

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

LIBRO DE REPORTES CORTOS

**5^{to} COLOQUIO
INTERNACIONAL
DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL**



Junio 16- 19, 1999

Diseño: D.I. Omar Rojas Martínez
COPEXTEL S.A. Villa Clara

Edición: Yelenys Alvarado Capó
Orlando Gregorio Chaviano

Fotomecánica e impresión: Ediciones GEO.

Instituto de Biotecnología de las Plantas,
1999
Sobre la presente edición:
Instituto de Biotecnología de las Plantas,
1999

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de este libro puede ser reproducida en forma alguna por cualquier sistema electrónico, mecánico, por fotocopia o cualquier otro, sin permiso por escrito de los titulares del copyright.

- © El contenido de los trabajos que aparecen en
este libro es responsabilidad de sus autores.

Instituto de Biotecnología de las Plantas:
Biotecnología Vegetal: Libro de reportes cortos, Quinto Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, 16-19 de Junio, 1999/ Instituto de Biotecnología de las Plantas; Santa Clara, IBP, 1999.

270p., 16x24cm

1-Biotecnología Vegetal
I-Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, Quinto, Santa Clara, 1999

Instituto de Biotecnología de las Plantas
Carretera a Camajuaní, Km. 5 ½. Santa Clara.
Villa Clara. Cuba.
Fax: 53(422) 81329
e-mail: orlando@ibp.edu.cu

ISBN 959-7122-03-0

Impreso en Cuba / Printed in Cuba
200 ejemplares.

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

5to COLOQUIO INTERNACIONAL

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente:

Dr. Andrés Olivera Ranero.
Rector
Universidad Central “Marta Abreu”
de Las Villas.

Vicepresidente:

Dr. Sc. Juan N. Pérez Ponce.
Director
Instituto de Biotecnología de las
Plantas.

Secretario Ejecutivo:

Dr. Rafael Gómez Kosky
Vicedirector científico
Instituto de Biotecnología de las
Plantas.

Miembros:

Yelenys Alvarado Capó
Elio Jiménez González
Daniel Agramonte Peñalver
Rolando Manso Muro
Orlando Gregorio Chaviano
Miguel Suárez Castellá
Jorge Luis Proenza

TEMÁTICAS

1. Saneamiento y diagnóstico de microorganismos patógenos.
2. Mejora por variación somaclonal, mutagénesis y selección *in vitro*.
3. Cultivo de tejidos y células.
4. Embriogénesis somática y semilla artificial.
5. Propagación masiva de plantas.
6. Transformación genética y biología molecular.
7. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro*.
8. Metabolitos secundarios

TABLA DE CONTENIDO

9	Conferencias
	Reportes cortos
25	Saneamiento y diagnóstico de microorganismos patógenos.
35	Mejora por variación somaclonal, mutagénesis y selección <i>in vitro</i> .
62	Cultivo de tejidos y células.
96	Embriogénesis somática y semilla artificial.
133	Propagación masiva de plantas.
197	Transformación genética y biología molecular.
237	Contaminación microbiana en el cultivo <i>in vitro</i> .
246	Metabolitos secundarios
250	
	Resúmenes
261	Indice de materia
262	Indice de autores

C-1 Aplicaciones de la biotecnología vegetal en frutos tropicales: manejo postcosecha y usos como vehículos de inmunización en seres humanos.

Miguel A. Gómez Lim

Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV, Irapuato, Apartado Postal 629.
Irapuato, GTO. México, E-mail: mgomez@irapuato.ira.cinvestav.mx

La maduración de frutos es un complejo proceso de desarrollo, esencial en el ciclo de vida de las plantas. Normalmente hay un incremento dramático en la biosíntesis de etileno, el principal acelerador de la maduración, y en la tasa respiratoria. Estos eventos son solo dos manifestaciones externas de una serie de reacciones internas que reflejan una marcada actividad metabólica. Este proceso se ha estudiado fundamentalmente desde un punto de vista descriptivo y bioquímico. Su importancia radica en el hecho de que la sobremaduración (ablandamiento acelerado) de frutas y hortalizas constituye una de las principales causas de pérdidas económicas en la actualidad en el mundo entero.

Gracias a los estudios efectuados en los últimos años en esta área, se han logrado diseñar estrategias para controlar la sobremaduración, por ejemplo con el uso de cámaras con atmósferas controladas. Sin embargo, en la actualidad el uso de la biología molecular en el área de la fisiología postcosecha ha contribuido al control de este fenómeno de una manera sin precedentes.

Las estrategias basadas en el uso de la biotecnología, emplean la información genética de las enzimas que producen etileno, el agente responsable de la sobremaduración. Por medio de la transformación genética se producen plantas con frutos que no producen etileno o producen muy poco. La aplicación de etileno exógeno restaura el patrón normal de maduración. Esta estrategia es aplicable en potencia a cualquier fruto. Actualmente en el CINVESTAV-Irapuato llevamos a cabo un programa encaminado a reducir las pérdidas postcosecha de mango, plátano y papaya por medio de la manipulación genética de la producción de etileno. Los frutos resultantes presentarán maduración controlada.

Por otra parte, muchos grupos de investigación han estado experimentado con plantas transformadas para usarlas como "biorreactores". Se ha demostrado que las plantas pueden utilizarse para producir proteínas de alto valor tales como péptidos para uso terapéutico, anticuerpos, soroalbúmina humana o vacunas orales. Los datos obtenidos indican que el consumo por vía oral de material transgénico conteniendo antígenos induce una respuesta inmune. ¿Qué ventajas tendría el utilizar a frutos como vehículos para aplicar vacunas humanas? La principal ventaja es de tipo económico. Se estima que el costo de producción de vacunas de este tipo sería extremadamente bajo, sobre todo en comparación con los costos actuales. Otra ventaja sería una distribución mucho más fácil y amplia, al no requerir refrigeración. Esto redundaría en menos inactivación de las vacunas. Para este proyecto se escogió al plátano porque es el fruto tropical más popular del mundo y en muchos países es un alimento básico. Por ello no sería difícil lograr su aceptación. Por otra parte el plátano es un cultivo que puede transformarse y regenerarse. En la ponencia se discutirán los últimos resultados y las perspectivas y el potencial de estas líneas de investigación.

C-02 Recent Progress in Banana Biotechnology Research

L. Sági

Laboratory of Tropical Crop Improvement. Catholic University of Leuven, Belgium. Kardinaal Mercierlaan 92
B-3001 Heverlee, Belgium.
Email: laszlo.sagi@agr.kuleuven.ac.be [http:// www.agr.kuleuven.ac.be/dtp/tro/home.htm](http://www.agr.kuleuven.ac.be/dtp/tro/home.htm)

Conventional breeding of banana is hampered by relatively long generation times, sterility and triploidy of most cultivated varieties, which impede successful breeding for resistance against the major diseases and pests caused by fungi (*Mycosphaerella* spp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*), viruses (bunchy top, bract mosaic and streak viruses) and nematodes (*Radopholus similis*, *Pratylenchus* spp., etc.).

Recent developments in biotechnology offer new opportunities in controlling diseases and pests in banana. Regenerable embryogenic cell suspensions have been established from various somatic tissues. Protoplasts have been isolated from cell suspensions and plants have been regenerated at a high frequency. Cryopreservation techniques have been elaborated for long-term storage of cell suspensions and *in vitro* meristems. Genetic transformation of embryogenic cell suspensions and meristematic tissues has led to the production of the first transgenic banana plants.

At present, three systems appear to be feasible for the production of transgenic banana plants: (i) introduction of DNA into regenerable, cell suspension-derived protoplasts by electroporation, (ii) particle bombardment transformation of embryogenic cell suspension cultures, and (iii) *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cells. Using these technologies, more than 1,000 independent transgenic lines have been recently produced from plantain and Cavendish dessert banana cultivars. Large-scale molecular and biochemical characterization confirmed that a vast majority of them contained and expressed the foreign genes. For instance, PCR-screening of in total more than 800 putative transgenic plants revealed that more than 90% of them contained the selectable marker gene. No significant differences were found in this respect between the two cultivars and the different genes used as a selectable marker. Similar results were obtained by Southern blot hybridization which confirmed that the majority of the plants analysed had the selectable marker gene incorporated in their genome. Several hundreds of transgenic lines have been micropropagated for testing the stability and effect of the transgenes in different field environments.

Furthermore, a new group of broad-spectrum antifungal proteins has been found to control pathogenic fungi of banana *in vitro*. Close to 200 individual transgenic plants transformed with gene combinations encoding different antifungal protein genes have been grown in the greenhouse. A simple and reproducible leaf disc bioassay has been developed for the evaluation of resistance to fungal pathogens. A differential disease response has been observed among transgenic plants, which ranges from susceptibility to a high degree of resistance compared to control plants. Computer image capturing and software based area calculation allowed for the precise measurement of the infected leaf area and for the classification of the level of resistance of each transformant.

In view of the progress mentioned above, it can be expected that genetic improvement by transformation will, in the near future, contribute to the production of disease and/or pest resistant bananas with improved quality both for local consumption and commercial production.

C-03 Bases fisiológicas del envejecimiento y revigorización vegetal.

R. Rodríguez; M.I Centeno; M.J.Cañal; B. Fernández y M F Fraga.

Instituto de Biotecnología de Asturias (Asociado al CSIC), E-33071 Oviedo, España. Fax N° 34-7-5104867, E-mail: rrodri@sci.cpd.uniovi.es
Lab. Fisiología Vegetal, Dpto. B.O.S., Facultad de Biología Universidad de Oviedo, España.

Cambio de fase (Brink, 1962), envejecimiento ontogénico (Fortanier y Jonkers, 1976), envejecimiento de meristemas (Olesen, 1978) y maduración (Pierik, 1990) son términos que se refieren a la transición fase juvenil-fase adulta. Leopold (1975) utilizó el término maduración para referirse a la transición a fase madura, y envejecimiento para indicar el conjunto de procesos degenerativos controlados, al menos en parte, por factores exógenos. Asociados a la maduración existen cambios en las características morfológicas y de desarrollo, estos cambios son graduales y se presentan de forma variable según las especies; de tal forma que los materiales adultos sufren alteraciones edad-dependientes que conllevan una pérdida generalizada de vigor y descenso de sus posibilidades de manipulación. El conjunto de estos procesos que dificultan la manipulación de material adulto se denomina envejecimiento fisiológico (Franclet et al., 1987).

El conocimiento de las bases moleculares del cambio de fase y maduración de las plantas tiene gran interés académico pero además, constituye un campo de investigación y desarrollo importante desde la perspectiva aplicada; ya que, aunque la etapa de maduración-envejecimiento puede ser adecuada para la selección, minimiza las posibilidades de manipulación de especies elite que hayan expresado sus características genéticas aditivas y no aditivas.

El rejuvenecimiento total implica la reversión completa del proceso de maduración, como resultado de la reproducción sexual o de la propagación vegetativa a través de formación de yemas adventicias y embriones somáticos.

La reproducción sexual o apomíctica media, de forma natural procesos de rejuvenecimiento-revigorización que facilitarían la propagación de especies adultas. Estos procesos de revigorización también puede ser inducido mediante aplicaciones de giberelinas, temperaturas altas, iluminación baja, cultivo *in vitro* seriado, microinjerto en cascada, entre otros tratamientos. Desafortunadamente, no se conocen en profundidad los mecanismos de control de estos procesos, y por tanto, su manipulación con fines prácticos de clonación es aún muy limitada. Además, ni la maduración ni el rejuvenecimiento se han podido caracterizar bioquímicamente y el conocimiento sobre las bases moleculares de estos procesos es escasa.

Desde 1989, con la organización del Instituto de Estudios Avanzados sobre las bases moleculares del envejecimiento en plantas, (Rodríguez, Sánchez Tamés y Durzan, Eds, 1990); nuestro grupo trata de realizar aportaciones sobre las bases moleculares de este proceso en especies leñosas (Rodríguez, 1993). Hasta la fecha, hemos realizado nuestros estudios con la angiosperma *Corylus avellana* y con las Gimnospermas *Pinus nigra* y *Pinus radiata*.

Los resultados obtenidos en *Corylus avellana* (Berros et al, 1996, 1997; Centeno et al., 1998^a; Diaz-Sala et al. 1990, 1994, 1995; Rey et al., 1993; 1994, 1998; Rodríguez et al., 1988) pueden resumirse (Tabla 1) en los siguientes puntos:

1. Relación directa entre tejidos competentes y mayores actividades respiratorias y peroxidásicas. También mayor contenido azúcares, RNA y proteínas.
2. Expresión proteica específica en función del grado de desarrollo del material objeto de estudio; más complejos en materiales adultos.
3. Diferente nivel expresión de la subunidad 55 kD de rubisco, inferior en materiales adultos y superior en juveniles e intermedia en tejidos revigorizados.
4. Determinación de rangos de PM específicos: 14.2-20.1 Kda determinantes de tejidos maduros, 40-60 Kda específicos de tejidos revigorizados, juveniles y embrionarios.
5. Patrones de metilación sitio específica del gDNA dependientes de fase de desarrollo, siendo menos complejos en materiales juveniles..
6. Presencia de mayores niveles de citoquininas en materiales adultos, principalmente debido a la contribución de Z y DHZ.
7. Contenidos superiores de Put. libre en tejidos juveniles. Posibilidad de utilizar la relación Put /Spd + Spm como indicadora de envejecimiento - rejuvenecimiento.

Tabla 1. Características diferenciales asociadas con la edad en avellano.

CARACTERÍSTICA MATERIAL JUVENIL	MATERIAL ADULTO	MATERIAL <i>IN VITRO</i>
Floración	Presente	Ausente
Ausente		
Enraizamiento	Bajo	Alto
Alto		
Patrón polipeptídico	Complejo	Sencillo
Intermedio		
Polipéptidos específicos	Presentes	Ausentes
Ausentes		
Actividad Rubisco	Baja	Baja
Elevada		
Frecuencia metilación DNA	Mayor	Intermedia
Menor		
PA's mayoritarias	Spm, Spd	Put
Put		
Put/Spd+Spm	Baja	Intermedia
Alta		
Citoquininas	Superior	-
Inferior		
Z, DHZ	Superior	-
Inferior		

Dentro del proyecto europeo (Fair3 CT96-1445), nuestro grupo de investigación ha

puesto de manifiesto (Centeno et al., 1998b; Centeno et al., 1998c; Fraga et al., 1997a, 1997b; Lopez et al., 1993^a, 1993b, 1996; Pacheco et al., 1993) los siguientes datos acerca de *Pinus radiata*.

8. Se han conseguido establecer *in vitro* tanto tejidos juveniles como tejidos adultos de *Pinus radiata*. Mientras que los tejidos juveniles han podido ser establecidos directamente, para introducir tejidos adultos ha sido necesario recurrir a la técnica del microinjerto
9. Se han observado respuestas de organogénesis directa y organogénesis adventicia indirecta con tejidos juveniles de un año, mientras que con tejidos juveniles de cuatro años solo se han observado respuestas de organogénesis directa.
10. La época de recogida de las púas, estado fisiológico, localización en el árbol, el tratamiento al que son sometidas y la naturaleza del porta son factores decisivos en el éxito de la revigorización de tejidos adultos mediante la técnica del microinjerto.
11. Tratamientos de revigorización *ex vitro* (como injertos en cascada) facilitan la revigorización *in vitro*.
12. En *Pinus radiata* existe mayor número de metil-citosinas en secuencias CCA/AGG que en secuencias CCGG.
13. El grado de metilación «sitio-específica» del DNA genómico de individuos juveniles es inferior al de individuos adultos y cultivados *in vitro*.
14. Los individuos cultivados *in vitro* presentan un grado de metilación diferente al de individuos juveniles, debido, posiblemente, a las peculiares condiciones de crecimiento en las que se encuentran.
15. Los braquiblastos en desarrollo del árbol correspondiente al tercer injerto seriado mostraron los mayores contenidos en citoquininas por gramo de peso seco, en relación a los encontrados en braquiblastos sin crecimiento y en braquiblastos de los dos tipos procedentes del primer injerto. Esto fue debido principalmente a una acumulación de isopenteniladenina e isopenteniladenosina en la porción basal de los mismos, aquella que contiene el meristemo.
16. Los niveles de citoquininas (iP e iPA) presentan niveles 8 veces superiores en los braquiblastos en desarrollo árboles correspondientes al tercer injerto seriado respecto a los del primer injerto, concentrándose las citoquininas en la porción basal de los mismos.
17. Los braquiblastos en desarrollo del árbol procedente del primer injerto, presentan doble contenido de AIA que aquellos procedentes del tercer injerto. Esta auxina se distribuye de forma homogénea en las porciones apical y basal.
17. Los niveles de PAs totales disminuyen durante la maduración-envejecimiento de órganos tanto en individuos juveniles como adultos.
18. En individuos juveniles la contribución mayoritaria de PAs corresponde a la fracción libre, mientras que en individuos adultos la mayor parte del contenido de PAs corresponde a la fracción ligada a compuestos de bajo peso molecular solubles en ácido perclórico.
- 19.- La relación PAs libres/ PAs conjugadas es próxima a uno en individuos en los que el cambio de fase es inminente.

