ya que el fenómeno de vitrificación no se dio en los explantes. En desarrollo se evaluaron 3 medios nutritivos: M1(1/2MS, sucrosa 30 g/L y phytagel 2.0 g/L), M2(1/2MS, sucrosa 30 g/L y phytagel 3.0 g/L), M3(MS, sucrosa 30 g/L y phytagel 2.0 g/L). En las 5 variedades los mejores resultados se obtuvieron en M2. Se realizaron 2-7 multiplicaciones. Para inducir a la formación de raíces se usó: 1/2MS, NAA 0.5 mg/L, phytagel 2.0 g/L con 2 dosis de sucrosa 15 y 30 g/L. En ambos medios nutritivos, el comportamiento de las variedades fue igual. En la variedad de SR el brote de raíces fue tardío. Por eso se redujo gel (phytagel 1.75 g/L) del medio nutritivo, observándose más rápido el enraizamiento. Las vitroplantas de las variedades en estudio respondieron muy bien al proceso de aclimatación. Al final se logró conseguir una alta producción de cada variedad de crisantemos en un período de 100 días.

Palabras clave: concentración, establecimiento, enraizamiento

# MICROPROPAGACIÓN DE *GERBERA JAMESONII*: UNA ESPECIE ORNAMENTAL DE GRAN INTERÉS COMERCIAL

Rodríguez, C; M.Vidal<sup>1</sup>; M.G. Brucato<sup>1</sup>; A, Silva<sup>1</sup>; M. Rivas<sup>1</sup> y I.Trujillo<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Centro de Estudios de Agroecología Tropical (CEDAT). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez". Apartado 47925. Caracas 1010. e-mail: [jarn1234@telcel.net.ve](mailto:jarn1234@telcel.net.ve)

## RESUMEN

*Gerbera* es un género que abarca cerca de 40 especies. Es una planta perenne con flores, perteneciente a la familia *Compositae*. En Venezuela el material vegetal utilizado para el establecimiento de los cultivos florícolas en general proviene del extranjero, lo que repercute en el incremento de los costos de producción; es aquí donde la micropropagación puede ser una alternativa para la disponibilidad del material vegetal que permita un mejor aprovechamiento del cultivo de gerbera. Para la iniciación del cultivo *in vitro* se tomaron plantas madres de *Gerbera jamesonii* mantenidas en vivero, de las cuales se tomaron tres tipos de explantes: inflorescencias jóvenes, pedúnculos de las inflorescencias y brotes jóvenes. Para el establecimiento del cultivo *in vitro* y para su posterior multiplicación, se utilizó el medio de cultivo MS suplementado con diferentes concentraciones de BA, originándose 4 tratamientos: un control y tres medios de diferente composición. De los tres tipos de explantes utilizados encontramos que los brotes jóvenes resultaron adecuados para regenerar plantas de *Gerbera jamesonii*. El proceso se desarrolló en tres etapas: la fase de inducción de brotes (3 meses), fue de aproximadamente tres meses, usando altas concentraciones de citoquininas (10 mg/l de BA). Posteriormente, los explantes fueron subcultivados en medio MS donde la concentración óptima resultó ser de 1 mg/l de BA y 0.1 mg/ de IBA, donde los brotes se multiplicaron y desarrollaron hasta formar plántulas. El enraizamiento se obtuvo en el mismo medio de multiplicación. En la actualidad, las plántulas están en la fase de aclimatación.

Palabras clave: BA, micropropagación, *gerbera*, cultivo *in vitro*

# MULTIPLICACIÓN EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL DEL CULTIVAR HÍBRIDO 'FHIA-21' (AAAB)

Milagros Basail Pérez<sup>1\*</sup>, Rafael Gómez Kosky<sup>2</sup>, Victor Medero Vega<sup>1</sup>, Manuel Cabrera Jova<sup>1</sup>, Arletys Santos Pino<sup>1</sup>, Marlenys Torres Delgado<sup>1</sup>, Eneida Otero Gálvez<sup>1</sup>, Ania Robaina Jiménez<sup>1</sup>, Diosdada Gálvez Guerra<sup>1</sup>, Maricel Bauta Toledo<sup>1</sup>, Miguel Álvarez Mesa<sup>1</sup>, Jorge López Torres<sup>1</sup>, Aymé Rayas Cabrera<sup>1</sup>, Magaly García García<sup>1</sup>, Robersy Sánchez<sup>1</sup>, Yoel Beovides García<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP. 53000, Villa Clara, Cuba. e-mail: [milagrosb@inivit.co.cu](mailto:milagrosb@inivit.co.cu)

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

## RESUMEN

El trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) con el objetivo de establecer una metodología para la multiplicación en sistema de inmersión temporal (SIT) del cultivar híbrido 'FHIA 21' (AAAB). Se estudiaron diferentes tiempos y frecuencias de inmersión así como combinaciones de reguladores e inhibidor del crecimiento (6-BAP, AIA y PBZ), volumen de medio de cultivo, momento de subcultivos, densidad de explantes por frasco para incrementar el coeficiente de multiplicación. Además, se evaluó la influencia de las condiciones de luz y el comportamiento de las vitroplantas obtenidas en la fase de aclimatización. En condiciones *in vitro* y *ex vitro* se realizaron un conjunto de evaluaciones para observar el comportamiento de las plantas. Los resultados obtenidos permitieron establecer una metodología para la micropropagación en los SIT del cv. híbrido 'FHIA 21' (AAAB), la cual consistió en utilizar un tiempo de inmersión de 10 minutos a una frecuencia de ocho veces por día. Para cada frasco de 10 L se inocularon 70 explantes y la renovación con 2800 ml de medio de cultivo y un tiempote cultivo de 18 días en condiciones de oscuridad permitió alcanzar la mayor productividad del material en fase de multiplicación. Además al utilizar las sales MS suplementadas con 2.0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP; 0.65 mg.L<sup>-1</sup> de AIA y 10.0 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico y 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de paclobutrazol, se logró disminuir el crecimiento innecesario de los tallos y hojas de los brotes en la fase de multiplicación y por lo tanto un mayor número de brotes por explantes inoculados sin la presencia de multiyemas e hiperhidricidad. En la fase de aclimatización las plantas procedentes del sistema de inmersión temporal tuvieron un comportamiento superior a las procedentes del medio de cultivo semisólido y sin la presencia de cambios fenotípicos.

Palabras clave: micropropagación, sistema de inmersión temporal, explantes y coeficiente de multiplicación.

# OBTENCIÓN Y PROPAGACIÓN IN VITRO DE UN NUEVO HÍBRIDO DE PAPAYA IBP 42-99

Laisyn Posada Pérez<sup>1</sup>, Jorge Gallardo Colina<sup>1</sup>, Rafael Gómez Kosky<sup>1</sup>, Leticia Más Castellanos<sup>1</sup>, Juan Pérez Ponce<sup>1</sup>, Maritza Reyes Vega<sup>1</sup>, Idalia Herrera Ofarril<sup>1</sup> y Osvaldo Noman Montenegro<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>.Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: laisynpp@yahoo.es

<sup>2</sup>.Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivos: obtener híbridos con frutos de mayor calidad (alto brix y menor tamaño del fruto) que la variedad Maradol Roja, implantar *in vitro* ápices del híbrido seleccionado y desarrollar una metodología para la propagación *in vitro* de este. Para los cruzamientos se escogieron plantas representativas de la variedad Maradol Roja y las variedades seleccionadas como progenitores. Para lograr porcentajes de establecimiento adecuados se realizaron tres experimentos empleando distintas sustancias desinfectantes y antibióticos. Se estudiaron diferentes medios de cultivos para las fases de multiplicación y enraizamiento, así como distintos tipos de condiciones para la aclimatación de las plantas. El híbrido F tuvo un comportamiento superior. Se seleccionó como mejor planta la número dos nombrada como el híbrido de Papaya IBP 42-99 porque fue la que presentó un menor peso del fruto (1.00 kg). El éxito de la desinfección y establecimiento *in vitro* del híbrido de Papaya con porcentajes de 68.5% de ápices establecidos, se logró a través de un esquema repetible donde se utilizó como material vegetal de partida brotes axilares jóvenes con dos meses de edad, desinfección superficial durante 10 minutos con hipoclorito de sodio al 1% e inmersión en mezcla de antibióticos durante 30 minutos antes de la siembra en medio de cultivo líquido con soporte de papel. Al adicionar auxina al medio de cultivo de multiplicación se lograron vitroplantas de mayor tamaño y mayor número de explantes. Para la fase de enraizamiento se alcanzaron los mejores resultados en el medio de cultivo MS suplementado con 5.0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, con un 68% de plantas enraizadas. Las vitroplantas a los 60 días en los contenedores de polieturano alcanzaron una altura de 10-12 cm y emitieron de 5-7 hojas, estando listas para el trasplante a condiciones de campo.

Palabras clave: AIB, establecimiento, Maradol roja

# PRODUCCIÓN ACELERADA DE SEMILLA DE NUEVAS VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR MEDIANTE EL EMPLEO DEL CULTIVO DE TEJIDOS

Yandi H. Estévez Martín,\* Mayra Jiménez Vázquez, Aydiloide Bernal Villegas, Jorge L. Montes de Oca, Pablo Machado Armas, Odalys Rivero, Zenaida Occeguera, F. R. Díaz Mujica, Osmany Aday Díaz, María Manresa Roque, Ariel Arencibia, Nicolás Fernández, Yulexy Gil Cruz, Luis Aguilera, Héctor Jorge, Rigoberto García, Iroel Rodríguez, Midiala Bermúdez, Marlen Cortes, Diamilis Ojeda, Nexy Hernández, Gercy Álvarez, Asela González, Mirelis Alejo, Yaimí Otero, Sonia Hernández, Ana Núñez, Ada Aguiar, Lianys López, Nedé Quintero, Idesnel Banquela, Madelaine Águila, Nexy Hernández, Ana R. Hernández y Dalidia Ravelo. \*Autor para correspondencia.

**Colaboradores:** Elio Pascual, Arbelio Cruz, Madelina Alba Félix Martínez, Lorenzo Iglesias, Luis Bosch y Yairiel Moreno

Etica. Villa Clara, Cienfuegos. Cuba.

## RESUMEN

La utilización de la propagación masiva de plantas a partir del cultivo de tejidos, está considerada como tecnología de punta, si se tiene en cuenta el desarrollo alcanzado por nuestro país en la temática en cuestión. Partiendo de la composición varietal de la provincia se trazó como estrategia la multiplicación acelerada de un grupo de nuevas variedades, de amplio margen de adaptabilidad a las condiciones agroproductivas del territorio. Se introdujeron mediante vitroplantas las variedades C85-102 (130 ha), C86-12 (1 ha), C88-380 (1 ha) y C86-56 (1 ha) en la categoría de Semilla Registrada I en todas las Empresas Azucareras de la provincia, lo que propició que durante el año 2005 se contara con semilla de calidad para extender el genotipo a todas las áreas de las Unidades productoras. Finalmente se valora la factibilidad de la producción de semilla de caña a partir de vitroplantas.

Palabras clave: cultivo de tejidos, propagación masiva, semilla registrada



# TECNOLOGÍA DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE LA *HELICONIA STANDLEYI* MACBRIDE

Pablo Machado Armas<sup>1</sup>, Flora Margarita Sosa Rodríguez<sup>2</sup>, Yandi Estévez Martín<sup>1</sup>, Aydiloide Bernal Villegas<sup>1</sup>, Odalys Rivera Fernández<sup>1</sup>, Mayra Jiménez Vázquez<sup>1</sup>, Zenaida Occeguera Aguila<sup>1</sup>, Jorge Luis Montes de Oca<sup>1</sup>, Carlos Reyes Esquirol, Midiala Bermudez<sup>1</sup>, Lianis López, Ada T. Aguiar<sup>1</sup>, Madelaine Aguila<sup>1</sup>, Ana M. Nuñez<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara – Cienfuegos (ETICA).  
e-mail: [biofábrica@vc.minaz.cu](mailto:biofábrica@vc.minaz.cu)

<sup>2</sup> ANAP Provincial Cienfuegos. Autopista Nacional Km. 246. Ranchuelo. Villa Clara.

## RESUMEN

La *Heliconia* es una especie hortícola, muy llamativa, su inflorescencia tiene un bonito colorido, es muy demandada como flores cortadas. El presente trabajo se realizó con la finalidad de establecer una metodología para la propagación comercial de la *Heliconia standleyi* Macbride, se estudiaron variantes de desinfección, los medios de cultivo y el manejo de los explantes en las diferentes fases de la micropropagación. Los resultados mostraron que con el empleo de hipoclorito de sodio al 2%, durante 15 minutos se logró una alta desinfección de los ápices. Con la combinación de 6 bencilaminopurina ( $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y el AIA ( $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) en el medio de cultivo fue posible lograr una alta regeneración y crecimiento de los ápices. En la fase de multiplicación los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de 6-BAP ( $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) con AIA ( $0.65$  y  $1.3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) subcultivando los explantes mayores  $1.0 \text{ cm}$  individualmente en medio de cultivo semisólido. Una influencia significativa sobre el número de raíces y el crecimiento de los explantes tuvo la adición de ácido indolacético al medio de cultivo y utilizando para el subcultivo explantes mayores de  $3.0 \text{ cm}$ . La calidad de los explantes también influyó de forma significativa en los resultados de la fase de aclimatización quedando demostrado que las plantas *in vitro* provenientes de la fase de enraizamiento deben tener  $3.0 \text{ cm}$  o más de altura.

Palabras clave: desinfección, enraizamiento, propagación

# TECNOLOGÍA PARA LA MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL *SPATHIPHYLUM STANLAI*

Odalys Rivera<sup>1</sup>, Pablo Machado<sup>1</sup>, Alejandro González Rodríguez<sup>2</sup>, Aydiloide Bernal<sup>1</sup>, Mayra Jiménez<sup>1</sup>, Yandi H. Estévez<sup>1</sup>, Jorge L. Montes de Oca<sup>1</sup>, Carlos Reyes Esquirol<sup>1</sup>, Zenaida Occeguera<sup>1</sup>, Gercy Álvarez<sup>1</sup>, Asela González<sup>1</sup>, Yaimí Otero<sup>1</sup>, Sonia Hernández<sup>1</sup>, Mirelis Alejo<sup>1</sup>, Elio Pascual<sup>1</sup> y Yadier Rubio<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara – Cienfuegos (ETICA).  
e-mail: [biofábrica@vc.minaz.cu](mailto:biofábrica@vc.minaz.cu)

<sup>2</sup> MINED Placetás

## RESUMEN

Las aráceas se micropropagan como una alternativa de multiplicación rápida y para la eliminación de fitopatógenos. En el género de *Spathiphyllum* constituye el principal método de propagación a escala comercial y en la introducción de nuevas especies y variedades. Se realizó en la Biofábrica de Flores perteneciente a la Dirección Provincial de Servicios Comunes de Villa Clara, con el objetivo de establecer una metodología de micropropagación de *Spathiphyllum stanlai* que permita obtener plantas de calidad genética y sanitaria. Se evaluó la respuesta de la especie en las diferentes etapas definidas en el proceso de propagación *in vitro*. Se estableció un método de desinfección superficial con Hipoclorito de sodio al 2% a tres tiempos de exposición 10, 20 y 30 minutos. Se determinó que las yemas axilares inactivas entre 1-2 mm a 30 minutos y tratadas al 2% con NaOCl mostraron el menor porcentaje de brotación aunque con mayor demora. Al evaluar el efecto de cinco combinaciones de 6BAP (0, 1, 2, 4, 5 mg.l<sup>-1</sup>) con AIA (0.5 y 1mg.l<sup>-1</sup>) en explantes provenientes de yemas axilares inactivas en el tercer subcultivo, resultó que los máximos valores en el número de brotes y el coeficiente de multiplicación se obtuvieron cuando se utilizó 4 mg.l<sup>-1</sup> de 6BAP y 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de AIA en el medio de cultivo líquido a intervalos de subcultivos de 30 días. El número de raíces y el crecimiento de los explantes se favoreció con la adición de 1.3 mg.l<sup>-1</sup> de AIA al medio de cultivo de enraizamiento.

Palabras clave: aráceas, multiplicación, *Spathiphyllum*

# VERANERO PARA EL CULTIVO DE PLANTAS EN CLIMA TROPICAL

Luis Berriz Pérez, Manuel Álvarez González\*, Lisandro Vázquez Hernández , Juan Bermúdez Torres y Guillermo Saura. \*Autor para correspondencia.

Centro de gestión de la información y desarrollo de la energía (CUBAENERGÍA) Calle 20 # 4111 e/ 18-A y 47 Miramar Playa, Ciudad de La Habana, CP 11 300. e-mail: [malvarez@cubaenergía.cu](mailto:malvarez@cubaenergía.cu)

## RESUMEN

En las cámaras de clima controlado empleadas actualmente como cámaras de crecimiento en la agricultura, el uso de la luz solar es deficiente y trae aparejada heterogeneidad en su calidad y distribución interior, así como la existencia de un alto costo energético por climatización de las mismas durante el proceso productivo. El veranero constituye una nueva tecnología utilizable en el cultivo de plantas que no pueden ser obtenidas normalmente en clima tropical y en la biotecnología como cámara de crecimiento que permite mejorar la distribución interior y la calidad de la luz, así como disminuir los consumos energéticos, por concepto de climatización. Para esto es necesario contar con un número de filtros ópticos líquidos que permita el paso de la radiación solar en la cantidad y calidad requerida para cada aplicación específica del veranero y que al mismo tiempo no deje pasar la radiación del infrarrojo cercano no útil, presente en el espectro solar y que se convierte en calor. El objetivo del presente trabajo es presentar el desarrollo y evaluación de filtros ópticos líquidos apropiados, para las diferentes aplicaciones posible del veranero, que permitan el paso de la radiación fotosintéticamente activa en la cantidad necesaria y distribución espectral adecuada de acuerdo a los requerimientos del cultivo.

Palabras clave: costo energético, filtros ópticos líquidos, luz solar

# EFFECT OF THREE SYNTHETIC BRASSINOSTEROID ANALOGUES APPLIED *IN VITRO* AND AT ACCLIMATISATION ON YIELD AND SEED QUALITY OF POTATO MINITUBERS

Britta Kowalski, Felipe Jimenez Terry, Isabel Jomarrón Rodiles, Daniel Agramonte Peñalver,

Universität Rostock, Agrar- und umweltwissenschaftliche Fakultät, Institut für Landnutzung  
Justus-von-Liebig-Weg 6. 18059 Rostock. Tel. 0381 498 2100, Fax 0381 498 2376  
[www.britta-kowalski.de](http://www.britta-kowalski.de)

Potato microplants cv. Desirée were treated *in vitro* with three synthetic brassinosteroid analogues added to semisolid tissue culture medium in different concentrations. One brassinosteroid analogue was also applied to liquid culture medium in a temporary immersion system (TIS). Microplants derived from nodes grown on semisolid culture medium were subsequently transferred to the gauze tunnel and sprayed with brassinosteroids solutions or remained unsprayed. Untreated microplants were also established *ex vitro* and sprayed with brassinosteroids, and unsprayed controls established. Minitubers derived from acclimatized microplants were planted in the field. Plant quality was evaluated in three successive years at the various stages of the seed production process using a complex of growth parameters. Brassinosteroid analogues improved the quality of potato microplantlets *in vitro* and at acclimatisation in the gauze tunnel and increased the number of minitubers harvested. Beneficial concentrations and their influence on single growth parameters depended on the brassinosteroid analogue used, mode of application (*in vitro*, foliar, combination of both) throughout the minituber production process, as well as year and season. In TIS culture the addition of a brassinosteroid analogue led to improved growth parameters and increased microtuber formation, depending on the concentration applied to the liquid culture medium. Growth under subtropical conditions and tuber yield parameters of field plants derived from minitubers depended on the brassinosteroid analogue used, concentration applied, mode of application and year. The carry through effects from the *in vitro* and acclimatisation phases led to increased tuber numbers and yields in the field; incidence of *Alternaria solani* leaf spots was not affected, with the exception of the year 2005 when a slight but significant decrease occurred. Synthetic analogues of brassinosteroids can be successfully incorporated into potato seed production from microplants, on condition that seasonal and yearly effects on plant growth parameters be monitored closely and concentrations applied to the culture medium adjusted for accordingly.



# TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

# ANÁLISIS PRIMARIO DE LOS MICROORGANISMOS DE LA RIZOSFERA Y LA ENTOMOFAUNA FOLIAR EN UN ÁREA DE EXPERIMENTACIÓN PLANTADA CON BANANO Y PLÁTANO TRANSGÉNICOS

J.M. Machado<sup>1\*</sup>, H. Grillo<sup>2</sup>, C. Pérez<sup>2</sup>, Zuleika Martínez<sup>3</sup>, Yelenys Alvarado<sup>1</sup>, M. Leyva<sup>1</sup>, Norma Suárez<sup>3</sup>, Ana L. Darias<sup>1</sup> y R. Gómez<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½. CP 54830. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: [machado@ibp.co.cu](mailto:machado@ibp.co.cu)

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara, V.C., Cuba.

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara, V.C., Cuba.

<sup>4</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Carretera de Malezas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

## RESUMEN

Para la evaluación de riesgos de organismos vivos modificados genéticamente, liberados al medio ambiente de manera controlada, se aplican diversas técnicas para el monitoreo de aquellas variables que interactúan con el medio ambiente y la planta transgénica en sí. Antes de establecer parámetros que definan una desviación dada que pueda inferirse como un impacto al medio ambiente, es necesario hacer análisis previos que orienten la situación en el área de experimentación. Con ese fin se realizó una evaluación primaria de la microflora de la rizosfera, de los plátanos y bananos transgénicos así como de los controles no transgénicos. De la misma manera se procedió a hacer un inventario de la entomofauna presente sobre las plantas en experimentación por simple inspección, colecta de ejemplares y las variaciones poblacionales del *Tetranychus tumidus* Banks. Los conteos de la microflora mostraron una variación inicial que debe ser tomada en cuenta para las ulteriores investigaciones. Los resultados primarios obtenidos sirven como base para los estudios en la extensión del experimento a áreas mayores de terreno.

Palabras clave: evaluación de riesgo, medio ambiente, plantas transgénicas

## MICROFLORA, RIZOSPHERA AND ENTOMOLOGICAL PRELIMINARY ANALYSIS ON A TRANSGENIC BANANA AND PLANTAIN FIELD TRIAL

### ABSTRACT

In risk assessment with live transgenic organism (LTO), which are released in the environment to perform field trials under control measures, a few techniques are applied to monitoring the risk that involve the interaction between transgenic plants and the environment itself. In order to have valuable parameters in the beginning of the trial, it is necessary to make some primary analysis in the experimental area. The microflora of the rhizosphere from transgenic plantain and banana, as well as from non-transformed controls, was evaluated. On the other hand was developed a list of insects present on the leaves of transgenic plants, after they were collected and submitted to classification, at the same time we studied the variation of colonies of *Tetranychus tumidus* Banks. The results from microorganisms counting showed that there was differences which must be taken into account in further research. This kind of study can be a starting point for risk assessment on more extensive experimental areas.

Key words: environment risk assessment, transgenic plants

# CAMBIOS BIOQUÍMICOS EN PLANTAS TRANSFORMADAS DE PIÑA

L. Yabor\*, M. Arzola, C. Aragón, M. Hernandez, A. Arencibia, J.C. Lorenzo. \*Autor para correspondencia.

Laboratory for Plant Breeding, Bioplant Center, University of Ciego de Avila, 69450, Cuba. e-mail: lyabor@bioplantitas.cu, Fax: 53-33 266340, [www.bioplantitas.cu](http://www.bioplantitas.cu)

## RESUMEN

La piña es una de las frutas tropicales más importantes, por tanto en muchos países se han llevado a cabo intensivos programas de mejoramiento genético. Cuba es uno de ellos. Nuestro grupo de investigación ha introducido previamente el gen *bar* en el genoma de la piña. Este trabajo muestra los datos sobre los efectos del herbicida FINALE (0, 15 y 30 días) sobre las plantas de piña transformadas que portan el gen *bar*. En comparación con las plantas no transformadas, las plantas de piña transformadas sobrevivieron al efecto del herbicida y mostraron un dramático incremento de malondialdehído, otros aldehídos, clorofilas a, b y totales y contenido de fenoles libres como resultado de la aplicación del herbicida FINALE. Sin embargo las plantas transformadas no mostraron incremento de fenoles ligados a la pared celular. El análisis estadístico de la actividad peroxidasa después de la aplicación del herbicida no mostró diferencias entre ambos grupos de plantas (no transformadas y transformadas) y se incrementó la actividad durante la evaluación del experimento. El análisis estadístico del contenido de proteínas después de asperjar el herbicida FINALE, no mostró ningún efecto en el transcurso del tiempo. Sin embargo, en general el contenido de proteínas fue estadísticamente superior en plántulas no transformadas que en plántulas transformadas. En nuestro experimento, la transformación genética de piña con el gen *bar* no solo confirió resistencia al herbicida FINALE sino que además promovió varios eventos bioquímicos adicionales. Estos eventos pudieran modificar importantes caracteres agrícolas en las plantas de piña, que en futuros experimentos serán estudiados bajo condiciones de campo.

Palabras clave: *Ananas comosus* (L.) Merr., transformación genética, cambios bioquímicos.

## BIOCHEMICAL SIDE EFFECTS OF TRANSFORMED PINEAPPLE PLANTS

### ABSTRACT

Pineapple is one of the most important tropical fruit and therefore intensive genetic improvement programs are being carried out in many countries. Cuba is one of them. Our research team has previously introduced the *bar* gene into the pineapple genome. This report shows data about the effects (0-30 days) of herbicide FINALE on *bar* gene-containing pineapple plantlets. In comparison with non-transformed plantlets: transformed pineapples survived the application of the herbicide and showed a dramatic increase of malondialdehyde, other aldehydes, chlorophyll (a, b, total) and free phenolics contents as results of FINALE application. However, transformed plants did not show increases of cell wall-linked phenolics. Statistical analysis of peroxidase activity after herbicide application did not show difference between both groups of plantlets (non-transformed and transformed) and the activity increased during the experiment. Statistical analysis of protein contents after FINALE spraying showed no-effects of the time course. However, in general, protein content was statistically higher in non-transformed than in transformed plantlets. In our experiment, genetic transformation of pineapple with *bar* gene not only conferred resistance to herbicide FINALE but also promoted several additional biochemical events. Those events could modify important agricultural traits of pineapple plants that will be studied under fields conditions in futures researches.