En el transcurso de la ponencia se hará referencia a algunos de los resultados citados, prestando especial atención a las técnicas de revigorización y alternativas para superar la baja competencia morfogénica dependiente del envejecimiento ontogénico y fisiológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Berros, B.; Albuerne, M.; Rodríguez, R., 1996 Filbert Embryogenesis. En: Y.P.S. Bajaj, ed. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees IV. Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg. 20.
- Berros, B.; Alvarez, C.; Rodríguez, R., 1997. Effect of putrecine-synthesis inhibitors on somatic embryogenesis in hazelnut. Journal of Experimental Botany. 71:85-90.
- Brink, R.A., 1962. Phase change in higher plants and somatic cell heredity. Quart. Rev. Biol., 37:1-22.
- Centeno, M.L.; Rodríguez, R.; Berros, B. Rodríguez, A., 1998 a) Endogenous Hormonal content and somatic embryogenesis capacity of *Corylus avellana* L. Plant Cell Reports 16: 139-144.
- Centeno, M.L.; Fraga, M.F.; Rodríguez, A.; Rodríguez, R.; Fernández, B., 1998 b). Efecto de la revigorización *ex vitro* sobre el contenido endógeno de fitohormonas y la eficiencia de microinjerto de púas de material seleccionado de *Pinus radiata*. En: Metabolismo y Mecanismo de acción de Fitohormonas. S.Publi. U.Oviedo. ISBN 84-8317-059-0. Pp 107-113.
- Centeno, M.L.; Fraga, M.F.; Rodríguez, R.; Fernández, B., 1998 c). Micrografting and endogenous hormonal content in a rejuvenated clone of *Pinus radiata*. Bulgarian Journal of Plant Physiology. Pp63.
- Díaz-Sala, C.; Rey, M.; Rodríguez, R., 1990. *In vitro* establishment of a cycloclonal chain from nodal segments and apical buds of adult filbert. Plant Cell tissue and Organ Culture 23:151-157.
- Díaz-Sala, C.; Rey, M.; Rodríguez, R., 1994. Temporary modification of adult filbert proliferation capacity by sequential subcultures. Journal of Horticultural Science. 69.4.673-678
- Díaz-Sala, C.; Besford, R.T.; Rey, M.; Rodríguez, R., 1995. Variations in the DNA-methylation and polipeptide patterns of adult hazel associated with sequential *in vitro* subcultures. Plant Cell Reports. 15:218-221.
- Fortanier, E.J. y Jonkers, H., 1976. Juvenility and maturity of plants as influenced by their ontogenetical and physiological ageing. Acta Hort., 56:37-44.
- Franclet, A., 1981. Rajeunissement et propagation végétative des ligneux. Annales AFOCEL. 1980:11-40
- Fraga, M.; Berros, B.; Uribe, M.; Rodríguez, R., 1997a). Estado de desarrollo y metilación del DNA genómico en pináceas. XII Reunión Nacional de la SEFV, 1997, Córdoba, España.
- Fraga, M.; Pacheco, J.C.; Fernández, B.; Centeno, M.L.; Rodríguez, R., 1997 b). Edad cronológica y manipulación de la organogénesis en pináceas. XII Reunión Nacional de la SEFV, 1997, Córdoba, España.
- Leopold, A.C., 1975. Aging senescence and turnover in plants. Bioscience, 25:645-662.
- López, M.A.; Ordás, R.; Pacheco, J.C.; Manzanera, J.A.; Bueno, A.; Pardo, J.A.; Rodríguez, R., 1993a). Variación del contenido endógeno de poliaminas y fases de desarrollo en *Pinus nigra* Arn. Libro resúmenes X Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal.
- López, M.A.; Ordás, R.; Manzanera, J.A.; Bueno, A.; Pacheco, J.C.; Pardo, J.A.; Rodríguez, R. 1993b). Tissue culture of

- Pinus nigra*: a comparative study of the responses at embryonic, juvenile and adult level. Biotechnology of trees. Fifth International Workshop of the IUFRO Working Party S2-04-07. Somatic cell genetics. ICONA-CENEAN. Balsain (Segovia) Spain.
- López, M.A.; Pacheco, J.C.; Rodríguez, R.; Ordás, R., 1996. Regeneration of plants from isolated cotyledons of Salgareño pine (*Pinus nigra* Arn. ssp. *salmanii* (Dunal) Franco. In vitro Cell. Dev. Biol-Plant. 32: 109-114.
- Olesen, P. O., 1978. On cyclophysis and topohhysis. *Silvae Genet.*, 27:173-178.
- Pacheco, J.; Bueno, M.A.; Manzanera, J.A., López, M.; Ordás, R.; Rodríguez, R.; Pardo, J.A., 1993. Reactivación de *Pinus nigra* Arn. por cultivo de tejidos y microinjertos. Libro resúmenes X Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. III Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. (Ed. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco) pg. 190.
- Pierik, R. L. M., 1990. Rejuvenation micropropagation. En: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. H.J.J. Nijkamp, L.H.W. van der Plas y J. van Artrijk (Eds.). Kluwer Acad. Pub., Dordrecht. pp91-101.
- Rey, M.; Díaz-Sala, C.; Rodríguez, R., 1993. Endogenous polyamine content in juvenile, adult and in vitro reinvigorates hazel. *Tree Physiology*. 14:191-200.
- Rey, M.; Díaz-Sala, C.; Rodríguez, R., 1994. Comparison of endogenous polyamine content in hazel leaves and buds between the annual dormancy and flowering phases of growth. *Physiologia Plantarum*. 91:45-50.
- Rey, M.; Diaz-Sala, C.; Rodríguez, R., 1998. Free polyamine content in leaves and buds of hazelnut (*Corylus avellana* cv, Negret) trees subjected to repeated severe pruning. *Scientia Horticulturae* 76: 115 –
- Rodríguez, Rodríguez, R.; Rodríguez, A.; González, A.; Pérez, C. (1988). Filbert. En: Y.P.S. Bajaj, ed. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 5. Tress II. pp. 127-160. Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg.
- Rodríguez, R., 1993. Métodos tradicionales de propagación asexual y biotecnología. ¿Un mismo lenguaje?. Ponencia invitada. Congreso Forestal Español. Lourizan. Ponencias y comunicaciones tomo II, 319-330.

C-04 Fisiología del cultivo *in vitro*.

Maria Jesús Cañal, Roberto Rodríguez, Belén Fernández, Ricardo Sánchez-Tames Y Juan Pedro Majada

Lab. Fisiología Vegetal, Dpto B.O.S., C/ Catedrático Rodrigo Uría s/n 33071, Universidad de Oviedo, España.

INTRODUCCIÓN

La micropropagación es una técnica, desarrollada para la producción en masa de plantas, que ha sido utilizada con éxito desde los años 60. La principal ventaja de esta técnica estriba en la multiplicación rápida de material clonal libre de enfermedades. Esta característica ha servido para introducir rápidamente en el mercado nuevas variedades de plantas obtenidas mediante selección, mutación, programas de mejora o manipulación genética. Sin embargo, la industria de la micropropagación presenta serias limitaciones debido a los elevados costes de producción, reduciéndose la mayor parte de su actividad al sector de plantas ornamentales (Holdgate y Zandvoort, 1992).

En la mayor parte de los procedimientos empleados actualmente no se hace referencia al control efectivo del desarrollo de las plantas *in vitro*. Sin embargo, las tasas de crecimiento, desarrollo y muchas de las características fisiológicas y morfológicas de las plantas formadas *in vitro* están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso de los recipientes (Kozai et al., 1992a; Buddenford-Joosten y Woltering, 1994). Por tanto el estudio y control del ambiente de los cultivos también incidirá positivamente en la optimización de los procedimientos de micropropagación.

CARACTERÍSTICAS DEL AMBIENTE *IN VITRO* EN LA MICROPROPAGACIÓN CONVENCIONAL

Tradicionalmente los protocolos de propagación han ignorado los factores ambientales del cultivo, centrándose en experimentos factoriales de aplicación exógena de nutrientes y reguladores del crecimiento. En estas condiciones las plantas se desarrollan en condiciones asépticas dentro de un recipiente hermético, expuestas a bajos niveles de luz, sobre un medio gelificado que contiene nutrientes para mantener un crecimiento heterótrofo, y todo ello bajo unas condiciones de elevada humedad relativa.

Los factores que pueden afectar al crecimiento y morfogénesis de las plantas *in vitro* se pueden clasificar como se indica en la Fig. 1. Los fenómenos que controlan los cambios ambientales en el interior de un recipiente de cultivo son similares a los que ocurren en el interior de un invernadero, ya que de hecho un recipiente de cultivo es, hasta cierto punto, un invernadero en miniatura mantenido en condiciones asépticas. Bajo este punto de vista, Kozai et al., (1992a) mantienen que es interesante realizar estudios ecológicos, ecofisiológicos, y de fisiología e ingeniería ambiental en el proceso de micropropagación. Aunque el valor que presenta cada uno de los parámetros descritos en la Fig. 1, va a depender de las condiciones de la cámara de crecimiento, del recipiente, de las condiciones de cultivo y de los propios explantos, el ambiente *in vitro* presenta unas características generales que se resumen en la Tabla 1. Como se puede observar, el ambiente *in vitro* presenta unas tasas bajas de flujo y energía, debido a la existencia de un sistema semicerrado, con mínimas variaciones de temperatura, elevada humedad relativa y grandes cambios diarios de la concentración de CO₂ en el interior de los recipientes.

CARACTERÍSTICAS DE AMBIENTE AÉREO EN EL INTERIOR DE LOS RECIPIENTES

El tipo de recipiente de cultivo (tamaño, forma, material y sistema de cierre) puede condicionar la evolución de la composición gaseosa en su interior durante el cultivo. En recipientes de cultivo cerrados herméticamente se ha detectado una acumulación de gases (dióxido de carbono -CO₂-, etileno -C₂H₄-, etano, etanol y acetaldehído) que, además de influir o controlar el crecimiento, también pueden afectar a procesos de diferenciación y morfogénesis (Thomas y Murashige, 1979; Righetti et al., 1990).

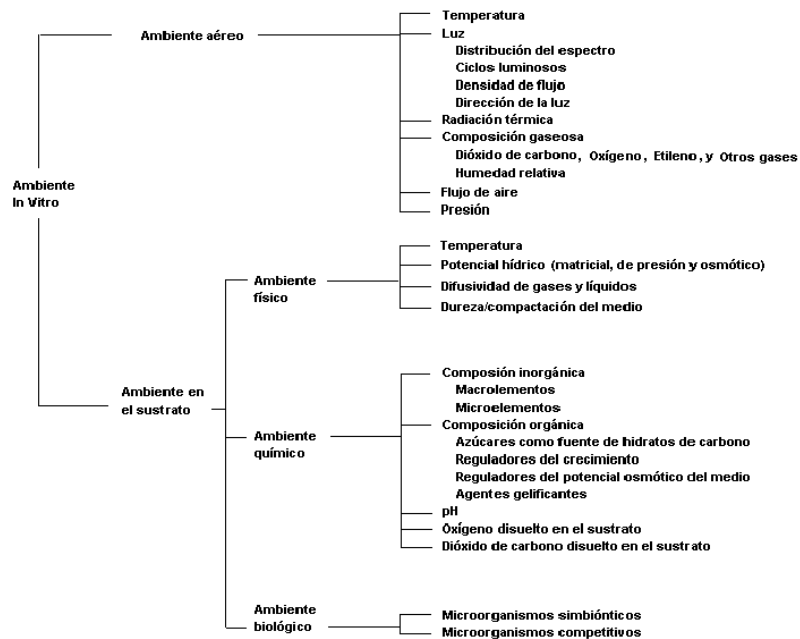


Fig. 1.- Factores que pueden influir en el crecimiento y morfogénesis de las plantas *in vitro*. (Basado en el modelo propuesto por Kozai et al. (1992).

Para mantener un crecimiento heterótrofo en estos recipientes, es necesaria una fuente exógena de hidratos de carbono, ya que la concentración de CO₂ durante el período luminoso está por debajo del punto de compensación (50-100 μmol mol⁻¹) (Ando, 1978; Fujiwara *et al.*, 1987; Pospisilova *et al.*, 1988; Desjardins *et al.*, 1988; Infante *et al.*, 1989; Kozai y Sekimoto, 1988). La concentración de CO₂ aumenta de forma constante durante el período oscuro, aunque una vez reiniciado el período luminoso, el nivel de CO₂ desciende rápidamente (Fujiwara *et al.*, 1987; Fujiwara y Kozai, 1995). En estas condiciones, la falta de CO₂ disminuye los requerimientos lumínicos de los cultivos, siendo más importante su papel en fotomorfogénesis que en fotosíntesis. Además, generalmente los gradientes de potencial hídrico y los coeficientes de difusión del aire y del medio en el recipiente son más pequeños que los existentes en el exterior, lo que genera bajas tasas de flujo de agua en el recipiente (Sallanon y Coudret, 1990). La introducción de filtros bacteriológicos en los recipientes de cultivo permite aumentar la tasa de intercambio gaseoso y mantener gradientes de humedad que han introducido nuevos parámetros a considerar en los procesos morfogénicos (Majada *et al.*, 1997).

Tabla 1. Características generales del ambiente *in vitro* en la micropropagación convencional con respecto a las variables de estado y de flujo

Variables de estado	Variables de flujo
Ambiente aéreo 1. Elevada humedad relativa 2. Temperatura del aire 3. Concentración elevada de CO ₂ durante el período oscuro y baja durante el período luminoso 4. Elevada concentración de etileno Ambiente en el sustrato 5. Elevada concentración de azúcar 6. Elevada concentración de sales 7. Baja concentración de oxígeno, y liberación de exudados tóxicos 8. Elevada concentración de reguladores	Flujo de materia y energía 1. Tasa de transpiración baja 2. Tasa fotosintética baja 3. Elevada respiración en oscuridad 4. Flujo de radiación térmica y de fotones bajo 5. Balance negativo de CO ₂ 6. Tasa baja de absorción de agua 7. Tasa baja de absorción de azúcares 8. Tasa baja de absorción de iones 9. Tasa baja de absorción de componentes del medio.

CARACTERÍSTICAS DEL AMBIENTE EN LOS SUSTRATOS

Para estudiar la disponibilidad de agua, nutrientes y reguladores de desarrollo en los distintos sustratos empleados en cultivo de tejidos, debemos de tener en cuenta los diferentes componentes del potencial hídrico (Debergh et al., 1981, Debergh, 1983), y otros tres factores de especial relevancia en sustratos gelificados: la dinámica de flujo, la velocidad de difusión de solutos y la influencia de la temperatura (Campbell y Cheftel, 1985).

A. Agar.

Distintos autores han estudiado el efecto de la concentración y marca comercial de agar, así como el comportamiento de las distintas especies ante el tipo de agar y su concentración (Debergh, 1983, Bornman y Vogelmann 1984, Kordan 1988, Leshem, 1983 y Scherer 1988), pero no se encontró una correlación entre las características y el crecimiento de las plantas.

B. Nutrientes y reguladores.

La definición de protocolos para la micropropagación heterótrofa de plantas, se ha basado en experimentos factoriales de aplicación exógena de nutrientes y reguladores del crecimiento (Williams, 1992; Williams y Taji, 1991). Este hecho explica la gran cantidad de medios existentes, definidos específicamente para cada especie y tipo de explanto empleado. Estos factores, junto al empleo de sustratos gelificados, han influido negativamente en la realización de trabajos que analicen el efecto del balance iónico y de la concentración total de iones y reguladores en la absorción y asimilación de nutrientes (George y Sherrington, 1984).

Aunque los medios nutritivos empleados en la micropropagación convencional han sido optimizados para cultivos heterótrofos, en la actualidad se trabaja para definir nuevas formulaciones adaptadas a las posibilidades de control ambiental existentes en la actualidad, investigando previamente el control y la eficiencia de la absorción de nutrientes bajo distintas condiciones ambientales (Kozai et al., 1992a). Resultados ob-

tenidos en nuestro laboratorio ponen de manifiesto que el consumo de nutrientes es muy inferior al esperado, siendo únicamente significativo en el caso del fosfato, que puede llegar a ser limitante en algunos cultivos (Dantas et al., 1999; Moncaleán et al., 1999). A partir del análisis de nuestros resultados y de los obtenidos por otros autores (Williams, 1992 y Leifert et al., 1995) parece claro que la composición y la concentración mineral de los medios de cultivo, así como el ambiente del cultivo condiciona totalmente la respuesta de los cultivos en cuanto a crecimiento y características fisiológicas de las plantas obtenidas; lo cual está condicionando la definición de nuevos medios de cultivo aplicados de forma estática o de forma dinámica durante el transcurso de cada período de cultivo.

Al igual que en el medio mineral, de forma general los protocolos de aplicación de reguladores del crecimiento se establecen mediante ensayos factoriales, manteniendo los cultivos en contacto con la hormona durante todo el subcultivo. Sin embargo, resultados obtenidos en nuestro laboratorio ponen de manifiesto que la absorción de hormonas en la fase de proliferación se produce mayoritariamente en las primeras horas de cultivo (Feito et al., 1994; Feito et al., 1995; Moncaleán et al., 1999), absorción que condiciona totalmente la respuesta morfogénica de los cultivos mediante la alteración del balance endógeno de reguladores del crecimiento (Dantas et al., 1997). En este sentido ensayos realizados en nuestro laboratorio, ponen de manifiesto que la administración de pulsos hormonales durante períodos cortos es más efectiva en la proliferación de yemas axilares y lo que resulta más interesante favorece el posterior enraizamiento de los tallos obtenidos.

RESPUESTAS DE TALLOS/PLÁNTULAS AL AMBIENTE *IN VITRO*

En la Tabla 2 se resumen algunas de las respuestas más habituales de los explantos introducidos en cultivo, como resultado de la interacción que se produce entre los explantos y las características ambientales descritas (Tabla 2). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que la manipulación del ambiente en los recipientes de cultivo, modula las características morfo-anatómicas y fisiológicas de las plantas obtenidas a través de cultivo de tejidos (Majada et al., 1998, Majada et al., 1999). De forma general podríamos decir que el fenotipo inducido por las condiciones de cultivo es intermedio entre plantas crecidas en ambientes herméticos no controlados y plantas aclimatadas

Tabla 2. Respuestas al ambiente en la micropropagación convencional

Tejidos	Planta
1. Disminución o alteración del contenido de ceras epicuticulares	1. Menor tasa de crecimiento
2. Funcionamiento estomático anormal	2. Crecimiento suculento
3. Disminución del contenido en clorofila	3. Desórdenes fisiológicos y morfológicos
4. Menor peso seco final	4. Formación de pocas raíces secundarias
5. Disminución del área foliar	5. Elevada variabilidad en tamaño, forma y estado de
6. Disminución del número estomático	6. Mayor frecuencia de mutaciones
7. Menor desarrollo anatómico	7. Presencia de contaminaciones

ESTRATEGIAS EN EL CONTROL AMBIENTAL DE LOS RECIPIENTES

Como consecuencia del ambiente *in vitro*, todos los factores descritos en la Tabla 2, contribuyen al desarrollo de plantas con un fenotipo incapaz de sobrevivir al trasplante a invernadero o campo (Preece y Sutter, 1991), debido al stress hídrico provocado por la ausencia de regulación estomática (Brainerd y Fuchigami, 1982; Conner y Conner, 1984; Ziv et al., 1987; Pospisilova et al., 1988) y menor cantidad de ceras epicuticulares (Sutter y Langhams, 1979, 1982; Sutter, 1988; Conner y Conner, 1984).

Actualmente disponemos de distintas estrategias para controlar el ambiente en los sistemas de micropropagación: control en cultivos heterótrofos (a), en cultivos mixótrofos (b) y en cultivos autótrofos (c).

- a. El control del ambiente en cultivos heterótrofos (recipientes sin ventilación) se centra en las fases de enraizamiento y aclimatación. El ambiente puede ser modificado gradualmente en estas etapas para favorecer posteriormente el crecimiento y desarrollo de tallos y plantas en invernadero. Aunque ampliamente utilizada por los micropropagadores convencionales, las posibilidades de control son mínimas y se limita generalmente a una disminución de la humedad relativa.
- b. Establecimiento de cadenas cicloclonales de micropropagación mixótrofa, las cuales se sustentan en una mezcla de nutrición heterótrofa y autótrofa (recipientes con ventilación), y que va a depender de la disponibilidad de CO₂ y azúcares por los explantos en el recipiente de cultivo.
- c. La tercera estrategia alternativa la constituye el control del ambiente para mantener un crecimiento autótrofo (recipientes con ventilación y control de dióxido de carbono) aséptico en las fases de multiplicación y enraizamiento.

La elección de la mejor estrategia va a depender de los objetivos específicos de producción, así como de los requerimientos culturales de cada especie, número de trasplantes requerido, valor añadido del producto, relación calidad precio, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- Aitken-Christie, J.; Davies, H.; Kubota, H. y Kozai, T., 1990. Benefits of using a microporous membrane in the tissue culture vessel lid for the micropropagation of *Pinus radiata*. VIIth IAPTC Congress, Amsterdam.
- Ando, T., 1978. Gaseous environment in the airtight culture vessel containing orchids. Abst. Annual Autumn Meet. Jap.Soc. 368-369.
- Blazkova, A.; Ullmann, J.; Josefusova, Z.; Machackova, I. y Krekule, J., 1989. The influence of gaseous phase on growth on plants *in vitro* - The effect of different types of stoppers. Acta Hort 251:209-214.
- Brainerd, K.E. y Fuchigami, L.H., 1982. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA, and CO₂. J. Exp. Bot. 33:388-392.
- Bornman, C.H. y Vogelmann, T.C., 1984. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. Physiol. Plant. 61:502-512.
- Boyer, J.S., 1989. Water potential and plant metabolism: comments on Dr P.J.Kramer's article 'Changing concepts regarding plant water relations'. Plant Cell Environ. 11:565-568.
- Buddenford-Joosten, J.M.C. y Woltering, E.J., 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. Plant Growth Reg. 15:1-16.
- Campbell, G.S. y Cheftel, J.C., 1985. Diffusivity of sorbic acid in food gels at high and

- intermediate water activities. En: Simatos, D. y Multon, J.L. eds. Properties of water in foods gels in relation and stability. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 343-356.
- Conner, L.N. y Conner, A.J., 1984. Comparative water loss from leaves of *Solanum laciniatum* plants cultured *in vitro* and *in vivo*. Plant Sci. Let 36:241-246.
- Cournac, L.; Dimon, B.; Carrier, P.; Lohou, P. y Chavgardieff, P., 1991. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultured *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply and CO₂ enrichment. Plant Physiol. 97:112-117.
- Cuello, J.L.; Walker, P.N. y Heuser, C.W., 1992. Controlled *in vitro* environment for stage II in micropropagation of *Chrysanthemum*. ASAE, 35:1079-1083.
- Dantas, K.A.; Cañal, M.J.; Centeno, M.L.; Feito, I. y Fernández, B., 1997. Endogenous plant growth regulators in carnation tissue cultures under different conditions of ventilation. Plant Growth Regul 22:169-174.
- Dantas, K.A.; Majada J.P.; Fernández, B. y Cañal, M.J. 1999. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different conditions of ventilation. Plant Cell Reports 00:000-000.
- Davies, H.; Hobbs, J.; Kroese, H.; Fiedler, J. y Aitken-Christie, J. 1992. Measurement of CO₂ concentration in tissue culture vessels for sugar-free micropropagation and climate change studies. Acta Hort. 319:279-284.
- Debergh, P.C., 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol. Plant. 59:270-276.
- Debergh, P.C.; Aitken-Christie, J.; Cohen, J.; Grout, D.B.; von Arnold, S.; Zimmerman, R. y Ziv, M., 1992. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30:135-140.
- Debergh, P.; Harbaoui, Y. Lemeur, R., 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiol. Plant. 52:181-187.
- Dillen, W. y Buysens, S., 1989. A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 19:181-188.
- Feito, I., Rodríguez, A., Centeno, M.L., Sánchez-Tamés, R. y Fernández, B., 1994. Effect of the physical nature of the culture medium on the metabolism of benzyladenine and endogenous cytokinins in *Actinidia deliciosa* tissues culture *in vitro*. Physiol. Plant. 91, 449-453
- Feito, I., A. Rodríguez, Centeno, M.L., Sánchez-Tamés, R. y Fernández, B., 1995. Effect of applied benzyladenine on endogenous cytokinin content during the early stages of bud development of kiwifruit. Physiol. Plant. 95, 241-246
- Fujiwara, K.; T. Kozai, y Watanabe, I., 1987. Fundamental studies on environment in plant tissue cultured *Vitis rupestris* plantlets. J. Agric. Meteorol. 43:21-30.
- Fujiwara, K y Lozai, T., 1995. Physical microenvironment and its effects. En: Kurata, K. y Kozai, T. eds. Transplant Production Systems. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 319-369.
- Galzy, R. y Compan, D. (1992). Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 31:239-244.
- George, E.F. y Sherrington P.D., 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Limited, Hants, Inglaterra.
- Ghashghaie, J., Brenckmann, F. y Saugier, B., 1991. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured *in vitro*. Physiol. Plant., 82:73-78.
- Hakkaart, F.A. y Versluijs, J.M.A., 1983. Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. Neth. J. Plant. Path. 89:47-53.
- Hayashi, M.; Fujita, N.; Kitaya, Y.; y Kozai, T., 1992. Effect of sideward lighting on the growth of potato plantlets *in vitro*. Acta

- Hort. 319:163-170.
- Holdgate, D.P. y Zandvoort, E.A., 1992. Automated micropropagation and the application of a laser beam for cutting. En: Kurata, K. y Kozai, T. eds. Transplant production systems. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. pp:297-231.
- Honjo, T. y T. Takakura, 1987 Effects of CO₂ concentration, light intensity and liquid medium composition for the growth of *Cymbidium* PLB *in vitro*. J. Agric. Metereol. 43:223-227.
- Infante, R.; Magnanini, E. y Righetti, B., 1989. The role of light and CO₂ in optimizing the conditions for shoot proliferation of *Actinidia deliciosa in vitro*. Physiol. Plant. 77:191-195.
- Jackson, M.B.; Abbott, A.J.; Belcher, A.R. y Hall, K.C., 1987. Gas exchange in plant tissue cultures. En: M.B. Jackson, S.H. Mantell and J. Blake, eds. Advances in the chemical manipulation of plant tissue cultures. Proc.Meet.British Plant Growth Regulator Group. London, pp:57-71.
- Jackson, M.B.; Abbott, A.J.; Belchet, A.R.; Hall, K.C. y Cameron, J., 1991. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. Ann. Bot. 67:229-237.
- Kitaya, Y. y Kozai, T., 1995. Visualization and analysis of air current patterns in the plant tissue culture vessel as affected by radiation flux, plantlet size and vessel type. ASAE Paper 957198, ASAE, St. Joseph, MI.
- Kordan, H., 1988. Inorganic ions present in commercial agar. Biochem. Physiol. Pflanz. 183:355-359.
- Kozai T.; Fujiwara, K. y Watanabe, I. (1986). Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. Effects of stoppers and vessels on gas exchange rates between inside and outside of vessels closed with stoppers. J. Agr. Met. 42:119-127.
- Kozai, T. e Iwanami, Y., 1988. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 57:279-288
- Kozai, T.; Koyama, Y. y Watanabe, C., 1988. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. Acta Hort. 230:121-127.
- Kozai, T. y Sekimoto, K., 1988. Effects of the number of air exchanges per hour of the closed vessel and the photosynthetic photon flux on the carbon dioxide concentration inside the vessel and the growth of strawberry plantlets *in vitro*. Environ. Control Biol. 26:21-29.
- Kozai, T.; Takazawa, I.; Watanabe, I. y Sugi, J., 1990. Growth of tobacco seedlings and plantlets *in vitro* as affected by *in vitro* environment. Environ. Control Biol. 28:31-39.
- Kozai, T.; Hayashi, M. y Ochiai, M., 1991. Effect of the sideways lighting on the growth and morphogenesis of potato plantlets *in vitro*. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 60:228-229.
- Kozai, T.; Fujiwara, M.; Hayashi, M. y Aitken-Christie, J., 1992a. The *in vitro* environment and its control in micropropagation. En: Kurata, K. y Kozai, T. eds. Transplant Production Systems. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 247-282.
- Kozai, T.; Oki, H. y Fujiwara, K., 1992b. Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 22:205-211.
- Kubota, C.; Fujiwara, K.; Kitaya, Y. Y Kozai, T., 1997. Recent advances in environment control in micropropagation. En: Goyo, E. ed. Plant Production in Closed Ecosystems. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 153-169.
- Labauve, M.P.; Viemont, J-D. y Beaujard, F., 1989. Evolution morphogénétique de la bouture de *Rhododendron* cultivée *in vitro*. Influence de la concentration du milieu et de la quantité de gélose. Bull. Soc. Bot. Fr. 136:19-30 (Lettres.Bot.).

- Leshem, B., 1983. Growth of carnation meristems *in vitro*. Anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium of their formation. *Ann. Bot.* 52:413-415.
- Leifert C, Murphy KP, Lumsden PJ, 1995. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures – *Crit Rev Plant Sci* 14: 83-109.
- Lim, L.Y.; Hew, Y.C.; Wong, S.C. y Hew, C.S., 1992. Effects of light intensity, sugar and CO₂ concentrations on growth and mineral uptake of *Dendrobium* plantlets. *J. Hort. Sci.* 67:601-611.
- Majada J.P.; Fal M.A. y Sánchez-Tames, R., 1997. The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. *In vitro Cell.Dev.Biol.* 33: 66-69
- Majada, J.P.; Feito, I.; Centeno, M.L.; Fernández, B. y Sánchez-Tamés, R., 1998. *Plant. Growth Regulation* 25:113-121.
- Majada J.P.; Tadeo, F.; Fal M.A. y Sánchez-Tames, R., 1999. Impact of culture container ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated *Dianthus caryophyllus* cv. Nelken. *Plant Cell Tiss. Org. Cult. (Acceptada)*.
- Mascarehnas, A.F.; Khuspe, S.S.; Nadgauda, R.S.; Gupta, P.K. y Khan, B.M., 1989. Biotechnological application of plant tissue culture to forestry in India. En: Dhawan, V. ed. *Applications of biotechnology in forestry and horticulture*, Plenum Press, New York, pp:73-86.
- Moncaleán, P.; Cañal, M.J.; Feito, I.; Rodríguez, A. y Fernández, B., 1999. Cytokinins and mineral nutrition in shoots of *Actinidia deliciosa* cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.* (En prensa).
- Morini, S.; Fortuna, R.; Sciutti, R. y Muelo, R., 1990. Effect of different light-dark cycles on growth of fruit tree shoots cultured *in vitro*. *Adv. Hort. Sci.* 4:163-166.
- Morini, S.; Trinci, M y Zacchini, M., 1991. Effect of different photoperiods on *in vitro* growth of Mr.S.2/5 plum rootstock. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 25:141-145.
- Mosseau, M., 1986. CO₂ enrichment *in vitro*. Effect on autotrophic and heterotrophic cultures of *Nicotiana tabacum*. *Photosynthesis Res.* 8:187-191.
- Pospisilova, J.; Solarova, J.; Catsky, J.; Ondrej, M. y Opatny, Z., 1988. The photosynthetic characteristics during the micropropagation of tobacco and potato plants. *Photosynthetica* 22:205-213.
- Preece, J.E. y Sutter, E.G., 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P.C. y Zimmerman R.H. eds. *Micropropagation: tecnology and application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp:71-93.
- Righetti, B.; Magnanini, E.; Infante, R. y Pedreri, S., 1990. Ethylene, ethanol, acetaldehyde and carbon dioxide released by *Prunus avium* shoot cultures. *Physiol. Plant.* 78:507-510.
- Sallanon, H. y Coudret, A., 1990. Water fluxes between *in vitro* plants and atmosphere in micropropagation. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 310:607-613.
- Scherer, P.A., 1988. Standardization of plant micropropagation by usage of a liquid medium with polyurethane foam plugs or a solidified medium with the gellan gum gelrite instead of agar. *Acta Hort.* 226:107-114.
- Singha, S.; Townsend, E.C. y Oberly, G.H. 1985. Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured *in vitro* on varying concentrations of three commercial agars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110:407-411
- Sutter, E. 1988. Stomatal and cuticular waxes loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113:234-238.
- Sutter, E. y Langhans, R.W. 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104:493-496.
- Sutter, E. y Langhans, R.W., 1982. Formation of epicuticular wax and its effect of water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Can. J. Bot.*

- 60:2896-2902.
- Thomas, D.D.S. y Murashige, T., 1979. Volatile emission of plant tissue culture. I. Identification of the major components. In *Vitro* 15:654-658.
- Tsuji, K.; Nagaoka, M. y Oda, M., 1992. Promotion of the growth of carrot plantlets *in vitro* by controlling environmental conditions in culture vessels. *Acta Hort.* 319:279-302.
- Walker, P.N., Heuser, V.W. y Heinemann, P.H., 1988. Micropropagation: studies of gaseous environments. *Acta Hort.* 230:141-145.
- Williams, R.R., 1992. Towards a model of mineral nutrition *in vitro*. En: Kurata K. y Kozai, T. eds. *Transplant production systems*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 213-229.
- Williams, R.R. y Taji, A.M., 1991. Effect of temperature, gel concentration and cytokinins on vitrification of *Olearia microdisca* (J.M.Black) *in vitro* shoot cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 26:1-6.
- Yue, D.; Gosselin, A. y Desjardins, Y., 1993. Effects of forced ventilation at different relative humidities on growth, photosynthesis and transpiration of geranium plantlets *in vitro*. *Can. J. Plant Sci.* 73:249-256.
- Zimmerman, R.H. 1984. Application of tissue culture propagation to woody plants. En: Henke, R.R.; Hughes, K.W.; Constantin, M.J. y Hollaender, A. eds. *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*, Plenum Press, New York, pp:165-177.
- Ziv, M., 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En: Debergh, P.C. y Zimmerman R.H. eds. *Micropropagation: tecnology and application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp:45-69.
- Ziv, M., Schwarts, A. y Fleminger, D., 1987. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant Sci.* 52:127-134.

SANEAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

1-01 Evaluación del saneamiento al Raquitismo de los retoños por tratamiento térmico a propágulos de caña de azúcar.

J.R. Pérez Milián, Yamilé Figueredo y Madyu Matos.

Estación de Investigación de la Caña de azúcar. Jovellanos 42600, Matanzas, Cuba. E-mail: pp@epica.atenas.inf.cu

Palabras claves: raquitismo de los retoños, hidrotermoterapia, caña de azúcar, control.

INTRODUCCIÓN

La hidrotermoterapia, por su alta efectividad, es el método de control más usado en el mundo contra varias enfermedades de la caña de azúcar. En Cuba se utiliza en la obtención de semilla categorizada para garantizar que el material de propagación llegue a los campos comerciales con un estado fitosanitario capaz de competir contra las adversidades del medio, entre las que se incluye la posibilidad real del ataque de plagas y enfermedades. Las investigaciones desarrolladas en este sentido reflejan las posibilidades de contrarrestar el raquitismo de los retoños (RSD) mediante un manejo adecuado del tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se evaluaron diferentes combinaciones de tiempo y temperatura: 53°C/20min., 50.5°C/2h y remojado + 50°C/3h para estudiar el saneamiento en la variedad CP31-294 muy enferma de RSD (comprobado por contraste de fase) empleando tamaños del propágulo de 1, 2 y 3 yemas. Se plantó en el campo un bloque al azar

con 3 repeticiones. A los 10 meses se evaluó el saneamiento por el método de tinción por transpiración (STM), tomando 5 tallos por réplica (15 por tratamiento). Por otra parte se estudió la efectividad de tratamientos sucesivos (3 durante 20 meses) en la misma variedad, empleando tratamiento hidrotérmico de 50.5°C/2h y aplicando el STM para su evaluación final.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que con ninguno de los tratamientos empleados se logró un control absoluto del RSD, que los tratamientos más largos son más efectivos y que el tamaño del propágulo no tiene influencia sobre el control. Se obtuvo además, que un primer tratamiento sobre material enfermo es eficaz, sin que se observen grandes diferencias respecto al segundo y tercer tratamiento, lográndose después del primer tratamiento un aumento del porcentaje de vasos funcionales desde el 40% del material original hasta por encima del 85%.

1-02 Empleo del método de tinción por transpiración de los vasos del xilema (STM) para la evaluación del saneamiento al RSD.

Yamilé Figueredo, J. R. Pérez Milián y Madyu Matos.

Estación de Investigación de la caña de Azúcar. Jovellanos 42600, Matanzas, Cuba.

E-mail: pp@epica.atenas.inf.cu

Palabras claves: raquitismo de los retoños, tinción, xilema, saneamiento, caña de azúcar.