Key words: *Ananas comosus* (L.) Merr., genetic transformation, biochemical changes

# EFFECTOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE LA APLICACIÓN DEL ETHREL-480 Y EL NITRATO DE AMONIO EN CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM* SP. HÍBRIDO) VAR. CP52-43

Janet Quiñones<sup>1</sup>, Yanelis Capdesuñer<sup>1\*</sup>, Janetsy Borroto<sup>1</sup>, Orlando Borrás<sup>2</sup>, María A. Blanco<sup>1</sup>, Yanet Tambara<sup>2</sup>, Maribel Rivas<sup>1</sup>, Hipólito Peralta<sup>3</sup>, Mayra Rodríguez<sup>2</sup>; Eduardo Canales, Maylin Rodríguez<sup>3</sup>, Liudmila Chavez<sup>2</sup>, Justo González<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Centro de Bioplantitas, Carretera a Morón Km 9 CP 69450. Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila. Cuba. Teléf:(53-33) 224016/225768. Fax: (53-33)266340. e-mail: jquinones@bioplantitas.cu

<sup>2</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba

<sup>3</sup> Universidad de Ciego de Ávila, Cuba

## RESUMEN

La búsqueda de variedades mejoradas de caña de azúcar con alto contenido azucarero y para la alimentación animal son objetivos priorizados en Cuba. Una forma de contribuir a lograr ambos objetivos es manipulando genes relacionados con los procesos de maduración y asimilación de nitrógeno. Por lo que en el presente trabajo se evaluaron los efectos químicos, bioquímicos y moleculares de la aplicación del Ethrel-480 y los moleculares del nitrato de amonio en caña de azúcar var. CP52-43. Para ello se desarrollaron dos experimentos bajo condiciones controladas en áreas del Centro de Bioplantitas. Se empleó el Ethrel-480 a razón de 1g/L de i.a. para evaluar indicadores químicos (polisacáridos, glucosa, fructosa, sacarosa) y bioquímicos (sacarosa fosfato sintasa (SFS) e invertasas ácidas solubles (IAS)) del metabolismo del carbono y (nitrato reductasa (NR) y proteínas) del metabolismo del nitrógeno, se determinó además la relación carbono nitrógeno. Para evaluar la expresión diferencial de genes mediante AFLP-ADNc se aplicó Ethrel-480 a razón de 1g/L de i.a y nitrato de amonio a 0.2g/L. El Ethrel-480 estimuló cambios metabólicos en plantas tratadas con respecto a las plantas no tratadas: un incremento de la sacarosa con disminución de la fructosa en hojas a los 7 días después de la aplicación; un incremento de la actividad de la SFS, y de los contenidos de polisacáridos y sacarosa, y una reducción de la actividad de las IA y de los contenidos de glucosa, fructosa y proteínas a los 14 días en tallos. Al analizar la relación C:N, se mostraron valores superiores en las plantas tratadas, indicando que se favoreció el metabolismo del carbono y se obtuvieron 18 y 9 bandas diferenciales relacionadas con los tratamientos con Ethrel-480 y nitrato de amonio respectivamente.

Palabras clave: AFLP-ADNc, Caña de Azúcar, Etileno, Ethrel-480, Sacarosa

## ABSTRACT

The search of improved varieties of sugar cane with high sugar content and for the feeding animal objective is prioritized in Cuba. A form to contribute to obtain both objectives is manipulating genes related to the maturation processes and nitrogen assimilation. Reason why in the present work the chemical effects, biochemical and molecular of the application of the Ethrel-480 and the molecular ones of sugar cane ammonium nitrate were evaluated to var. CP52-43. For it two experiments under conditions controlled in areas of the Bioplantitas Center were developed. The Ethrel-480 at the rate of 1g.L<sup>-1</sup> of i.a. was used to evaluate chemical tracers (polysaccharides, glucose, fructose, sucrose) and biochemists (sucrose phosphate sintase (SPS) and soluble acid invertase (SAI)) of the metabolism of carbon and (nitrate reductasa (NR) and proteins) of the metabolism of nitrogen, the relation was determined in addition carbon nitrogen. In order to evaluate the differential expression of genes by means of AFLP-cDNA it was applied to Ethrel-480 at the rate of 1g.L<sup>-1</sup> of i.a and ammonium nitrate to 0.2g.L<sup>-1</sup>. The Ethrel-480 stimulated metabolic changes in plants treated with respect to the plants nontreated: an increase of sucrose with decrease of the fructose one in leaves to the 7 days after the application: an increase of the activity of the SFS, and the contents of polysaccharides and sucrose, and a reduction of the activity of the IA and the contents of glucose, fructose and proteins to the 14 days in stems. When analyzing relation C:N, were superior values in the treated plants, indicating that the metabolism of carbon was stimulated



and 18 and 9 bands were obtained respectively differentials related to the treatments with Ethrel-480 and ammonium nitrate.

Keywords: AFLP-cDNA, Ethylene, Ethrel-480, Sucrose, Sugarcane

# GEN MODIFICADO DE *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR *TENEBRIONIS* PARA ALTOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA TOXINA INSECTICIDA CRY 3A EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE BONIATO (*IPOMOEA BATATAS*)

Irene Alvarez\*, Rolando Morán, Barbaro Usatorres, Zurima Zaldúa, Danalay Somonte, y Tania Olivera.  
\*Autor para correspondencia.

Laboratorio de Biología Molecular de Plantas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 387. Camagüey 70100. Cuba. e-mail: [irene.alvarez@cigb.edu.cu](mailto:irene.alvarez@cigb.edu.cu)

## RESUMEN

La expresión de las Cry  $\delta$ -endotoxinas en plantas es una valiosa herramienta para el control de insectos debido a que estas se unen específicamente a receptores de su tracto medio intestinal causando la lisis celular y muerte en pocos días. Se ha reportado el uso del gen sintético *cry3a* de *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis* como un controlador potencial activo contra coleopteros, mediante la expresión de la toxina Cry 3A. Para obtener plantas transgénicas de Boniato (*Ipomoea batatas*) resistentes al ataque del Tetuán (*Cylas formicarius*) mediante la alta expresión de este gen, se diseñó una estrategia para lograr una versión sintética vegetalizada del *cry3a* nativo. Las modificaciones realizadas a este gen para la expresión óptima en plantas han sido informadas previamente. Se sintetizaron cinco fragmentos de ADN con un rango de tallas entre los 200 y 400 pb. La ligación de estos fragmentos se llevó a cabo por protocolos convencionales y se precedió de una reacción de fosforilación en tampón T4 DNA Ligasa. El producto de la ligación fue amplificado por P.C.R con la enzima *Taq* Polimerasa. La banda de 1833 pb que se obtuvo de la reacción de amplificación se clonó en vector pBluescript de *E.coli* tratado *Sma*I/ *CIP*. Los clones positivos fueron seleccionados por análisis de restricción y secuenciación. En todos los casos se comprobó que el ensamblaje de los cinco fragmentos fue correcto, sin embargo, se observaron varias diferencias puntuales en la secuencia nucleotídica del gen con relación a la diseñada, por lo que se repitió el evento de polimerización con una enzima de alta fidelidad (*Pfu* Polimerasa). Sin embargo, nuevamente los resultados de la secuenciación indicaron algunas sustituciones nucleotídicas aunque en más baja frecuencia por lo que se ejecutó una estrategia de clonaje donde se combinaron las regiones correctas de tres de los clones obtenidos. Del resultado de esta clonación pudo aislarse el gen *cry 3a* sintético para la obtención del vector de transformación de plantas: plasmidio pCKGS. Plantas de boniato de la variedad CEMSA 78-354 se transformaron vía *Agrobacterium tumefaciens* con esta construcción sintética y fueron caracterizadas por la actividad biológica contra el Tetuán, evaluando el porcentaje de infestation en condiciones controladas y de campo; y por ensayos moleculares. El clon denominado C-26 fue el que mostró los mayores niveles de expresión de la toxina y la mejor protección contra el ataque del insecto.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis*, Boniato,  $\delta$ -endotoxina, gen sintético *cry 3a*, plantas transgénicas

## MODIFIED *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR *TENEBRIONIS* GENE FOR HIGH EXPRESSION LEVELS OF CRY 3A TOXIN IN TRANSGENIC SWEET POTATO (*IPOMOEA BATATAS*) PLANTS

### ABSTRACT

Cry  $\delta$ -endotoxin expression in plants is a valuable tool for pest insect control because  $\delta$ -endotoxin binds specifically to receptors at insect gut level, causing cell lysis and insect death in a few days. The design and synthesis of a coleopteran active *cry3a* gene from *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* for optimized expression in plants has been reported. To obtain Sweet Potato (*Ipomoea batatas*) transgenic plants resistant to Weevil (*Cylas formicarius*) attack through high expression levels of Cry 3A toxin, a strategy including a synthetic version of the native *cry3a* gene was designed. Genetic modifications for optimal expression in plants had been previously reported. Five DNA fragments ranging from 200 to 400 bp were

synthesized. Ligation of these fragments was carried out by conventional protocols, preceded by phosphorylation in T4 DNA Ligase buffer. Ligation reaction rendered mostly five fragments in the expected arrangement. However, the amount of DNA was not enough to be cloned directly, so amplification by P.C.R was carried out with *Taq* Polymerase. A 1833 bp band was obtained as P.C.R. product and cloned in a pBluescript *E.coli* vector *Sma*I/*CIP* treated. Positive clones were selected by restriction analysis. Sequencing results confirmed the correct fragment assembling, however, some nucleotide differences compared with the expected sequence were observed in all clones. To obtain a construct with the appropriate sequence, polymerization with high fidelity *Pfu* Polymerase was carried out. However, sequencing results indicated some base substitutions, in a lower frequency than *Taq* Polymerase amplified clones. An effective cloning strategy, combining gene regions with the correct sequences was performed. Several clones containing the synthetic construct with the expected sequence were obtained. A plant transformation vector containing the designed synthetic *cry3a* gene ( plasmid pCKGS) was obtained and transformed in an *Agrobacterium tumefaciens* strain to be used for Sweet Potato variety CEMSA 78-354 transformation. Plants having the synthetic gene were characterized by the biological activity against Sweet Potato Weevil, both under infestation at controlled and field conditions. Several molecular tests were performed to these plants. Clone called C-26 showed the highest toxin levels and the best protection against insect attack.

Key words: *Bacillus thuringiensis*,  $\delta$ -endotoxin, Sweet Potato, synthetic *cry 3a* gene, transgenic plants

# OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *A. THALIANA* CON NIVELES MODIFICADOS DE FORMALDEHÍDO DESHIDROGENASA DEPENDIENTE DE GLUTATIÓN. SU IMPORTANCIA EN LA DESCONTAMINACIÓN DE FORMALDEHÍDO EXÓGENO

Maykelis Díaz<sup>1\*</sup>, Hakima Achkor<sup>2</sup>, M. Carmen Martínez<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba. e-amil: [maykelis.diaz@indio.atenas.inf.cu](mailto:maykelis.diaz@indio.atenas.inf.cu)

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, España.

## RESUMEN

Como consecuencia de la alta contaminación ambiental, se está comenzando a aplicar la bioremediación utilizando plantas para eliminar compuestos perjudiciales (fitoremediación). El formaldehído es un compuesto muy tóxico cuya eliminación es necesaria en todas las células vivas. A temperatura ambiente es un gas inflamable, incoloro y muy soluble en agua. Este producto se puede encontrar dentro de la casa, en el medio ambiente, de forma natural o como resultado de la actividad industrial humana. La formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH), conocida también como ADH clase III, es una enzima ubicua, presente tanto en el reino animal como vegetal. La eliminación del formaldehído dentro de la célula se realiza principalmente mediante la FALDH, que utiliza NAD<sup>+</sup> como cofactor. Para investigar el papel de la FALDH, se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* bajo el control del promotor CaMV35S. El clonaje se realizó en 2 etapas: primero se clonó el cDNA de la FALDH en el vector pDH51 y a continuación se subclonó en el vector de expresión de plantas pBin19. La transformación se llevó a cabo mediante la infiltración de *Arabidopsis* con *Agrobacterium tumefaciens*. Dichas plantas transgénicas presentaron variación en la capacidad de metabolizar el formaldehído exógeno y en la actividad enzimática FALDH directamente relacionados con los niveles de proteína. Por otra parte, mostraron un fenotipo diferente, principalmente en la raíz. Basándonos en estudios bioquímicos y de localización subcelular hemos propuesto que una de las funciones de la FALDH es ser una enzima capaz de descontaminar el formaldehído medioambiental, presente en el aire y en aguas residuales. La construcción de plantas transgénicas con niveles modificados de formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) puede ser, por tanto, de gran interés para remediar la contaminación atmosférica en espacios interiores.

Palabras clave: *A. thaliana*, FALDH, formaldehído, planta transgénica

Key words: *A. thaliana*, FALDH, formaldehyde, transgenic plant

# TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *STEVIA REBAUDIANA* BERT MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Martínez R. Diego<sup>1\*</sup>, Monsalve F. Zulma<sup>1</sup>, Urrea Aura I<sup>1</sup>, Jiménez G. Elio<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Universidad de Antioquia, Laboratorio de Biología Molecular de Plantas. Medellín- Colombia e-mail: [drivilla2001@yahoo.es](mailto:drivilla2001@yahoo.es)

<sup>2</sup>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.

## RESUMEN

*Stevia rebaudiana* Bert., (*Asteraceae*) es una planta herbácea originaria del Paraguay. Presenta en sus hojas compuestos que pueden ser 300 veces más dulces que el azúcar con un reducido aporte energético. Estas sustancias tienen un importante valor económico y posicionamiento en el mercado de edulcorantes. Con el objetivo de aportar herramientas al mejoramiento genético de la especie y la producción de sus metabolitos secundarios, se estableció un método para la transformación genética basado en *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación de segmentos de hojas provenientes de vitroplantas de *Stevia* se realizó utilizando la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Se emplearon dos plásmidos de la serie pCambia, el p1301 que porta un gen de resistencia a higromicina *hptII* (higromycin phosphotransferase) y el gen de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y el segundo plásmido p1302 con el gen *hptII* y el gen de *gfp* (*green fluorescent protein*). Las plantas fueron regeneradas después de 8 semanas en medio de cultivo MS suplementado con 2.5 mg/L de 6-bencil amino-purina (BAP). 0.5 mg/L de higromicina para selección y Tetraciclina 200 mg/L para la eliminación de la bacteria. La efectividad de la infección se comprobó mediante detección histoquímica de GUS y la expresión de GFP. Los brotes desarrollados luego de 12 semanas fueron transferidos a medio de cultivo de libre de reguladores de crecimiento para multiplicación y posteriores verificaciones. Se presenta el primer informe del uso de *Agrobacterium tumefaciens* en la transformación de *Stevia rebaudiana*.

Palabras clave:  $\beta$ -glucuronidasa, proteína verde fluorescente, edulcorantes, higromicina.

## AGROBACTERIUM TUMEFACIENS- MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION IN STEVIA REBAUDIANA

### ABSTRACT

*Stevia rebaudiana* Bert., is an herbaceous native plant from Paraguay. Its leaves contain compounds that can be 320 fold times sweeter than sugar with reduced caloric contribution. It give to them an important economic value and positioning on edulcorants market. With the objective to contribute with tools for improvement and secondary metabolites production in *Stevia*, an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method was established. Leaves segments infection from *in vitro* plants of *Stevia* was done with *A. tumefaciens* LBA4404 strain. Two plasmids from pCambia series were used, p1301 carrying both hygromycin resistance gene (*hptII*, hygromycin phosphotransferase) and  $\beta$ -glucuronidase gene (*gus*) and the second one plasmid was p1302 carrying both *hptII* gene and green fluorescent protein gene (*gfp*). Plants were regenerated after eight weeks on MS medium supplemented with 6-bencil amino-purine (BAP) 2.5 mg/L, hygromycin 0.5 mg/L for selection and Tetracycline 200 mg/L for bacterium elimination. Effectiveness of infection was verified by GUS histochemical detection and GFP expression. Shoots developed after 12 weeks were transferred to free growth regulators medium for multiplication and later verifications. This is the first report of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Stevia rebaudiana*.

Key words:  $\beta$ -glucuronidase, green fluorescent protein, edulcorants, hygromycin

# TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE VARIEDADES COLOMBIANAS DE CRISANTEMO (*DENDRATHEMA GRANDIFLORA*) EMPLEANDO *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Hodson E., Forero A.\*, Garcia A., Cancino G. & Vaca J. \*Autor para correspondencia.

Unidad de Biotecnología Vegetal, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. A.A.56710.  
[www.javeriana.edu.co](http://www.javeriana.edu.co)

## RESUMEN

Colombia es el segundo exportador mundial de flores frescas de corte, entre las que se incluye *Dendranthema grandiflora* (Crisantemo). Sin embargo, su producción puede verse afectada por el ataque de enfermedades fúngicas, lo que trae como consecuencia que se empleen grandes cantidades de fungicidas aumentando los costos de producción a nivel económico y ecológico. La evaluación de sistemas de regeneración *in vitro* de Crisantemo a partir de discos de hoja vía organogénesis y embriogénesis somática, constituyó un primer paso hacia el empleo de la transformación genética. Con este fin, fueron establecidos *in vitro* discos de hoja de *D. grandiflora*, variedades Escapade, White albatross y Yellow albatross, sobre medio MS en presencia de ANA (0 - 4.83 µM) y BAP (0 - 13.32 µM). Así mismo, se establecieron discos foliares sobre el medio Mum B en presencia 2,4-D (0 - 4.52 µM) con periodos de exposición de 7, 14 y 21 días. Los brotes regenerados fueron individualizados, enraizados y endurecidos. Se desarrollaron protocolos de regeneración de tres variedades de crisantemo. Los resultados obtenidos mostraron la capacidad de regeneración de plantas completas vía organogénesis o embriogénesis somática a partir de segmentos foliares. El grupo desarrolló una metodología eficiente para la transformación de *D. grandiflora*, mediante el uso de *A. tumefaciens*. Se transfirió e integró el gen inhibidor de la poligalacturonasa (*pgip*) de frambuesa y de kiwi -en forma individual- y el gen marcador de selección (*bar*). Se obtuvo regeneración de plantas completas de *D. grandiflora* variedades Escapade y White Albatross. El tiempo de co-cultivo de 3 días y bajas concentraciones bacterianas en el momento de la infección, favorecieron la transformación y la regeneración de los explantes infectados con *A. tumefaciens* cepas EHA 105, GV2260 y LBA 4404. Con la cepa GV2260-pSPC1 se registró la mayor frecuencia de transformación en las plantas desarrolladas vía embriogénesis somática.

Palabras clave: *Dendranthema grandiflora*, Gen inhibidor de la poligalacturonasa (*pgip*), regeneración *in vitro*, transformación genética

## AGROBACTERIUM TUMEFACIENS-MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION OF COLOMBIAN VARIETIES OF CHRYSANTHEMUM (*DENDRATHEMA GRANDIFLORA*)

### ABSTRACT

Colombia is the world's second largest exporter of fresh cut flowers including chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). Chrysanthemum production can be affected by fungal diseases hence involving the heavy use of fungicides, which leads to increased ecological and commercial production costs. *In vitro* regeneration from leaf discs was evaluated via organogenesis and somatic embryogenesis on three varieties: Escapade, White Albatross, and Yellow Albatross. Leaf discs cultures were initiated on MS medium supplemented with NAA (0-4.83 µM) and BAP (0-13.32 µM). In addition, Mum B medium supplemented with 2,4-D (0-4.52 µM) was evaluated after 7, 14, and 21 days. Regenerated shoots were transferred to rooting medium and hardened. Plant regeneration protocols via organogenesis and somatic embryogenesis were developed for the three varieties. An efficient genetic transformation methodology using *Agrobacterium tumefaciens* was developed. The Polygalacturonase Inhibiting Protein (*pgip*) genes from raspberry and kiwi were transferred and integrated individually along with a selection marker gene (*bar*). Escapade and White Albatross whole plants were regenerated. A 3 day-co-cultivation period combined with low bacterial concentrations when initiating the infection, favoured the transformation and regeneration of explants infected with *A. tumefaciens* strains EHA 105, GV2260, and LBA 4404. The highest transformation frequency was recorded on plants regenerated via somatic embryogenesis prior explant infection with strain GV2260-pSPC1.

Key words: *Dendranthema grandiflora*, Polygalacturonase Inhibiting Protein (*pgip*) gene, *in vitro* regeneration, genetic transformation.

# SONICATION-ASSISTED SYSTEM FOR TRANSIENT EXPRESSION IN RICE EMBRYOS USING *AGROBACTERIUM*

Meilyn Rodríguez\*, Ana V. Pérez, Kenia Tiel, Daymi Abreu, Marlene Pérez, Osmany Ramos, Cecilia Sánchez and Merardo Pujol. \*Autor para correspondencia.

Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB). P.O. Box 6162, Havana 10600, Cuba. e-mail: [meilyn.rodriguez@cigb.edu.cu](mailto:meilyn.rodriguez@cigb.edu.cu)

## ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most versatile and important cereal crops. Currently this crop supports more than 50 % of the World population. Recent advances in molecular biology and genetic engineering have provide tools that increase the efficiency of existing breeding methods and allow unconventional approaches for rice improvement. Results obtained from transient expression systems rapidly and efficiently provide important information and reflect *in vivo* situation *in planta*. Microprojectile bombardment is commonly used to assay transient gene expression, but the main difficulty in its use is the variability in the number of individual bombardment events between independent experiments. Sonication-assisted *Agrobacterium* mediated transformation tremendously improves the efficiency of *Agrobacterium* infection by introducing large numbers of microwounds into the target plant tissue. Using immature embryos of rice as explants, we evaluated the transient expression of  $\beta$ -glucuronidase (GUS) activity. The highest GUS expression was obtained when immature embryos were sonicated for 2 s in the presence of *Agrobacterium*, followed by co-cultivation with the explants in contact the culture medium for 3, 5 and 7 days at 25 °C. The addition of acetosyringone to the co-culture medium enhanced transient expression.

Key words: rice embryos, sonication, transient expression

Palabras clave: embriones de arroz, expresión transitoria, ultrasonido



# GENÓMICA



# **AISLAMIENTO, CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE UN AISLADO DEL VIRUS DE LA MANCHA ANULAR DE LA PAPAYA PROCEDENTE DE LA HABANA, CUBA**

Dariel Cabrera<sup>1</sup>, Aminaél Sánchez<sup>2</sup>, Bárbara Ocaña<sup>2</sup>, Ana L. Darías<sup>2</sup>, José E. Gonzáles<sup>3</sup>, Maylin Cruz<sup>4</sup>, Rafael Gómez<sup>2</sup> y Orelvis Portal<sup>2\*</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Carretera a Camajuaní Km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: [oportal@ibp.co.cu](mailto:oportal@ibp.co.cu); [villaport@gmail.com](mailto:villaport@gmail.com)

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

<sup>4</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera Maleza Km 2.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

## **RESUMEN**

El Virus de la Mancha Anular de la Papaya (PRSV) produce una de las enfermedades más destructivas en el cultivo de la papaya (*Carica papaya*) alrededor del mundo, ocasionando pérdidas que pueden llegar hasta el 100 % de la producción. En muchos países, la secuencia de la proteína de la cápsida ha sido determinada para diferentes aislados virales, mostrando distintos niveles de variación, que los distinguen en origen y patogenicidad. El análisis de la composición de nucleótidos y aminoácidos correspondientes, de dicha región, son características individuales de los virus en plantas, lo cual hace posible la clasificación de miembros del grupo de los potivirus. Con el objetivo de conocer la secuencia del gen que codifica para la proteína de la cápsida del PRSV, se seleccionaron hojas de papaya var. Maradol roja, de la localidad de Boyeros (La Habana), que mostraban síntomas característicos de la enfermedad causada por dicho virus. Para la purificación del ARN total, la reacción de RT-PCR y el procedimiento de clonaje, se utilizaron los sistemas comerciales *RNAeasy® Plant Mini Kit*, *Access RT-PCR System* y *pGEM®-T Easy Vector System* respectivamente. Después de secuenciado el fragmento obtenido, se empleó el programa BLASTN para la búsqueda de homología mediante su alineamiento con otras secuencias ya reportadas en la base de datos internacional *GenBank*. Como resultado de la reacción de RT-PCR se obtuvo un fragmento de aproximadamente 850 pares de bases. Se observó que la secuencia en estudio comparte una alta homología con otra anteriormente reportada por el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de las Plantas (Cuba). Se puede afirmar que estamos en presencia de una nueva secuencia de la proteína de la cápsida del Virus de la Mancha Anular de la Papaya, que en estos momentos se encuentra registrada en el *GenBank* (Número de acceso DQ089489).

Palabras clave: CP, papaya, potivirus, PRSV, RNA, virus de plantas

## **ISOLATION, CLONING AND SEQUENCING OF THE COAT PROTEIN GENE OF A PAPAYA RINGSPOT VIRUS ISOLATE FROM LA HAVANA**

### **ABSTRACT**

Papaya Ringspot Virus (PRSV) produces one of the most destructive diseases in papaya (*Carica papaya*) around the world, causing losses that can reach until 100% of the production. In many countries, the sequence of the coat protein has been determined for different viral isolates, showing variations that distinguish them in origin and pathogenicity. The nucleic acids and amino acids composition, of this region, represents an individual characteristic for plant viruses; their analysis can make possible the classification of members of the potyvirus group. The objective of our work was to isolate the coat protein region of PRSV isolate originating from Boyeros (La Havana). Leaves of papaya var. Maradol roja showing symptoms of the papaya ringspot virus disease were used. For

the RNA isolation, RT-PCR and cloning procedure, the SV Total RNA Isolation System, the Access RT-PCR System and the pGEM®-T Easy Vector System were used according instructions of the manufactures. After sequencing, we submitted our result to the BLASTN program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) for homology searching. The RT-PCR analysis revealed one product of around 850 base pairs which corresponds to the expected size. The BLASTN analysis demonstrated that the putative PRSV sequence belonging to La Havana area shares a high homology with another coat protein of the Papaya Ringspot Virus previously reported by the Laboratory of Molecular Biology of the Institute of Plants Biotechnology (Cuba). Now, we can affirm that we are in presence of a new sequence of the coat protein of this virus, at this moment registered in the GenBank (Access number DQ089489).

Key words: PRSV, potyvirus, RNA, plant viruses, papaya, CP

# CARACTERIZACION MEDIANTE AFLPS DE *STEVIA REBAUDIANA* EN EL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA (COLOMBIA)

Martínez R. Diego<sup>\*1</sup>, Monsalve F Zulma<sup>1</sup>, Urrea Aura I\*, Rojas, Luis E.<sup>2</sup>, Jiménez G. Elio<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Universidad de Antioquia, Laboratorio de Biología Molecular de Plantas. Medellín- Colombia e-mail: [drivilla2001@yahoo.es](mailto:drivilla2001@yahoo.es)

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas Universidad Central de las Villas Carretera a Camajuaní km5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba CP 54830.