INTRODUCCIÓN

El raquitismo de los retoños es probablemente la enfermedad más importante de la caña de azúcar, afectando un gran número de variedades de la producción. El agente causal es la bacteria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, la cual se aloja en los vasos del xilema. El tratamiento hidrotérmico a la semilla es el método más usado para su control, pero no logra una total erradicación del patógeno. Sin embargo, después del tratamiento térmico se observa un incremento en el rendimiento, siendo este el criterio empleado para medir la efectividad del saneamiento.

Por otra parte, el diagnóstico visual de la enfermedad se dificulta ya que los síntomas externos pueden confundirse con otras patologías. Sobre la base de esta dificultad, se han desarrollado otras técnicas de diagnóstico que resistencia al RSD de 5 variedades de caña de azúcar (C111-79, C323-68, C120-78, CP 31-294 y My5514) tratadas a 50°C durante 2 horas e inoculadas con jugo de plantas enfermas. Los tallos se introdujeron en una solución de Safranina O manteniendo las hojas fisiológicamente activas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La solución es absorbida por la planta y los vasos funcionales (VF) se tiñen con el colorante. Al realizar un análisis de los resultados se evidenció que mediante esta técnica se pudo demostrar un comportamiento diferenciado de las variedades ante el RSD, que va desde muy poca diferencia entre las plantas tratadas e inoculadas en My5514 hasta una diferencia muy acentuada en C120-78. El comportamiento del porcentaje de vasos funcionales corroboró los resultados alcanzados en otras investigaciones con My5514 (resistente) y CP31-294 (susceptible). Se analizó el saneamiento de las variedades Ja60-5, C1051-73 y CP52-43 mediante el contraste de fases (CF) y el STM cuando los tallos enfermos se trataron térmicamente con diferentes combinaciones de tiempo y temperaturas (50.5°C/2h, 53°C/20 min. y un testigo sin tratar). Se encontró la presencia de la bacteria utilizando el CF, sin embargo al analizar el porcentaje VF en todos los casos fue superior al 85% después de un tratamiento de 50.5°C/2h, lo cual confirma la utilidad de este método para la evaluación del saneamiento al RSD, criterio que puede utilizarse para la calificación de los bancos de semilla.

1-03 Marchitez de vitroplantas de bananos (FHIA-18, Gran enano y Gross Michel) causadas por *Pythium debaryanum* Hesse en fase de aclimatización.

Michel Leiva Mora y Miguel Angel Dita Rodríguez.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km. 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. E-mail: fitopat@ibp.edu.cu

Palabras claves: banano, aclimatización, *Pythium debaryanum*, marchitez.

INTRODUCCIÓN

Como consecuencia de los cambios provocados por el cultivo *in vitro* en las plantas micropropagadas ha sido necesario desarrollar técnicas especiales de aclimatización en condiciones *ex vitro* e *in vitro* que aseguren un acercamiento gradual y progresivo a sus caracteres normales.

La fase de aclimatización es de vital importancia para lograr plantas sanas y vigorosas aunque en muchos casos este importante requisito se ve obstaculizado por la incidencia de plagas y enfermedades. La alta humedad relativa que se requiere, sobre todo en los primeros momentos después del trasplante para evitar transpiraciones excesivas y con ello lograr un desarrollo adecuado de los estomas y la cutícula favorece la aparición de numerosos organismos entre los que predominan: algas, hongos fitopatógenos aéreos y del suelo, moluscos y enfermedades bacterianas.

Dentro de las enfermedades observadas en nuestras condiciones, inciden con mayor frecuencia las causadas por hongos fitopatógenos. Dentro de los principales géneros encontrados se destacan: *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Cercospora*, etc.

El género *Pythium* comprende varias especies fitopatógenas productoras de Damping-off, marchitez, pudriciones de frutos, entre otros. Estos representantes son

habitantes del suelo, considerados comúnmente como patógenos débiles que atacan a las plantas en los primeros estadios de su crecimiento y desarrollo, así como en condiciones de elevado humedecimiento del suelo.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal la determinación del agente causal de la marchitez de vitroplantas de bananos en fase de aclimatización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron vitroplantas de bananos en la fase de aclimatización (fase IV) de: FHIA-18 (AAAA), (AAA), (AA), Gross Michel y Gran enano; los cuales evidenciaban un marchitamiento pronunciado en todo el follaje, además presentaban daños necróticos en la base del pseudotallo. Además, los daños en el sistema radical eran apreciables.

De cada planta se extrajo el sistema radical y se lavó por separado con agua corriente durante un período de 15 min, posteriormente se desinfectó en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por un tiempo de 1 min y se lavó en un erlenmeyer que contenía 50 ml de agua desionizada estéril. Las raíces fueron colocadas en placas de Petri esterilizadas y con la ayuda de un bisturí estéril se cortaron segmentos de 1cm de longitud y posteriormente se secaron en un papel de filtro previamente esterilizado, en la cabina de flujo laminar. Se tomaron placas de Petri de 7 cm de diámetro que contenían

10 ml del medio PDA y en cada placa se colocaron 5 segmentos de raíces, seguidamente se incubaron a 28°C y a partir de las 24 horas se procedió a observar con la ayuda de un microscopio estereoscópico la aparición del crecimiento micelial; una vez confirmado el mismo se transfirió a placas de Petri de 7 cm de diámetro conteniendo 10 ml del medio PDA e incubadas a 28°C durante 48 horas. A los aislados obtenidos se realizaron preparaciones en portaobjetos con lactofenol azul y se procedió a describir sus características e identificar el género y especie.

Dentro de los principales caracteres culturales evaluados se destacaron: la forma de las colonias, color del césped micelial y del reverso de las colonias así como la textura.

Por último se realizó la prueba de patogenicidad, cumpliendo con el último postulado de Koch, sobre vitroplantas recién adaptadas de Gran Enano en condiciones de sustrato previamente esterilizado, con el régimen de humedad establecido en la fase IV para simular las condiciones a que son sometidas las vitroplantas de bananos. Se utilizaron cuatro aislados y se inocularon a razón de 10⁵ ufc/ml y se emplearon por planta 20 ml de la suspensión por planta e inocularon 10 plantas por aislados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó que el agente causal de la marchitez de las posturas de bananos fue *Pythium derbayanum* Heese, un patógeno importante del suelo que se ve favorecido por condiciones de alta humedad.

Se obtuvieron un total de 4 aislados del agente causal de la marchitez en vitroplantas de bananos, que resultaron ser patogénicos, además se describieron algunas características entre las que se destacaron: hifas engrosadas, hialinas, ramificadas, sin septos, esporangios dentados y alargados, zoosporangios redondeados con zoosporas envueltas en

una matriz gelatinosa. Las colonias obtenidas fueron de crecimiento uniforme, el césped micelial de color blanco, con reverso blanco-amarillento y de textura algodonosa. En los aislamientos realizados aparecieron otros hongos que demostraron tener actividad saprofítica en el suelo, de ellos se identificaron los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*. Las características anteriormente descritas coinciden con las reportadas por autores como Walker (1965), Herrera (1989, 1996).

Los primeros síntomas aparecieron aproximadamente a los 35 días después de inoculadas las plantas y se lograron reproducir con exactitud los síntomas observados con anterioridad; el testigo sin inocular no mostró ningún síntoma de la enfermedad. Con esto se confirmó que *Phytium Debaryanum* era el agente causal de la marchitez de las vitroplantas de banano en la fase de aclimatización.

Las condiciones de elevada humedad favorecen la aparición de esta importante enfermedad por lo que el uso de un sustrato con buenas propiedades físicas así como mantener un régimen de riego adecuado son elementos importantes para evitar la aparición de este patógeno. Recomendamos tener especial cuidado en la elaboración del sustrato a utilizar, de modo que no permita un sobrehumedecimiento al establecerse las condiciones de humedad requerida en esta fase. Además orientamos en lo posible realizar una desinfección del sustrato y del material vegetal antes de ser plantado.

BIBLIOGRAFÍA

- Herrera, Y. L., 1996. La marchitez de las vitroplantas de banano en la fase de adaptación causada por *Pythium derbayanum*, Heese. Centro Agrícola 3: 93-96.
- Walker, J. C., 1965. Patología Vegetal. 2^{da} Edición. La Habana, Instituto cubano del Libro, 818 p.

1-04 Alternativa para el saneamiento al virus DMV en malanga (*Xanthosoma sagittifolium* Schott), Clon México 8, mediante electroterapia.

Janet Igarza Castro¹, Ricardo Hernández Pérez², Beatriz Cruz Castellanos¹.

¹Laboratorio Provincial de Biotecnología Vegetal, Holguín, Cuba. E-mail: cbv@cbv.hlg.sld.cu²Instituto Nacional de Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara. E-mail: inivit@quantum.inf.cu

Palabras claves: *Xanthosoma sagittifolium*, saneamiento, virus del mosaico de la malanga, electroterapia.

INTRODUCCIÓN

Los métodos tradicionales de saneamiento a enfermedades han sido aplicados, por lo general teniendo en cuenta el patógeno y su traslocación en el tejido de la planta. Comúnmente se utilizan para atenuar o eliminar los virus en vegetales (Quar, 1977; Lozoya y Dawson, 1982; Griffith et al., 1990; El Amin et al 1994; Hernández et al, 1995). Numerosas investigaciones al aplicar estas técnicas han llegado a obtener hasta un 100% de saneamiento, sin embargo no se pueden proponer como tecnologías estandarizadas porque no cumplen con los requisitos fundamentales como son la eficiencia para entrar en un proceso productivo y presentan desventajas por el gran número de material inicial destruido, largos periodos de tiempo para obtener material vegetal para el diagnóstico y la baja producción de material saneado (Hernández et al., 1997).

Hernández et al, (1997) construyeron un equipo con aditamentos para procesar un gran número de muestras para el programa Nacional de Saneamiento del Complejo Viral del Ajo (Patente AO 1C/ 08 No 22496) extendido después como método al Programa Nacional de Producción de micropropagación de líneas sanas de caña de azúcar desde 1995-1997, como alternativa para el control de bacterias y virus (Hernández et al, 1997) y posteriormente en papa para el control del Virus del Enrollamiento de la Hoja de la papa (Bernal y Hernández 1997), reportado para otros virus como el PVX y PVY (Lozoya, 1996).

Según se informa la enfermedad más difundida en *Xanthosoma*, *Colocasia* y de forma general en las Aráceas, es el virus del mosaico de la malanga (Dasheen Mosaic Virus, DMV) (Zettler et al, 1978); encontrándose su incidencia en Cuba en el 95% de las plantaciones de malanga (Quintero, 1987). Teniendo en cuenta las limitaciones que tienen el cultivo de meristemos y las pérdidas que se producen cuando se usa la hidrotermoterapia (MINAGRI, 1990), es que consideramos importante estudiar como alternativa de saneamiento el uso de la corriente eléctrica para la eliminación del virus mosaico de la malanga (DMV).

Se seleccionaron los cormos debidamente diagnosticados con presencia de la enfermedad viral DMV. A las yemas se le aplicó electroterapia como método de saneamiento y los ápices meristemáticos (0.1-0.5 mm) fueron sembrados en medios de cultivo líquido según tecnología de micropropagación en el cultivo de malanga del INIVIT (García et al, 1998). Se realizaron dos subcultivos para el diagnóstico mediante UM-ELISA, obteniéndose como resultado de los diferentes tratamientos eléctricos empleados un 100 % de plantas regeneradas, mayor que el testigo sin tratar (70-75 %). Una X de crecimiento de casi el doble del tamaño de las vitroplantas (6,1 cm). Con un saneamiento al virus entre 70-100%. Los resultados de la investigación al aplicar la Electroterapia, permiten llegar a definir un procedimiento para la obtención de plantas libres al DMV lo cual fue comprobado en el clon Mex-8 del género *Xanthosoma*.

1-05 Selección de plantas libre de virus en el campo para la micropropagación de *Xanthosoma sagittifolium* L.

Malachy Dottin¹, Juan N. Pérez Ponce¹, D. Agramonte¹, R. Hernández², Tatiana Pichardo¹ y Felipe Jiménez¹.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. E-mail: propag@ibp.edu.cu

²Instituto de Viandas Tropicales, Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara. E-mail: inivit@quantum.inf.cu

Palabras claves: micropropagación, *Xanthosoma sagittifolium*, malanga, diagnóstico, virus del mosaico de la malanga.

INTRODUCCIÓN

La selección de planta donadores de malanga se debe realizar en el banco de germoplasma de alta calidad genética y fitosanitaria o en plantaciones destinadas a semillas, con adecuada agrotécnica y sistemas fitosanitarios preventivos establecidos, esto es lo ideal. Resultaría además de gran factibilidad realizar la selección en plantación de vitroplantas, donde la utilización de semilla sana disminuye los niveles de infección de los campos. Cualquier intento por desarrollar un programa de reproducción de semilla básicas en este cultivo en las biofábricas del país, llevaría implícito la utilización de una gran cantidad recursos y equipamientos indispensable para obtener las plantas sanas de DMV. Por tanto, Los objetivos de este trabajo fueron los de conocer las posibilidades de detectar el Mosaico de la Malanga a través de un kit comercial, enfretándolo al aislado presente en Villa Clara, mediante la aplicación de la técnica de UM-ELISA en plantas micropropagadas y procedentes de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las técnicas utilizadas para el procesamiento de las muestras siguieron el procedimiento descrito por Bernal (1997). Se evaluaron 90 plantas de un total de 5557 de 1.2 hectáreas en el campo. El carácter sintomático y asintomático de sendos grupos fue confirmado mediante el diagnóstico por

Utramicro-ELISA de doble anticuerpo en el Laboratorio de Virología del IBP. La interpretación de los resultados se realizó considerándose positivas todas aquellas muestras cuyo valor fue superior al límite de corte (cut off) obtenido por el duplo de la medida de los controles negativos. Las placas fueron repetidas cuando no reunían los parámetros de calidad previstos para los análisis inmunoenzimáticos (Peralta y Frías, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 muestra la comprobación entre los valores de fluorescencia, obtenidos en muestras con síntomas del Mosaico, semejantes a los producidos por el DMV en campo y los valores de plantas asintomáticas. Se analizaron 45 plantas con síntomas, sólo el 32.4% de plantas con síntomas del mosaico en campo resultó positivo y el 67% negativo.

A manera de conclusión se observa que el porcentaje de plantas negativas al DMV en campo fue de 44.0-55.5%, la selección en base a los síntomas de campo no fue eficiente para obtener plantas negativas al DMV y las plantas positivas y negativas se comportaron con similares coeficientes de multiplicación *in vitro* (Tabla 2). Estos resultados obtenidos permiten postular que con un eficiente sistema de diagnóstico se pueden seleccionar plantas libres del virus en el campo.

Tabla 1: Valores de fluorescencia de muestras y controles con síntomas y asintomáticos procedentes de campo.

	Plantas con síntomas		Plantas asintomáticas	
	No. Muestras	Val. Fluoresc	No. Muestras	Val. Fluoresc
Positivos	12	14.99	1	13.29
Negativos	25	6.59	11	5.22
Dudosos	8	11.20	13	11.33
Total	45	-	25	-

Tabla 2: Resumen de la presencia de DMV en campo, *in vitro* y en fase de adaptación.

	Plantas en campo		Vitroplantas <i>in vitro</i>	Vitroplantas en fase de adaptación
	Con síntomas	Sn síntomas		
% Positivas	26.6 b	40.0 b	46.4 a	56.4 a
% Negativas	55.5 a	44.0 ab	53.6 a	39.8 b
% Dudosas	17.7 c	52.0 a	0 b	3.8 c

BIBLIOGRAFÍA

Dottin, M., 1997. Tecnologías para la micropropagación *in vitro* de clones de *Xanthosoma sagittifolium* (L). Tesis de Maestría. Universidad Central de las Villas. Santa Clara Cuba.

Bernal, F. J., 1997. Técnicas de saneamiento para la obtención de Papa. (*Solanum tuberosum* L.) libre de virus. Tesis de Maestría. Universidad Central de las Villas. Santa Clara Cuba.

1-06 Caracterización del organismo causal de la Escaldadura foliar en caña de azúcar.

Madyu Matos, Yamilé Figueredo, J. R. Pérez Milián, Antonio Chinae y Francisco Jerez.

Estación de Investigación de la Caña de Azúcar. Jovellanos 42600, Matanzas, Cuba. E-mail: pp@epica.atenas.inf.cu

Palabras claves: caña de azúcar, escaldadura foliar, *Xanthomonas albilineans*, bacteria, identificación.

INTRODUCCIÓN

La escaldadura foliar de la caña de azúcar, producida por la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, es una de las enfermedades vasculares más importantes a nivel mundial y está representada en 59 regiones geográficas. La sintomatología de esta enfermedad se distingue por presentar tres fases diferentes: crónica, aguda y una fase de latencia, que puede durar desde algunas semanas o meses, durante los cuales los tallos o raíces infectadas no manifiestan ningún síntoma. En Cuba permaneció en latencia durante muchos años, sin embargo recientemente se observó una manifestación de la sintomatología que afectó a un gran número de variedades.

La célula bacteriana, presenta forma alargada con dimensiones de 0.25-0.30mm por 0.6-1.0mm, puede aparecer solitaria o en cadenas y presenta un flagelo polar. Las colonias que forma son de color amarillo pálido, viscosas pero no mucosas. Se han encontrado 3 serovares distribuidos en diferentes zonas geográficas del mundo. El estudio de la resistencia varietal y la caracterización morfológica, serológica y bioquímica del organismo causal es de vital importancia para la obtención de variedades resistentes a esta enfermedad y garantizar un sistema de semilla con la calidad fitosanitaria que exigen los programas nacionales, ya sea por vía biotecnológica o por el sistema tradicional.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los aislamientos de la bacteria obtenidos sobre medio de cultivo Wilbrink, a partir de variedades con síntomas de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 6 aislamientos procedentes de las variedades L55-5, C120-78, C86-503, C85-214, My55-14 y CS93-4392 de las provincias de Matanzas, Villa Clara y La Habana. Para la evaluación morfológica se tuvo en cuenta la dinámica de crecimiento a 28°C y las características culturales de las colonias. La evaluación bioquímica incluyó la tinción de Gram, el comportamiento de la bacteria frente a la catalasa, el almidón, así como su crecimiento en agar nutritivo y medio Wilbrink sin peptona. El estudio serológico se realizó mediante la técnica de Aglutinación en portaobjetos y la Inmunodifusión Doble (IDD), utilizando antisueros de producción nacional.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de la evaluación morfológica se apreciaron colonias aisladas de 1mm de diámetro con bordes enteros, lisas, de color miel al principio, brillantes y después se tornaron amarillas, las cuales comenzaron a crecer a partir del 5^{to} y 6^{to} día de sembradas, coincidiendo con lo descrito por otros autores. Al realizar los ensayos bioquímicos el comportamiento fue el esperado, en todos los casos respondieron al género y especie estudiados. La evaluación serológica corroboró la presencia de *X. albilineans*, ya que la aglutinación en portaobjetos fue positiva con todos los aislamientos y la IDD reveló identidad serológica entre las cepas y el antisuero utilizado. Podemos concluir que las cepas analizadas responden a la presencia de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y estas pueden ser utilizadas para las inoculaciones en los experimentos de resistencia de las variedades de caña de azúcar ante la escaldadura foliar.

1-07 Diagnóstico del virus del estriado del banano (BSV) en cultivares híbridos de la FHIA y otros de interés comercial en Cuba.

Tatiana Pichardo Moya¹, Elio Jiménez¹, Caridad Font², Elena Medina³, Rafael Prado³.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas. Cuba, Carretera a Camajuaní km. 5.5 Santa Clara, Villa Clara, Cuba. E-mail: virol@ibp.edu.cu

²Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ministerio de la Agricultura, Cuba.

³Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Villa Clara. Ministerio de la Agricultura, Cuba

Palabras claves: banano, virus del estriado del banano, diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

El virus del estriado del banano (BSV) se ha convertido en los últimos años en una fuerte preocupación para los productores de bananos y plátanos a nivel mundial. Aún cuando existen muy pocas evidencias acerca del impacto agronómico y económico de la enfermedad y la interacción entre las razas del virus y los distintos cultivares, sí se han reportado pérdidas importantes en algunos genotipos.

Este virus fue descrito por primera vez en Costa de Marfil (Lassoudiere, 1974) y fue aislado por Lockhart en 1986. El mismo ha estado ampliamente distribuido en distintas áreas geográficas, sin embargo el incremento reciente en su incidencia parece estar ligado, aunque no siempre, al uso de híbridos tetraploides (INIBAP, 1998).

En Cuba fueron introducidos a inicios de la década del 90 un grupo de híbridos tetraploides de la Federación Hondureña de Investigaciones Agrarias (FHIA) y varios de ellos han sido pro-

pagados aceleradamente mediante cultivo *in vitro* e introducidos ampliamente a escala comercial. El objetivo del presente trabajo fue realizar un diagnóstico de BSV y determinar su posible distribución entre los principales cultivares híbridos de FHIA introducidos al país así como otros cultivares de interés comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron en campo muestras de 11 cultivares tetraploides así como de los cultivares triploides Gran Enano y Gross Michel (AAA) procedentes de la Estación Experimental del IBP en Remedios y de la Empresa de Cultivos Varios La Cuba en la provincia de Ciego de Avila.

La detección del BSV se realizó utilizando la técnica de DAS-ELISA con un kit comercial de la firma AGDIA, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La lectura de las placas se realizó en un equipo SUMA 121.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los dos muestreos realizados, de un total de 650 plantas testadas 26 resultaron positivas para un 4% de infección. La presencia del virus fue detectada en 8 de los cultivares híbridos de FHIA (FHIA 01-V1, 02, 04, 18, 19, 21, 22 y 23), con rangos que oscilaron entre un 2 y un 30 % de infección, mientras que en los cultivares FHIA 01, 05 y 20 no se detectó ninguna planta positiva. En los dos cultivares triploides incluidos en estos ensayos (Gran Enano y Gross Michel) no se detectaron plantas con infección por BSV. Estos resultados coinciden con la hipótesis de que la incidencia de este badnavirus es mayor en cultivares híbridos tetraploides, tal vez debido a la activación de secuencias virales integradas que ocurre durante el propio proceso de hibridación (INIBAP, 1998). Otros factores como stress ambiental y la multiplicación *in vitro* han sido identificados como causas también del aumento de la incidencia del BSV. La detección de este virus es muy problemática debido a la heterogeneidad genómica y serológica de los distintos aislados, es por esta razón que se precisa del desarrollo de métodos de diagnóstico que permitan la detección más precisa del virus tanto en su forma episomal como integrada.

Los resultados de este trabajo constituyen la base para posteriores estudios sobre la incidencia y distribución de esta enfermedad en cultivares de *Musa sp.* en Cuba.

BIBLIOGRAFÍA

- INIBAP, 1998. Banana streak virus: a unique virus-Musa interaction? Proceedings of a workshop of the PROMUSA Virology working group held in Montpellier, France. 19-21 January. 67 pp.
- Lassoudiere, A., 1974. La mosaïque dite à tirets du bananier Poyo en Côte d'Ivoire. Fruits 29:349-357.
- Lockhart B. E.L. 1986. Purification and serology of a bacilliform virus associated with banana streak virus disease. Phytopathology 76 (10): 995-999.

MEJORA POR VARIACIÓN SOMACLONAL, MUTAGÉNESIS Y SELECCIÓN *IN VITRO*.

2-01 Obtención, evaluación y extensión de somaclones de caña de azúcar (*Saccharum spp.* Híbrido).

Juan Pérez Ponce, Pedro Orellana Pérez, Elio Jiménez González, Rafael Gómez Kosky, Víctor Gil Díaz, Lourdes García Rodríguez, Ignacio García Moya, Blanca Pérez Mederos, Idalia Herrera O'Farrill, María de los Ángeles Águila, Elio Alfonso Castro, Juan Vidal Herrada¹, Ignacio Santana², Omelio Carvajal²,

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: perez@ibp.edu.cu

¹Facultad de Montaña del Escambray (FAME), Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba.

²Estación Experimental de la Caña de Azúcar, EPICA, Jovellanos, Matanzas.

Palabras claves: caña de azúcar, mejoramiento genético, mutagénesis, somaclones IBP.

INTRODUCCIÓN

La alta ploidía de las especies implicadas en el mejoramiento genético, la inestabilidad de los cromosomas debido a las aneuploidías (Price, 1962) y al mosaico cromosómico que se presenta en este cultivo, hacen muy difícil los estudios genéticos, así como los trabajos de mejoramiento clásico por hibridación. Por ello se trabaja con grandes poblaciones segregantes, de modo que la eficiencia de muchos programas de cruzamiento es baja, ya que requieren de 10 a 15 años de trabajo en los esquemas de selección a partir de cruzamientos, y para la obtención de una nueva variedad como media mundial se requieren 500 000 posturas.

Con el surgimiento de las técnicas biotecnológicas que permiten manejar *in vitro* órganos, tejidos y células, surge una amplia perspectiva para el empleo de estas técnicas tanto para la propagación masiva como para el mejoramiento genético

La posibilidad de tener un método sencillo y eficiente para poder mejorar caracteres específicos a buenos genotipos, como resistencia a enfermedades o a condiciones

ambientales adversas como sequía o salinidad u otros defectos de las plantas ha sido siempre una hipótesis de la genética mutacional, sin embargo, no se han obtenido los resultados que se esperaban. Con el empleo del cultivo *in vitro* para la mutagénesis inducida se abren muchas perspectivas para la genética mutacional, lo que puede considerarse la nueva era de las mismas

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la aplicación de técnicas biotecnológicas en la mejora genética de la caña de azúcar se realizaron investigaciones básicas para evaluar la regeneración de plantas con alta eficiencia, la magnitud de la variación somaclonal, el empleo de mutagénicos físicos y químicos *in vitro*, así como los métodos y procedimientos para la selección de poblaciones obtenidas *in vitro*. Para la ejecución del trabajo se confeccionó un esquema de selección (Pérez Ponce et al., 1998) donde se obtuvieron de 5000 - 22 928 individuos por variedad de interés para la producción, los que fueron seleccionados sobre la base de los objetivos específicos de la mejora. En el caso de la variedad B43-62 también se trabajó con tratamientos mutagénicos químicos en las

yemas. Los mutagénicos empleados fueron radiaciones de Co^{60} a dosis de 10 - 20 - 30 - 40 y 50 Gy y NaN_3 a 0.01, 0.001 %. Se determinaron las técnicas y procedimientos *in vitro* incluyendo los tratamientos mutagénicos. Los experimentos de campo fueron evaluados en base a las características morfológicas según metodología de Dillewijn (1952) y para los caracteres agroazucareros por la metodología del INICA, (Anónimo, 1985)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los resultados metodológicos se definió un esquema de selección, también se verificó que sólo después de tres multiplicaciones vegetativas, se puede realizar una selección de verdaderos mutantes.

Se obtuvieron 16 somaclones. Los somaclones obtenidos fueron evaluados con respecto a la resistencia a enfermedades en las pruebas estatales establecidas para este objetivo. El comportamiento agroazucarero se

determinó en experimentos de campo desarrollados en estaciones experimentales de la Universidad Central, del INICA y en bloques experimentales de complejos azucareros. Para la extensión se obtuvieron de 200000 a 400000 vitroplantas de cada somaclón seleccionado en dependencia de las solicitudes de la producción. De los 16 somaclones evaluados 5 se aprobaron para la extensión e introducción en la producción, estos son: de la CP52-43 el somaclón IBP83-27, de C87 51 el IBP 87-100 de POJ28-78 los somaclones IBP 89-112, IBP 89-361 e IBP 89-355. En la tabla 1 se exponen los resultados integrales del programa, apreciándose que para la obtención de una nueva variedad se requirieron 11 432 individuos y los esquemas de selección duraron de 5 a 7 años demostrándose la eficiencia de la mejora mutacional *in vitro* en comparación con la mejora convencional para caracteres específicos, lo cual ha sido planteado por varios investigadores, pero no con resultados concretos (Larkin y Scowcroft, 1981 y Micke y Donini, 1994).

Tabla 1. Resultados del programa de mejora por Biotecnología.

Carácter a mejorar y Genotipo	Tratamiento mutagénico	No Plantas	Selección x Tratamiento	No.	% Total	Variedades obtenidas
Contenido de azúcar POJ28-78	10 - 20Gy callos	8 230	4	10 Gy-2	0.04	2-10 Gy 3
Reducción de la floración C52-43	0 - 10 - 30 - 50Gy callos	5 000	8	20 Gy-2	0.16	1-30Gy 1
Resistencia a roya B43-62	NaN_3 0.01 callo	22 928	3	0-2, 10Gy-2, 3-1, 50Gy-3	0.02	1-10Gy 1
Resistencia a la sequía C87-51	10 y 20Gy callo	6 000	1	2-40Gy 1 NaN_3	0.01	1-10Gy 1
Resistencia a carbón J60-5 y My54-50	0 - 10 - 30Gy callo	15 500		1 - 10Gy		
						4-10Gy 5
TOTAL		57 158	16	-----	-----	1-30Gy

BIBLIOGRAFÍA

- Dillewijn, C. Van., 1952. Botánica de la caña de azúcar. Ed. Revolucionaria, Instituto del Libro. Habana 480 p.
- Larkin, P., J., Y W., R., Scowcroft, 1981. Eyespot disease of sugarcane. Plant Physiol. 67; 408-414.
- Micke, A., y B., Donin, 1994. Induced Mutation. En: M. D. Haywood, N. O., Chapman y J. Hall (Eds) Plant Breeding; Principles and Prospects p 52-62.

Anónimo, 1985 Normas técnicas para el cultivo de la caña de azúcar y las evaluaciones de campo. INICA.

Pérez Ponce, J.N., 1998. Mutagénesis *in vitro*. En: J. N. Pérez Ponce (Ed) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas p 297-324.

2-02 Mejoramiento del híbrido de plátano FHIA - 21 (AAAB) con el uso de la mutagénesis *in vitro*.

Idalmis Bermúdez, P. Orellana, J. Pérez Ponce, J. Clavero, N. Veitía, C. Romero, L. García R, R. Mujica y L. García.

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: orrellana@ibp.edu.cu

Palabras claves: FHIA-21, mutagénesis, mejoramiento genético, Sigatoka negra, radiaciones Gamma.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad más destructiva de bananos, plátanos y bananos de cocción en el mundo es la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Desde su aparición en Cuba en noviembre de 1990, la Sigatoka se ha convertido en la enfermedad fungosa más importante que afecta las plantaciones de plátanos y bananos en el país.

La solución más adecuada para reducir los daños de esta devastadora enfermedad, es el desarrollo de variedades resistentes. Desde 1984 la FHIA (Federación Hondureña de Investigación Agrícola) ha venido desarrollando un amplio programa para la búsqueda de híbridos resistentes a la Sigatoka, entre ellos el plátano FHIA-21 (AAAB), tipo French (hembra), de alto rendimiento, buena calidad y tamaño de los frutos, resistente a *Fusarium oxysporum*, pero presenta problemas debido a su porte demasiado alto y su pobre ahijamiento.

El empleo de agentes mutagénicos conjugados con las técnicas de la biotecnología ofrece una oportunidad de intensificar la variabilidad genética para mejorar características agronómicas (Ho et al, 1993, 1994). Adicionalmente, la disponibilidad de las técnicas de cultivo de tejidos también facilita la inducción, la selección y propagación de los mutantes.

En vistas del estado actual de las técnicas de mejoramiento con el uso de la

Biotechnología se desarrolló este trabajo con el objetivo de seleccionar somaclones con porte bajo en poblaciones irradiadas del cultivar FHIA 21 y estudiar su comportamiento frente a la Sigatoka negra.

MATERIALES Y MÉTODOS

La primera parte del trabajo consistió en el establecimiento en el laboratorio del material vegetal, para luego multiplicarlo *in vitro* siguiendo el procedimiento que describen Orellana et al., (1991). Luego fueron irradiadas con dosis de 25 Gy de radiaciones Gamma, fuente C⁶⁰, para inducir variabilidad en el material vegetal (multiyemas). Posteriormente se multiplicaron durante 5 subcultivos y se regeneraron hasta obtener 10 000 vitroplantas enraizadas, las que se sembraron en invernadero durante 45 días y finalmente fueron transplantadas al campo, en la Estación Experimental de Remedios (IBP). Durante el desarrollo de la plantación, no se realizaron aplicaciones de fungicidas y se realizó una labor cultural mínima para observar la respuesta natural de las plantas.

Las evaluaciones realizadas consistieron en la selección de plantas con caracteres positivos en el campo, a la vez que se estudió la variabilidad de la población. Se evaluó la altura de la planta (estableciéndose tres rangos), diámetro del pseudotallo, número de hojas totales y número de hojas manchadas por Sigatoka negra en la emisión y cosecha del racimo, número de manos y dedos del racimo (en tres rangos). Las líneas con

características positivas se sembraron en la misma Estación Experimental, en forma de estudio clonal a 5 plantas por línea en comparación con el FHIA 21 original. Las líneas más promisorias fueron implantadas *in vitro* para incrementar la población de cada una de ellas y estudiarlas en otros ambientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las evaluaciones mostraron una alta variabilidad en el material vegetal en cuanto a la altura de la planta, diámetro del pseudotallo, número total de hojas, incidencia de Sigatoka negra así como cambios en el racimo, lo cual indica la eficiencia de la combinación del mutágeno físico y el cultivo de tejidos. Resultados semejantes obtuvieron Novak et al., (1990) en un programa de mejoramiento por mutaciones en los clones de este género.

Una alta tasa de variación entre las plantas fue observada fundamentalmente en la altura de estas como se puede apreciar en la tabla 1.

En el material irradiado seleccionado se obtuvieron 41 plantas (38,3%) con altura inferior a 250 cm y 61 (57,0 %), que varió entre 251 y 300 cm, sólo 5 plantas seleccionadas, sobrepasaron los 300 cm. En la población irradiada no seleccionada el 35.76 % de las plantas alcanzaron una altura no superior a 250 cm y el 58.68 % no sobrepasó los 300 cm. Lo anterior evidencia que existió una marcada influencia ambiental en ambas poblaciones, pues la altura normal de este cultivar para el primer ciclo oscila entre 250 y 300 cm, sin embargo, se encontró dentro de las plantas de porte más bajo, en el material irradiado, varias con cambios favorables en cuanto al tamaño del dedo, forma del racimo y estructura foliar, muy diferentes a las del original. Los objetivos de la investigación no estaban encaminados sólo a la búsqueda de plantas de porte bajo, pues como indican los valores porcentuales, estos se mantienen muy similares, sino teniendo en cuenta el conjunto de otros caracteres positivos. Es importante señalar que muchos cultivares de plátanos y bananos, en el primer ciclo, no desarro-

llan la altura que alcanzan en los siguientes.

Se observaron también grandes variaciones en el número de dedos del racimo en la población total, obteniéndose una mayor cantidad de plantas con racimos de más de 60 dedos. La frecuencia de variantes fenotípicas en las primeras 1024 plantas evaluadas fue de 4.00 %, obteniendo 4 somaclones con posible cambio a Horn, aunque dos de ellos han presentado afectaciones por Sigatoka negra (Tabla 2).

Cuando se comparó la población de material irradiado seleccionada y no seleccionada en cuanto a su promedio y a la desviación típica de las poblaciones, se pudo determinar que el material irradiado no seleccionado presentó una altura media de 270.71 cm superior a la del material seleccionado que fue de 250.44 cm. En el caso del número de manos por racimo la media estuvo entre seis y siete manos en ambos casos. Al analizar los promedios del número de dedos por racimo se encontró que las plantas lograron en la mayoría de los casos más de 60, mostrando una correlación positiva entre la altura de la planta y el número de dedos totales por racimo.

Entre las selecciones se destacan cinco plantas que presentaron el mejor comportamiento integral en varios caracteres, encontrándose diferencias entre ellas en cuanto a su reacción a la Sigatoka negra.

Las líneas seleccionadas se han establecidas nuevamente *in vitro* con el fin de producir suficiente cantidad de plantas para las comparaciones posteriores en ensayos replicados con el cultivar original FHIA-21, una vez se tengan los resultados del estudio clonal. Es importante señalar que existió una alta afectación por Sigatoka negra en el clon FHIA-21 de forma general, no llegando a llenar completamente los dedos del racimo, siendo esto contradictorio con reportes que plantean la alta resistencia de este híbrido (Cote et al., 1994).