## RESUMEN

La técnica de AFLP consiste en la amplificación arbitraria, de fragmentos de restricción de una digestión total del ADN genómico, los cuales son amplificados por PCR y luego detectados en geles desnaturizantes de poliacrilamida. La efectividad de la técnica se basa en las variaciones genéticas que existen entre especies, variedades y cultivares estrechamente relacionados. *Stevia* presenta en sus hojas una alta producción de "steviosidos" y "rebaudiosidos". Sustancias con gran poder edulcorante, llegando a ser 320 veces más dulces que el azúcar. Un gran interés por esta planta en el mercado de edulcorantes ha sido desarrollado, particularmente en Japón. El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente mediante AFLP los genotipos de *Stevia rebaudiana* presentes en el departamento de Antioquia, Colombia. Se hicieron extracciones de ADN de 46 individuos provenientes de laboratorios de la Universidad de Antioquia y diferentes localidades del departamento de Antioquia, dos muestras de referencia de los genotipos "Morita" y "Bertoni" obtenidas a través de CORPOICA y el Jardín Botánico de la Ciudad de Medellín, respectivamente. Se expusieron a la técnica de AFLP usándose cuatro combinaciones de cebadores con tres bases selectivas cada uno, las bandas se visualizaron por tinción en plata en gel de poliacrilamida al 6%. Se obtuvieron 383 marcadores con alto polimorfismo. Los resultados analizaron en el programa NTsys pc2 se establecieron dos principales agrupamientos, genotipos "Morita" y "Bertoni" para el departamento de Antioquia. El genotipo SRQ-93 obtenido por mutagénesis en Laboratorios de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Antioquia se agrupó dentro del grupo "Bertoni", mientras la mayor parte de las muestras procedentes de las diferentes localidades se agruparon dentro de "Morita".

Palabras clave: edulcorantes, genotipos, PCR

## AFLP CHARACTERIZATION OF *STEVIA REBAUDIANA* IN DEPARTMENT OF ANTIOQUIA (COLOMBIA)

### ABSTRACT

AFLP technique is based on the selective restriction fragment amplification; from a total digestion of the genomic DNA, which are amplified by PCR and later detected in polyacrylamide denaturing gels. The effectiveness of this technique is based on the genetic variations that exist between species, varieties or cultivars closely related. *Stevia* has a high production of steviolosides and rebaudiosides in leaves tissues. These have a great edulcorant power, getting to be 320 fold times sweeter than sugar. A great interest for this plant has been generated in edulcorants market, particularly in Japan. AFLP technique was used on this work in to molecular characterization of "Bertoni", Sr-q93, and "Morita" genotypes of *Stevia rebaudiana* Bert. presents in the Department of Antioquia, Colombia. In this work, DNA extractions were done of 46 individuals from University of Antioquia laboratories and different localities of Antioquia Department. Two reference samples of "Morita" and "Bertoni" cultivars were supplied by CORPOICA and Medellín Botanical garden respectively. They were exposed to AFLP technique, using four combinations of three selective bases primers. Bands were visualized by silver

staining in polyacrilamide gel 6%. 383 markers were obtained with a high polymorphism observed. Results were analyzed by NTsys pc2 software. Two main genotype grouping, "Morita" and "Bertoni" were established for Antioquia Department. Srq-93 genotype obtained by mutagenesis in University of Antioquia Plant Biotechnology laboratories was grouped in "Bertoni", while most of samples from different localities were grouped in "Morita".

Key words: edulcorants, genotypes, PCR

# EMPLEO DE LOS MARCADORES AFLP PARA LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DIFERENTES CULTIVOS CON INTERÉS AGRÍCOLA

Luis E. Rojas<sup>1\*</sup>, Jorge López<sup>2</sup>, Diego R. Martínez<sup>3</sup>, Rafael Gómez<sup>1</sup> y Orelvis Portal<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto 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.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo. Villa Clara. Cuba. CP 53 000.

<sup>3</sup>Universidad de Antioquia, Laboratorio de Biología Molecular de Plantas. Medellín, Colombia. e-mail: [luis@ibp.co.cu](mailto:luis@ibp.co.cu)

## RESUMEN

La técnica de AFLP está basada en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción a partir de una digestión total del ADN genómico. Los fragmentos se amplifican por PCR y posteriormente se detectan en un gel de poliacrilamida desnaturalizante. La efectividad de esta técnica se basa en las variaciones genéticas que existen entre especies, variedades o cultivares estrechamente relacionados. En el laboratorio de Biología Molecular del IBP se han realizado diferentes análisis con este tipo de marcadores, ya que tienen una alta reproducibilidad y generan un gran número de fragmentos por muestra. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos con el empleo de la técnica AFLP, para la caracterización molecular de tres cultivos, en los cuales se persiguen objetivos diferentes. Se realizó un estudio de estabilidad genética en plantas de cultivar 'Navolean' (*Musa* AAB), que fueron propagadas por diferentes métodos biotecnológicos. Además se caracterizaron mutantes de caña de azúcar, obtenidos a partir de una variedad susceptible a la roya de la caña de azúcar, los cuales se seleccionaron en campo por su resistencia a la enfermedad y fenotipo similar a la variedad original. Finalmente se realizó la caracterización molecular de variedades del cultivo *Stevia rebaudiana*, de diferentes localidades en el distrito de Antioquia en Colombia. En el cultivar 'Navolean' (*Musa* AAB), se obtuvieron dos bandas diferenciales para un 0.66 % de polimorfismo, esta estabilidad molecular se corrobora con los resultados obtenidos en las evaluaciones en campo. En el estudio de los somaclones de caña de azúcar se obtuvieron trece bandas polimórficas para un 1.85 % de polimorfismo, estas bandas encontradas pudieran estar relacionadas con la resistencia a la enfermedad aunque no es concluyente pues en el proceso de mutagénesis pueden ocurrir otros cambios genéticos no relacionados con el problema planteado. Finalmente en el cultivo de *Stevia rebaudiana* se encontraron 167 marcadores polimórficos para un 43.6 % indicando una alta diversidad genética. Los datos obtenidos para cada cultivo se analizaron con el programa NTSys pc2.02.

Palabras clave: Caña de azúcar, *Musa*, PCR, *Stevia rebaudiana*

## USE OF AFLP MARKERS FOR THE MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DIFFERENT CULTURES WITH AGRICULTURAL INTEREST

### ABSTRACT

The AFLP technique is based on the selective restriction fragment amplification from a total digestion of the genomic DNA. The fragments are amplified by PCR and later detected in a denaturant polyacrylamide gel. The effectiveness of this technique is based on the genetic variations that exist between species, varieties or cultures closely related. In our laboratory it has been made different analysis with this kind of markers since they have a high reproducibility and generate a great number of fragments by sample. In this work are shown the results obtained with the use of AFLP technique, for the molecular characterization of three cultures, in which different objectives are followed. It was made a genetic stability study in 'Navolean' (*Musa* AAB), that were propagated by different biotechnological methods. In addition sugar cane mutants were characterized, obtained from a rust susceptible sugar cane variety, which were selected in field by their disease resistance and similar phenotype to the original variety. Finally it was made the molecular characterization of *Stevia rebaudiana* varieties from different locations in Antioquia district in Colombia. In the 'Navolean' cultivate (*Musa* AAB) two differential bands were obtained for a 0.66 % of polymorphism, this molecular stability is corroborated with the results obtained from field evaluations. Thirteen polymorphic bands were obtained in the study of sugar cane somaclons for a 1.85 % of polymorphism, these bands could be related with the disease resistance although is not conclusive because in the mutagenic process another genetic changes can happen not related with the problem. Finally in *Stevia rebaudiana* culture 167

polymorphic markers were found for a 43.6 % indicating a high genetic diversity. The data collected for each culture were analyzed with the NTsys program pc2.02.

Key words: *Musa*, PCR, *Stevia rebaudiana*, Sugar cane

# LA TRANSICIÓN FLORAL EN PLÁTANO *MUSA* (AAB) CV. HARTÓN ENANO: GENÉTICA Y ONTOGENIA

Hernández, Yvo<sup>1\*</sup>, Carlos Giménez<sup>2</sup> y Miguel Gómez Lim<sup>3</sup>. \*Autor para correspondencia.

1.-Universidad Nacional Experimental Sur del Lago. 2.-Facultad Experimental de Ciencias de La Universidad del Zulia. 3.- Dpto. Ingeniería Genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. México. yvo333@hotmail.com

## RESUMEN

Con el propósito de establecer el tiempo y momento fenológico de la transición floral en *Musa* (AAB) cv. Plátano Hartón enano y caracterizar secuencias de genes que regulan este proceso, se realizó un ensayo en el INIA Chama, (LN: 8°43'27" y LW:71°44'33). Para ello se tomaron ápices meristemáticos provenientes de cormos de plantas cuya emisión foliar total se encontraran entre las 15 y 36 hojas, esto con el propósito de tomar ápices en estado de transición floral (aproximadamente en hoja 20). Los ápices fueron seccionados longitudinalmente a la mitad, donde una parte fue observada a través del microscopio óptico y electrónico de barrido y la otra mitad fue utilizada para la búsqueda de genes que regulan el proceso de floración en este cultivo. La transición floral se observó en un 60% en plantas que habían emitido un total de 27 hojas, pero fue a partir de la hoja 30, donde se observó entre un 80 y 100 %. La altura y perímetro de estas plantas en transición fue de 142 y 30 cm respectivamente. La altura del ápice meristemático, se incrementó desde la hoja número 15 y hasta la hoja 27, en 0.25 mm, respecto al plano de inserción de la tercera axila de los primordios foliares con respecto al domo apical meristemático, mientras que la longitud de la base del ápice meristemático disminuyó de 3.5 a 1.64 mm. Los genes encontrados relacionados con transición floral fueron: "GIMUS" 1, 2, 3, 4 y 5, homólogos del gen *GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE* (GAI) en *Arabidopsis*, "MUSAFLT" 1, 2 y 3, homólogos del gen *FLOWERING LOCUS T* (FLT) en *Arabidopsis*, MUSACO, homólogo del gen *CONSTAN* (CO) en *Arabidopsis*, MUSDELLA homólogo de *DELLA* y MUSGAMYB homólogo de *GAMYB*, ambos en *Arabidopsis*.

Palabras clave: *Arabidopsis*, Genes, *Musa*, Transición floral

## THE FLORAL TRANSITION IN PLANTAIN *MUSA* AAB CV HORN DRAFT: GENETIC AND ONTOGENY

### ABSTRACT

In *Musa* a mayor problem for somatic embryogenesis is the estimation of flower transition. In some species, the timing of flowering is primarily influenced by environmental factors, photoperiod, light quality and quantity, vernalization, and nutrient and water availability. Other species like bananas and plantains are less sensitive to environmental variables and appear to flower in response to internal cues such as plant size or number of vegetative nodes. In *Musa*, the number of leaves is a critical factor to flowering. Decapitated plants with less than 10 leaves return to initial state at first leaf emitted, after that the flowering process is irreversible. Genetic analysis of flowering time in pea, cereals, and *Arabidopsis* supports the hypothesis that the transition to flowering is under multifactorial control. These genetic and molecular studies have revealed an evolutionarily conserved network. Comparative gene expression studies between the families Brassicaceae (*Arabidopsis*), Scrophulariaceae (*Antirrhinum*) and Solanaceae (*Petunia*) indicate strong conservation of floral developmental gene functions across broad taxonomic levels. In *Musa*, no information about flower genes have been reported. Based on conserved motif of *FLT*, *CO* and *GAI*, of flowering time genes of rice and *Arabidopsis*, our group designed degenerated

primers using CODEHOP software. Based on theoretical size, we cloned, and sequenced PCR fragments amplified with degenerated primers. Sequence analysis with ClustalW show three different *FLT*, five *GAI* and one *CO* sequences. Genes *CO*, *GAI* and *FLT* have 59, 69 and 83% of identical amino acid respectively to orthologues in *Oryza*. We are working for sequencing additional genes like *GAMBy*, *GA3ox*, *GA20ox*, *DELLA* to perform expression analyses of these analogues with real time PCR, in *Musa* shoot tips at different vegetative and floral stages.

Key words: Arabidopsis, Flower transition, Gene, *MUSA*.



# IMPROVED METHOD FOR ISOLATION OF HIGH-QUALITY TOTAL RNA FROM FILAMENTOUS FUNGI

Aminael Sánchez<sup>1,\*</sup>, Orelvis Portal<sup>1</sup>, Bárbara Ocaña<sup>1</sup> and Milady Menadoza<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Institute of Plants Biotechnology. Central University of 'Las Villas', 54830 Cuba. e-mail: [aminael@uclv.edu.cu](mailto:aminael@uclv.edu.cu)

## ABSTRACT

RNA isolation is a prerequisite to the study of gene expression at the molecular level and has an increasingly important role in investigations about plant-fungal pathogens interactions. However, RNA isolation is difficult in filamentous fungi, those organisms are notorious for their rigid cell walls and the presence of high levels of carbohydrates excreted from the fungal cells during submerged growth that interferes with the extraction procedures. Although many commercial kits for this purpose are already available, the obtained results do not provides in the majority of the cases enough amount of RNA to be used in upstream applications. In the present work we present an easy and efficient protocol for isolating total RNA from filamentous fungi, specifically we report its use for *Mycosphaerella fijiensis* and *Cladosporium fulvum*. The protocol was developed based on the SDS method with modifications including and additional washing step of the material before the extraction for the removal of proteins, polyphenols and the excess of carbohydrates. The protocol results in high-quality RNA suitable for all kinds of further molecular studies.

Key words: RNA isolation, filamentous fungi, carbohydrates

# LARGE-SCALE IDENTIFICATION OF ESTS FROM *NICOTIANA TABACUM*

Sandra Pérez Alvarez<sup>1\*</sup>, Hai-Tao Dong<sup>2</sup>, Daniel Cabezas Montero<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Agrarian University of Havana, Carretera Tapaste, Km 23 ½, Autopista Nacional, San Jose de las Lajas, Habana, Cuba. e-mail: [sandra05@isch.edu.cu](mailto:sandra05@isch.edu.cu)

<sup>2</sup>Bioinformatics and gene network research group, Zhejiang University, Hangzhou, 310029, China.

## ABSTRACT

Over 5000 expressed sequence tags (ESTs) were generated from the 3' ends of 8000 clones selected from one cDNA library representing a range of plant organs (leaf, stem, root and root base), analyzed by BLAST searches and they were functionally categorized. All annotation ESTs were classified in 18 functional categories, unique transcripts involved in energy were largest group accounting for 831 (32.32%) in all annotation ESTs. After excluding 2450 non-significant TUTs in sequence similarity, 100 unique sequences (1.67% in total TUTs) were identified from *N. tabacum* database. To identify genes among of 5927 clones the amplified cDNAs were arrayed and hybridized. After comparing the hybridization data 359 high quality ESTs from four tobacco varieties were generated and analyzed using the Cyber-T statistic program. In the array result two EST strongly related to tobacco mosaic virus (TMV) were obtained, basic form of pathogenesis-related protein 1 precursor (TBT012G08) and ubiquitin (TBT087G01) both of them were found in the variety Hongda, some others important ESTs were grouped into two group related with plant development like those EST related with a photosynthetic process (Chlorophyll a-b binding protein, Photosystem I and ATP synthase) and the other group that include ESTs related with plant stress response (Ubiquitin, Ubiquitin SMT3 and Glycine-rich RNA binding protein). The interesting finding in this study is that the Ubiquitin SMT3 has never been reported in tobacco plants before.

Key words: Expressed sequence tag (ESTs); microarray; Tobacco mosaic virus (TMV)

Palabras clave: microarreglo, Secuencias marcadas expresadas (ESTs), Virus del mosaico del tabaco

# THE USE OF CDNA MICROARRAY TECNOLOGY TO MONITORING MRNA IN DIFFERENT RICE (*ORYZA SATIVA*) TISSUES

D. Cabezas<sup>1\*</sup>, Sandra Perez<sup>1</sup>, D. Haitao<sup>2</sup> and L. Debao<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Universidad Agraria de La Habana, Carretera Tapaste, km 23 ½, Autopista Nacional, San José de las Lajas, Habana, Cuba. e-mail: [cabezas@isch.edu.cu](mailto:cabezas@isch.edu.cu)

<sup>2</sup>Bioinformatics and gene network research group, Zhejiang University, Hangzhou, 310029, China

## ABSTRACT

To identify specific tissues expressed in genes, 1330 unigenes from rice endosperm cDNA library were used for detecting mRNA expression levels in rice roots, stems and leaves. Hybridization results show that the isolated 1330 unigenes are mainly endosperm-specific cDNA in rice. Also, in a cDNA clone H012d03, a strong expression EST (Expression Sequence Tag) was detected in leaves. This gene can be slightly expressed in rice stem tissues, but not any hybridized signal could be monitored in root tissues. Northern blot showed that the clone H012d03 was intensively expressed in leaf tissues, moderate fully in stem tissues of different physiological stages (water treatment and ABA treatment), and tenuously in root tissues. Additionally, no expression was found in embryo, coleoptile and radicle tissues during rice seed germination, which showed that the gene might be associated with photosynthesis or light induction. The electronic PCR was carried out in order to obtain a full length of the clone H012d03. The clone was located inside a pair of 23S rRNA. This result shows for the first time, that a pair of intron genes was involved in rice structural genes 23S rRNA and they can be transcribed inside mRNA which has a polyA tail.

Key words: cDNA microarray; repeated intron gene; rRNA; tissue-specific expression

Palabras clave: ADNc microarreglo; ARNr; Gen intron repetido; Expresión tejido-especifico



# CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS

## **CONSERVACIÓN DE ESPECIES ENDÉMICAS DE LA FAMILIA CACTACEAE. III: MAMMILLARIA PROLIFERA L.**

Yamila Rosales Simonot\* ; Argelio Pifferrer Escalona; Luis Enrique Rodríguez de Francisco; Rayma Cantillo Ardeból; Yerina Santiago Bardón; Janet Igarza Castro. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. CITMA. Holguín. Jardín Botánico en Carretera a Mayabe. Teléfono: 425342. e-mail. [yamila@cbv.holguin.inf.cu](mailto:yamila@cbv.holguin.inf.cu)

### **RESUMEN**

La familia de las cactáceas esta catalogada como una de las más seriamente amenazadas con la extinción. Cuba cuenta con varias especies incluidas en esta categoría. *Mammillaria prolifera* L., es la única especie endémica de este género, categorizada como estado crítico por la colecta desmedida de los coleccionistas. En el presente trabajo se describen los riesgos que amenazan a la especie en nuestra provincia, así como la metodología desarrollada para la conservación de semillas. Se realizan diferentes estudios para conservar las semillas y de su comportamiento durante la conservación respecto a la desinfección, a la capacidad germinativa de las semillas, a la ruptura de la dormancia o latencia, y estudios sobre la longevidad de las semillas conservadas, comparando la germinación entre semillas conservadas y sin conservar, así como la adaptación de las plantas germinadas *in vitro* y su posterior reincorporación a la colección de plantas vivas del Jardín Botánico de Holguín.

Palabras clave: Conservación de semillas, desinfección, dormancia, germinación, cactáceas

## **SEEDS CONSERVATION OF AN ENDEMIC SPECIE OF CACTACEAE. III: MAMMILLARIA PROLIFERA L.**

### **ABSTRACT**

The *Cactaceae* family is catalogued as one of the most seriously threatened of extinction. Cuba has some species included in this category. *Mammillaria prolifera* L. is the only endemic specie of this genera in Cuba, and is categorized in critical stage in danger of extinction because of the excessive collecting of the collectionists people. In this work we describe the risk which endangered the specie in our province, and the developed methodology for seeds conservation. We realized different studies for seeds conservation and their behaviour during conservation process, such as disinfection, seeds germinative capacity, dormancy breakdown and conserved seeds longevity, comparing the conserved and not conserved seeds germination power, and the acclimatization of *in vitro* seeds germinated and their introduction in the alive plants collection in the Botanical Garden of Holguín.

Keywords: Seeds conservation, disinfection, dormancy, germination, *Cactaceae*

## **CONSERVACIÓN DE ESPECIES ENDÉMICAS DE LA FAMILIA CACTACEAE. IV: *OPUNTIA MILITARIS* BRITT**

Yamila Rosales Simonot;\* Argelio Pifferrer Escalona; Luis Enrique Rodríguez de Francisco; Rayma Cantillo Ardeból; Yerina Santiago Bardón; Janet Igarza Castro. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. CITMA. Holguín. Jardín Botánico en Carretera a Mayabe. Teléfono: 425342. e-mail: [yamila@cbv.holguin.inf.cu](mailto:yamila@cbv.holguin.inf.cu)

### **RESUMEN**

La familia de las cactáceas esta catalogada como una de las más seriamente amenazadas con la extinción. Cuba cuenta con varias especies incluidas en esta categoría. *Opuntia militaris* Britt. es una especie endémica oriental, actualmente amenazada por la acción antropogénica en su hábitat natural. En el presente trabajo se describen los riesgos que amenazan a la especie en nuestra provincia, así como la metodología desarrollada para la conservación de semillas. Se realizan diferentes estudios para conservar las semillas y de su comportamiento durante la conservación respecto a la desinfección, a la capacidad germinativa de las semillas, a la ruptura de la dormancia o latencia, y estudios sobre la longevidad de las semillas conservadas, comparando la germinación entre semillas conservadas y sin conservar, así como la adaptación de las plantas germinadas *in vitro* y su posterior reincorporación a la colección de plantas vivas del Jardín Botánico de Holguín.

Palabras clave: conservación de semillas, desinfección, dormancia, germinación, cactáceas

## **SEEDS CONSERVATION OF AN ENDEMIC SPECIE OF CACTACEAE. IV: *OPUNTIA MILITARIS* BRITT**

### **ABSTRACT**

The *Cactaceae* family is catalogued as one of the most seriously threatened of extinction. Cuba has some species included in this category. *Opuntia militaris* Britt. Is an oriental endemic specie, actually threatened of extinction due to the anthropogenic action in its natural habits. In this work we describe the risk which endangered the specie in our province, and the developed methodology for seeds conservation. We realized different studies for seeds conservation and their behaviour during conservation process, such as disinfection, seeds germinative capacity, dormancy breakdown and conserved seeds longevity, comparing the conserved and not conserved seeds germination power, and the acclimatization of *in vitro* seeds germinated and their introduction in the alive plants collection in the Botanical Garden of Holguín.

Keywords: seeds conservation, disinfection, dormancy, germination, *Cactaceae*

# CONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE ESPECIES ENDÉMICAS DE LA FAMILIA CACTACEAE. I: *HARRISIA ERIOPHORA* PFEIFFER

Yamila Rosales Simonot\* ;Argelio Pifferrer Escalona; Luis Enrique Rodríguez de Francisco; Rayma Cantillo Ardeból; Yerina Santiago Bardón; Janet Igarza Castro. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. CITMA. Holguín. Jardín Botánico en Carretera a Mayabe. Teléfono: 425342. e-mail. [yamila@cbv.holguin.inf.cu](mailto:yamila@cbv.holguin.inf.cu)

## RESUMEN

La familia de las cactáceas esta catalogada como una de las más seriamente amenazadas con la extinción. (Hustenberger et al; 1992; SEDESOL, 1994). Cuba cuenta con varias especies incluidas en esta categoría. *Harrisia eriophora* Pfeiffer, es una especie endémica de este género. *Harrisia eriophora* (L.) Pfeiffer es una especie endémica representantes de su género en Cuba, la presencia de esta, unidas a otros endemismos dentro del Área protegida de Güirito-Punta de Mangle, es uno de los factores que hacen tan particular esta zona dentro de la Reserva Ecológica de Caletones, sin embargo, se pudo determinar, que las poblaciones de esta especie dentro de esta área poseen escasos individuos, los cuales se están perdiendo a causa de diversos factores bióticos y abióticos. En el presente trabajo se describen los riesgos que amenazan a la especie en nuestra provincia, así como la metodología desarrollada para la conservación de semillas. Se realizan diferentes estudios para conservar las semillas y de su comportamiento durante la conservación respecto a la desinfección, a la capacidad germinativa de las semillas, a la ruptura de la dormancia o latencia, y estudios sobre la longevidad de las semillas conservadas, comparando la germinación entre semillas conservadas y sin conservar, así como la adaptación de las plantas germinadas *in vitro* y su posterior reincorporación a la colección de plantas vivas del Jardín Botánico de Holguín.

Palabras clave: Conservación de semillas, desinfección, dormancia, germinación, cactáceas

## SEEDS CONSERVATION OF AN ENDEMIC SPECIE OF CACTACEAE. I: *HARRISIA ERIOPHORA* PFEIFFER

### ABSTRACT

The *Cactaceae* family is catalogued as one of the most seriously threatened of extinction. (Hustenberger et al; 1992; SEDESOL, 1994). Cuba has some species included in this category. *Harrisia eriophora* Pfeiffer is an endemic specie of this genera in Cuba. Its presence joined to the others endemisms in the Güirito-Punta de Mangle Protected Area is one of the factors which make this zone so particular in the Caletones Ecological Reserve, nevertheless, it is determinated that the population of this specie in these area has very scared plants which are losing because of some biotics and abiotics factors. In this work we describe the risk which endangered the specie in our province, and the developed methodology for seeds conservation. We realized different studies for seeds conservation and their behaviour during conservation process, such as disinfection, seeds germinative capacity, dormancy breakdown and conserved seeds longevity, comparing the conserved and not conserved seeds germination power, and the acclimatization of *in vitro* seeds germinated and their introduction in the alive plants collection in the Botanical Garden of Holguín.

Keywords: Seeds conservation, disinfection, dormancy, germination, *Cactaceae*

# CONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE ESPECIES ENDÉMICAS DE LA FAMILIA CACTACEAE. II: *MELOCACTUS HOLGUINENSIS ARECES*

Yamila Rosales Simonot;\* Argelio Pifferrer Escalona; Luis Enrique Rodríguez de Francisco; Rayma Cantillo Ardeból; Yerina Santiago Bardón; Janet Igarza Castro. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. CITMA. Holguín. Jardín Botánico en Carretera a Mayabe. Teléfono: 425342. e- mail: [yamila@cbv.holguin.inf.cu](mailto:yamila@cbv.holguin.inf.cu)

## RESUMEN

La familia de las cactáceas esta catalogada como una de las más seriamente amenazadas con la extinción. Cuba cuenta con varias especies incluidas en esta categoría. *Melocactus holguinensis Areces*, presenta una situación bastante dramática. Según un informe presentado en el Tercer Taller para la conservación, Análisis y Manejo planificado de Plantas Silvestres Cubanas CAMP III, reportan esta especie como incluida dentro del Libro Rojo Nacional con categoría P (peligro de extinción), en CITES categoría II, y se le ha asignado la categoría de estado crítico, por poseer poblaciones muy localizadas y reducidas, planteándose que sólo existen aproximadamente 118 individuos maduros. También se informa de la pérdida de sus ecosistemas naturales por la antropización y factores naturales como el fuego. Esta especie no cuenta con planes de manejo *ex situ*, que incluyan el cultivo *ex situ*, la recuperación del taxón, la introducción o reintroducción de individuos, el desarrollo de métodos para propagar el taxón, en fin, no existen medidas que contribuyan en el más mínimo grado a la conservación actual de estas especies en sus localidades de origen. En el presente trabajo se describen los riesgos que amenazan a la especie en nuestra provincia, así como la metodología desarrollada para la conservación de semillas. Se realizan diferentes estudios para conservar las semillas y de su comportamiento durante la conservación respecto a la desinfección, a la capacidad germinativa de las semillas, a la ruptura de la dormancia o latencia, y estudios sobre la longevidad de las semillas conservadas, comparando la germinación entre semillas conservadas y sin conservar, así como la adaptación de las plantas germinadas *in vitro* y su posterior reincorporación a la colección de plantas vivas del Jardín Botánico de Holguín.