Tabla 1, Comportamiento de la variabilidad en la altura de las plantas durante el primer ciclo.

Rangos de altura (cm)	No. de plantas seleccionadas	Frecuencia de cambios (%)
MATERIAL IRRADIADO SELECCIONADO		
100-250	41	38.30
251-300	61	57.00
> 300	5	4.70
TOTAL	107	100.00
MATERIAL IRRADIADO SIN SELECCIONAR		
100-250	103	35.76
251-300	169	58.68
> 300	16	5.55
TOTAL	288	100.00

Tabla 2. Variaciones fenotípicas observadas en plantas seleccionadas durante el primer ciclo, con relación al cultivar original.

No.plantas evaluadas	Porte bajo (posible Horn)	Dedos más largos.	Dedos cortos y finos.	Dedos pequeños y rectos.	Alta resistencia Sigatoka negra.	Frecuencia Total (%)
1024	4	10	20	12	3	4.00

BIBLIOGRAFÍA

- Cote, J, Rosales, F, Rowe, P y Rivera, C., 1994. Reacción a Sigatoka negra y comportamiento agronómico de plátanos híbridos (AAAB) sometidos a desmane. Memorias XI Reunión ACORBAT. San José. Costa Rica: 339-405.
- Ho, Y. W., Tan, Y. P y Mak, C., 1993. Micropropagation for commercial production of plantings materials with special reference to banana. En: Proceedings of a Seminar on The Fruits Industry in Malaysia, Jahor Bham, Malaysia, 7-9 september.
- Ho, Y.W., Mak, C y Tan, Y. P., 1994. Strategies in the improvement of banana cultivars for commercial scale cultivation. En: Proceedings of International Planters Conference, Kmalu Lumpur, Malaysia: 71-82.
- Novak, F. J., Afza, R., Van Duren, M and Omar, M. S., 1990. Mutation induction by Gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot tips of banana and plantain (*Musa cvs.*). Tropical Agriculture (Trinidad) 67: 21-28.
- Orellana, P. P., Pérez, J., Agramonte, D., Gómez, R., Jiménez, E., Martínez, S., Almaguer, E y Gómez, R. 1991. La micropropagación del plátano a escala comercial en Cuba. ACEVIC. Boletín Científico. Vol. 3 (3) : 29-38.

2-03 Inducción de mutaciones por radiaciones Gamma en el cultivo *in vitro* de brotes de banano cv. Gran Enano (AAA).

Lourdes García Rodríguez, Idalmis Bermúdez Caraballos, Pedro Orellana Pérez, Novisel Veitia Rodríguez, Leonardo García Rodríguez, Justo Clavero García y Carlos Romero Quintana.

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 orellana@ibp.edu.cu

Palabras Claves: banano, mutagénesis, radiaciones Gamma, variación fenotípica, mejoramiento genético

INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos constituyen unos de los principales cultivos en los países tropicales y subtropicales, siendo el cuarto después del arroz, el trigo y el maíz en importancia para la alimentación. Sin embargo la producción de *Musa* está seriamente afectada por la incidencia de plagas y enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nemátodos. Debido a que la mayoría de los clones de plátano y banano son propagados vegetativamente, generalmente son triploides, estériles y con frutos partenocárpicos, el mejoramiento a través de cruzamientos es extremadamente difícil, por lo que la utilización del mejoramiento por mutaciones cobra un rol importante en este cultivo.

Las técnicas convencionales de mutación han sido frecuentemente utilizadas para mejorar los rendimientos, calidad, enfermedades y plagas en los cultivos. Ya que se pueden cambiar una o pocas características de un cultivar sin alterar completamente al genotipo. Más de 1700 variedades mutantes desarrolladas de 154 especies de plantas han sido oficialmente liberadas (Maluszynski et al., 1995). El uso del cultivo *in vitro* puede sobreponer algunas de las limitaciones en la aplica-

ción de esta técnica y en combinación pueden acelerar los programas de mejoramiento desde la generación de la variabilidad hasta la selección y la multiplicación de los genotipos deseados. Las ventajas que como modelo tiene el cultivo *in vitro*, para la aplicación de la mutagénesis están claras por dos razones biológicas que son: la capacidad de regenerar plantas a partir de una o pocas células y la otra, la capacidad de la descomposición de las quimeras manejando el cultivo (Pérez, 1998).

Con el objetivo de estudiar diferentes dosis de radiaciones Gamma en brotes del clon Gran Enano para seleccionar el rango óptimo y cuantificar las alteraciones fenotípicas encontradas en la población es que se decide la realización de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ápices de banano cv. Gran Enano (AAA) fueron aislados de cormos provenientes de la Estación experimental de Remedios (IBP) para su establecimiento en el laboratorio según el procedimiento descrito por Orellana et al. (1991). Los brotes obtenidos se colocaron en un medio para la inducción de yemas adventicias compuesto por las sales MS suplementadas con 6 Bencil aminopurina (6BAP) 20 mg/l,

ácido indolacético (AIA) 0.65 mg/l y sacarosa 30 g/l. El pH del medio se ajustó a 5.8. Los explantes fueron tratados con 8 dosis desde 5 hasta 40 Gy de radiaciones gamma empleando una fuente Co⁶⁰. Inmediatamente después del tratamiento fueron colocados en frascos de cultivo de tejidos que contenían 30ml del medio de crecimiento. Se utilizaron 100 explantes por tratamiento. La misma cantidad fue evaluada como testigo sin la aplicación del tratamiento mutagénico. La radiosensibilidad y la recuperación posterior fueron medidas evaluando:

- Peso fresco a los 14, 30 y 45 días después de aplicado el tratamiento mutagénico
- Porcentaje de mortalidad de los brotes a los 45 días.

Con la dosis seleccionada se procedió a un tratamiento masivo de explantes con el objetivo de evaluar en condiciones de campo las alteraciones fenotípicas de las plantas. Se sembraron 6000 vitroplantas en el área de la Estación Experimental antes mencionada, evaluándose los cambios encontrados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los explantes mostraron diferentes respuestas en dependencia de las dosis de radiaciones aplicadas y los utilizados como testigo tuvieron un incremento del peso fresco de 8.21 gr., mientras que los tratamientos mostraron una disminución gradual del incremento del peso a medida que las dosis de radiaciones se hacían mayores, llegando solo a 2.2 gr. con la dosis de 40 Gy. Cuando se analizó el porcentaje de mortalidad encontramos que aumentó considerablemente a medida que se incrementaron las dosis de radiaciones encontrándose los valores de la LD₅₀ entre 20-25 Gy.

Roux, (1997) realizando un estudio de radiosensibilidad en varios cultivares

de *Musa* encontró que existían diferentes respuestas en dependencia del nivel de ploidía y la constitución genética de los clones proponiendo diferentes dosis de radiaciones gamma para cada uno: 10-20 Gy para los diploides Calcutta 4 (AA) y Tani (BB), 30-40 Gy para los triploides Gran Enano (AAA) y Williams (AAA) y 40-50 Gy para el triploide Cachacco (ABB).

En nuestro trabajo con dosis de 40 Gy encontramos un porcentaje de mortalidad muy alto (85%), por lo que podemos considerar esta dosis como letal, seleccionándose 25 Gy como la dosis óptima que permite un crecimiento aceptable de los explantes en el medio de cultivo.

Una considerable variación fenotípica fue observada en las plantas regeneradas desde los brotes después del tratamiento mutagénico. En los primeros estados de desarrollo de las plantas la irradiación afectó la emergencia y la expansión de las hojas jóvenes. Las alteraciones fenotípicas encontradas se aprecian en la tabla 1. Aberraciones morfológicas fueron observadas principalmente en algunas hojas jóvenes, lo cual indica un daño en el meristemo apical. Las variantes comprendieron cambios fenotípicos en la estatura de la planta, en la morfología y pigmentación de las hojas y el pseudotallo, así como en el hábito de crecimiento de la planta y el florecimiento precoz (alrededor de los 9 meses). Novak, (1990) obtuvo un 7.4% de alteraciones fenotípicas cuando trató brotes de Gran Enano con 30 Gy, en nuestro trabajo obtuvimos un 20.28% de cambios fenotípicos, donde el mayor porcentaje de variación se encontró en los cambios de coloración del margen del peciolo (39.6%) del total de variación y en el cambio de coloración de las hojas (18.39%).

Tabla1. Alteraciones fenotípicas observadas en las plantas de banano cv. Gran Enano (AAA) después de ser tratados los brotes con las radiaciones Gamma, dosis de 25 Gy.

Tipo de variación fenotípica	No. plantas	%
Enanismo: Plantas por debajo de los 1.10 m de altura	50	5.4
Coloración violácea de las hojas, nerviaciones y pseudotallo	93	10.12
Forma irregular de las hojas, textura coriácea	25	2.72
Cambio en la coloración de las hojas		
• Aumento de la pigmentación por antocianina (Hojas verde amarillentas y variegadas)	137	14.9
• Tonalidad verde oscuro	14	1.52
• Incremento de manchas violáceas	18	1.96
Cambio de coloración del margen del peciolo		
• Verde	108	11.75
• Pardo oscuro	71	7.72
• Franja ancha violácea	185	20.13
Rayado blanquecino de las hojas y el pseudotallo	6	0.65
Cambio en el hábito de crecimiento de la planta		
1. Hojas erectas	93	10.12
2. Roseta	21	2.28
3. Abanico	8	0.87
Pseudotallos finos	26	2.83
FloreCIMIENTO precoz (9 meses)	14	1.52
Unión de dos o más cambios	50	5.44

BIBLIOGRAFÍA

- Maluszynski, M.; Ahloowalia, B.S.; Sigurbjörnsson, B., 1995. Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. Euphytica 85: 303-315.
- Novak, F.J.; Afza, R.; Van Dren, M.; Omar, M.S., 1990. Mutation induction by Gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot-tips of banana and plantain (*Musa* cvs). Trop. Agric. (Trinidad). Vol 67 (1).
- Orellana, P.; Pérez, J.N.; Agramonte, D.; Gómez, R.; Jiménez, E., 1991. La micropropagación del plátano a escala comercial en Cuba. ACEVIC. Boletín Científico. Vol.3 (3): 29-38.
- Pérez, J.N., 1998. Mutagénesis *in vitro*. En: J.N. Pérez Ponce (Ed.) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Capítulo 17.390 pp.
- Roux, N., 1997. Improved methods to increase diversity in *Musa* using mutation and tissue culture techniques. Report of the Second Research Co-ordination Meeting of FAO/IAEA/BADC.

2-04 Estudio en condiciones de campo de seis líneas seleccionadas *in vitro* frente al cultivo filtrado de *Alternaria solani* (Sorauer) en papa *S. tuberosum* L. var Desirée.

Novisel Veitía Rodríguez, Miguel A. Dita, Lourdes García, Idalmis Bermúdez, Justo Clavero, Carlos Romero, Mayra Acosta y Leonardo García.

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: orellana@ibp.edu.cu

Palabras claves: Tizón temprano, papa, cultivo filtrado, mutagénesis, mejoramiento genético.

INTRODUCCIÓN

El tizón temprano enfermedad causada por el hongo *Alternaria solani* Sorauer y *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, según Arzuaga e Izquierdo (1983) constituye económicamente la enfermedad más importante que ataca las plantaciones de papa en Cuba. El principal método de control empleado ha sido el químico pero se buscan variedades resistentes como solución a largo plazo (Caligary y Nachmias 1988).

La variación somaclonal aparece como una fuente útil y accesible debido a la variabilidad expresada en la regeneración de plantas a partir de callos, protoplastos, embriones en cultivo y cultivo de meristemas; esta puede ser aumentada con el empleo de la mutagénesis *in vitro*. Las plantas regeneradas presentan diferencias en cuanto a características morfológicas, madurez y respuesta ante el ataque de patógenos; si además se cuenta con métodos efectivos de selección utilizando toxinas, medios selectivos y selección ante los patógenos, se incrementa significativamente la frecuencia de obtención de plantas tolerantes o resistentes.

La variación somaclonal como variabilidad en sí, es inferior desde el punto de vista del mejoramiento a la que se puede producir por medios físicos y químicos ya que las frecuencias de mutaciones génicas y puntuales pueden ser aumen-

tadas manejando los tipos y dosis de radiaciones fundamentalmente (Pérez, 1992).

El empleo de toxinas de carácter hospedero-específico en la búsqueda de plantas resistentes a enfermedades brinda la posibilidad de su uso en programas de mejoramiento como agente selectivo, incorporado a los medios de crecimiento en callos para la realización de bioensayos, así como estudios relacionados con la interacción huésped-patógeno (Lorenzo et al., 1992).

Tomando en consideración las afectaciones de este patógeno en nuestras condiciones y la susceptibilidad que en mayor o menor escala muestran las variedades que se cultivan actualmente en nuestro país nos propusimos en este trabajo evaluar en condiciones de campo la respuesta al ataque del tizón temprano en seis líneas seleccionadas *in vitro* frente al cultivo filtrado de *Alternaria solani*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las líneas seleccionadas se obtuvieron a partir de callos irradiados de la variedad Desirée (susceptible); estas fueron sometidas a la acción del cultivo filtrado de *A. solani* en condiciones *in vitro* según la metodología desarrollada por Veitía y Dita (1995). Posteriormente se multiplicaron, adaptaron y se sembraron un total de 1 000 vitroplantas por línea en condiciones de campo en la Estación Experimen-

tal de Remedios (IBP). Las evaluaciones respecto a la enfermedad se realizaron de acuerdo a la escala aprobada por el comité de expertos de Sanidad Vegetal ampliada a la categoría de afectación para la evaluación del tizón temprano en papa. Como testigo resistente se empleó la especie *Solanum chacoense*.

Los parámetros evaluados fueron los siguientes: brotación, altura de las plantas, número de tallos, incidencia de la enfermedad, número de tubérculos por planta y peso total de los tubérculos por planta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar la respuesta de las líneas frente a la enfermedad se observó que existió un grupo de estas que tuvieron un mejor comportamiento durante el transcurso de las evaluaciones, no difiriendo significativamente del testigo resistente. Se destacó la línea L-27 que alcanzó grados de afectación similares a la especie *Solanum chacoense* empleada como testigo resistente; le siguieron con menor grado de afectación las líneas L-30 y L-101. Las restantes líneas (L-107, L-38 y L-93) alcanzaron grados de afectación similares al testigo Desirée (susceptible). Estos resultados permitieron afirmar que tres de las seis líneas estudiadas, seleccionadas *in vitro* con el cultivo filtrado de *Alternaria solani*, han presentado en campo resistencia o tolerancia a la enfermedad lo cual corroboró los resultados obtenidos por Martínez y Mantell, (1994) quienes lograron trabajando con *Alternaria solani* en *Solanum phureja* Juz, et Buk correspondencia entre las plantas seleccionadas *in vitro* y las seleccionadas en condiciones de campo.

El comportamiento agronómico de las líneas que mostraron resistencia o tolerancia a la enfermedad fue superior (L-27 y L-30) o similar (L-107) a la variedad original.

Como resultado de las evaluaciones realizadas en condiciones de campo las líneas L-38 y L-93 presentaron los porcentajes de supervivencias más bajos respecto a las demás líneas y el testigo, de igual forma se comportaron en cuanto a

la altura y al número de tallos por planta.

En relación con los resultados referidos al peso total de los tubérculos por planta se obtuvo que las líneas L-27 y L-30 presentaron valores superiores en comparación con el testigo Desirée, la L-107 alcanzó valores similares y por el contrario las líneas L-38, L-93 y L-101 mostraron pesos muy inferiores con respecto al testigo y las demás líneas evaluadas. En cuanto al número de tubérculos por planta se obtuvo que la L-107 produjo el mayor número, los resultados de las restantes líneas fueron similares al testigo Desirée que produjo 6.77 tubérculos por planta. Las líneas L-38 y L-93 tuvieron los valores más bajos, produciendo 4.58 y 4.87 tubérculos por planta, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Arzuaga, J. e Izquierdo, F., 1983. Comportamiento de la resistencia a *Alternaria solani* (Ellis y Martin.) de 9 variedades de papa *Solanum tuberosum* L. en condiciones controladas. Cult. Trop. 4 (2) .p.303-311.
- Caligary, P. D.S. y Nachmias, A. 1988. Screening for field resistance to early blight (*Alternaria solani*) in potatoes. Potatoes Res. 31:451-460.
- Lorenzo, P.; Ramos, M; y Hernández, M. M. 1992. Extracción de la toxina producida por el hongo *Alternaria alternata* Cultivos Tropicales 13 (1): 67-69.
- Martínez, P. y Mantell, S., 1994. Selección *in vitro* de resistencia al tizón temprano (*Alternaria solani* Sorauer) en la papa criolla (*Solanum phureja* Juz. et Buk).
- Pérez, P.J., 1992. Mejoramiento convencional vs Cultivo *in vitro*. Primer curso FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas.
- Veitía, N; Dita, M. A., 1995. Estudio de los metabolitos producidos por *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler sobre vitroplantas y callos de papa (*Solanum tuberosum* L.). Trabajo de Diploma IBP, UCLV. Cuba.

2-05 Algunos parámetros bioquímicos de la interacción piña-*Phytophthora* para el mejoramiento genético.

Ramón Santos, Raúl Tapia, Yudelsy Tandrón, Yania Rodríguez, Martha Hernández, Janet Quiñones, Yarianne Lezcano, Yoany González, Alfredo González.

Centro de Bioplasmas. UNICA. Carretera a Morón km. 9. CP 69450. E-mail: bioquim@bioca.edu.cu

Palabras claves: mejoramiento genético, piña, interacción piña-*Phytophthora*, pudrición del corazón de la piña, *Phytophthora*.

INTRODUCCIÓN

La pudrición del corazón de la piña, causada por *Phytophthora spp.*, constituye la principal enfermedad fungosa en Cuba, responsable de pérdidas alrededor del 20 % de las plantaciones. En la actualidad no se encuentran disponibles fuentes comerciales resistentes, lo que imposibilita desarrollar programas tradicionales de cruzamientos. Una alternativa para esta problemática se basa en el uso de la biotecnología y la transformación genética de plantas (Hein, 1998).