Palabras clave: Conservación de semillas, desinfección, dormancia, germinación, cactáceas

## SEEDS CONSERVATION OF AN ENDEMIC SPECIE OF CACTACEAE. II: *MELOCACTUS HOLGUINENSIS ARECES*

### ABSTRACT

The *Cactaceae* family is catalogued as one of the most seriously threatened of extinction. Cuba have some species included in this category. *Melocactus holguinensis Areces*, presents a very dramatic situation. In The third Workshop for Conservation, Analysis and planified management of Cuban Wild plants CAMP III, report this specie included in the National Red Book as a critical stage in danger of extinction, in CITES II, and it posses very localized and reduced populations, with only 118 adults approximately. As where as they support the lose cause associated with the lost of its ecosystems because of the antropization and natural factors as fire. This specie have not *ex situ* management plans, which include the *ex situ* culture, the taxon rescued the introduction or reintroduction of individuals, the development of the taxon propagation methods, and do not exist alternatives which contributes at least grade of the actual conservation in their original localities. In this work we describe the risk which endangered the specie in our province, and the developed methodology for seeds conservation. We realized different studies for seeds conservation and their behaviour during conservation process, such as disinfection, seeds germinative capacity, dormancy breakdown and conserved seeds longevity, comparing the conserved and not conserved seeds germination power, and the acclimatization of *in vitro* seeds germinated and their introduction in the alive plants collection in the Botanical Garden of Holguín.

Keywords: Seeds conservation, disinfection, dormancy, germination, *Cactaceae*



# **EFFECTO DE LAS ULTRA-BAJAS TEMPERATURAS EN LAS MEMBRANAS CELULARES DEL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM* SPP.)**

Marcos Edel Martínez-Montero\*; Julia Martínez Rodríguez. \*Autor para correspondencia.

Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Avila, Carretera a Morón km 10, CP69450,  
email: [marcosem@bioplantass.cu](mailto:marcosem@bioplantass.cu)

## **RESUMEN**

En años recientes se han revelado considerables avances en el uso de diferentes técnicas analíticas (biofísicas, bioquímicas, histo-citológicas y moleculares) como herramientas para mejorar los conocimientos sobre los efectos de la crioconservación en el material biológico en general. Sin embargo, la aplicación de éstas para los estudios de la crioconservación en el material vegetal es aún limitada, y en la mayoría de los casos se emplean técnicas costosas y complejas. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo general de estudiar los efectos de las ultra-bajas temperaturas en las membranas celulares del cultivo de la caña de azúcar. Para ello se utilizó callos con estructuras embriogénicas y cluster de embriones somáticos de caña de azúcar del cultivar CP52-43. Para determinar el estado fisiológico del material durante la crioconservación se utilizó una técnica conductimétrica. Como resultados y conclusiones importantes se determinaron los cambios en las membranas celulares durante la recuperación de callos con estructuras embriogénicas crioconservados por una metodología de deshidratación por enfriamiento lento. Se demostró que las ultra-bajas temperaturas provocaron cambios significativos en las membranas celulares de los callos crioconservados pero las mismas se repararon a los cinco días de la recuperación. Además, se estableció un procedimiento de microgoteo/vitrificación como estrategia para la crioconservación de embriones somáticos que incluyeron un pre-tratamiento de  $1.5 \text{ mol.L}^{-1}$  glicerol +  $0.3 \text{ mol.L}^{-1}$  sacarosa y deshidratación en PVS2 durante 20 minutos. De esta manera se recomienda extender el uso de la técnica conductimétrica de forma sistemática a los cultivos prioritarios en el Centro de Bioplantass para conocer el efecto de las ultra-bajas temperaturas en las membranas celulares durante el establecimiento de protocolos nuevos ó mejorados de crioconservación.

Palabras clave: crioconsevación, caña de azúcar, callos, embriones, conductimetría

## **ABSTRACT**

In recent years considerable advances in the use of different analytical techniques (biophysic, biochemical, histo-cytological and molecular) like tools have been revealed to improve the knowledge on the effects of the cryopreservation in the bacteriological agents in general. Nevertheless, the application of these for the studies of the cryopreservation in the vegetal material still is limited, and in most of the cases expensive and complex techniques are used. The present work was developed with the general mission to study the effects of the ultralow temperatures in cellular membranes of the culture of the sugar cane. For it it was used calluses with embryos structures and to cluster of sugar somatic cane embryos of cultivating Cp52-43. In order to determine the physiological state of the material during the cryopreservation a conductimetric technique was used. As important results and conclusions determined the changes in cellular membranes during the recovery of calluses with embriogénicas structures crioconservados by a methodology of dehydration by slow cooling. One demonstrated that the ultralow temperatures caused significant changes in cellular membranes of the cryopreserved calluses but the same ones were repaired to the five days of the recovery. In addition, a procedure of droplet/vitrification like strategy for the cryopreservation of somatic embryos settled down that included a pre-cure of  $1.5 \text{ mol.L}^{-1}$  glycerol +  $0.3 \text{ mol.L}^{-1}$  sucrose and dehydration in PVS2 during 20 minutes. This way is recommended to extend the use of the conductimétrica technique of systematic form to the high-priority cultures in the Bioplantass Center to know the effect the ultralow temperatures in cellular membranes during the establishment of new or improved protocols of cryopreservation.

Keywords: cryopreservation, sugarcane, callus, embryos, conductimetry

# EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL HÍBRIDO IBP 42-99 DE PAPAYA (CARICA PAPAYA L.)

Jorge Gallardo Colina\*, Rafael Gómez Kosky, Marisol Tejeda Fernández, Laisyn Posada Pérez, Idalia Herrera O'farril, Maritza Reyes Vega, Leyanis García Aguila, Borys Chong Pérez y Marisol Freire Seijo.

\* Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: [gallardo05@ibp.co.cu](mailto:gallardo05@ibp.co.cu). o [Jorge\\_gallardo2002@yahoo.es](mailto:Jorge_gallardo2002@yahoo.es)

## RESUMEN

Para obtener plantas transgénicas en cualquier especie vegetal es necesario contar con metodologías eficientes de transformación y regeneración de plantas por cultivo de tejidos. El principal objetivo fue desarrollar una metodología de embriogénesis somática en un híbrido de papaya a partir de segmentos de tallo de plantas *in vitro*. Como material vegetal se emplearon plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99. Para la formación de callos se utilizó el medio de cultivo Nitsch y Nitsch suplementado con 1.5 mg.l<sup>-1</sup> de AIA y 1.5 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP. Para obtener y multiplicar embriones somáticos se estudió el 2,4-D en diferentes concentraciones. Para la germinación de los embriones somáticos se estudiaron diferentes concentraciones de 6-BAP. Con el empleo del AIA combinado con 6-BAP se obtuvieron callos compactos, secos y nodulares a partir de las secciones de tallo de las plantas *in vitro*. Con las concentraciones de 5 y 10 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D se obtiene el mayor número de embriones somáticos a partir de los callos y cuando se elevó la concentración del regulador de crecimiento a 15 mg.l<sup>-1</sup> este valor disminuyó significativamente. Al emplear 5 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D en el medio de cultivo se lograron los mejores valores de multiplicación y el mayor porcentaje de embriones somáticos en etapa globular. Al utilizar concentraciones mayores del regulador de crecimiento disminuyó significativamente la multiplicación de los embriones somáticos aunque el 100% de los mismos se encontraba en etapa globular y con 2 mg.l<sup>-1</sup> aumentó significativamente el grado de diferenciación de los embriones. Se logró al 100% la germinación de los embriones somáticos en etapa de torpedo y cotiledonal al emplear 0.15 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP.

Palabras clave: callos, embriones somáticos, germinación, plantas *in vitro*

## ABSTRACT

By obtained transgenic plants in anything species is necessary to have efficient methodology of plants transformation and regeneration. The same objective was: to develop a methodology to propagation via somatic embryogenesis in papaya hybrid IBP 42-99 from slice stem of *in vitro* plants. As plant materials *in vitro* plants of papaya hybrid IBP 42-99 was used. For the callus formation was used as explants slice stem of 5.0 mm to long and the culture medium Nitsch and Nitsch 1969 with 1.5 mg.l<sup>-1</sup> of AIA, 1.5mg.l<sup>-1</sup> of 6-BAP was used. For obtained and multiplication somatic embryos the 2,4-D in different concentration was studied. For the germination of somatic embryos different concentration of 6-BAP was studied. When used AIA with 6-BAP compact, dry and nodular callus were obtained. With 5 and 10 mg.l<sup>-1</sup> of 2,4-D the major number of somatic embryos were obtained from callus, when the growth regulator was used in 15 mg.l<sup>-1</sup> these parameter diminished significantly. When used 5 mg.l<sup>-1</sup> of 2,4-D the best multiplication and the major percentage of somatic embryos in globular stage was achieved. To use 8 mg.l<sup>-1</sup> of the growth regulator diminished significantly the multiplication of the somatic embryos though 100 % of the same ones were in globular stage and when used 2 mg.l<sup>-1</sup> increased significantly the differentiation of the embryos. Was achieved 100 % the germination of the somatic embryos in torpedo and cotyledonal stage to the employed 0.15 mg.l<sup>-1</sup> of 6-BAP.

Keywords: callus, germination, *In vitro* plants, Somatic embryos

# EMBRIOGENESIS SOMÁTICA EN FRIJOL TEPARI (*PHASEOLUS ACUTIFOLIUS* A. GRAY CV. TB1)

Lourdes García Rodríguez<sup>\*1</sup>, Jorge Pérez Pérez<sup>2</sup>, Rafael Gómez Kosky<sup>1</sup>, Yenny Padrón Montesino<sup>1</sup>, Damaris Torres Rodríguez<sup>1</sup> y Carlos Romero Quintana<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara. Villa clara, Cuba CP 54830 e-mail: [lougr2003@yahoo.es](mailto:lougr2003@yahoo.es), [lourdes05@ibp.co.cu](mailto:lourdes05@ibp.co.cu)

<sup>2</sup>Universidad de Granma, Carretera a Manzanillo, km 17, Peralejo, Bayamo. CP 85100, Granma.

## RESUMEN

Las plantas del género *Phaseolus* spp. L. han presentado dificultades con la regeneración *in vitro*, no existiendo en la actualidad una metodología de regeneración vía embriogénesis somática eficiente y reproducible. Esta investigación se desarrolló en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas con el objetivo de lograr la regeneración de plantas de *Phaseolus acutifolius* cv. TB1 a partir de la embriogénesis somática con miras a utilizar dicho procedimiento en el mejoramiento genético del cultivo. Se estudiaron dos tipos de explantes: cotiledones y brotes de embriones cigóticos germinados *in vitro* y varias concentraciones de 2,4-D, AIA y TDZ en los medios de cultivo. Los explantes brotes de embriones cigóticos germinados *in vitro* mostraron la mayor capacidad para la formación de callos con estructuras embriogénicas cuando fueron colocados en un medio de cultivo compuesto por las sales MS, vitaminas Heinz y Mee, 2 % sacarosa y enriquecido con TDZ, y AIA. La luz solar con la intensidad y duración del fotoperíodo evaluado, resultó ser la más favorable para el desarrollo de las plantas *in vitro* alcanzándose un 14 % de embriones somáticos con germinación completa.

Palabras clave: embriones somáticos, formación de callos, regeneración *in vitro*, reguladores del crecimiento

## ABSTRACT

The plants of *Phaseolus* spp L. have presented difficulties with the *in vitro* regeneration, not existing a regeneration methodology via somatic embryogenesis efficient and reproducible at the present time. This investigation was developed in the Institute of Biotechnology of the Plants of the Central University "Marta Abreu" of Las Villas with the objective of achieving the regeneration of plants of *Phaseolus acutifolius* cv. TB1 to use it in the genetic breeding programmes. Two explantes types were studied: cotyledons and zygotic embryos shoots germinated *in vitro* and several concentrations of 2,4-D, AIA and TDZ in the culture medium. The explantes zygotic embryos shoot germinated *in vitro* showed the biggest capacity for the formation of calli with embryogenic structures when they were placed in a culture medium composed by the salts MS, vitamins Heinz and Mee (1969), 2% sucrose and supplemented with TDZ, and AIA. The solar light with the intensity and duration of the evaluated photoperiod, turned out to be the most favourable for the development of the *in vitro* plants being reached 14% of somatic embryos with complete germination.

Key words: calli formation, growth regulators, *in vitro* regeneration, somatic embryos

# FORMACIÓN DE BROTES POR CULTIVO IN VITRO DE *PENNISETUM PURPUREUM* CV CUBA CT-115

Llanes, L.Y.

Instituto de Ciencia Animal. Carretera Central, Km 47 <sup>1</sup>/<sub>2</sub>, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.  
Código Postal 32700, Apartado Postal 24. e-mail: [lyllanes@ica.co.cu](mailto:lyllanes@ica.co.cu)

## RESUMEN

El clon CT-115, perteneciente a la especie *Pennisetum purpureum*, ha sido ampliamente utilizado en la producción animal debido a su alta producción de biomasa en época de seca. Sin embargo, esta planta presenta el inconveniente de poseer una baja digestibilidad de materia seca en estados avanzados de su desarrollo lo que afecta negativamente sus índices productivos. Una forma de contrarrestar esta situación es obtener plantas mejoradas a través de la transformación genética de este carácter. Un requisito indispensable para emplear esta metodología es contar con un sistema eficiente de regeneración *in vitro* de *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-115. En este trabajo se estudió la posibilidad de establecer un sistema de regeneración *in vitro* para esta planta. Se partió de un sistema empleado en caña de azúcar que permite la obtención temprana de gran cantidad de brotes por callo. Como explantes se utilizaron discos de hojas inmaduras de la región apical. Los mismos se establecieron en medio MS en presencia del regulador ácido naftalén acético para la formación de callos. Transcurrida una semana, los explantes se transfirieron a medio MS suplementado con ácido indol acético y kinetina. Cuando se utilizaron altas concentraciones de ácido naftalén acético solo se produjeron raíces. Al disminuir la cantidad de esta auxina se logró, al cabo de las tres semanas, la regeneración de brotes vigorosos que dieron lugar a la formación de plantas. Aunque no se obtuvo un número considerable de brotes por explante, se demostró la posibilidad de obtener plantas a partir de la metodología empleada.

Palabras clave: CT-115, cultivo *in vitro*, formación de brotes, inducción de callos

## ABSTRACT

Clone CT-115, pertaining to the *Pennisetum purpureum* specie, has been used widely in the animal production due to its high production of biomass in the dry season. Nevertheless, this plant has the disadvantage of having a low digestibility of dry matter in advanced stages of its development which affects its productive indices negatively. A form to fight against this situation is to obtain plants improved through the genetic transformation of this character. An indispensable requirement to use this methodology is to have an efficient system of *in vitro* plant regeneration of *Pennisetum purpureum* cv Cuba CT-115. In this paper, the possibility of establishing an *in vitro* plant regeneration system for this plant was studied. We started from a system used in sugar cane that allows the early obtaining of large amount of shoots by callus. As explants, discs of immature leaves of the apical region were used. They were established on MS medium in the presence of naphthalene acetic acid regulator for the formation of calluses. After one week, the explants were transferred to MS medium supplemented with indol acetic acid and kinetin. When high concentrations of naphthalene acetic acid were used, there was production of roots only. By decreasing the amount of auxin, the regeneration of the vigorous shoots was achieved after three weeks, producing the formation of plants. Although a considerable number of shoots was not obtained by explant, the possibility of obtaining plants from the methodology used was proved.

Key words: callus induction, CT-115, *in vitro* culture, shoots formation

# FORMACIÓN DE CALLOS EN *PHASEOLUS VULGARIS* L CV. TURRIALBA- 4 CON THIDIAZURON Y ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Jorge Pérez Pérez<sup>\*1</sup>, Lourdes García Rodríguez<sup>2</sup>, Rafael Gómez Kosky<sup>2</sup>, Idalmis Bermúdez Caraballoso<sup>2</sup>, Yenis Padrón Montesino<sup>2</sup>, Damaris Torres Rodríguez<sup>2</sup> y Carlos Romero Quintana<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Universidad de Granma, Carretera a Manzanillo, km 17, Peralejo, Bayamo. CP 85100, Granma. e-mail: [jorge.perez@udg.co.cu](mailto:jorge.perez@udg.co.cu)

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

## RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) juega un rol importante en la sostenibilidad de la agricultura y en el suplemento proteico en los países en desarrollo. En esta especie se ha intentado establecer un procedimiento eficiente de regeneración *in vitro* y transformación genética en algunas variedades. Sin embargo, los resultados obtenidos en la embriogénesis somática no han sido exitosos. Este trabajo tuvo como objetivo lograr la formación de callos con estructuras embriogénicas en *Phaseolus vulgaris* L. cv. Turrialba-4 con empleo de los reguladores del crecimiento Thidiazurón (TDZ) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Se utilizaron como explantes cotiledones de semillas maduras germinadas *in vitro* en medio de cultivo con las sales MS. En los medios de cultivo que contenían 2,4-D se obtuvieron callos voluminosos y no compactos, mientras que los formados en los medios de cultivo que contenían TDZ (0.20 mg.l<sup>-1</sup>) eran menos voluminosos, compactos y con formación de estructuras embriogénicas.

Palabras clave: estructuras embriogénicas, medio de cultivo, reguladores del crecimiento

## CALLUS FORMATION FROM *PHASEOLUS VULGARIS* L CV. TURRIALBA- 4 WITH THIDIAZURON AND 2,4-DICHLOROPHENOXIACETICO ACID USE

## ABSTRACT

Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) play a crucial role in the sustainability of agricultural systems and in food protein supply in developing countries. In this species it has been tried to establish an efficient procedure of *in vitro* regeneration and genetic transformation in some varieties. However, the results obtained in the somatic embryogenesis have not been successful. This work had like objective to obtain callus formation with embryogenic structure in *Phaseolus vulgaris* L. cv. Turrialba-4 with growth regulators Thidiazuron (TDZ) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Mature cotyledon explants germinated *in vitro* seeds in culture medium with salts MS. In the culture medium with 2,4-D obtained voluminous and non compact callus, whereas the formed in the culture medium that contained TDZ were less voluminous, compact and with formation of embryogenic structures to 0.20 mg.l<sup>-1</sup>.

Key words: culture medium, embryogenic structures, growth regulator

# MULTIPLICACIÓN DE ATRAPAMOSCAS DE VENUS (*DIONAEA MUSCIPULA* ELLIS)

Jorge A. Vilchez. P<sup>1.\*</sup>, Nilca R. Albany V<sup>1</sup>. y Orlek Ferrer<sup>1</sup>, Leyanis García<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Lab. De Cultivo de Tejidos. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia. AP 15205. Maracaibo, Edo. Zulia. (4005ZU), Republica Bolivariana de Venezuela. Telf: 58-261-7597140. e-mail: [jvilchezp@luz.edu.ve](mailto:jvilchezp@luz.edu.ve)

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV). Carretera a Camajuní Km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba CP 54830. Fax: 53-422-81329. e-mail: [leyanis02@yahoo.es](mailto:leyanis02@yahoo.es)

## RESUMEN

La *Dionea muscipula* Ellis, sin duda es la de mayor importancia de las plantas carnívoras por ser activa y muy atractiva, aunado a las recientes investigaciones en el campo de la medicina por las posibilidades de uso en el tratamiento contra el cáncer. La obtención y multiplicación de esta especie se encuentra limitada por la rápida pérdida de la viabilidad de sus semillas. Con la finalidad de evaluar la fase de multiplicación (FM) se estudió el efecto de tres concentraciones (0.25; 0.5 y 1 mg L<sup>-1</sup>) de kinetina (K) y un control sin regulador sobre el coeficiente de multiplicación y altura del brote (CM y AB, respectivamente). Así como el efecto del estado físico del medio de cultivo (sólido, líquido en agitación y en sistema de inmersión temporal (SIT)) sobre el CM y la AB. En la FM, después de 8 semanas de cultivo los análisis estadísticos sólo mostraron diferencias para el CM (11.5) con la aplicación de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de K. Se logró un CM de 22.3 en SIT y la mayor AB en medio de cultivo líquido en agitación.

Palabras clave: *Dionaea muscipula* Ellis, Kinetina, plantas insectívoras, RITA, sistema de inmersión temporal

## VENUS FLY TRAP (*DIONAEA MUSCIPULA* ELLIS) MULTIPLICATION

### ABSTRACT

The *Dionea muscipula* Ellis is the most important carnivorous plants due to its activity and attractiveness, besides its usages in medicine as treatment against cancer. The obtaining and multiplication of this species is limited by the quick lack of seed viability. The effect of four concentration of Kinetin (K) (0, 0.25; 0.5 and 1 mg) and three physical stage of culture media [solid, liquid in agitation, temporal immersion system (TIS)] on the coefficient of multiplication (CM) and height of the shoot (HS) were studied to evaluate the multiplication phase (MP). There was significant difference for CM (11.5) when 0.5 mg L<sup>-1</sup> of K after 8 weeks of culture. A CM value of 22.3 was obtained in the TIS and the large HS was obtained using the liquid media with agitation.

Keywords: *Dionaea muscipula* Ellis, insectivorous plant, kinetin, RITA®, temporary immersion system

# REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *STEVIA REBAUDIANA* MEDIANTE ORGANOGÉNESIS DIRECTA A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES

Martínez R. Diego<sup>\*1</sup>, Monsalve F Zulma<sup>1</sup>, Urrea Aura I<sup>1</sup>, Jiménez G. Elio<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Universidad de Antioquia, Laboratorio de Biología Molecular de Plantas. Medellín- Colombia. e-mail: [drivilla2001@yahoo.es](mailto:drivilla2001@yahoo.es)

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

## RESUMEN

*Stevia rebaudiana* Bert es una planta perteneciente a la familia *Asteraceae*, nativa del Paraguay, también conocida como "hierba dulce", "hoja de miel" o simplemente *Stevia*, cultivada en diferentes países alrededor del mundo. Produce en sus hojas varios edulcorantes de alta potencia y bajos en calorías que pueden ser entre 30 y 320 veces más dulces que el azúcar sin efectos secundarios de riesgo para humanos, haciendo de esta planta una especie de gran valor económico en el mercado mundial de los edulcorantes y endulzantes naturales. La regeneración de plántulas mediante organogénesis o embriogénesis somática indirecta a partir de explantes foliares ha sido descrita anteriormente en esta especie. Sin embargo, no existen antecedentes de regeneración directa en *Stevia rebaudiana*. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo para la regeneración de plántulas mediante organogénesis directa a partir de segmentos foliares de plántulas cultivadas *in vitro*, el cual pudiera ser empleado en los programas de transformación genética de *Stevia rebaudiana*. Los explantes fueron cultivados en medio Murashige y Skoog (MS) con diferentes concentraciones de bencil amino-purina (BAP 0 – 2.5 mg/L) sola y en combinación con ácido indol-acético (IAA 0, 0.5 y 1.0 mg/L). La adición de BAP en una concentración de 2.5 mg/L al medio de cultivo MS fue suficiente para inducir una organogénesis directa, con porcentaje de regeneración de 65% y promedio 5.5 brotes/explante. La posterior elongación y propagación de los brotes formados se logró en medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento y 30 g/L de sacarosa. No se observaron cambios en el fenotipo de las plántulas regeneradas.

Palabras clave: bencil amino-purina, edulcorantes, cultivo *in vitro*, esteviósidos

## PLANT REGENERATION OF *STEVIA REBAUDIANA* FROM LEAVES EXPLANTS BY DIRECT ORGANOGENESIS

### ABSTRACT

*Stevia rebaudiana* Bert (*Asteraceae*) is a perennial herb, native from Paraguay also well-known like "grass sweet", "leaf of honey" or simply *Stevia*, cultivated in different countries around the world. It produces in his leaves several low sweeteners of high power and low calories that can be between 30 and 320 times sweeter than sugar without indirect effect of risk for humans, it does of this plant a species of great economic value to world market of switeners and natural edulcorants. Plant regeneration in *Stevia rebaudiana* from leaves explants has been obtained previously by indirect organogenesis, from callus phase or by somatic embryogenesis using different growth regulators. Our aim was to establish a protocol for plants regeneration from leaves explants in order to used this system in genetic transformation of *Stevia rebaudiana*. An efficient method for plant regeneration in *Stevia* by direct organogenesis was established using leaves segments of plants cultivated *in vitro* conditions. Leaves were cultivated in Murashige and Skoog (MS) media with different bencil amino-purine (BAP) concentrations (0 – 2.5 mg/L) alone or in combination with indol-acetic acid (IAA 0, 0.5 and 1.0 mg/L). Addition of 2.5 mg/L BAP to MS medium was able to induce a direct organogenesis, regeneration was 65% and an average of 5.5 shoots per explant. Elongation and propagation of shoots was achieved in MS media without growth regulators and 30 g/L of sucrose. Appreciable changes in the phenotype of regenerated plantlets were not observed.

Key words: bencil amino-purine, edulcorants, *in vitro* culture, steviosids

# ALTERNATIVA DE SUSTITUCIÓN DE LA KINETINA POR EL BRASINOESTEROIDE BB-6 EN EL ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE LA PAPAYA (*CARICA PAPAYA* L., CV. MARADOL ROJA)

## KINETINA SUBSTITUTE ALTERNATIVE FOR BB-6 BRASINOESTEROIDE IN PAPAYA (*CARICA PAPAYA* L., CV. MARADOL ROJA) *IN VITRO* ESTABLISHMENT AND GROWTH

Ariannys Roque López<sup>1\*</sup>, Miriam Núñez Hernández<sup>2</sup>, Eduardo Héctor Ardisana<sup>3</sup>, Miriam Isidró Pérez<sup>3</sup>, Antonio Torres García<sup>3</sup>, Solvig Rodríguez Troche<sup>3</sup>, Lianette Godoy del Pozo<sup>4</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro Universitario de Las Tunas. Ave. Carlos J. Finlay s/n. Las Tunas. Cuba. [ariannys@isch.edu.cu](mailto:ariannys@isch.edu.cu)

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas

<sup>3</sup>Universidad Agraria de La Habana.

<sup>4</sup>Instituto de Normalización.

### RESUMEN

En el presente trabajo se tomaron segmentos nodales de plantas jóvenes de papaya (*Carica papaya* L.)cv. Maradol Roja para el establecimiento y multiplicación *in vitro*. El medio de cultivo empleado fue el MS modificado (Roque *et al.*, 2001) suplementado con 30.0 g. L<sup>-1</sup> de sacarosa. Como soporte se empleó en el establecimiento papel de filtro y en la multiplicación Agar (7.0 g. L<sup>-1</sup>). Para sustituir la mitad y la totalidad de las concentraciones de kinetina empleadas en la metodología propuesta por Roque *et al.* (2001) se empleó 0.02 y 0.1 μmol.L<sup>-1</sup> de BB-6, según lo recomendado por Rodríguez (1999) en el cultivo *in vitro* del plátano (*Musa sp.*), y la combinación de estas concentraciones con 1.1 μmol.L<sup>-1</sup> de kinetina en el establecimiento y multiplicación. En esta última etapa se añadió además 2.88 μmol.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. Se realizaron evaluaciones en el comportamiento de la morfogénesis *in vitro*. Los datos se procesaron por un ANOVA con ayuda del paquete estadístico STATGRAPHIC. Los resultados muestran que es posible sustituir totalmente la kinetina por el brasinoesteroide BB-6.

Palabras clave: brasinoesteroide, *in vitro*, papaya



# CRIOCONSERVACIÓN DEL HÍBRIDO IBP 99-42 DE PAPAYA

Karel Ismar Acosta<sup>2</sup>, Leyanis García Águila<sup>1\*</sup>, Rafael Gómez Kosky, <sup>1</sup>Laisyn Posada, <sup>1</sup>Jorge Gallardo, <sup>1</sup>Marisol Tejeda, <sup>1</sup>Yelenys Alvarado y <sup>1</sup>Marisol Freire. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>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: [leyanis02@yahoo.es](mailto:leyanis02@yahoo.es)

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Centro Universitario Vladimir I Lenin. Las Tunas. Cuba. CP. e-mail: [karelap@ult.edu.cu](mailto:karelap@ult.edu.cu)

## RESUMEN

La conservación de genotipos híbridos de papaya (*Carica papaya* L.) es muy importante para los programas de mejora genética y la propagación de plantas. Con el objetivo de conservar el híbrido de papaya IBP 99-42 se desarrolló un protocolo de crioconservación de ápices de plantas *in vitro*. Para ello, se precultivaron las plantas donantes durante 14 días en 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y se extrajeron ápices de 2.0 mm longitud con la presencia de dos a tres primordios foliares. La solución vitrificadora PVS2 propició mejor deshidratación de los ápices en un tiempo de inmersión de 40 minutos previo a la inmersión en nitrógeno líquido (NL). La recuperación de los ápices después de 10 días en NL fue posible con la descongelación a 40°C y la incorporación a las condiciones normales de crecimiento en medio de cultivo de multiplicación. A los 90 días el número de brotes por planta fue similar a las plantas no crioconservadas.

Palabras clave: ápices crioconservados, PVS2, recuperación, papaya

# EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE 6-BAP Y TIPO DE EXPLANTE EN LA MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *HYLOCEREUS PURPUSII*

Daniel Rojas Bravo<sup>2\*</sup>, Manuel de Faria Silva<sup>1</sup>, Mireya Reyna Villela<sup>2</sup>, Elisa Quiala Mendoza<sup>1</sup>, Maité Chávez Milian<sup>1</sup>, Alberto Taylor Preciado<sup>2</sup>, Domingo Ruvalcaba Ruiz<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115. C.P. 47820, Ocotlán, Jalisco, México. e-mail: [drojas@cuci.udg.mx](mailto:drojas@cuci.udg.mx)

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de cuatro concentraciones de 6-BAP y dos tipos de explantes en la multiplicación *in vitro* de Pitahaya púrpura. Como material vegetal se emplearon brotes con dos subcultivos en fase de multiplicación y una longitud aproximada de 5.0 centímetros, los cuales fueron seccionados de manera transversal por la mitad para obtener un explante que fue denominado ápice y otro como base. Ambas secciones fueron combinadas con cuatro concentraciones de 6-BAP (0.0, 2.22, 4.44, 6.66  $\mu\text{M.l}^{-1}$ ) y se evaluó cada seis días y hasta los 60 días de cultivo la aparición de brotes en cada uno de los ocho tratamientos. Se observó que independientemente al tipo de explante, a medida que se incrementó la concentración de 6-BAP, se produjo un mayor número de brotes. Sin embargo, en los explantes considerados como ápices se logró que casi la totalidad de las yemas axilares localizadas en las areolas de los brotes se diferenciaron y como promedio en este tipo de explante se produjo 3.48 brotes más que en los explantes considerados como bases, en los cuales, fundamentalmente se activaron las yemas axilares que se encontraban en la zona del explante que estaba en contacto con el medio de cultivo. Como mejor concentración de 6-BAP se seleccionó la de 4.44  $\mu\text{M.l}^{-1}$ , ya que permitió utilizar tanto los explantes considerados como ápice o base, al no existir diferencias estadísticas en cuanto al número de brotes que se obtuvieron (9.15 por 8.8 respectivamente). Sin embargo, si bien es cierto que con 6.66  $\mu\text{M.l}^{-1}$  de 6-BAP se alcanzaron los mayores valores en cuanto al número de brotes para ambos tipos de explantes (23 en los ápices y 12.6 en las bases), también se observó que en este tratamiento se produjeron brotes a partir de yemas adventicias y se apreció la formación de callos en algunos explantes, además, los brotes que se formaron apenas se desarrollaron, lo cual hizo más difícil su manejo *in vitro* al momento de realizar los subcultivos.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, reguladores del crecimiento, pitahaya

Key words: growth regulators, multiplication rate, pitahaya

# **EFFECTO DE LAS AUXINAS Y CITOQUININAS SOBRE EXPLANTES NODALES E INTERNODALES EN LA CALLÓGENESIS DE *TROPAEOLUM TUBEROSUM* (R. AND P.) “MASHUA”**

Sánchez, DF\*, Huamaní K, Pascual E, Rodríguez I, Sánchez H, Estrada R. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. e-mail: [Dfavo666@hotmail.com](mailto:Dfavo666@hotmail.com)

## **RESUMEN**

La mashua es una planta herbácea, forma tubérculos y es parte de la alimentación en ciertas poblaciones altoandinas rurales. Presentan propiedades medicinales, antibacteriales, insecticidas y nematocidas, resisten bajas temperaturas y plagas, con dos importantes limitaciones, un sabor amargo de los tubérculos debido a la presencia glucosinolatos y la segunda es la sensibilidad al ataque de virus afectando su producción. Con el cultivo de tejidos podemos vencer estos inconvenientes, realizando trabajos de selección de plántulas con características deseables a través de la regeneración indirecta vía cultivo de callos. El objetivo fue evaluar el efecto de cuatro reguladores del crecimiento sobre explantes de mashua a fin de obtener una buena inducción de callos en un menor tiempo posible. Segmentos nodales e internodales de plántulas *in vitro* de mashua fueron sembrados en medios de inducción de callos, medio MS semisólido suplementado con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento (2,4-D, ANA, BAP y Kinetina), el pH se ajustó a 5.8 incubándose a  $18 \pm 2$  °C, 16 horas luz y 2000 lux por 4 semanas. Se logró la inducción de callos en ambos explantes, el porcentaje de inducción fue dependiente del tipo de explante y del tipo de regulador utilizado. El mayor porcentaje de inducción de callos para los explantes nodales se observó en los medios MS + 2,4-D (1mg/L) + BAP (1mg/L) y MS +2,4-D (2mg/L) + BAP (1mg/L) y para los explantes internodales en los medios MS + 2,4-D (0.5mg/L) + BAP (1mg/L) y MS + 2,4-D (1mg/L) +BAP (1mg/L), luego de 4 semanas de sembrados. Se espera inducir un mayor volumen de callos aumentando las concentraciones de auxinas (5-10 mg/L) o realizando subcultivos de los callos ya inducidos a intervalos de dos semanas, con el fin de poder obtener un buen protocolo de inducción de callos en plántulas de mashua.

Palabras clave: inducción de callos, mashua, reguladores del crecimiento

Key words: callus induction, mashua, plant growth regulators

# **EFFECTO DEL PULSO LIQUIDO SOBRE LA MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE ZABILA (*ALOE VERA* L.).**

Ferrer, O.\* Chacín, P. Albany, N. Vilchez, J. \*Autor para correspondencia.

La Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Maracaibo–Venezuela. e-mail: [orlekferrer@yahoo.com](mailto:orlekferrer@yahoo.com)

## **RESUMEN**

En la actualidad existe un incremento en las superficies sembradas en el país, debido a la sustancial demanda de los productos de la zábila en el mercado nacional e internacional. Esto implica la necesidad de mejorar el rendimiento y calidad, mediante la introducción de tecnologías de producción eficientes. Por ello se estudio efecto del pulso liquido sobre la multiplicación *in vitro* de zábila, para lo cual se utilizaron vitroplantas de zábila en crecimiento; las cuales se colocaron en inmersión en una solución de 25 mg.L<sup>-1</sup> de Kinetina y 50mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP durante 90, 60 y 30 min y control sin inmersión. Luego se colocaron en medio de multiplicación constituido por 50% de las sales MS, 1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 100 mg.L<sup>-1</sup> mioinositol, 25 mg.L<sup>-1</sup> de cisteina, 100 mg.L<sup>-1</sup> ácido ascórbico, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 7 g.L<sup>-1</sup> de agar; ajustando el pH a 5,8. Las vitroplantas crecieron a una temperatura de 26°C y bajo luz blanca fluorescente (150umol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) constante. Las variables evaluadas fueron número de brotes por vitroplanta, altura de vitroplanta y altura de brotes de las vitroplantas. El diseño experimental fue totalmente al azar y el cual se analizo estadísticamente mediante un modelo completamente aleatorizado. A los 30 días de cultivo, el análisis estadístico detecto efectos para las variables evaluadas. Se concluye que el mejor tiempo de inmersión es de 30 min.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, pulso liquido, zábila

# EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA EN ANTURIO (*ANTHURIUM ANDRAEANUM* LIND.) VARIEDAD 'LAMBADA'

Nydia del Rivero Bautista<sup>1\*</sup>, Daniel Agramonte Peñalver<sup>1</sup>, Raúl Barbón Rodríguez<sup>1</sup>, Wilder Camacho Chiu<sup>2</sup>, Martha Pérez Peralta<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>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 54830.

<sup>2</sup>Dirección General Tecnológica Agropecuaria. Carretera Cumuapa, Cunduacán, Tabasco, México. e-mail: delriverobautista@yahoo.com.mx

## RESUMEN

La embriogénesis somática es de los procesos de la morfogénesis *in vitro* de mayor actualidad por su aplicación tanto en la propagación masiva de plantas como para el mejoramiento genético. El *Anthurium* es el género de las *Araceae* más importante en el mercado mundial como flores de corte y maceta. El objetivo del trabajo fue lograr la embriogénesis somática indirecta. Como explantes iniciales se utilizaron segmentos de hojas de aproximadamente 1.0 cm<sup>2</sup> de plantas *in vitro*, obtenidas por organogénesis indirecta. Se emplearon dos medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) y Nitsch y Nitsch modificados y suplementados con tiamina 0.4 mg.L<sup>-1</sup>, mioi-inositol 100 mg.L<sup>-1</sup> y sacarosa 3%. Para la inducción de callos se estudiaron cuatro concentraciones 2.26, 4.52, 6.79 y 9.05 µM 2,4-D manteniendo constante 2.32 µM kin. Se evaluó porcentaje de formación de callos. En la formación y diferenciación de los embriones somáticos se emplearon los medios de cultivo descritos anteriormente. Se compararon tres concentraciones 2.22, 4.44 y 6.66 µM 6-BAP y un control. La variable evaluada fue porcentaje de explantes con formación de embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF) y embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF). Los resultados mostraron una interacción significativa entre los medios de cultivo y los reguladores de crecimiento. En los medios de cultivo MS y Nitsch y Nitsch los mayores porcentajes de formación de callos se obtuvieron con una concentración de 6.79 µM 2,4-D, con diferencias entre los tratamientos. La mayor formación y diferenciación de embriones somáticos de alta frecuencia se obtuvo al emplear 4.4 µM 6-BAP en los medios de cultivo MS y Nitsch y Nitsch; aunque, difirió con los otros tratamientos. En la formación de embriones somáticos de baja frecuencia los mayores valores se encontraron con concentraciones de 2.2 y 4.4 µM 6-BAP en el medio de cultivo MS y Nitsch y Nitsch.

Palabras clave: organogénesis, plantas *in vitro*, propagación

# EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE LIMBOS FOLIARES EN EL CULTIVO DEL BONIATO (*IPOMOEA BATATAS* (L.) LAM.)

Orlando González Paneque<sup>1\*</sup>, María M. Hernández Espinosa<sup>2</sup>, Juan J. Silva Pupo<sup>1</sup>, Mirtha López Machado<sup>2</sup>, Silvia montes Cruz<sup>2</sup>, Angel Espinosa Reyes<sup>1</sup>, y Luis M. González Núñez<sup>3</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Apdo. 21, Bayamo, CP.: 85100, Granma, Cuba, e-mail: [ogpaneque@udg.co.cu](mailto:ogpaneque@udg.co.cu)

<sup>2</sup>Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP.: 32700, Cuba.

<sup>3</sup>Departamento de Técnicas Nucleares, Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", Bayamo, Granma, Cuba.

## RESUMEN

La embriogénesis somática constituye en la actualidad una vía rápida y eficiente para la micropropagación de plantas mediante el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Por ello el objetivo de establecer la micropropagación del Boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), mediante la embriogénesis somática, se tomaron explantes de limbos foliares de brotes jóvenes de los clones CEMSA 78-354, INIVIT B 90-1, INIVIT B 93-1, Yabú-8 y Jewel. Los mismos se tomaron a partir de brotes de raíces tuberosas colocadas en frascos con agua y se emplearon explantes de los limbos foliares colocados en contacto con el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962). La mayor efectividad para la formación de los callos potencialmente embriogénicos se obtuvo en el medio de cultivo con 2,4-D (0.50 mg.L<sup>-1</sup>) y 6-BAP (0.25 mg.L<sup>-1</sup>), la formación de los embriones somáticos con 2,4-D (0.2 mg.L<sup>-1</sup>), la maduración con ABA (1.0 mg.L<sup>-1</sup>), la germinación con TDZ (0.25 mg.L<sup>-1</sup>) y la conversión en plántulas con GA<sub>3</sub> (10.0 mg.L<sup>-1</sup>) y finalmente se llevó a cabo la aclimatización de las vitroplantas obtenidas.

Palabras clave: callos, plantas *in vitro*, reguladores del crecimiento

# **EMPLEO DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE YUCA (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ)**

Víctor Medero<sup>1\*</sup>, Rafael Gómez<sup>2</sup>, Carlos Borroto<sup>3</sup>, Sergio Rodríguez<sup>1</sup>, Marilyn Martínez<sup>1</sup>, Milagros Basail<sup>1</sup>, Jorge López<sup>1</sup>, Magaly García<sup>1</sup>, José de la C. Ventura<sup>1</sup>, Manuel Cabrera<sup>1</sup>, Carmen Pons<sup>1</sup>, Aymé Rayas<sup>1</sup>, Arletys Santos<sup>1</sup>, José A. Cruz<sup>1</sup>, Miguel Álvarez<sup>1</sup> y Jesús García<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo. 6, Santo Domingo, CP: 53000, Villa Clara, Cuba. e-mail: [vmedero@inivit.co.cu](mailto:vmedero@inivit.co.cu)

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara. Villa clara, Cuba CP 54830

<sup>3</sup>Centro de Ingeniería genética y biotecnología (CIGB). Ciudad de La Habana, Cuba.

## **RESUMEN**

El trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Se utilizaron los clones 'CMC-76' y 'CEMSA 74-725' procedentes del banco de germoplasma del INIVIT. El objetivo principal consistió en aplicar el sistema de inmersión temporal tipo RITA<sup>®</sup> para incrementar los porcentajes de germinación de los embriones somáticos. Se evaluó el efecto de la densidad de agregados embriogénicos por RITA y el tiempo de inmersión de los mismos. Se utilizó como control la germinación de los embriones somáticos en medio de cultivo semisólido. Como resultado se obtuvo un 52.8% de germinación de los embriones somáticos en medio de cultivo semisólido y un 91.7% con el empleo del sistema de inmersión temporal tipo RITA<sup>®</sup>.

Palabras clave: agregados embriogénicos, RITA<sup>®</sup>, tiempo de inmersión

# GERMINACIÓN Y ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *HYLOCEREUS PURPUSII* A PARTIR DE SEMILLAS BOTÁNICAS

Manuel de Feria Silva<sup>1\*</sup>, Daniel Rojas Bravo<sup>2</sup>, Elisa Quiala Mendoza<sup>1</sup>, Mireya Reyna Villela<sup>2</sup>, Maité Chávez Milian<sup>1</sup>, Alberto Taylor Preciado<sup>2</sup>, Domingo Ruvalcaba Ruiz<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5. ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail: [mdeferia@yahoo.es](mailto:mdeferia@yahoo.es)

<sup>2</sup>Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115, C.P. 47820, Ocotlán, Jalisco, México.

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del hipoclorito de sodio, el tiempo de inmersión de las semillas en este producto y la concentración de las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog sobre la germinación y establecimiento *in vitro* de plantas de Pitahaya púrpura obtenidas a partir de semillas botánicas. Al evaluar todos los experimentos se determinó que el mayor número de semillas germinaron entre el octavo y noveno día de cultivo. La inmersión de las semillas durante 15 minutos en tres concentraciones de hipoclorito de sodio (1.0, 1.5, 2.0%) demostró que tanto el número de semillas que germinaron como el número de plantas que se establecieron *in vitro* disminuyeron a medida que se incrementó la concentración de hipoclorito de sodio. Los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento con 1.0% de hipoclorito de sodio y 15 minutos, con 89.7% de germinación y 76.5% de establecimiento de plantas *in vitro*. Al combinar diferentes tiempos de inmersión (5.0, 10, 15 minutos) con 1.0% de hipoclorito de sodio, se observó que no hubo diferencias estadísticas en la germinación y establecimiento *in vitro* de las plantas. Sin embargo, en el tratamiento con 5.0 minutos y 1.0% se presentó un 1.3% de contaminación microbiana, con lo cual se determinó utilizar el tratamiento con 1.0% de hipoclorito de sodio y 10 minutos, como el mejor tratamiento para desinfectar, germinar y establecer *in vitro* plantas de esta especie. Se demostró que con un 125% de sales MS en el medio de cultivo, se afectó la germinación de las semillas y no se logró establecer plantas *in vitro*, por otro lado, aunque no hubo diferencias estadísticas entre los resultados obtenidos para la germinación entre los tratamientos con 25, 50, 75 y 100% de sales MS en el medio de cultivo, al emplear estas diferentes concentraciones, si se afectó el establecimiento *in vitro* y el mejor resultado (80%) se alcanzó con el 100% de las sales MS.

Palabras clave: desinfección, germinación, pitahaya

Key words: disinfection, germination, pitahaya



# IMPORTANCIA DE LOS BANCOS DE GERMOPLASMA PARA LA CONSERVACIÓN DE PLANTAS MEDICINALES

Trujillo, I<sup>1</sup>; Salazar, E<sup>2</sup>; \*; Oropeza, Maira<sup>3</sup>; Albarrán, G<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Centro de Estudios de Agroecología Tropical (CEDAT). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez". Apartado 47925. Caracas 1010. e-mail: [jarn1234@telcel.net.v.e](mailto:jarn1234@telcel.net.v.e)

<sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal Instituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. e-mail: [moropeza@strix.ciens.ucv.ve](mailto:moropeza@strix.ciens.ucv.ve)

<sup>3</sup>Unidad de Biotecnología Vegetal. CENIAP. Instituto de Investigaciones Agrícolas. Maracay

## RESUMEN

Un amplio porcentaje de los recursos fitogenéticos para la alimentación, la agricultura y la salud del mundo son insuficientes y/o están escasamente documentados en comparación con lo que debería saberse de ellos para que la conservación, el acceso y la utilización fueran óptimos. El área de biotecnología vegetal a través de la micropropagación *in vitro* ha proporcionado las bases para el establecimiento de bancos de germoplasma. El establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro* que permita la conservación de especies vegetales utilizadas con fines medicinales, con la mínima alteración del ecosistema donde son ubicadas para su uso, constituye un punto de gran importancia en la conservación de la biodiversidad en diversos ambientes, de este tipo de plantas donde se plantea mantener la estabilidad de las condiciones físicas de un área, manteniendo en su mínima expresión la degradación ambiental. Las colecciones *ex situ*, permiten tener el material conservado con una identificación básica del mismo, como el número de muestra y el nombre taxonómico; dónde y cómo se ha obtenido el material; descripciones de la morfología básica y de los caracteres agronómicos; actuales resultados de la prueba de viabilidad; ciclos de regeneración; donde se ha distribuido el material y la pertinente información etnobotánica y conocimientos de los agricultores y la población local, lo cual adicional a su conservación, permitirá realizar investigación básica en el área de micropropagación de plantas medicinales, caracterización molecular y bioquímica de las plantas micropropagadas con el propósito de establecer sistemas ideales de multiplicación de estas plantas, que permitan su uso a mayor escala, y para ofrecer nuevas alternativas del uso de este tipo de plantas en propuestas eficaces y eficientes en la atención primaria de salud. Con este objetivo, se ha iniciado la conformación del banco de germoplasma en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la UNESR con especies como hierbamora, neem, sábila, mastuerzo, cañafístola, orégano orejón y alcornoque.

Palabras clave: etnobotánica, micropropagación, germoplasma, plantas medicinales, conservación

# INDUCCIÓN DE CALLOS EN SEGMENTOS DE HOJA DE *ANTHURIUM ANDRAEANUM* LIND.

Nydia Del Rivero<sup>1\*</sup>, Daniel Agramonte<sup>1</sup>, Raúl Barbón<sup>1</sup> y Wilder Camacho<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara. Villa clara, Cuba CP 54 830. e-mail: [delriverobautista@yahoo.com.mx](mailto:delriverobautista@yahoo.com.mx)

<sup>2</sup>Dirección General de Estudios Tecnológicos Agropecuarios, Carretera Cumuapa Cunduacán Tabasco, México.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue lograr la inducción de callos a partir de segmentos de hojas jóvenes de anturio (*A. andraeanum* Lind.) en tres variedades Lambada, Tropical y Sonate. Para la desinfección del material vegetal se estudiaron tres concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5%) de hipoclorito de sodio (NaClO) durante 10, 15 y 20 minutos. El medio de cultivo utilizado fue el MS modificado, micronutrientes MS, vitaminas MS, 100 mg.L<sup>-1</sup> mio-inositol, 3% sacarosa y 2.0 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite. En la inducción de callos se evaluaron tres concentraciones (0.13, 0.18 y 0.22 mg.L<sup>-1</sup>) de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) y dos concentraciones (1.1 y 2.2 mg.L<sup>-1</sup>) de 6-BAP (bencialaminopurina). Se evaluó el crecimiento de los callos por la escala de Santana (1982) y de forma visual color y apariencia. Los mejores resultados en la desinfección de los explantes se obtuvieron con una concentración de 0.5% de NaClO durante 10 minutos, con un 78.8, 79.5 y 78.3% de supervivencia para las variedades Lambada, Tropical y Sonate, respectivamente. En la inducción de callos la variedad Lambada respondió mejor con 0.18 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D combinado con 1.1 mg.L<sup>-1</sup> de 6BAP, y la variedad Tropical con 0.13 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D y 1.1 mg.L<sup>-1</sup> 6BAP. En la variedad Sonate la callogénesis se favoreció con 0.18 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D y 2.2 mg.L<sup>-1</sup> 6BAP. Con el empleo de este medio de cultivo y las combinaciones de reguladores de crecimiento fue posible obtener callos en las variedades Lambada, Tropical y Sonate lo que permitirá desarrollar protocolos para la propagación de esta especie.

Palabras clave: organogénesis, desinfección *in vitro*, variedades Lambada, Tropical, Sonate

# INDUCCIÓN DE CALLOS EN *CLEOBULIA MULTIFLORA*

Soares, G.A.\*; Dias, A.A.; Lopes, C.A.R.G.; Muzzi, F.C.; Pagano, M.C.; Sá, N.M.H.; Scotti, M.R.M. \*Autor para correspondencia.

Departamento de Botânica/ICB – UFMG. Belo Horizonte/MG, Av. Antônio Carlos 6627 CEP 31.270-010, e-mail: [guasoaes@bol.com.br](mailto:guasoaes@bol.com.br); [mrita@icb.ufmg.br](mailto:mrita@icb.ufmg.br).

## RESUMEN

Entre las especies indicadas para recuperación de pilas de material estéril en las áreas de mineración, se destaca *Cleobulia multiflora* (Leguminosae), especie herbácea, estolonífera y nativa del bioma brasileiro Mata Atlântica. La principal dificultad en la propagación de la misma es obtener semillas viables, debido a la intensa depredación. Además, no existen estudios de cultivo *in vitro* con esta especie. Con el objeto de inducir callos en explantes de *C. multiflora*, se llevaron a cabo dos experimentos. En el primero, explantes foliares de 1 cm<sup>2</sup>, luego de ser desinfectados con Tween 20, etanol 70%, hipoclorito de sodio 2%, Fungizon (250mg/l) y agua destilada autoclavada, fueron inoculados en medio MS suplementado con 2,4-D en 4 concentraciones (0, 1, 2 y 3 mg/l). En el segundo, segmentos foliares y nodales fueron inoculados en medio MS suplementado con diferentes dosis de fungicidas Fungizon®, Priori®, Derosal®, Folicur® y Systhane® y con el antibiótico Rifampicina (250mg/l). Los resultados del primer experimento mostraron que utilizando 2,4-D (3mg/l) y Fungizon, se obtuvo una mayor inducción de callos en *C. multiflora* (56%) a los 12 días de incubación. Ya en el segundo experimento, el Fungizon® controló en un 78% la contaminación de los segmentos foliares, mientras que fue ineficiente para el control de segmentos nodales. Para éstos, la asociación entre los fungicidas Priori® (F1), Derosal® (F2), Folicur® (F3) y Systhane® (F4) junto con el antibiótico rifampicina fue eficiente para inhibir el crecimiento de hongos, pero no de bacterias. La bacteria aislada fue testada en antibiogramas utilizando los últimos 4 fungicidas junto con rifampicina y estreptomycin en las concentraciones de 200, 300 y 400 mg/l. El tratamiento seleccionado para el control de la contaminación fúngica y bacteriana fue el antibiótico rifampicina (400mg/l) aliado a los fungicidas F1, F2 y F4.