Diversos estudios acerca de las interacciones planta-hongo, especialmente en interacciones incompatibles, evidencian la inducción de varios tipos de isoenzimas que no están normalmente presentes en plantas sanas, lo cual ha mostrado ser el resultado de la síntesis neta de proteínas (Lucas, 1998). El hecho sugiere que la interacción causa activación de genes que codifican estas proteínas y las reacciones de defensa parecen ser evocadas a partir de esta expresión de genes. Como concepto general, la expresión de estos genes debe ser suficiente para soportar las reacciones de defensa que debe prevenir la infección por el organismo invasor. El objetivo de la investigación estuvo encaminado a la caracterización bioquímica de expresión en la principal senda metabólica conducente al pool fenilpropanoides, con vistas a establecer la hipótesis para el estudio de pasos claves en la regulación de la respuesta defensiva de la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y material vegetal

Phytophthora nicotianae var. *parasitica* se aisló de plantas enfermas y se mantuvo durante siete días en jugo V-8 a 26° C y oscuridad. Vitroplantas de piña cv. *Cayena lisa* y el genotipo silvestre *Bromelia pinguin* se usaron como las variantes susceptible (S) y resistente (R), respectivamente. Luego de tres meses de adaptación se inocularon causando una herida en la base de las hojas y la inmersión en una suspensión de esporas (10⁶ esp/ml). Las plantas controles, descritas como sanas, fueron sumergidas en agua estéril.

Evaluación diferencial de proteínas

Se empleó un procedimiento previamente descrito por Bauw y Montagu (1997), con ligeras modificaciones. La electroforesis en SDS-PAGE se realizó en geles de poliacrilamida al 12%.

Análisis de fenoles

Se empleó una modificación del procedimiento desarrollado por Hoagland (1990), previamente descrito (Santos et al., 1996). La determinación en HPLC se desarrolló según el procedimiento de Carpita (1986).

RESULTADOS

El reconocimiento específico del patógeno es gobernado genéticamente por

interacciones entre los productos de los genes de resistencia (R) en el hospedero y moléculas codificadas en un aislado de patógeno dado nombrados genes de avirulencia 'avr'. (Dang y Holub, 1997).

En la evaluación realizada a las 12 horas, se expresaron al menos tres proteínas en los tejidos del cultivar *R* inoculado, ausentes en los tejidos intactos, mientras que para el cultivar *S* cuatro de las proteínas inicialmente expresadas en tejidos intactos no se detectaron en tejidos sometidos a la inoculación. A las 24 horas se detectó una banda de proteínas en el genotipo *R*, ausente en los tejidos sometidos a la inoculación. No obstante, en estos últimos se apreció un reforzamiento en una de las bandas, mientras que a las 36 horas, una de las bandas apreciada en la evaluación de los tejidos *R* intactos no fue detectada para los mismos tejidos sometidos a la inoculación, al tiempo que fueron expresadas otras proteínas de elevada masa molar y se apreció un reforzamiento en la banda de aproximadamente 43 kDa. Luego de 48 horas del momento de la inoculación, una de las bandas de elevada masa molar no se detectó en los tejidos dañados para el genotipo *R*, mientras que se apreciaron cambios significativos en los patrones de síntesis de estas biomoléculas. En los tejidos *S* se apreció la síntesis "De Novo" de al menos dos proteínas.

Transcurridas 60 horas de la inoculación, dos bandas detectadas en los tejidos *R* intactos no se apreciaron en los sometidos a la inoculación. La evaluación de los tejidos *S* infestados evidenció la ausencia de al menos dos proteínas expresadas en los tejidos intactos y en su lugar la presencia de otras dos bandas. A las 72 horas de la inoculación con el patógeno el 100 % de las plantas *S* mostraron los síntomas visibles de la infección. Los tejidos resistentes sometidos a la inoculación se mantuvieron respondiendo al ataque del microorganismo.

El análisis cuantitativo relacionado con la expresión del "pool" de fenoles en las vitroplantas mostró una gran variabilidad en la síntesis y acumulación de los mismos en tejidos de hojas con relación a la respuesta al ataque del patógeno. Al

comparar los patrones del cultivar *S* sin inocular respecto al efecto de la inoculación se observó una drástica reducción en los tenores de estos compuestos a partir de las 12 horas con marcada diferencia en la evaluación de las 36 horas, mientras que el cultivar *R* mostró en este momento específicos niveles superiores en respuesta a la inoculación con el patógeno con diferencias más marcadas respecto al control sin inocular en cuanto al contenido de fenoles totales.

Justo a las 36 horas se detectó la mayor variedad de fenoles en los tejidos inoculados y a partir de este momento apareció una mayor cantidad de compuestos desconocidos en los tejidos resistentes sometidos a la inoculación con el patógeno. En evaluaciones realizadas a las 72 horas para el cultivar *R* se apreció una degradación (o conversión) de estas moléculas, mientras que existió una mayor acumulación de las mismas en los tejidos *S*. La acumulación de fitoalexinas o compuestos antibióticos es una característica de los tejidos necrosados, aunque no se conoce claramente si ello constituye una causa o un efecto. Lo que si está claro que estas moléculas pueden acumularse en niveles autotóxicos para los tejidos vegetales, si no existe alguna señal que indique a la planta su degradación o conversión a moléculas inertes.

BIBLIOGRAFÍA

- Bauw, G. y M.V. Montagu, 1997. *A brech Manual*. Ed. by E. hansen and G. Harper. 135 pp.
- Carpita, N.C., 1986. *Plant Physiol.* 80:660-666.
- Dang, J. y E. Holub., 1997. *Cell.* 91:17-24.
- Hein, M., 1998. *Plant Biotechnology. Current Opinion in Biotechnology.* 9:187—188.
- Hoagland, R.E., 1990. *Phytopathology.* 130:177-187.
- Lucas, J.A., 1998. *Plant Pathology and Plant pathogens.* Third Edition. 257 pp.
- Santos, R; Y. Portilla; R. Tapia; N. Nieves; A. González; O. Borrás; B. Companioni; J.L. González; Y. Santiago; Y. Velázquez, 1996. *Biotechnología Aplicada.* 13(2):141

2-06 Selección *in vitro* en condiciones salinas de líneas de arroz obtenidas a través del uso combinado de técnicas biotecnológicas y nucleares.

Miriam Labrada Pons ¹ y María C. González Cepero ².

¹Instituto de Investigaciones Jorge Dimitrov, Bayamo, Granma. E-mail: dimitrov@granma.inf.cu

²Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Carretera a Tapaste, San José de Las Lajas, La Habana. E-mail: inca@ceniai.inf.cu

Palabras claves: arroz, selección *in vitro*, salinidad, mejoramiento genético, radiaciones Gamma.

INTRODUCCIÓN

La utilización de variedades tolerantes representa una de las principales vías para contrarrestar las pérdidas económicas por salinidad y sodicidad. En el presente trabajo se realizaron varios experimentos con el objetivo de determinar las concentraciones salinas e indicadores a emplear para la selección *in vivo* e *in vitro* de genotipos de arroz tolerantes a la salinidad, así como establecer la radiosensibilidad de callos y semillas de la variedad de arroz Perla de Cuba para el empleo de las dosis adecuadas en los programas de mejoramiento genético donde se combinen técnicas biotecnológicas y nucleares.

MATERIALES Y MÉTODOS

El primer experimento estuvo dirigido a determinar el efecto de diferentes concentraciones de NaCl y Na₂CO₃ sobre la germinación y las etapas iniciales del crecimiento de las plántulas. Se utilizaron semillas de las variedades Perla (susceptible a la salinidad) y Pokkali (tolerante). Las mismas se colocaron en placas de Petri con papel de filtro humedecido con 10 ml de las soluciones de NaCl (50, 100, 150 mM) y soluciones de Na₂CO₃ (10, 20, 30, 40, 50, 100 y 150 mM). A los 7 días se evaluó el porcentaje de germinación y a los 15 días se determinó la altura de las plántulas (mm), longitud

de la raíz (mm), masa fresca y masa seca en gramos. Por otra parte se evaluó el comportamiento *in vitro* de las variedades estudiadas ante diferentes concentraciones salinas. Se emplearon como explantes iniciales semillas de las variedades antes mencionadas. Se utilizaron 9 tratamientos, los que se conformaron con el medio de formación de callos, adicionándosele las concentraciones de NaCl (20, 40 y 60 mM) y Na₂CO₃ (10, 20, 30, 40 y 50 mM) establecidas a partir del experimento anterior, incluyendo, además un control con sal. Los callos se transfirieron al medio de regeneración con las mismas concentraciones salinas y se colocaron en condiciones de iluminación con un fotoperíodo de 16 horas. A las 3 semanas se evaluó el porcentaje de callos con brotes y el número de brotes por callo, determinándose el porcentaje de regeneración por tratamiento.

También se establecieron las dosis de radiaciones Gamma de Co 60 útiles, con el propósito de incrementar la variabilidad genética de la variedad Perla. Semillas de la variedad perla fueron irradiadas con dosis entre 0-1000 Gy, a intervalos de 100 y sembradas en condiciones de laboratorio por el método de Sandwich modificado (Labrada et al, 1983), distribuidas en tres réplicas con 300 semillas por tratamiento, incluyendo el testigo sin irradiar. Al cabo de los 7 días se evaluó el porcentaje de germinación y a los 15 días de la siembra se midió la altura de

las plántulas (AP) en cm, desde el cuello de la raíz hasta el ápice de la hoja más larga y la longitud de la raíz (LR); a los 30 días se evaluó el porcentaje de supervivencia. Estos indicadores fueron utilizados como criterio de radiosensibilidad. Se estudió además el efecto de las radiaciones sobre la callogénesis y la regeneración de plantas. Para ello se emplearon dos tipos de explantes. Semillas: Se irradiaron con las dosis determinadas en el experimento anterior (0-500 Gy), a intervalos de 100. Se sembraron en el medio para la formación de callos formados, la masa fresca de los mismos y se calcularon los porcentajes de formación de callos. Posteriormente se transfirieron al medio de regeneración de plantas. A los 21 días se determinaron los porcentajes de regeneración por dosis y se evaluó el número de brotes por callo y por dosis.

Callos: Se irradiaron callos de 21 días de incubación con dosis de 0 a 100 Gy, a intervalos de 10, utilizando 30 callos por cada tratamiento. Se evaluó en el número de callos con brotes, determinándose los porcentajes de regeneración en cada caso.

Teniendo en cuenta los resultados de los experimentos anteriores, se estudió el efecto de las radiaciones y las concentraciones salinas sobre la callogénesis y la regeneración de plantas en la variedad Perla. Se irradiaron semillas con dosis de 100 y 174 Gy. Posteriormente se colocaron en un medio de formación de callos con las concentraciones (0, 20, 40 mM) de las sales estudiadas. Los callos obtenidos fueron transferidos a un medio de regeneración con las mismas concentraciones salinas. A las 3 semanas se evaluó el porcentaje de callos regenerados y el número de brotes por callo. También se irradiaron callos con la dosis establecidas previamente (5 y 20 Gy), conformándose 12 tratamientos con las concentraciones (0, 20 mM de NaCl y 0, 10 mM de Na_2CO_3) en el medio de regeneración, a los 21 días se evaluó el porcentaje de formación de brotes y el número de brotes por callo.

Se observó el comportamiento de los regenerantes en condiciones semicontroladas. Las plántulas obtenidas a partir del experimento anterior fueron sembradas en macetas plásticas y colocadas en una cámara de crecimiento con una temperatura de 25 ± 2 grados y un fotoperíodo de 16 horas-luz. Al momento de la cosecha, en todas las variantes se seleccionaron al azar 5 panículas, a las cuales se les evaluaron los siguientes caracteres: Longitud de la a en cm (LP), número de granos llenos por panícula (Grll/P), número de granos vanos (GrV/P), peso de 1000 gramos (PMG) y total de granos (TG).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos se comprobó que el Na_2CO_3 ocasiona mayores daños a las plantas que el NaCl. Los índices: altura de las plantas, longitud de la raíz y masa seca pueden ser utilizados como indicadores de tolerancia a la salinidad, en los primeros estadios del crecimiento de las plántulas. En cuanto a la respuesta *in vivo* de la variedad Perla a las dosis de irradiación, se encontró que la altura y la longitud de la raíz fueron los indicadores más radiosensibles y se observó que las dosis con valores por encima de 500 Gy, provocan drásticas disminuciones en la supervivencia de las plantas.

En el comportamiento *in vitro* se evidenció, que la regeneración resultó más afectada que la formación de callos, por el efecto de las dosis de irradiación y que la selección de las mismas depende del material a irradiar. Al evaluar la respuesta *in vitro* de la variedad Perla al efecto de las radiaciones y las concentraciones salinas se encontraron diferencias significativas en dependencia del aumento de las dosis y de las concentraciones salinas, así como el tipo de sal empleada. Los regenerantes obtenidos a partir de las dosis de 100 Gy y 20Gy en medio salino, mostraron los mayores valores en los componentes del rendimiento.

2-07 Isolation and partial purification of metabolites produced by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*

Raúl Tapia¹; Yania Rodríguez¹; Janet Quiñones¹; Marais Mosqueda¹; Carol Carvajal¹; Luis M. Peña Rodríguez²; Ramón Santos.¹

¹Centro de Bioplasmas. Carretera a Morón km. 9 Ciego de Avila, Cuba. Email: biomol@bioca.edu.cu

²Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY) Mérida, Yucatán, México

Palabras claves: *Phytophthora nicotianae* var *parasitica*, cultivo filtrado, piña.

INTRODUCTION

The rot heart of the pineapple, caused by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* constitutes the fungous disease more important for this cultivation in our country, provoking considerable lost in the crops of the fruit. Coppens and Matos reported this disease for the first time in Hawaii, in 1994. An important factor in the development of the disease is the toxins production, (Gaumann, 1954) these are freed when the fungi grows in an appropriate liquid medium. On the other hand, it has been proven the production of crude filtered culture with phytotoxic activity as of *Phytophthora cactorum*, something which has permitted to select resistant plants to the disease (Rosati, 1990 and Mezzetti, 1994).

The objective of this work is to obtain a phytotoxic filtered, as well as its separation partially with conferences to develop a selection system of crop resistant to the rot heart of the pineapple, caused by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

Phytophthora nicotianae var. *parasitica* causative agent of the production of the heart of the pineapple was isolated

as of plants you sicken, the sheltered was maintained during 7 days in the middle of juice cultivation at temperature of 26° C under darkness conditions. Disks of 1 cm of diameter were inoculated in erlenmeyer of 250 mL. Culture medium containing: D - glucose (30 g/L); L-asparagine (2g/L); FeSO₄ · 7 H₂O (1 mg/L); CaCl₂ · 2 H₂O (10 mg/L); MgSO₄ · 7 H₂O (0.1 mg/L); KH₂PO₄ (0.47 g/L); K₂HPO₄ (0.26 g/L), tiamine (1 mg/L); ZnSO₄ · 7 H₂O (4.4 mg/L); MnCl₂ · 4 H₂O (0.072 mg/L); CuSO₄ · 5 H₂O (0.079 mg/L); Na₂MoO₄ · 2 H₂O (0.054 mg/L). The pH was adjusted to 5.4 and was put on agitation to the darkness during 24 days. To interval of four days was evaluated the production of pathogen metabolite in the liquid medium, based on spectroscopic analysis.

Electrophoresis SDS-PAGE

Was performed as described by Laemmli method (1970). Two-dimensional gel electrophoresis was performed in a BioRad electrophoresis cell, according to O'Farrell (1975).

Bioassays

Fragments of leaves (4 cm of length) of the base were submerged in recipients containing 3mL of the filtered crude concentrated to the 80 % (v/v). The recipients were put on wet chambers and similar conditions to the needed by the

fungi to produce the disease (necrosis in the form of mean ellipse).

Partial separation of the Metabolite

The filtered crude of cultivation, concentrated to the 80% (v/v) was submitted to a partition process with organic solvents of different polarities. The obtained fractions were chromatographed in silicagel plates

RESULTS

The figures 1 shows ultraviolet spectrums of inoculated and control medium. In the inoculated medium was observed two maxims around 210-275 nm region. This indicates the presence of unsaturated metabolites with high conjugation in its chemical structure.

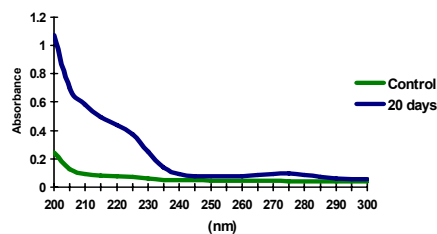


Figure 1. Ultraviolet spectrum of crude filtrate.

The crude culture filtrate was partitioned with different organic solvents (Ethyl Acetate and n-butanol) and approximately 100 % of phytotoxic activity were recovered in the ethyl acetate phase.

To be analyzed the proteins present in the aqueous phase by SDS-PAGE was appreciated three well defined spot (67-45 kDa). When the proteinaceous fraction was resolved by two-dimensional gel electrophoresis was found a spot around 45 kDa with acid properties (IP» 5.2).

BIBLIOGRAPHIC

- Coppens. G., A. P. Matos, 1994. Pineapple Compending of Tropical Fruit Diseases. (Eds) Ploetz, R.C, Zwtmyer, W.T., Nishijime., K.G Rohanbach and H.D. Ohr. Pp. 45-55.
- Gaumann, E., 1954. Toxins and Plant diseases. Endeavour 13 198-204.
- Laemmli, U.K, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680 - 685.
- Mezzetti, B., R. Capasso., A. Evidente., F. A. Hammerschlag., R.H. Zimmerman., G.Cristinzio. and P. Rosati., 1994 Interaction of Partially Purified Phytotoxins from *Phytophthora cactorum* on Apple Cell Plasma Membrane. J. Phytopathology_142: 219-226.
- O'Farrell, P. H., 1975 High resolution two-dimentional electrophoretis of proteins. The Journal of Biologicall Chemistry, 250(10): 4007- 4021.
- Rosati, P., B. Mezzetti., M. Ancherani., S. Foscolo., S. Predieri. and F. Fasolo, 1990. *In vitro* Selection of Appel Rootstock somaclones with *Phytophthora cactorum* culture filtrate. Acta Horticulturae_280: 409 - 416.