Palabra clave: antibiograma, callo, *Cleobulia multiflora*, Mata Atlântica, micropropagación

# **AN OPTIMISED METHOD FOR *IN VITRO* MULTIPLICATION IN SWEETPOTATO – *IPOMOEA BATATAS* (L.) LAM. IN ORDER TO PROMOTE ITS GROWTH IN ROMANIA**

ANA ROSU

University of Agronomic Sciences of Bucharest, Faculty of Biotechnology, Bd. Marasti 59, 011464 Bucharest, Romania. e-mail: [anabiotech@yahoo.com](mailto:anabiotech@yahoo.com)

## **ABSTRACT**

Though sweetpotato is originating from the tropical areas in Latin America, its culture is at present also extended in the temperate zones. The importance of this species for food, animal feed and industrial raw material stimulated the researches for establishing techniques for efficient production of the planting material. The rapid multiplication of sweetpotato by *in vitro* methods guaranties the obtaining of a true-to-type planting material, which is in the same time of the highest sanitary quality, with minimum uses of fertilizers, pesticides, water, space, labour and in a limited time period. The aim of our research was to establish an efficient and reproducible protocol for producing the sweetpotato planting material by biotechnological means. The shoot apices detached from shoots developed from storage roots were cultured on several variants of the MS basal medium supplemented with cytokinins and auxins. The best results were obtained on the variant with 0.3 mg/l NAA and 1 g/l activated charcoal, which stimulated in the same time a good shoot elongation and a well developed root system, thus allowing the vitroplant acclimatization after 2 weeks since culture initiation, in all tested sweetpotato phenotypes. Following the planting in the field the vitroplants fully proved their potential of adaptability, vigorous growth and a good production of storage roots, which recommends this crop to be more promoted in Romania for being cultivated on extended areas in the near future.

Key words: MS – Murashige and Skoog basal medium; NAA – naphthalene acetic acid; vitroplants; storage roots; sweetpotato (*Ipomoea batatas*)

# A PROTOCOL FOR MICROPROPAGATION AND SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *LILIUM LEDEBOURII* (BAKER) BOISS AN ENDEGRADED RARE SPECIES ENDEMIC TO IRAN

Pejman Azadi<sup>1\*</sup>, Morteza KhoshKhoi<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Dept. of Biotechnology, National Research Center of Ornamental Plants, Mahallat. Iran. e-mail: azadip22@yahoo.com.

<sup>2</sup>Dept. Horticulture-Shiraz university, Shiraz - Iran.

## ABSTRACT

The perennial plant *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss (Liliaceae) is an endangered rare species endemic to Iran. It is under surveillance of regional Environmental Protection Agency. Due to the collection of these plants, specially of the underground organs, the number of this species is continuously decreasing. Effect of growth regulators, sucrose concentration and scale segment on bulblet regeneration were investigated in factorial design on the basis of completely randomized with three replication and 12-16 sample for each replication. Also the effect of Picloram, IAA and 2,4-D for somatic embryogenesis of the thin cell layer derived from scale of bulblet were considered. The highest number of bulblets was formed on a MS medium with BA ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) + NAA ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) and 9% sucrose at basal segment. The presence of growth regulators increased fresh weight of bulblets compared with hormone free medium. The highest number of direct somatic embryogenesis was obtained in MS medium containing  $1 \text{ mg l}^{-1}$  IAA with  $1.8 \text{ g l}^{-1}$  gelrite. The bulblets at the end of the culture period were given cold treatment at  $4^\circ\text{C}$  for 8 weeks and then transplanted to a potting mixture of sand, leaf mold and peat moss (1:1:1). The horticultural habits of the cloning plants are being investigated to introduce the germplasm into lily breeding program.

Keywords: conservation, *Lilium*, *In vitro*, regeneration, somatic embryogenesis

# EFFECT OF VARIOUS AMINO ACIDS ON SHOOT REGENERATION OF SUGARCANE

Shaheen Asad<sup>1</sup>, Muhammad Arshad<sup>1\*</sup> and Yusuf Zafar<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Plant Biotechnology Division, P.O Box 577, Jhang Road Faisalabad, Pakistan. e-mail: arshadchbt@yahoo.com

<sup>2</sup>National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering.

## ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum officinarum*) SP-241 embryogenic callus was induced from meristemic explants cultured on MSB (Murashige and Skoog supplemented with B5 vitamins) containing 13.6  $\mu$ M 2-4, dichlorophenoxyacetic acid, 0.05%(w/v) Casein hydrolysate, 10% (v/v) coconut water and 3% glucose. Five concentrations (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mM) of five different amino acids (glutamine, asparagine, glycine, cysteine and arginine) were tested with and without 22.5  $\mu$ M  $\alpha$ -naphthalene acetic acid to compare their ability to induce regeneration from embryogenic callus. After one month on medium, the percentage of shoot meristem induction was evaluated and after 45 days the total number of shoots produced as well as percentage of shoots greater than 1 cm in length was obtained. Although, it had the lowest range, the medium containing cysteine and arginine were found better than all other amino acids tested with the highest %age of shoot meristem induction and largest number of shoots particularly at a concentration of 0.25 mM and 0.5 mM respectively.

Key words: *Saccharum*, Amino acids, shoot meristem, Sugarcane tissue culture



# CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS

## **CONSERVACIÓN DE ESPECIES ENDÉMICAS DE LA FAMILIA CACTACEAE. III: MAMMILLARIA PROLIFERA L.**

Yamila Rosales Simonot\* ; Argelio Pifferrer Escalona; Luis Enrique Rodríguez de Francisco; Rayma Cantillo Ardeból; Yerina Santiago Bardón; Janet Igarza Castro. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. CITMA. Holguín. Jardín Botánico en Carretera a Mayabe. Teléfono: 425342. e-mail. [yamila@cbv.holguin.inf.cu](mailto:yamila@cbv.holguin.inf.cu)

### **RESUMEN**

La familia de las cactáceas esta catalogada como una de las más seriamente amenazadas con la extinción. Cuba cuenta con varias especies incluidas en esta categoría. *Mammillaria prolifera* L., es la única especie endémica de este género, categorizada como estado crítico por la colecta desmedida de los coleccionistas. En el presente trabajo se describen los riesgos que amenazan a la especie en nuestra provincia, así como la metodología desarrollada para la conservación de semillas. Se realizan diferentes estudios para conservar las semillas y de su comportamiento durante la conservación respecto a la desinfección, a la capacidad germinativa de las semillas, a la ruptura de la dormancia o latencia, y estudios sobre la longevidad de las semillas conservadas, comparando la germinación entre semillas conservadas y sin conservar, así como la adaptación de las plantas germinadas *in vitro* y su posterior reincorporación a la colección de plantas vivas del Jardín Botánico de Holguín.

Palabras clave: Conservación de semillas, desinfección, dormancia, germinación, cactáceas

## **SEEDS CONSERVATION OF AN ENDEMIC SPECIE OF CACTACEAE. III: MAMMILLARIA PROLIFERA L.**

### **ABSTRACT**

The *Cactaceae* family is catalogued as one of the most seriously threatened of extinction. Cuba has some species included in this category. *Mammillaria prolifera* L. is the only endemic specie of this genera in Cuba, and is categorized in critical stage in danger of extinction because of the excessive collecting of the collectionists people. In this work we describe the risk which endangered the specie in our province, and the developed methodology for seeds conservation. We realized different studies for seeds conservation and their behaviour during conservation process, such as disinfection, seeds germinative capacity, dormancy breakdown and conserved seeds longevity, comparing the conserved and not conserved seeds germination power, and the acclimatization of *in vitro* seeds germinated and their introduction in the alive plants collection in the Botanical Garden of Holguín.

Keywords: Seeds conservation, disinfection, dormancy, germination, *Cactaceae*



## **CONSERVACIÓN DE ESPECIES ENDÉMICAS DE LA FAMILIA CACTACEAE. IV: *OPUNTIA MILITARIS* BRITT**

Yamila Rosales Simonot;\* Argelio Pifferrer Escalona; Luis Enrique Rodríguez de Francisco; Rayma Cantillo Ardeból; Yerina Santiago Bardón; Janet Igarza Castro. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. CITMA. Holguín. Jardín Botánico en Carretera a Mayabe. Teléfono: 425342. e-mail: [yamila@cbv.holguin.inf.cu](mailto:yamila@cbv.holguin.inf.cu)

### **RESUMEN**

La familia de las cactáceas esta catalogada como una de las más seriamente amenazadas con la extinción. Cuba cuenta con varias especies incluidas en esta categoría. *Opuntia militaris* Britt. es una especie endémica oriental, actualmente amenazada por la acción antropogénica en su hábitat natural. En el presente trabajo se describen los riesgos que amenazan a la especie en nuestra provincia, así como la metodología desarrollada para la conservación de semillas. Se realizan diferentes estudios para conservar las semillas y de su comportamiento durante la conservación respecto a la desinfección, a la capacidad germinativa de las semillas, a la ruptura de la dormancia o latencia, y estudios sobre la longevidad de las semillas conservadas, comparando la germinación entre semillas conservadas y sin conservar, así como la adaptación de las plantas germinadas *in vitro* y su posterior reincorporación a la colección de plantas vivas del Jardín Botánico de Holguín.

Palabras clave: conservación de semillas, desinfección, dormancia, germinación, cactáceas

## **SEEDS CONSERVATION OF AN ENDEMIC SPECIE OF CACTACEAE. IV: *OPUNTIA MILITARIS* BRITT**

### **ABSTRACT**

The *Cactaceae* family is catalogued as one of the most seriously threatened of extinction. Cuba has some species included in this category. *Opuntia militaris* Britt. Is an oriental endemic specie, actually threatened of extinction due to the anthropogenic action in its natural habits. In this work we describe the risk which endangered the specie in our province, and the developed methodology for seeds conservation. We realized different studies for seeds conservation and their behaviour during conservation process, such as disinfection, seeds germinative capacity, dormancy breakdown and conserved seeds longevity, comparing the conserved and not conserved seeds germination power, and the acclimatization of *in vitro* seeds germinated and their introduction in the alive plants collection in the Botanical Garden of Holguín.

Keywords: seeds conservation, disinfection, dormancy, germination, *Cactaceae*

# CONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE ESPECIES ENDÉMICAS DE LA FAMILIA CACTACEAE. I: *HARRISIA ERIOPHORA* PFEIFFER

Yamila Rosales Simonot\* ;Argelio Pifferrer Escalona; Luis Enrique Rodríguez de Francisco; Rayma Cantillo Ardeból; Yerina Santiago Bardón; Janet Igarza Castro. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. CITMA. Holguín. Jardín Botánico en Carretera a Mayabe. Teléfono: 425342. e-mail. [yamila@cbv.holguin.inf.cu](mailto:yamila@cbv.holguin.inf.cu)

## RESUMEN

La familia de las cactáceas esta catalogada como una de las más seriamente amenazadas con la extinción. (Hustenberger et al; 1992; SEDESOL, 1994). Cuba cuenta con varias especies incluidas en esta categoría. *Harrisia eriophora* Pfeiffer, es una especie endémica de este género. *Harrisia eriophora* (L.) Pfeiffer es una especie endémica representantes de su género en Cuba, la presencia de esta, unidas a otros endemismos dentro del Área protegida de Güirito-Punta de Mangle, es uno de los factores que hacen tan particular esta zona dentro de la Reserva Ecológica de Caletones, sin embargo, se pudo determinar, que las poblaciones de esta especie dentro de esta área poseen escasos individuos, los cuales se están perdiendo a causa de diversos factores bióticos y abióticos. En el presente trabajo se describen los riesgos que amenazan a la especie en nuestra provincia, así como la metodología desarrollada para la conservación de semillas. Se realizan diferentes estudios para conservar las semillas y de su comportamiento durante la conservación respecto a la desinfección, a la capacidad germinativa de las semillas, a la ruptura de la dormancia o latencia, y estudios sobre la longevidad de las semillas conservadas, comparando la germinación entre semillas conservadas y sin conservar, así como la adaptación de las plantas germinadas *in vitro* y su posterior reincorporación a la colección de plantas vivas del Jardín Botánico de Holguín.

Palabras clave: Conservación de semillas, desinfección, dormancia, germinación, cactáceas

## SEEDS CONSERVATION OF AN ENDEMIC SPECIE OF CACTACEAE. I: *HARRISIA ERIOPHORA* PFEIFFER

### ABSTRACT

The *Cactaceae* family is catalogued as one of the most seriously threatened of extinction. (Hustenberger et al; 1992; SEDESOL, 1994). Cuba has some species included in this category. *Harrisia eriophora* Pfeiffer is an endemic specie of this genera in Cuba. Its presence joined to the others endemisms in the Güirito-Punta de Mangle Protected Area is one of the factors which make this zone so particular in the Caletones Ecological Reserve, nevertheless, it is determinated that the population of this specie in these area has very scared plants which are losing because of some biotics and abiotics factors. In this work we describe the risk which endangered the specie in our province, and the developed methodology for seeds conservation. We realized different studies for seeds conservation and their behaviour during conservation process, such as disinfection, seeds germinative capacity, dormancy breakdown and conserved seeds longevity, comparing the conserved and not conserved seeds germination power, and the acclimatization of in vitro seeds germinated and their introduction in the alive plants collection in the Botanical Garden of Holguín.

Keywords: Seeds conservation, disinfection, dormancy, germination, *Cactaceae*

# CONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE ESPECIES ENDÉMICAS DE LA FAMILIA CACTACEAE. II: *MELOCACTUS HOLGUINENSIS ARECES*

Yamila Rosales Simonot;\* Argelio Pifferrer Escalona; Luis Enrique Rodríguez de Francisco; Rayma Cantillo Ardeból; Yerina Santiago Bardón; Janet Igarza Castro. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. CITMA. Holguín. Jardín Botánico en Carretera a Mayabe. Teléfono: 425342. e- mail: [yamila@cbv.holguin.inf.cu](mailto:yamila@cbv.holguin.inf.cu)

## RESUMEN

La familia de las cactáceas esta catalogada como una de las más seriamente amenazadas con la extinción. Cuba cuenta con varias especies incluidas en esta categoría. *Melocactus holguinensis Areces*, presenta una situación bastante dramática. Según un informe presentado en el Tercer Taller para la conservación, Análisis y Manejo planificado de Plantas Silvestres Cubanas CAMP III, reportan esta especie como incluida dentro del Libro Rojo Nacional con categoría P (peligro de extinción), en CITES categoría II, y se le ha asignado la categoría de estado crítico, por poseer poblaciones muy localizadas y reducidas, planteándose que sólo existen aproximadamente 118 individuos maduros. También se informa de la pérdida de sus ecosistemas naturales por la antropización y factores naturales como el fuego. Esta especie no cuenta con planes de manejo *ex situ*, que incluyan el cultivo *ex situ*, la recuperación del taxón, la introducción o reintroducción de individuos, el desarrollo de métodos para propagar el taxón, en fin, no existen medidas que contribuyan en el más mínimo grado a la conservación actual de estas especies en sus localidades de origen. En el presente trabajo se describen los riesgos que amenazan a la especie en nuestra provincia, así como la metodología desarrollada para la conservación de semillas. Se realizan diferentes estudios para conservar las semillas y de su comportamiento durante la conservación respecto a la desinfección, a la capacidad germinativa de las semillas, a la ruptura de la dormancia o latencia, y estudios sobre la longevidad de las semillas conservadas, comparando la germinación entre semillas conservadas y sin conservar, así como la adaptación de las plantas germinadas *in vitro* y su posterior reincorporación a la colección de plantas vivas del Jardín Botánico de Holguín.

Palabras clave: Conservación de semillas, desinfección, dormancia, germinación, cactáceas

## SEEDS CONSERVATION OF AN ENDEMIC SPECIE OF CACTACEAE. II: *MELOCACTUS HOLGUINENSIS ARECES*

### ABSTRACT

The *Cactaceae* family is catalogued as one of the most seriously threatened of extinction. Cuba have some species included in this category. *Melocactus holguinensis Areces*, presents a very dramatic situation. In The third Workshop for Conservation, Analysis and planified management of Cuban Wild plants CAMP III, report this specie included in the National Red Book as a critical stage in danger of extinction, in CITES II, and it posses very localized and reduced populations, with only 118 adults approximately. As where as they support the lose cause associated with the lost of its ecosystems because of the antropization and natural factors as fire. This specie have not *ex situ* management plans, which include the *ex situ* culture, the taxon rescued the introduction or reintroduction of individuals, the development of the taxon propagation methods, and do not exist alternatives which contributes at least grade of the actual conservation in their original localities. In this work we describe the risk which endangered the specie in our province, and the developed methodology for seeds conservation. We realized different studies for seeds conservation and their behaviour during conservation process, such as disinfection, seeds germinative capacity, dormancy breakdown and conserved seeds longevity, comparing the conserved and not conserved seeds germination power, and the acclimatization of *in vitro* seeds germinated and their introduction in the alive plants collection in the Botanical Garden of Holguín.

Keywords: Seeds conservation, disinfection, dormancy, germination, *Cactaceae*

# **EFFECTO DE LAS ULTRA-BAJAS TEMPERATURAS EN LAS MEMBRANAS CELULARES DEL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM* SPP.)**

Marcos Edel Martínez-Montero\*; Julia Martínez Rodríguez. \*Autor para correspondencia.

Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Avila, Carretera a Morón km 10, CP69450,  
email: [marcosem@bioplantitas.cu](mailto:marcosem@bioplantitas.cu)

## **RESUMEN**

En años recientes se han revelado considerables avances en el uso de diferentes técnicas analíticas (biofísicas, bioquímicas, histo-citológicas y moleculares) como herramientas para mejorar los conocimientos sobre los efectos de la crioconservación en el material biológico en general. Sin embargo, la aplicación de éstas para los estudios de la crioconservación en el material vegetal es aún limitada, y en la mayoría de los casos se emplean técnicas costosas y complejas. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo general de estudiar los efectos de las ultra-bajas temperaturas en las membranas celulares del cultivo de la caña de azúcar. Para ello se utilizó callos con estructuras embriogénicas y cluster de embriones somáticos de caña de azúcar del cultivar CP52-43. Para determinar el estado fisiológico del material durante la crioconservación se utilizó una técnica conductimétrica. Como resultados y conclusiones importantes se determinaron los cambios en las membranas celulares durante la recuperación de callos con estructuras embriogénicas crioconservados por una metodología de deshidratación por enfriamiento lento. Se demostró que las ultra-bajas temperaturas provocaron cambios significativos en las membranas celulares de los callos crioconservados pero las mismas se repararon a los cinco días de la recuperación. Además, se estableció un procedimiento de microgoteo/vitrificación como estrategia para la crioconservación de embriones somáticos que incluyeron un pre-tratamiento de  $1.5 \text{ mol.L}^{-1}$  glicerol +  $0.3 \text{ mol.L}^{-1}$  sacarosa y deshidratación en PVS2 durante 20 minutos. De esta manera se recomienda extender el uso de la técnica conductimétrica de forma sistemática a los cultivos prioritarios en el Centro de Bioplantitas para conocer el efecto de las ultra-bajas temperaturas en las membranas celulares durante el establecimiento de protocolos nuevos ó mejorados de crioconservación.

Palabras clave: crioconsevación, caña de azúcar, callos, embriones, conductimetría

## **ABSTRACT**

In recent years considerable advances in the use of different analytical techniques (biophysic, biochemical, histo-cytological and molecular) like tools have been revealed to improve the knowledge on the effects of the cryopreservation in the bacteriological agents in general. Nevertheless, the application of these for the studies of the cryopreservation in the vegetal material still is limited, and in most of the cases expensive and complex techniques are used. The present work was developed with the general mission to study the effects of the ultralow temperatures in cellular membranes of the culture of the sugar cane. For it it was used calluses with embryos structures and to cluster of sugar somatic cane embryos of cultivating Cp52-43. In order to determine the physiological state of the material during the cryopreservation a conductimetric technique was used. As important results and conclusions determined the changes in cellular membranes during the recovery of calluses with embriogénicas structures crioconservados by a methodology of dehydration by slow cooling. One demonstrated that the ultralow temperatures caused significant changes in cellular membranes of the cryopreserved calluses but the same ones were repaired to the five days of the recovery. In addition, a procedure of droplet/vitrification like strategy for the cryopreservation of somatic embryos settled down that included a pre-cure of  $1.5 \text{ mol.L}^{-1}$  glycerol +  $0.3 \text{ mol.L}^{-1}$  sucrose and dehydration in PVS2 during 20 minutes. This way is recommended to extend the use of the conductimétrica technique of systematic form to the high-priority cultures in the Bioplantitas Center to know the effect the ultralow temperatures in cellular membranes during the establishment of new or improved protocols of cryopreservation.

Keywords: cryopreservation, sugarcane, callus, embryos, conductimetry

# EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL HÍBRIDO IBP 42-99 DE PAPAYA (CARICA PAPAYA L.)

Jorge Gallardo Colina\*, Rafael Gómez Kosky, Marisol Tejeda Fernández, Laisyn Posada Pérez, Idalia Herrera O'farril, Maritza Reyes Vega, Leyanis García Aguila, Borys Chong Pérez y Marisol Freire Seijo.

\* Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: [gallardo05@ibp.co.cu](mailto:gallardo05@ibp.co.cu). o [Jorge\\_gallardo2002@yahoo.es](mailto:Jorge_gallardo2002@yahoo.es)

## RESUMEN

Para obtener plantas transgénicas en cualquier especie vegetal es necesario contar con metodologías eficientes de transformación y regeneración de plantas por cultivo de tejidos. El principal objetivo fue desarrollar una metodología de embriogénesis somática en un híbrido de papaya a partir de segmentos de tallo de plantas *in vitro*. Como material vegetal se emplearon plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99. Para la formación de callos se utilizó el medio de cultivo Nitsch y Nitsch suplementado con 1.5 mg.l<sup>-1</sup> de AIA y 1.5 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP. Para obtener y multiplicar embriones somáticos se estudió el 2,4-D en diferentes concentraciones. Para la germinación de los embriones somáticos se estudiaron diferentes concentraciones de 6-BAP. Con el empleo del AIA combinado con 6-BAP se obtuvieron callos compactos, secos y nodulares a partir de las secciones de tallo de las plantas *in vitro*. Con las concentraciones de 5 y 10 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D se obtiene el mayor número de embriones somáticos a partir de los callos y cuando se elevó la concentración del regulador de crecimiento a 15 mg.l<sup>-1</sup> este valor disminuyó significativamente. Al emplear 5 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D en el medio de cultivo se lograron los mejores valores de multiplicación y el mayor porcentaje de embriones somáticos en etapa globular. Al utilizar concentraciones mayores del regulador de crecimiento disminuyó significativamente la multiplicación de los embriones somáticos aunque el 100% de los mismos se encontraba en etapa globular y con 2 mg.l<sup>-1</sup> aumentó significativamente el grado de diferenciación de los embriones. Se logró al 100% la germinación de los embriones somáticos en etapa de torpedo y cotiledonal al emplear 0.15 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP.

Palabras clave: callos, embriones somáticos, germinación, plantas *in vitro*

## ABSTRACT

By obtained transgenic plants in anything species is necessary to have efficient methodology of plants transformation and regeneration. The same objective was: to develop a methodology to propagation via somatic embryogenesis in papaya hybrid IBP 42-99 from slice stem of *in vitro* plants. As plant materials *in vitro* plants of papaya hybrid IBP 42-99 was used. For the callus formation was used as explants slice stem of 5.0 mm to long and the culture medium Nitsch and Nitsch 1969 with 1.5 mg.l<sup>-1</sup> of AIA, 1.5mg.l<sup>-1</sup> of 6-BAP was used. For obtained and multiplication somatic embryos the 2,4-D in different concentration was studied. For the germination of somatic embryos different concentration of 6-BAP was studied. When used AIA with 6-BAP compact, dry and nodular callus were obtained. With 5 and 10 mg.l<sup>-1</sup> of 2,4-D the major number of somatic embryos were obtained from callus, when the growth regulator was used in 15 mg.l<sup>-1</sup> these parameter diminished significantly. When used 5 mg.l<sup>-1</sup> of 2,4-D the best multiplication and the major percentage of somatic embryos in globular stage was achieved. To use 8 mg.l<sup>-1</sup> of the growth regulator diminished significantly the multiplication of the somatic embryos though 100 % of the same ones were in globular stage and when used 2 mg.l<sup>-1</sup> increased significantly the differentiation of the embryos. Was achieved 100 % the germination of the somatic embryos in torpedo and cotyledonal stage to the employed 0.15 mg.l<sup>-1</sup> of 6-BAP.

Keywords: callus, germination, *In vitro* plants, Somatic embryos

# EMBRIOGENESIS SOMÁTICA EN FRIJOL TEPARI (*PHASEOLUS ACUTIFOLIUS* A. GRAY CV. TB1)

Lourdes García Rodríguez<sup>\*1</sup>, Jorge Pérez Pérez<sup>2</sup>, Rafael Gómez Kosky<sup>1</sup>, Yenny Padrón Montesino<sup>1</sup>, Damaris Torres Rodríguez<sup>1</sup> y Carlos Romero Quintana<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara. Villa clara, Cuba CP 54830 e-mail: [lougr2003@yahoo.es](mailto:lougr2003@yahoo.es), [lourdes05@ibp.co.cu](mailto:lourdes05@ibp.co.cu)

<sup>2</sup>Universidad de Granma, Carretera a Manzanillo, km 17, Peralejo, Bayamo. CP 85100, Granma.

## RESUMEN

Las plantas del género *Phaseolus* spp. L. han presentado dificultades con la regeneración *in vitro*, no existiendo en la actualidad una metodología de regeneración vía embriogénesis somática eficiente y reproducible. Esta investigación se desarrolló en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas con el objetivo de lograr la regeneración de plantas de *Phaseolus acutifolius* cv. TB1 a partir de la embriogénesis somática con miras a utilizar dicho procedimiento en el mejoramiento genético del cultivo. Se estudiaron dos tipos de explantes: cotiledones y brotes de embriones cigóticos germinados *in vitro* y varias concentraciones de 2,4-D, AIA y TDZ en los medios de cultivo. Los explantes brotes de embriones cigóticos germinados *in vitro* mostraron la mayor capacidad para la formación de callos con estructuras embriogénicas cuando fueron colocados en un medio de cultivo compuesto por las sales MS, vitaminas Heinz y Mee, 2 % sacarosa y enriquecido con TDZ, y AIA. La luz solar con la intensidad y duración del fotoperíodo evaluado, resultó ser la más favorable para el desarrollo de las plantas *in vitro* alcanzándose un 14 % de embriones somáticos con germinación completa.

Palabras clave: embriones somáticos, formación de callos, regeneración *in vitro*, reguladores del crecimiento

## ABSTRACT

The plants of *Phaseolus* spp L. have presented difficulties with the *in vitro* regeneration, not existing a regeneration methodology via somatic embryogenesis efficient and reproducible at the present time. This investigation was developed in the Institute of Biotechnology of the Plants of the Central University "Marta Abreu" of Las Villas with the objective of achieving the regeneration of plants of *Phaseolus acutifolius* cv. TB1 to use it in the genetic breeding programmes. Two explantes types were studied: cotyledons and zygotic embryos shoots germinated *in vitro* and several concentrations of 2,4-D, AIA and TDZ in the culture medium. The explantes zygotic embryos shoot germinated *in vitro* showed the biggest capacity for the formation of calli with embryogenic structures when they were placed in a culture medium composed by the salts MS, vitamins Heinz and Mee (1969), 2% sucrose and supplemented with TDZ, and AIA. The solar light with the intensity and duration of the evaluated photoperiod, turned out to be the most favourable for the development of the *in vitro* plants being reached 14% of somatic embryos with complete germination.

Key words: calli formation, growth regulators, *in vitro* regeneration, somatic embryos

# FORMACIÓN DE BROTES POR CULTIVO IN VITRO DE *PENNISETUM PURPUREUM* CV CUBA CT-115

Llanes, L.Y.

Instituto de Ciencia Animal. Carretera Central, Km 47 <sup>1</sup>/<sub>2</sub>, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.  
Código Postal 32700, Apartado Postal 24. e-mail: [lyllanes@ica.co.cu](mailto:lyllanes@ica.co.cu)

## RESUMEN

El clon CT-115, perteneciente a la especie *Pennisetum purpureum*, ha sido ampliamente utilizado en la producción animal debido a su alta producción de biomasa en época de seca. Sin embargo, esta planta presenta el inconveniente de poseer una baja digestibilidad de materia seca en estados avanzados de su desarrollo lo que afecta negativamente sus índices productivos. Una forma de contrarrestar esta situación es obtener plantas mejoradas a través de la transformación genética de este carácter. Un requisito indispensable para emplear esta metodología es contar con un sistema eficiente de regeneración *in vitro* de *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-115. En este trabajo se estudió la posibilidad de establecer un sistema de regeneración *in vitro* para esta planta. Se partió de un sistema empleado en caña de azúcar que permite la obtención temprana de gran cantidad de brotes por callo. Como explantes se utilizaron discos de hojas inmaduras de la región apical. Los mismos se establecieron en medio MS en presencia del regulador ácido naftalén acético para la formación de callos. Transcurrida una semana, los explantes se transfirieron a medio MS suplementado con ácido indol acético y kinetina. Cuando se utilizaron altas concentraciones de ácido naftalén acético solo se produjeron raíces. Al disminuir la cantidad de esta auxina se logró, al cabo de las tres semanas, la regeneración de brotes vigorosos que dieron lugar a la formación de plantas. Aunque no se obtuvo un número considerable de brotes por explante, se demostró la posibilidad de obtener plantas a partir de la metodología empleada.

Palabras clave: CT-115, cultivo *in vitro*, formación de brotes, inducción de callos

## ABSTRACT

Clone CT-115, pertaining to the *Pennisetum purpureum* specie, has been used widely in the animal production due to its high production of biomass in the dry season. Nevertheless, this plant has the disadvantage of having a low digestibility of dry matter in advanced stages of its development which affects its productive indices negatively. A form to fight against this situation is to obtain plants improved through the genetic transformation of this character. An indispensable requirement to use this methodology is to have an efficient system of *in vitro* plant regeneration of *Pennisetum purpureum* cv Cuba CT-115. In this paper, the possibility of establishing an *in vitro* plant regeneration system for this plant was studied. We started from a system used in sugar cane that allows the early obtaining of large amount of shoots by callus. As explants, discs of immature leaves of the apical region were used. They were established on MS medium in the presence of naphthalene acetic acid regulator for the formation of calluses. After one week, the explants were transferred to MS medium supplemented with indol acetic acid and kinetin. When high concentrations of naphthalene acetic acid were used, there was production of roots only. By decreasing the amount of auxin, the regeneration of the vigorous shoots was achieved after three weeks, producing the formation of plants. Although a considerable number of shoots was not obtained by explant, the possibility of obtaining plants from the methodology used was proved.

Key words: callus induction, CT-115, *in vitro* culture, shoots formation

# FORMACIÓN DE CALLOS EN *PHASEOLUS VULGARIS* L CV. TURRIALBA- 4 CON THIDIAZURON Y ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Jorge Pérez Pérez<sup>\*1</sup>, Lourdes García Rodríguez<sup>2</sup>, Rafael Gómez Kosky<sup>2</sup>, Idalmis Bermúdez Caraballos<sup>2</sup>, Yenis Padrón Montesino<sup>2</sup>, Damaris Torres Rodríguez<sup>2</sup> y Carlos Romero Quintana<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Universidad de Granma, Carretera a Manzanillo, km 17, Peralejo, Bayamo. CP 85100, Granma. e-mail: [jorge.perez@udg.co.cu](mailto:jorge.perez@udg.co.cu)

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

## RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) juega un rol importante en la sostenibilidad de la agricultura y en el suplemento proteico en los países en desarrollo. En esta especie se ha intentado establecer un procedimiento eficiente de regeneración *in vitro* y transformación genética en algunas variedades. Sin embargo, los resultados obtenidos en la embriogénesis somática no han sido exitosos. Este trabajo tuvo como objetivo lograr la formación de callos con estructuras embriogénicas en *Phaseolus vulgaris* L. cv. Turrialba-4 con empleo de los reguladores del crecimiento Thidiazurón (TDZ) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Se utilizaron como explantes cotiledones de semillas maduras germinadas *in vitro* en medio de cultivo con las sales MS. En los medios de cultivo que contenían 2,4-D se obtuvieron callos voluminosos y no compactos, mientras que los formados en los medios de cultivo que contenían TDZ (0.20 mg.l<sup>-1</sup>) eran menos voluminosos, compactos y con formación de estructuras embriogénicas.

Palabras clave: estructuras embriogénicas, medio de cultivo, reguladores del crecimiento

## CALLUS FORMATION FROM *PHASEOLUS VULGARIS* L CV. TURRIALBA- 4 WITH THIDIAZURON AND 2,4-DICHLOROPHENOXIACETICO ACID USE

## ABSTRACT

Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) play a crucial role in the sustainability of agricultural systems and in food protein supply in developing countries. In this species it has been tried to establish an efficient procedure of *in vitro* regeneration and genetic transformation in some varieties. However, the results obtained in the somatic embryogenesis have not been successful. This work had like objective to obtain callus formation with embryogenic structure in *Phaseolus vulgaris* L. cv. Turrialba-4 with growth regulators Thidiazuron (TDZ) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Mature cotyledon explants germinated *in vitro* seeds in culture medium with salts MS. In the culture medium with 2,4-D obtained voluminous and non compact callus, whereas the formed in the culture medium that contained TDZ were less voluminous, compact and with formation of embryogenic structures to 0.20 mg.l<sup>-1</sup>.

Key words: culture medium, embryogenic structures, growth regulator



# MULTIPLICACIÓN DE ATRAPAMOSCAS DE VENUS (*DIONAEA MUSCIPULA* ELLIS)

Jorge A. Vilchez. P<sup>1</sup>.\*; Nilca R. Albany V<sup>1</sup>. y Orlek Ferrer<sup>1</sup>, Leyanis García<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Lab. De Cultivo de Tejidos. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia. AP 15205. Maracaibo, Edo. Zulia. (4005ZU), Republica Bolivariana de Venezuela. Telf: 58-261-7597140. e-mail: [jvilchezp@luz.edu.ve](mailto:jvilchezp@luz.edu.ve)

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV). Carretera a Camajuní Km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba CP 54830. Fax: 53-422-81329. e-mail: [leyanis02@yahoo.es](mailto:leyanis02@yahoo.es)

## RESUMEN

La *Dionea muscipula* Ellis, sin duda es la de mayor importancia de las plantas carnívoras por ser activa y muy atractiva, aunado a las recientes investigaciones en el campo de la medicina por las posibilidades de uso en el tratamiento contra el cáncer. La obtención y multiplicación de esta especie se encuentra limitada por la rápida pérdida de la viabilidad de sus semillas. Con la finalidad de evaluar la fase de multiplicación (FM) se estudió el efecto de tres concentraciones (0.25; 0.5 y 1 mg L<sup>-1</sup>) de kinetina (K) y un control sin regulador sobre el coeficiente de multiplicación y altura del brote (CM y AB, respectivamente). Así como el efecto del estado físico del medio de cultivo (sólido, líquido en agitación y en sistema de inmersión temporal (SIT)) sobre el CM y la AB. En la FM, después de 8 semanas de cultivo los análisis estadísticos sólo mostraron diferencias para el CM (11.5) con la aplicación de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de K. Se logró un CM de 22.3 en SIT y la mayor AB en medio de cultivo líquido en agitación.

Palabras clave: *Dionaea muscipula* Ellis, Kinetina, plantas insectívoras, RITA, sistema de inmersión temporal

## VENUS FLY TRAP (*DIONAEA MUSCIPULA* ELLIS) MULTIPLICATION

### ABSTRACT

The *Dionea muscipula* Ellis is the most important carnivorous plants due to its activity and attractiveness, besides its usages in medicine as treatment against cancer. The obtaining and multiplication of this species is limited by the quick lack of seed viability. The effect of four concentration of Kinetin (K) (0, 0.25; 0.5 and 1 mg) and three physical stage of culture media [solid, liquid in agitation, temporal immersion system (TIS)] on the coefficient of multiplication (CM) and height of the shoot (HS) were studied to evaluate the multiplication phase (MP). There was significant difference for CM (11.5) when 0.5 mg L<sup>-1</sup> of K after 8 weeks of culture. A CM value of 22.3 was obtained in the TIS and the large HS was obtained using the liquid media with agitation.

Keywords: *Dionaea muscipula* Ellis, insectivorous plant, kinetin, RITA®, temporary immersion system

# REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *STEVIA REBAUDIANA* MEDIANTE ORGANOGÉNESIS DIRECTA A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES

Martínez R. Diego<sup>\*1</sup>, Monsalve F Zulma<sup>1</sup>, Urrea Aura I<sup>1</sup>, Jiménez G. Elio<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Universidad de Antioquia, Laboratorio de Biología Molecular de Plantas. Medellín- Colombia. e-mail: [drivilla2001@yahoo.es](mailto:drivilla2001@yahoo.es)

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

## RESUMEN

*Stevia rebaudiana* Bert es una planta perteneciente a la familia *Asteraceae*, nativa del Paraguay, también conocida como "hierba dulce", "hoja de miel" o simplemente *Stevia*, cultivada en diferentes países alrededor del mundo. Produce en sus hojas varios edulcorantes de alta potencia y bajos en calorías que pueden ser entre 30 y 320 veces más dulces que el azúcar sin efectos secundarios de riesgo para humanos, haciendo de esta planta una especie de gran valor económico en el mercado mundial de los edulcorantes y endulzantes naturales. La regeneración de plántulas mediante organogénesis o embriogénesis somática indirecta a partir de explantes foliares ha sido descrita anteriormente en esta especie. Sin embargo, no existen antecedentes de regeneración directa en *Stevia rebaudiana*. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo para la regeneración de plántulas mediante organogénesis directa a partir de segmentos foliares de plántulas cultivadas *in vitro*, el cual pudiera ser empleado en los programas de transformación genética de *Stevia rebaudiana*. Los explantes fueron cultivados en medio Murashige y Skoog (MS) con diferentes concentraciones de bencil amino-purina (BAP 0 – 2.5 mg/L) sola y en combinación con ácido indol-acético (IAA 0, 0.5 y 1.0 mg/L). La adición de BAP en una concentración de 2.5 mg/L al medio de cultivo MS fue suficiente para inducir una organogénesis directa, con porcentaje de regeneración de 65% y promedio 5.5 brotes/explante. La posterior elongación y propagación de los brotes formados se logró en medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento y 30 g/L de sacarosa. No se observaron cambios en el fenotipo de las plántulas regeneradas.

Palabras clave: bencil amino-purina, edulcorantes, cultivo *in vitro*, esteviosidos

## PLANT REGENERATION OF *STEVIA REBAUDIANA* FROM LEAVES EXPLANTS BY DIRECT ORGANOGENESIS

### ABSTRACT

*Stevia rebaudiana* Bert (*Asteraceae*) is a perennial herb, native from Paraguay also well-known like "grass sweet", "leaf of honey" or simply *Stevia*, cultivated in different countries around the world. It produces in his leaves several low sweeteners of high power and low calories that can be between 30 and 320 times sweeter than sugar without indirect effect of risk for humans, it does of this plant a species of great economic value to world market of switeners and natural edulcorants. Plant regeneration in *Stevia rebaudiana* from leaves explants has been obtained previously by indirect organogenesis, from callus phase or by somatic embryogenesis using different growth regulators. Our aim was to establish a protocol for plants regeneration from leaves explants in order to used this system in genetic transformation of *Stevia rebaudiana*. An efficient method for plant regeneration in *Stevia* by direct organogenesis was established using leaves segments of plants cultivated *in vitro* conditions. Leaves were cultivated in Murashige and Skoog (MS) media with different bencil amino-purine (BAP) concentrations (0 – 2.5 mg/L) alone or in combination with indol-acetic acid (IAA 0, 0.5 and 1.0 mg/L). Addition of 2.5 mg/L BAP to MS medium was able to induce a direct organogenesis, regeneration was 65% and an average of 5.5 shoots per explant. Elongation and propagation of shoots was achieved in MS media without growth regulators and 30 g/L of sucrose. Appreciable changes in the phenotype of regenerated plantlets were not observed.

Key words: bencil amino-purine, edulcorants, *in vitro* culture, steviosids

# ALTERNATIVA DE SUSTITUCIÓN DE LA KINETINA POR EL BRASINOESTEROIDE BB-6 EN EL ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE LA PAPAYA (*CARICA PAPAYA* L., CV. MARADOL ROJA)

## KINETINA SUBSTITUTE ALTERNATIVE FOR BB-6 BRASINOESTEROIDE IN PAPAYA (*CARICA PAPAYA* L., CV. MARADOL ROJA) *IN VITRO* ESTABLISHMENT AND GROWTH

Ariannys Roque López<sup>1\*</sup>, Miriam Núñez Hernández<sup>2</sup>, Eduardo Héctor Ardisana<sup>3</sup>, Miriam Isidró Pérez<sup>3</sup>, Antonio Torres García<sup>3</sup>, Solvig Rodríguez Troche<sup>3</sup>, Lianette Godoy del Pozo<sup>4</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro Universitario de Las Tunas. Ave. Carlos J. Finlay s/n. Las Tunas. Cuba. [ariannys@isch.edu.cu](mailto:ariannys@isch.edu.cu)

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas

<sup>3</sup>Universidad Agraria de La Habana.

<sup>4</sup>Instituto de Normalización.

### RESUMEN

En el presente trabajo se tomaron segmentos nodales de plantas jóvenes de papaya (*Carica papaya* L.)cv. Maradol Roja para el establecimiento y multiplicación *in vitro*. El medio de cultivo empleado fue el MS modificado (Roque *et al.*, 2001) suplementado con 30.0 g. L<sup>-1</sup> de sacarosa. Como soporte se empleó en el establecimiento papel de filtro y en la multiplicación Agar (7.0 g. L<sup>-1</sup>). Para sustituir la mitad y la totalidad de las concentraciones de kinetina empleadas en la metodología propuesta por Roque *et al.* (2001) se empleó 0.02 y 0.1 µmol.L<sup>-1</sup> de BB-6, según lo recomendado por Rodríguez (1999) en el cultivo *in vitro* del plátano (*Musa sp.*), y la combinación de estas concentraciones con 1.1 µmol.L<sup>-1</sup> de kinetina en el establecimiento y multiplicación. En esta última etapa se añadió además 2.88 µmol.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. Se realizaron evaluaciones en el comportamiento de la morfogénesis *in vitro*. Los datos se procesaron por un ANOVA con ayuda del paquete estadístico STATGRAPHIC. Los resultados muestran que es posible sustituir totalmente la kinetina por el brasinoesteroide BB-6.

Palabras clave: brasinoesteroide, *in vitro*, papaya

# CRIOCONSERVACIÓN DEL HÍBRIDO IBP 99-42 DE PAPAYA

Karel Ismar Acosta<sup>2</sup>, Leyanis García Águila<sup>1\*</sup>, Rafael Gómez Kosky, <sup>1</sup>Laisyn Posada, <sup>1</sup>Jorge Gallardo, <sup>1</sup>Marisol Tejeda, <sup>1</sup>Yelenys Alvarado y <sup>1</sup>Marisol Freire. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>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: [leyanis02@yahoo.es](mailto:leyanis02@yahoo.es)

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Centro Universitario Vladimir I Lenin. Las Tunas. Cuba. CP. e-mail: [karelap@ult.edu.cu](mailto:karelap@ult.edu.cu)

## RESUMEN

La conservación de genotipos híbridos de papaya (*Carica papaya* L.) es muy importante para los programas de mejora genética y la propagación de plantas. Con el objetivo de conservar el híbrido de papaya IBP 99-42 se desarrolló un protocolo de criopreservación de ápices de plantas *in vitro*. Para ello, se precultivaron las plantas donantes durante 14 días en 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y se extrajeron ápices de 2.0 mm longitud con la presencia de dos a tres primordios foliares. La solución vitrificadora PVS2 propició mejor deshidratación de los ápices en un tiempo de inmersión de 40 minutos previo a la inmersión en nitrógeno líquido (NL). La recuperación de los ápices después de 10 días en NL fue posible con la descongelación a 40°C y la incorporación a las condiciones normales de crecimiento en medio de cultivo de multiplicación. A los 90 días el número de brotes por planta fue similar a las plantas no criopreservadas.

Palabras clave: ápices criopreservados, PVS2, recuperación, papaya

# EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE 6-BAP Y TIPO DE EXPLANTE EN LA MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *HYLOCEREUS PURPUSII*

Daniel Rojas Bravo<sup>2\*</sup>, Manuel de Faria Silva<sup>1</sup>, Mireya Reyna Villela<sup>2</sup>, Elisa Quiala Mendoza<sup>1</sup>, Maité Chávez Milian<sup>1</sup>, Alberto Taylor Preciado<sup>2</sup>, Domingo Ruvalcaba Ruiz<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115. C.P. 47820, Ocotlán, Jalisco, México. e-mail: [drojas@cuci.udg.mx](mailto:drojas@cuci.udg.mx)

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de cuatro concentraciones de 6-BAP y dos tipos de explantes en la multiplicación *in vitro* de Pitahaya púrpura. Como material vegetal se emplearon brotes con dos subcultivos en fase de multiplicación y una longitud aproximada de 5.0 centímetros, los cuales fueron seccionados de manera transversal por la mitad para obtener un explante que fue denominado ápice y otro como base. Ambas secciones fueron combinadas con cuatro concentraciones de 6-BAP (0.0, 2.22, 4.44, 6.66  $\mu\text{M.l}^{-1}$ ) y se evaluó cada seis días y hasta los 60 días de cultivo la aparición de brotes en cada uno de los ocho tratamientos. Se observó que independientemente al tipo de explante, a medida que se incrementó la concentración de 6-BAP, se produjo un mayor número de brotes. Sin embargo, en los explantes considerados como ápices se logró que casi la totalidad de las yemas axilares localizadas en las areolas de los brotes se diferenciaron y como promedio en este tipo de explante se produjo 3.48 brotes más que en los explantes considerados como bases, en los cuales, fundamentalmente se activaron las yemas axilares que se encontraban en la zona del explante que estaba en contacto con el medio de cultivo. Como mejor concentración de 6-BAP se seleccionó la de 4.44  $\mu\text{M.l}^{-1}$ , ya que permitió utilizar tanto los explantes considerados como ápice o base, al no existir diferencias estadísticas en cuanto al número de brotes que se obtuvieron (9.15 por 8.8 respectivamente). Sin embargo, si bien es cierto que con 6.66  $\mu\text{M.l}^{-1}$  de 6-BAP se alcanzaron los mayores valores en cuanto al número de brotes para ambos tipos de explantes (23 en los ápices y 12.6 en las bases), también se observó que en este tratamiento se produjeron brotes a partir de yemas adventicias y se apreció la formación de callos en algunos explantes, además, los brotes que se formaron apenas se desarrollaron, lo cual hizo más difícil su manejo *in vitro* al momento de realizar los subcultivos.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, reguladores del crecimiento, pitahaya

Key words: growth regulators, multiplication rate, pitahaya

# **EFFECTO DE LAS AUXINAS Y CITOQUININAS SOBRE EXPLANTES NODALES E INTERNODALES EN LA CALLÓGENESIS DE *TROPAEOLUM TUBEROSUM* (R. AND P.) “MASHUA”**

Sánchez, DF\*, Huamaní K, Pascual E, Rodríguez I, Sánchez H, Estrada R. \*Autor para correspondencia.

Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. e-mail: [Dfavo666@hotmail.com](mailto:Dfavo666@hotmail.com)

## **RESUMEN**

La mashua es una planta herbácea, forma tubérculos y es parte de la alimentación en ciertas poblaciones altoandinas rurales. Presentan propiedades medicinales, antibacteriales, insecticidas y nematocidas, resisten bajas temperaturas y plagas, con dos importantes limitaciones, un sabor amargo de los tubérculos debido a la presencia glucosinolatos y la segunda es la sensibilidad al ataque de virus afectando su producción. Con el cultivo de tejidos podemos vencer estos inconvenientes, realizando trabajos de selección de plántulas con características deseables a través de la regeneración indirecta vía cultivo de callos. El objetivo fue evaluar el efecto de cuatro reguladores del crecimiento sobre explantes de mashua a fin de obtener una buena inducción de callos en un menor tiempo posible. Segmentos nodales e internodales de plántulas *in vitro* de mashua fueron sembrados en medios de inducción de callos, medio MS semisólido suplementado con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento (2,4-D, ANA, BAP y Kinetina), el pH se ajustó a 5.8 incubándose a  $18 \pm 2$  °C, 16 horas luz y 2000 lux por 4 semanas. Se logró la inducción de callos en ambos explantes, el porcentaje de inducción fue dependiente del tipo de explante y del tipo de regulador utilizado. El mayor porcentaje de inducción de callos para los explantes nodales se observó en los medios MS + 2,4-D (1mg/L) + BAP (1mg/L) y MS +2,4-D (2mg/L) + BAP (1mg/L) y para los explantes internodales en los medios MS + 2,4-D (0.5mg/L) + BAP (1mg/L) y MS + 2,4-D (1mg/L) +BAP (1mg/L), luego de 4 semanas de sembrados. Se espera inducir un mayor volumen de callos aumentando las concentraciones de auxinas (5-10 mg/L) o realizando subcultivos de los callos ya inducidos a intervalos de dos semanas, con el fin de poder obtener un buen protocolo de inducción de callos en plántulas de mashua.

Palabras clave: inducción de callos, mashua, reguladores del crecimiento

Key words: callus induction, mashua, plant growth regulators

# **EFFECTO DEL PULSO LIQUIDO SOBRE LA MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE ZABILA (*ALOE VERA* L.).**

Ferrer, O.\* Chacín, P. Albany, N. Vilchez, J. \*Autor para correspondencia.

La Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Maracaibo–Venezuela. e-mail: [orlekferrer@yahoo.com](mailto:orlekferrer@yahoo.com)

## **RESUMEN**

En la actualidad existe un incremento en las superficies sembradas en el país, debido a la sustancial demanda de los productos de la zábila en el mercado nacional e internacional. Esto implica la necesidad de mejorar el rendimiento y calidad, mediante la introducción de tecnologías de producción eficientes. Por ello se estudio efecto del pulso liquido sobre la multiplicación *in vitro* de zábila, para lo cual se utilizaron vitroplantas de zábila en crecimiento; las cuales se colocaron en inmersión en una solución de 25 mg.L<sup>-1</sup> de Kinetina y 50mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP durante 90, 60 y 30 min y control sin inmersión. Luego se colocaron en medio de multiplicación constituido por 50% de las sales MS, 1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 100 mg.L<sup>-1</sup> mioinositol, 25 mg.L<sup>-1</sup> de cisteina, 100 mg.L<sup>-1</sup> ácido ascórbico, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 7 g.L<sup>-1</sup> de agar; ajustando el pH a 5,8. Las vitroplantas crecieron a una temperatura de 26°C y bajo luz blanca fluorescente (150umol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) constante. Las variables evaluadas fueron número de brotes por vitroplanta, altura de vitroplanta y altura de brotes de las vitroplantas. El diseño experimental fue totalmente al azar y el cual se analizo estadísticamente mediante un modelo completamente aleatorizado. A los 30 días de cultivo, el análisis estadístico detecto efectos para las variables evaluadas. Se concluye que el mejor tiempo de inmersión es de 30 min.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, pulso liquido, zábila

# EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA EN ANTURIO (*ANTHURIUM ANDRAEANUM* LIND.) VARIEDAD 'LAMBADA'

Nydia del Rivero Bautista<sup>1\*</sup>, Daniel Agramonte Peñalver<sup>1</sup>, Raúl Barbón Rodríguez<sup>1</sup>, Wilder Camacho Chiu<sup>2</sup>, Martha Pérez Peralta<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>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 54830.

<sup>2</sup>Dirección General Tecnológica Agropecuaria. Carretera Cumuapa, Cunduacán, Tabasco, México. e-mail: delriverobautista@yahoo.com.mx

## RESUMEN

La embriogénesis somática es de los procesos de la morfogénesis *in vitro* de mayor actualidad por su aplicación tanto en la propagación masiva de plantas como para el mejoramiento genético. El *Anthurium* es el género de las *Araceae* más importante en el mercado mundial como flores de corte y maceta. El objetivo del trabajo fue lograr la embriogénesis somática indirecta. Como explantes iniciales se utilizaron segmentos de hojas de aproximadamente 1.0 cm<sup>2</sup> de plantas *in vitro*, obtenidas por organogénesis indirecta. Se emplearon dos medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) y Nitsch y Nitsch modificados y suplementados con tiamina 0.4 mg.L<sup>-1</sup>, mioi-inositol 100 mg.L<sup>-1</sup> y sacarosa 3%. Para la inducción de callos se estudiaron cuatro concentraciones 2.26, 4.52, 6.79 y 9.05 µM 2,4-D manteniendo constante 2.32 µM kin. Se evaluó porcentaje de formación de callos. En la formación y diferenciación de los embriones somáticos se emplearon los medios de cultivo descritos anteriormente. Se compararon tres concentraciones 2.22, 4.44 y 6.66 µM 6-BAP y un control. La variable evaluada fue porcentaje de explantes con formación de embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF) y embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF). Los resultados mostraron una interacción significativa entre los medios de cultivo y los reguladores de crecimiento. En los medios de cultivo MS y Nitsch y Nitsch los mayores porcentajes de formación de callos se obtuvieron con una concentración de 6.79 µM 2,4-D, con diferencias entre los tratamientos. La mayor formación y diferenciación de embriones somáticos de alta frecuencia se obtuvo al emplear 4.4 µM 6-BAP en los medios de cultivo MS y Nitsch y Nitsch; aunque, difirió con los otros tratamientos. En la formación de embriones somáticos de baja frecuencia los mayores valores se encontraron con concentraciones de 2.2 y 4.4 µM 6-BAP en el medio de cultivo MS y Nitsch y Nitsch.

Palabras clave: organogénesis, plantas *in vitro*, propagación



# EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE LIMBOS FOLIARES EN EL CULTIVO DEL BONIATO (*IPOMOEA BATATAS* (L.) LAM.)

Orlando González Paneque<sup>1\*</sup>, María M. Hernández Espinosa<sup>2</sup>, Juan J. Silva Pupo<sup>1</sup>, Mirtha López Machado<sup>2</sup>, Silvia montes Cruz<sup>2</sup>, Angel Espinosa Reyes<sup>1</sup>, y Luis M. González Núñez<sup>3</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Apdo. 21, Bayamo, CP.: 85100, Granma, Cuba, e-mail: [ogpaneque@udg.co.cu](mailto:ogpaneque@udg.co.cu)

<sup>2</sup>Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP.: 32700, Cuba.

<sup>3</sup>Departamento de Técnicas Nucleares, Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", Bayamo, Granma, Cuba.

## RESUMEN

La embriogénesis somática constituye en la actualidad una vía rápida y eficiente para la micropropagación de plantas mediante el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Por ello el objetivo de establecer la micropropagación del Boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), mediante la embriogénesis somática, se tomaron explantes de limbos foliares de brotes jóvenes de los clones CEMSA 78-354, INIVIT B 90-1, INIVIT B 93-1, Yabú-8 y Jewel. Los mismos se tomaron a partir de brotes de raíces tuberosas colocadas en frascos con agua y se emplearon explantes de los limbos foliares colocados en contacto con el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962). La mayor efectividad para la formación de los callos potencialmente embriogénicos se obtuvo en el medio de cultivo con 2,4-D (0.50 mg.L<sup>-1</sup>) y 6-BAP (0.25 mg.L<sup>-1</sup>), la formación de los embriones somáticos con 2,4-D (0.2 mg.L<sup>-1</sup>), la maduración con ABA (1.0 mg.L<sup>-1</sup>), la germinación con TDZ (0.25 mg.L<sup>-1</sup>) y la conversión en plántulas con GA<sub>3</sub> (10.0 mg.L<sup>-1</sup>) y finalmente se llevó a cabo la aclimatización de las vitroplantas obtenidas.

Palabras clave: callos, plantas *in vitro*, reguladores del crecimiento

# **EMPLEO DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE YUCA (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ)**

Víctor Medero<sup>1\*</sup>, Rafael Gómez<sup>2</sup>, Carlos Borroto<sup>3</sup>, Sergio Rodríguez<sup>1</sup>, Marilyn Martínez<sup>1</sup>, Milagros Basail<sup>1</sup>, Jorge López<sup>1</sup>, Magaly García<sup>1</sup>, José de la C. Ventura<sup>1</sup>, Manuel Cabrera<sup>1</sup>, Carmen Pons<sup>1</sup>, Aymé Rayas<sup>1</sup>, Arletys Santos<sup>1</sup>, José A. Cruz<sup>1</sup>, Miguel Álvarez<sup>1</sup> y Jesús García<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo. 6, Santo Domingo, CP: 53000, Villa Clara, Cuba. e-mail: [vmedero@inivit.co.cu](mailto:vmedero@inivit.co.cu)

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara. Villa clara, Cuba CP 54830

<sup>3</sup>Centro de Ingeniería genética y biotecnología (CIGB). Ciudad de La Habana, Cuba.

## **RESUMEN**

El trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Se utilizaron los clones 'CMC-76' y 'CEMSA 74-725' procedentes del banco de germoplasma del INIVIT. El objetivo principal consistió en aplicar el sistema de inmersión temporal tipo RITA<sup>®</sup> para incrementar los porcentajes de germinación de los embriones somáticos. Se evaluó el efecto de la densidad de agregados embriogénicos por RITA y el tiempo de inmersión de los mismos. Se utilizó como control la germinación de los embriones somáticos en medio de cultivo semisólido. Como resultado se obtuvo un 52.8% de germinación de los embriones somáticos en medio de cultivo semisólido y un 91.7% con el empleo del sistema de inmersión temporal tipo RITA<sup>®</sup>.

Palabras clave: agregados embriogénicos, RITA<sup>®</sup>, tiempo de inmersión

# GERMINACIÓN Y ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *HYLOCEREUS PURPUSII* A PARTIR DE SEMILLAS BOTÁNICAS

Manuel de Feria Silva<sup>1\*</sup>, Daniel Rojas Bravo<sup>2</sup>, Elisa Quiala Mendoza<sup>1</sup>, Mireya Reyna Villela<sup>2</sup>, Maité Chávez Milian<sup>1</sup>, Alberto Taylor Preciado<sup>2</sup>, Domingo Ruvalcaba Ruiz<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5. ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail: [mdeferia@yahoo.es](mailto:mdeferia@yahoo.es)

<sup>2</sup>Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115, C.P. 47820, Ocotlán, Jalisco, México.

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del hipoclorito de sodio, el tiempo de inmersión de las semillas en este producto y la concentración de las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog sobre la germinación y establecimiento *in vitro* de plantas de Pitahaya púrpura obtenidas a partir de semillas botánicas. Al evaluar todos los experimentos se determinó que el mayor número de semillas germinaron entre el octavo y noveno día de cultivo. La inmersión de las semillas durante 15 minutos en tres concentraciones de hipoclorito de sodio (1.0, 1.5, 2.0%) demostró que tanto el número de semillas que germinaron como el número de plantas que se establecieron *in vitro* disminuyeron a medida que se incrementó la concentración de hipoclorito de sodio. Los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento con 1.0% de hipoclorito de sodio y 15 minutos, con 89.7% de germinación y 76.5% de establecimiento de plantas *in vitro*. Al combinar diferentes tiempos de inmersión (5.0, 10, 15 minutos) con 1.0% de hipoclorito de sodio, se observó que no hubo diferencias estadísticas en la germinación y establecimiento *in vitro* de las plantas. Sin embargo, en el tratamiento con 5.0 minutos y 1.0% se presentó un 1.3% de contaminación microbiana, con lo cual se determinó utilizar el tratamiento con 1.0% de hipoclorito de sodio y 10 minutos, como el mejor tratamiento para desinfectar, germinar y establecer *in vitro* plantas de esta especie. Se demostró que con un 125% de sales MS en el medio de cultivo, se afectó la germinación de las semillas y no se logró establecer plantas *in vitro*, por otro lado, aunque no hubo diferencias estadísticas entre los resultados obtenidos para la germinación entre los tratamientos con 25, 50, 75 y 100% de sales MS en el medio de cultivo, al emplear estas diferentes concentraciones, si se afectó el establecimiento *in vitro* y el mejor resultado (80%) se alcanzó con el 100% de las sales MS.

Palabras clave: desinfección, germinación, pitahaya

Key words: disinfection, germination, pitahaya

# IMPORTANCIA DE LOS BANCOS DE GERMOPLASMA PARA LA CONSERVACIÓN DE PLANTAS MEDICINALES

Trujillo, I<sup>1</sup>; Salazar, E<sup>2</sup>; \*; Oropeza, Maira<sup>3</sup>; Albarrán, G<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Centro de Estudios de Agroecología Tropical (CEDAT). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez". Apartado 47925. Caracas 1010. e-mail: [jarn1234@telcel.net.v.e](mailto:jarn1234@telcel.net.v.e)

<sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal Instituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. e-mail: [moropeza@strix.ciens.ucv.ve](mailto:moropeza@strix.ciens.ucv.ve)

<sup>3</sup>Unidad de Biotecnología Vegetal. CENIAP. Instituto de Investigaciones Agrícolas. Maracay

## RESUMEN

Un amplio porcentaje de los recursos fitogenéticos para la alimentación, la agricultura y la salud del mundo son insuficientes y/o están escasamente documentados en comparación con lo que debería saberse de ellos para que la conservación, el acceso y la utilización fueran óptimos. El área de biotecnología vegetal a través de la micropropagación *in vitro* ha proporcionado las bases para el establecimiento de bancos de germoplasma. El establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro* que permita la conservación de especies vegetales utilizadas con fines medicinales, con la mínima alteración del ecosistema donde son ubicadas para su uso, constituye un punto de gran importancia en la conservación de la biodiversidad en diversos ambientes, de este tipo de plantas donde se plantea mantener la estabilidad de las condiciones físicas de un área, manteniendo en su mínima expresión la degradación ambiental. Las colecciones *ex situ*, permiten tener el material conservado con una identificación básica del mismo, como el número de muestra y el nombre taxonómico; dónde y cómo se ha obtenido el material; descripciones de la morfología básica y de los caracteres agronómicos; actuales resultados de la prueba de viabilidad; ciclos de regeneración; donde se ha distribuido el material y la pertinente información etnobotánica y conocimientos de los agricultores y la población local, lo cual adicional a su conservación, permitirá realizar investigación básica en el área de micropropagación de plantas medicinales, caracterización molecular y bioquímica de las plantas micropropagadas con el propósito de establecer sistemas ideales de multiplicación de estas plantas, que permitan su uso a mayor escala, y para ofrecer nuevas alternativas del uso de este tipo de plantas en propuestas eficaces y eficientes en la atención primaria de salud. Con este objetivo, se ha iniciado la conformación del banco de germoplasma en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la UNESR con especies como hierbamora, neem, sábila, mastuerzo, cañafístola, orégano orejón y alcornoque.

Palabras clave: etnobotánica, micropropagación, germoplasma, plantas medicinales, conservación

# INDUCCIÓN DE CALLOS EN SEGMENTOS DE HOJA DE *ANTHURIUM ANDRAEANUM* LIND.

Nydia Del Rivero<sup>1\*</sup>, Daniel Agramonte<sup>1</sup>, Raúl Barbón<sup>1</sup> y Wilder Camacho<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara. Villa clara, Cuba CP 54 830. e-mail: [delriverobautista@yahoo.com.mx](mailto:delriverobautista@yahoo.com.mx)

<sup>2</sup>Dirección General de Estudios Tecnológicos Agropecuarios, Carretera Cumuapa Cunduacán Tabasco, México.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue lograr la inducción de callos a partir de segmentos de hojas jóvenes de anturio (*A. andraeanum* Lind.) en tres variedades Lambada, Tropical y Sonate. Para la desinfección del material vegetal se estudiaron tres concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5%) de hipoclorito de sodio (NaClO) durante 10, 15 y 20 minutos. El medio de cultivo utilizado fue el MS modificado, micronutrientes MS, vitaminas MS, 100 mg.L<sup>-1</sup> mio-inositol, 3% sacarosa y 2.0 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite. En la inducción de callos se evaluaron tres concentraciones (0.13, 0.18 y 0.22 mg.L<sup>-1</sup>) de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) y dos concentraciones (1.1 y 2.2 mg.L<sup>-1</sup>) de 6-BAP (bencialaminopurina). Se evaluó el crecimiento de los callos por la escala de Santana (1982) y de forma visual color y apariencia. Los mejores resultados en la desinfección de los explantes se obtuvieron con una concentración de 0.5% de NaClO durante 10 minutos, con un 78.8, 79.5 y 78.3% de supervivencia para las variedades Lambada, Tropical y Sonate, respectivamente. En la inducción de callos la variedad Lambada respondió mejor con 0.18 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D combinado con 1.1 mg.L<sup>-1</sup> de 6BAP, y la variedad Tropical con 0.13 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D y 1.1 mg.L<sup>-1</sup> 6BAP. En la variedad Sonate la callogénesis se favoreció con 0.18 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D y 2.2 mg.L<sup>-1</sup> 6BAP. Con el empleo de este medio de cultivo y las combinaciones de reguladores de crecimiento fue posible obtener callos en las variedades Lambada, Tropical y Sonate lo que permitirá desarrollar protocolos para la propagación de esta especie.

Palabras clave: organogénesis, desinfección *in vitro*, variedades Lambada, Tropical, Sonate

# INDUCCIÓN DE CALLOS EN *CLEOBULIA MULTIFLORA*

Soares, G.A.\*; Dias, A.A.; Lopes, C.A.R.G.; Muzzi, F.C.; Pagano, M.C.; Sá, N.M.H.; Scotti, M.R.M. \*Autor para correspondencia.

Departamento de Botânica/ICB – UFMG. Belo Horizonte/MG, Av. Antônio Carlos 6627 CEP 31.270-010, e-mail: [guasoaes@bol.com.br](mailto:guasoaes@bol.com.br); [mrita@icb.ufmg.br](mailto:mrita@icb.ufmg.br).

## RESUMEN

Entre las especies indicadas para recuperación de pilas de material estéril en las áreas de mineración, se destaca *Cleobulia multiflora* (Leguminosae), especie herbácea, estolonífera y nativa del bioma brasileiro Mata Atlântica. La principal dificultad en la propagación de la misma es obtener semillas viables, debido a la intensa depredación. Además, no existen estudios de cultivo *in vitro* con esta especie. Con el objeto de inducir callos en explantes de *C. multiflora*, se llevaron a cabo dos experimentos. En el primero, explantes foliares de 1 cm<sup>2</sup>, luego de ser desinfectados con Tween 20, etanol 70%, hipoclorito de sodio 2%, Fungizon (250mg/l) y agua destilada autoclavada, fueron inoculados en medio MS suplementado con 2,4-D en 4 concentraciones (0, 1, 2 y 3 mg/l). En el segundo, segmentos foliares y nodales fueron inoculados en medio MS suplementado con diferentes dosis de fungicidas Fungizon®, Priori®, Derosal®, Folicur® y Systhane® y con el antibiótico Rifampicina (250mg/l). Los resultados del primer experimento mostraron que utilizando 2,4-D (3mg/l) y Fungizon, se obtuvo una mayor inducción de callos en *C. multiflora* (56%) a los 12 días de incubación. Ya en el segundo experimento, el Fungizon® controló en un 78% la contaminación de los segmentos foliares, mientras que fue ineficiente para el control de segmentos nodales. Para éstos, la asociación entre los fungicidas Priori® (F1), Derosal® (F2), Folicur® (F3) y Systhane® (F4) junto con el antibiótico rifampicina fue eficiente para inhibir el crecimiento de hongos, pero no de bacterias. La bacteria aislada fue testada en antibiogramas utilizando los últimos 4 fungicidas junto con rifampicina y estreptomycin en las concentraciones de 200, 300 y 400 mg/l. El tratamiento seleccionado para el control de la contaminación fúngica y bacteriana fue el antibiótico rifampicina (400mg/l) aliado a los fungicidas F1, F2 y F4.

Palabra clave: antibiograma, callo, *Cleobulia multiflora*, Mata Atlântica, micropropagación

# **AN OPTIMISED METHOD FOR *IN VITRO* MULTIPLICATION IN SWEETPOTATO – *IPOMOEA BATATAS* (L.) LAM. IN ORDER TO PROMOTE ITS GROWTH IN ROMANIA**

ANA ROSU

University of Agronomic Sciences of Bucharest, Faculty of Biotechnology, Bd. Marasti 59, 011464 Bucharest, Romania. e-mail: [anabiotech@yahoo.com](mailto:anabiotech@yahoo.com)

## **ABSTRACT**

Though sweetpotato is originating from the tropical areas in Latin America, its culture is at present also extended in the temperate zones. The importance of this species for food, animal feed and industrial raw material stimulated the researches for establishing techniques for efficient production of the planting material. The rapid multiplication of sweetpotato by *in vitro* methods guaranties the obtaining of a true-to-type planting material, which is in the same time of the highest sanitary quality, with minimum uses of fertilizers, pesticides, water, space, labour and in a limited time period. The aim of our research was to establish an efficient and reproducible protocol for producing the sweetpotato planting material by biotechnological means. The shoot apices detached from shoots developed from storage roots were cultured on several variants of the MS basal medium supplemented with cytokinins and auxins. The best results were obtained on the variant with 0.3 mg/l NAA and 1 g/l activated charcoal, which stimulated in the same time a good shoot elongation and a well developed root system, thus allowing the vitroplant acclimatization after 2 weeks since culture initiation, in all tested sweetpotato phenotypes. Following the planting in the field the vitroplants fully proved their potential of adaptability, vigorous growth and a good production of storage roots, which recommends this crop to be more promoted in Romania for being cultivated on extended areas in the near future.

Key words: MS – Murashige and Skoog basal medium; NAA – naphthalene acetic acid; vitroplants; storage roots; sweetpotato (*Ipomoea batatas*)

# A PROTOCOL FOR MICROPROPAGATION AND SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *LILIUM LEDEBOURII* (BAKER) BOISS AN ENDEGRADED RARE SPECIES ENDEMIC TO IRAN

Pejman Azadi<sup>1\*</sup>, Morteza KhoshKhoi<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Dept. of Biotechnology, National Research Center of Ornamental Plants, Mahallat. Iran. e-mail: azadip22@yahoo.com.

<sup>2</sup>Dept. Horticulture-Shiraz university, Shiraz - Iran.

## ABSTRACT

The perennial plant *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss (Liliaceae) is an endangered rare species endemic to Iran. It is under surveillance of regional Environmental Protection Agency. Due to the collection of these plants, specially of the underground organs, the number of this species is continuously decreasing. Effect of growth regulators, sucrose concentration and scale segment on bulblet regeneration were investigated in factorial design on the basis of completely randomized with three replication and 12-16 sample for each replication. Also the effect of Picloram, IAA and 2,4-D for somatic embryogenesis of the thin cell layer derived from scale of bulblet were considered. The highest number of bulblets was formed on a MS medium with BA ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) + NAA ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) and 9% sucrose at basal segment. The presence of growth regulators increased fresh weight of bulblets compared with hormone free medium. The highest number of direct somatic embryogenesis was obtained in MS medium containing  $1 \text{ mg l}^{-1}$  IAA with  $1.8 \text{ g l}^{-1}$  gelrite. The bulblets at the end of the culture period were given cold treatment at  $4^\circ\text{C}$  for 8 weeks and then transplanted to a potting mixture of sand, leaf mold and peat moss (1:1:1). The horticultural habits of the cloning plants are being investigated to introduce the germplasm into lily breeding program.

Keywords: conservation, *Lilium*, *In vitro*, regeneration, somatic embryogenesis



# EFFECT OF VARIOUS AMINO ACIDS ON SHOOT REGENERATION OF SUGARCANE

Shaheen Asad<sup>1</sup>, Muhammad Arshad<sup>1\*</sup> and Yusuf Zafar<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Plant Biotechnology Division, P.O Box 577, Jhang Road Faisalabad, Pakistan. e-mail: arshadchbt@yahoo.com

<sup>2</sup>National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering.

## ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum officinarum*) SP-241 embryogenic callus was induced from meristemic explants cultured on MSB (Murashige and Skoog supplemented with B5 vitamins) containing 13.6  $\mu$ M 2-4, dichlorophenoxyacetic acid, 0.05%(w/v) Casein hydrolysate, 10% (v/v) coconut water and 3% glucose. Five concentrations (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mM) of five different amino acids (glutamine, asparagine, glycine, cysteine and arginine) were tested with and without 22.5  $\mu$ M  $\alpha$ -naphthalene acetic acid to compare their ability to induce regeneration from embryogenic callus. After one month on medium, the percentage of shoot meristem induction was evaluated and after 45 days the total number of shoots produced as well as percentage of shoots greater than 1 cm in length was obtained. Although, it had the lowest range, the medium containing cysteine and arginine were found better than all other amino acids tested with the highest %age of shoot meristem induction and largest number of shoots particularly at a concentration of 0.25 mM and 0.5 mM respectively.

Key words: *Saccharum*, Amino acids, shoot meristem, Sugarcane tissue culture



# MEJORA GENÉTICA DE PLANTAS POR BIOTECNOLOGÍA

# **CARACTERIZACION AGROMORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LINEAS ENDOGAMICAS DE MAIZ (ZEA MAYS)**

Daymara Rodríguez<sup>1\*</sup>, Andrés Morales<sup>1</sup>, DrC Miriam Isidró<sup>1</sup>, Lic. Evelyn Valera<sup>1</sup>, Katia Gil<sup>2</sup>, Emigdia Alfaro<sup>2</sup>, June Simpson<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Grupo de Biotecnología Vegetal. Universidad Agraria de La Habana. Autopista Nac. Km 23, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 18-19. e-mail: [maviak@isch.edu.cu](mailto:maviak@isch.edu.cu)

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Genética. CINVESTAV, Unidad de Irapuato. Apdo postal 629, Irapuato, Guanajuato, México.

## **RESUMEN**

Con vistas a obtener material genéticamente adaptado a bajos insumos se realizaron autofecundaciones sucesivas al germoplasma de maíces cultivados en Cuba provenientes de productores, lo que llevó a cuatro líneas endogámicas seleccionadas por su comportamiento favorable en esas condiciones, con color de granos blanco, rojo, amarillo y anaranjado, respectivamente, con las que se desarrolló un ensayo agronómico en condiciones de campo y se aplicaron marcadores moleculares de ADN. La siembra se realizó en un suelo Ferralítico Rojo lixiviado con un diseño de bloques al azar; se evaluaron 20 plantas por réplica mediante el descriptor CIMMYT/IBPGR; para el procesamiento de los datos se aplicó el paquete estadístico ANOVA aplicando la prueba de Duncan para un 95 % de probabilidad. La extracción de ADN para el análisis molecular se realizó a partir de hojas jóvenes mediante un *kit* de la firma Promega. Se aplicó la técnica de AFLP para estudiar el grado de homología entre los materiales. Se emplearon cuatro combinaciones de cebadores (Eco RI+AAG x Mse I+AAG, ECO RI+ AGG y dNTPs) para la amplificación selectiva. En el análisis molecular, a partir de los datos generados, se hizo una matriz de similitud genética y con ella una de distancia genética. A partir de esta última se generó un dendograma con el empleo del método UPGMA. En cuanto al potencial productivo y otros caracteres se destacaron las líneas de granos de color anaranjado y rojos, aunque las cuatro manifestaron buena resistencia y precocidad. En el análisis de los AFLPs, se aprecian dos grupos, uno con la línea de granos color naranja y el otro formado por el resto de los materiales. Futuros estudios agronómicos se encaminarán para evaluar el comportamiento de híbridos y líneas en varias localidades.

Palabra clave: AFLPs, descriptor, líneas autofecundadas, maíz

# EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA EN PLANTAS DEL CLON 'NAVOLEAN' (*MUSA* SPP.) OBTENIDAS POR MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS

Leneidy Pérez Pelea<sup>\*1</sup>, Maria Isabel Román<sup>2</sup>, Jorge López<sup>2</sup>, Clara González<sup>1</sup>, Xonia Xiqués<sup>1</sup>, Alejandro Rojas<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>\*1</sup> Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Calle 25 #455 e/ I y J, Vedado, Plaza, C Habana. e-mail: [lene@fbio.uh.cu](mailto:lene@fbio.uh.cu)

<sup>2</sup> <sup>1</sup> Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo 6, Sto Dgo., Villa Clara, CP 53000. Cuba.

## RESUMEN

Se realizó la evaluación de la estabilidad genética, con el empleo de marcadores citogenéticos y genético-bioquímicos, en plantas del clon de plátanos 'Navolean' (*Musa spp.* grupo AAB) pertenecientes a la colección de plátanos y bananos del Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), obtenidas por embriogénesis somática a partir de domos meristemáticos de multiyemas y de una nueva fuente de explante: domos meristemáticos de yemas brotadas, en comparación con plantas propagadas por organogénesis (ápices meristemáticos) y por el método convencional (por cormos). El análisis citogenético se realizó en raíces de las plantas obtenidas por los diferentes métodos de propagación y permitió determinar que se mantuvo estable el número de cromosomas del clon al encontrar en todas las células analizadas  $2n=3x=33$  cromosomas, lo que confirma su condición triploide. El estudio genético-bioquímico mostró un marcado monomorfismo para los sistemas isoenzimáticos analizados (Peroxidasas, Polifenoloxidasas, Esterasas y Anhidrasa carbónica) para las vitroplantas y las plantas de campo obtenidas por los diferentes métodos de propagación, lo cual demostró que los métodos biotecnológicos utilizados no producen variación genética en el material. Al evaluar los embriones somáticos en distintas etapas del proceso de embriogénesis somática, todos los sistemas isoenzimáticos empleados mostraron un alto grado de polimorfismo y resultaron ser marcadores de las etapas de maduración en este proceso, al observarse bandas propias en los embriones que se encontraban en la fase más avanzada de la maduración.

Palabras clave: domos meristemáticos, marcadores citogenéticos, *Musa spp.*

# **OBTENIÓN Y SELECCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES A LA ROYA DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*PUCCINIA MELANOCEPHALA* H Y P SYDOW. MEDIANTE EL CULTIVO *IN VITRO* Y TRATAMIENTO CON RADIACIONES GAMMA ( $^{60}\text{Co}$ ) DE CALLOS DE LA VARIEDAD DE CAÑA DE AZÚCAR (*SACHARUM* SPP. HÍBRIDO) “SP 70-1284”:**

Orellana PP,\* Valdés BA, García RL., García RN., Bermúdez CI., Padrón MY., Torres D., y Romero QC. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: [orellana05@ibp.co.cu](mailto:orellana05@ibp.co.cu)

## **RESUMEN**

El cultivo de tejidos combinado con la mutagénesis *in vitro* son herramientas útiles para inducir variabilidad y reducir el tiempo en la selección de variedades con adecuadas características productivas y resistentes a enfermedades. Con base en lo anterior se desarrolló en el IBP, en Santa Clara, Cuba y en el campo experimental del Colegio de Postgraduados en Tabasco, México un trabajo de investigación, cuyo objetivo fue la obtención de mutantes resistentes a la roya de la caña de azúcar para esa región de México, a partir del cultivar susceptible “SP 70-1284”. En el IBP se estudió la formación, crecimiento y regeneración adecuada de callos, se emplearon como fuente para inducir variabilidad genética, las radiaciones Gamma ( $^{60}\text{Co}$ ), determinándose como mejor la dosis de 30 Gy aplicada en la fase crecimiento del callo. La selección en fase temprana para la infección por roya y presencia de variaciones fenotípicas, se efectuó durante tres ciclos bajo condiciones semicontroladas en Cuba. Las plantas seleccionadas con respuestas hasta grado 3 a la roya, se evaluaron en campo durante tres ciclos en Tabasco. En las evaluaciones y análisis del comportamiento en varios experimentos en las dos localidades de estudio, tres mutantes mostraron resistencia estable a la roya. De ellos, el mutante 7 por su alta resistencia a la roya y diferencias en algunas características agro morfológicas y genéticas a nivel molecular, pero de bajo potencial productivo con respecto al control, es un nuevo genotipo de utilidad en programas de mejoramiento genético y para estudios de mapeo genético. Los mutantes 2 y 3 con respuesta resistente y características morfológicas similares al control, pueden considerarse mutantes con potencial comercial para la región de Tabasco. Se propone un esquema de trabajo para obtener mutantes resistentes a la partir de genotipos susceptibles a la roya.

Palabras clave: cultivo de tejidos, selección, variabilidad genética