2-08 Mutagénesis *in vitro* en *Musa spp.*

José de la C. Ventura, Jorge López, Sergio Rodríguez, Magaly García, Víctor Medero, José A. Pino, Ayme Rayas, Lianet Gonzalez, Teresa Ramírez, Julian González, Juan R. Galvez, Damisela Reinaldo y Nery Montano.

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo, CP 53 000, Villa Clara, Cuba. Teléf: 4-2103 y 4-2344 Fax: 4-2201, Email: inivit@quantum.inf.cu.

Palabras claves: mutagénesis, Musa, variación somaclonal, radiaciones, Sigatoka negra, mejoramiento genético.

INTRODUCCIÓN

En áreas tropicales y subtropicales de alta presión demográfica, el banano y el plátano, se han convertido en una valiosa fuente de carbohidratos y vitaminas, pero no están libres de limitantes productivas como las enfermedades, problemas virales como el CMV, BSV y BBTV; los nemátodos y el picudo negro y factores adversos para la obtención de altos rendimientos (Sandoval, 1996). Lograr una base clonal relativamente amplia resulta sumamente importante, entre otras cosas, para evitar que el exceso de uniformidad genética haga vulnerable el cultivo al ataque de una nueva enfermedad, plaga o a razas más virulentas (Ventura, 1993). Sin lugar a dudas el plátano es la vianda fundamental en las condiciones de Cuba, sobre todo en los meses de verano y otoño, tan escasos en posibilidades en el caso de los cultivos de producción subterránea (Rodríguez, 1991).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron los clones 'Burro CEMSA' (ABB), 'Saba' (ABB), 'Americani' (AAA), 'Abagba' (AAB), 'Zanzíbar' (AAB), 'Navolean' (AAB), 'Montaña de Baracoa' (AAB), 'SH 3436' (AAAA) y otros. Se empleó en todos los casos el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), (MS); solo variaron las concentraciones de auxinas y citoquininas, según el caso.

Inducción de la variación somaclonal

El origen de la variación somaclonal y sus mecanismos de expresión aún no están

completamente definidos. Se elaboró una metodología que incluyó el uso de altas concentraciones de BAP y Kinetina, así como el aumento del número de subcultivos provocando la aparición de multiyemas.

Uso de radiaciones ionizantes

En colaboración con la Agencia Internacional de la Energía Atómica se desarrolló una metodología para inducir mutaciones a través de radiaciones ionizantes (Co 60) en los clones 'Navolean' (AAB), 'Montaña de Baracoa' (AAB), 'Zanzíbar' (AAB), 'Burro CEMSA' (ABB) y otros. Se utilizó una frecuencia de radiación de 8 Gy/minuto. Se realizaron tres subcultivos en la fase de multiplicación.

Estudios de campo

Se evaluaron lotes de plantas de los clones 'Burro CEMSA', 'Zanzíbar' y otros, provenientes del cultivo *in vitro* y plantas irradiadas. Se seleccionaron las mejores plantas (selección positiva, para obtener familias clonales, evaluándose estos dos ciclos, con testigos). Se determinaron los índices de variación somaclonal y sus principales características. Las evaluaciones se realizaron en el momento de la cosecha con los siguientes parámetros: Días a la floración, altura de la planta (m), grosor del pseudotallo a 1 m (m), número de hojas (u), número de hojas activas (u), área foliar (m²), número de dedos por racimo, número de dedos de la segunda mano, número de manos y peso del racimo. Otras evaluaciones se hicieron respecto a la presencia de plagas y enfermedades, fundamentalmente de Sigatoka negra, nemátodos, etc.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de la variación somaclonal

Se diseñó una metodología para lograr una mayor expresión de la variación somaclonal, utilizando combinaciones de 6 BAP y Kinetina de acuerdo a los genotipos, lo cual produce la formación de multiyemas. La selección de la Línea 9 y el somaclon Saba fueron los mejores resultados los cuales se generalizan en Cuba y otros países.

Uso de radiaciones ionizantes

Se elaboró una metodología basada en la diseñada por Novak (1987), que provocó un alto porcentaje de variación total, fundamentalmente en los clones 'Zanzíbar' y 'Parecido al Rey' seleccionando 15 somaclones a partir del 'Zanzíbar', siendo las principales variaciones en una reversión de Horn a French del 41,3%, disminución de altura, cambio de coloraciones y ordenamiento del ahijamiento. Detrimiento total de los componentes de rendimiento fue el resultado en el banano utilizado.

Estudios de campo y selección de somaclones

Durante tres años fueron evaluados, en la Estación del INIVIT en Camagüey, los somaclones seleccionados por variación somaclonal de los clones 'SH 3436', 'Burrro CEMSA' y 'Saba' concluyéndose que las líneas 'SH 3436 L6' y 'SH 3436 L9' fueron las de mejor comportamiento en rendimiento (52,09 y 56,19 ton/ha respectivamente) y los menores grados ponderados de infestación (GPI) frente a la Sigatoka negra (1,33 y 1,33) demostrando su tolerancia a esta enfermedad.

Se muestran los resultados de las líneas seleccionadas por irradiación a partir del clon 'Zanzíbar', observando que las líneas 6; 9; 10; 30; 30A y 13 ofrecen perspectivas por su rendimiento, eliminación de los cormos superficiales, disminución de altura y ahijamiento ordenado. No se encontró tolerancia a Sigatoka negra, pero siguiendo la metodología propuesta por Pino (1996), puede ser una alternativa apropiada para rescatar los plátanos viandas. Con el empleo de técnicas moleculares (PCR), se demostró que exis-

ten diferencias entre las líneas y por métodos de selección temprana se determinó que la Línea 13 presenta una posible tolerancia a Sigatoka negra (Pino, 1998).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La inducción de mutaciones físicas (Co 60) provocó una alta variabilidad genética, la cual puede ser aprovechada para el mejoramiento genético de *Musa* spp., fundamentalmente para los clones tipo vianda (AAB) en caracteres agronómicos deseables.
- Utilizar los esquemas propuestos a corto plazo para la inducción de mutaciones, tanto por variación somaclonal como por radiaciones.
- Se recomienda generalizar los somaclones 'SH 3436 L9' y el 'Somaclon Saba', para aumentar la variabilidad de estos cultivares, por sus características agronómicas deseables y su tolerancia a la Sigatoka negra, nemátodos, etc., con una estrategia adecuada.

BIBLIOGRAFÍA

- Novak, F. J., 1987. Micropropagation and radiation sensitivity in shott tip culture of banana and plantain. Intern. Symp. on Nuclear Techn. an *in vitro* culture for plant improv. Vienna 1:12.
- Pino Algora, J. A., 1996. Una producción sostenible del plátano vianda 'CEMSA 3/4' Santo Domingo: INIVIT, 10 p.
- Rodriguez Nodals, A. A., 1991. Avances en el programa de mejoramiento genético del banano y el plátano en Cuba. Infomusa Vol. 1, No.1.
- Sandoval, J. A. y P. Acuña, 1996. Perspectiva de la nueva biotecnología en el cultivo del banano. CORBANA 21, (45):63-65.
- Ventura Martin y J. de la C., 1993. El mejoramiento genético del plátano (*Musa* spp.) en Cuba y su repercusión social. Santo Domingo: INIVIT, 28 p.

2-09 Curva dosis efecto para la inducción de mutaciones *in vitro* de la yuca, por radiaciones Gamma.

Víctor R. Medero, Jorge López, Sergio Rodríguez, J. de la C. Ventura, Magaly García, M. Cabrera, Luis Del Sol, Marilyn Martínez, Marlenys Torres, Yadenys Torres y Miguel Alvarez.

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo, CP: 53000, Villa Clara, Cuba. E-mail: inivit@quantum.inf.cu

Palabras claves: mutagénesis, radiaciones Gamma, yuca, mejoramiento genético.

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento de la yuca a través de métodos convencionales ha sido usado por varios programas e instituciones (CIAT, INIVIT, NRCRI, IITA) logrando obtener clones de mayor potencial de rendimiento y tolerancia o resistencia a plagas y enfermedades (Mbanoso et al., 1992). Además, la combinación de genotipos con varios caracteres deseables resulta difícil para la mejora por cruzamientos, lo que dificulta el mejoramiento por esta vía de cultivares que poseen buena adaptabilidad a determinados ecosistemas y alta aceptabilidad pero con bajos rendimientos y susceptibilidad al estrés biótico. Por lo anterior, la integración de un sistema de mejoramiento desde los cruzamientos, la inducción de mutaciones y la transgénesis constituyen una estrategia para la mejora de esta raíz tuberosa en Cuba.

El mejoramiento por mutaciones a través del cultivo de tejidos *in vitro* abre grandes posibilidades en la inducción y selección de mutantes en plantas de propagación vegetativa (Novak et al., 1990). Resultados alentadores en yuca han

sido reportados por Mbanoso et al., (1992); Afza et al., (1992) y Zapatas (1995).

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó el presente trabajo con el objetivo de establecer un sistema para la mejora genética de la yuca por inducción de mutaciones a través del cultivo *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del INIVIT con los clones cubanos 'Señorita' y 'CEMSA 74-6329' del banco de germoplasma.

El material vegetativo fue seleccionado del banco de germoplasma a partir de plantas plus según características de cada genotipo. El stock de plantas donantes *in vitro* se estableció según metodología de Medero (1995).

Para la determinación de la curva dosis efecto se usaron 20 secciones nodales de cada clon, las cuales se irradiaron en el Centro Nacional de Estudios Aplicados a la Energía Nuclear (CEADEN) en una fuente de Co⁶⁰ (Rayos Gamma) a dosis de 0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 50 Gy. Después

del tratamiento se pasaron a medio fresco y se evaluó a los 30 días la sobrevivencia y muerte de los explantes para el cálculo de la dosis letal media (DL_{50}).

Para el análisis de la Dosis Letal Media calculada se utilizó el Programa de Raymond (1992) titulado Rrohit Analysis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar el efecto de los diferentes tratamientos mutagénicos se observó que independientemente del clon a medida que aumentaron las dosis de irradiación aumentó la muerte de los explantes con los valores más altos (letales) a partir de los 35 a 50 Gy.

Para el clon 'Señorita' la dosis más próxima a la DL_{50} fue 20 Gy, con la muerte total de 12 explantes y para el clon 'CEMSA 74-6329' también coincidiendo con la dosis de 20 Gy (DL_{50}) donde murieron 14 explantes. Resultados similares fueron obtenidos por Mbanoso et al., (1992) en otros genotipos que fueron irradiados a dosis de 20 y 25 Gy según DL_{50} obtenidas. Otros autores (Afza et al., 1992) en genotipos diferentes obtuvieron resultados similares al usar dosis entre 20 y 35 Gy, pero cuando usaron dosis de 40 Gy reportaron la inhibición del desarrollo de la planta.

Para corroborar los resultados anteriores al aplicar el Analysis de Prohit (Raymond, 1992) para el cálculo de la DL_{50} se pudo observar que para el clon 'Señorita' la DL_{50} calculada fue de 20,22 Gy con un nivel de confianza

de 95 % y que puede fluctuar en un rango de 17,23 Gy a 23,64 Gy. En el caso del clon 'CEMSA 74-6329' la DL_{50} calculada fue de 17,67 Gy para un nivel de confianza del 95 % y que puede oscilar de 15,71 a 19,59 Gy.

BIBLIOGRAFÍA

- Afza, R.; H. Brunner y X. Hu, 1992. Mutation induction and related techniques for casava breeding. Proceeding CBN First international Scientific Meeting of the Cassava Biot. Network Colombia 25-28 August, p. 122.
- Donini, B, 1992. Mutagénesis applied for the improvement of vegetatively propagated plants FAO/IAEA interregions course in Plant Breeding. Seiberdorf, 22 april-29 may. 80 p.
- Mbanoso, E.N.A; E.C. Nwachukwu y L.S.O. Ene, 1992. Progress on cassava improvement through biotechnology at National Root Crops Research Institute, Umudike, Nigeria. Proceeding CBN First international Scientific Meeting of the Cassava Biot. Network Colombia 25-28 August, p. 111.
- Medero, V., 1995. Regeneración por embriogénesis somática en yuca (*Manihot esculenta*, Crantz). Tesis (Master of Science). IBP - UCLV, — 50 p.
- Novak, F.; R. Afza; M. Vandure y M.S. Omar, 1990. Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* culture shoot-tips of banana and plantain (*Musa* spp.). *Trop. Agric.* (Trinidad) Vol. 67 No. 1 January.
- Raymond, M., 1992. Probit Analysis Program. U.S.T.L. France

2-10 Efecto de la inducción de mutaciones *in vitro* en poblaciones de la variedad de caña de azúcar (*Saccharum* spp híbrido.) My 5514.

Juan Vidal¹, Juan N. Pérez Ponce², Pedro Orellana², Elio Jiménez², Rafael Gómez Kosky.²

¹Facultad Agropecuaria de Montaña del Escambray, FAME, UCLV.

²Instituto 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: perez@ibp.edu.cu

Palabras claves: mutagénesis, caña de azúcar, variabilidad, mejoramiento genético.

INTRODUCCIÓN

Mejorar y obtener nuevas variedades de caña es una necesidad propia de la agroindustria azucarera, debido entre otras causas a la degeneración varietal, el creciente incremento de enfermedades y otros factores ambientales que en conjunto hacen disminuir las potencialidades de las variedades comerciales en explotación (Milanés, 1996). La inducción de mutaciones *in vitro* ha sido utilizada para generar variabilidad y seleccionar somaclones útiles (Nagatoni et al, 1996; Ahloowalla, 1994; Pérez et al, 1995), por lo que el estudio del comportamiento de las poblaciones mutadas *in vitro* puede contribuir a mejorar su manejo en la evaluación y selección de mutantes con características mejoradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de esta investigación se utilizaron varias cepas obtenidas de plantas regeneradas de callos de la variedad My 5514 inducidos a mutar *in vitro*, en el Instituto de Biotecnología de Las Plantas, estudiadas en campo en suelos pardos con carbonato del CAI "Uruguay" y comparadas con la variedad donante en iguales condiciones edafoclimáticas, evaluándose varios caracteres de importancia agrícola e industrial.

RESULTADOS

Los datos obtenidos en la población de vitroplantas mutadas, evaluada a los doce meses, mostró altos coeficientes de variabilidad (CV) en los caracteres brix superior, diámetro de los tallos y hábitos de crecimiento en relación con la variedad donante, observándose un incremento de

la incidencia de la roya; el retoño de las vitroplantas mutadas mostró valores absolutos superiores a la variedad donante en los caracteres relacionados con el potencial azucarero (brix superior, brix inferior, brix medio e índice de madurez) y con CV bajos y estables, la incidencia de roya fue significativamente inferior a la variedad donante y el hábito de crecimiento mejoró en igual sentido pero ambos con un alto CV. La primera multiplicación vegetativa de las vitroplantas mutadas mostró un comportamiento similar al retoño, con excepción del hábito de crecimiento que se mantuvo constante en esta población. Las selecciones realizadas en cada una de las poblaciones estudiadas, permitieron obtener mutantes con características superiores a la variedad donante y bajo coeficientes de variabilidad; los mutantes de mejor comportamiento se repiten en las tres selecciones realizadas, lo que confirma la posibilidad de obtener somaclones estables para caracteres específicos. Del análisis multivariado de los datos obtenidos se concluye que los caracteres relacionados con el potencial azucarero determinan la mayor variabilidad de las poblaciones estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Milanés, N., 1996. Proceso de obtención de variedades de caña en Cuba, INICA.
Nagatomi et al., 1996. Technical News, 64:1-2-
Ahloowalla, B.S., 1994. Abstract VIII International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze.
Pérez, J.N et al., 1995. En: Libro de Resúmenes III Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biotecnología de Las Plantas.

2-11 Establecimiento de las condiciones óptimas de producción de metabolitos en filtrados de *Fusarium oxysporum* var. *cubense* y su efecto en plantas de banano (*Musa sp.*).

Bárbara Companioni, Orlando Borrás, Yanet Quiñones, Mayda Arzola, Yania Rodríguez, Marais Mosqueda.

Centro de Bioplantas. UNICA. Carretera Ciego - Morón Km 9. Ciego de Ávila. CP- 69450. Cuba.

Palabras claves: banano, *Fusarium oxysporum*, cultivo filtrado, Mal de Panamá.

INTRODUCCIÓN

El Mal de Panamá o Fusariosis como se conoce comúnmente es causada por el hongo del suelo inhabitado *Fusarium oxysporum* var. *cubense* (Foc), esta es una de las enfermedades más destructivas del Banano (Stover, 1962) y la más difundida la cual constituye un desafío para el montaje de grandes experimentos (Ploetz, 1997). La enfermedad ha sido reportada en todas las regiones donde se cultiva el Banano, con excepción de algunas islas del Pacífico, incluyendo Nueva Guinea.

El objetivo de este trabajo consistió en obtener las condiciones óptimas de producción de metabolitos en filtrados de *Fusarium oxysporum* var. *cubense* y comparar el efecto fitotóxico del filtrado crudo sobre plantas adaptadas de variedades susceptibles, tolerantes y resistentes a la fusariosis del Banano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo fungal: El aislado de Foc utilizado en los experimentos para obtener filtrados crudos se obtuvo a partir de restos de cosecha de cultivares de Banano infectados con el hongo y conservados en agar de papa glucosado al 2 % (PDA) a 26 °C durante una semana.

Desarrollo de un bioensayo: Las plántulas de cada uno de los cultivares fueron testadas cuando presentaban de 5 - 8 ho-

jas. El bioensayo utilizado consistió en el punteado de fragmentos de hojas de la parte central de la hoja, añadiendo después en el daño producido, 5 µL de filtrado crudo. Se evaluó la expresión sintomatológica de necrosis alrededor del punto de aplicación a través del tamaño de la lesión

Preparación del cultivo del hongo en las diferentes condiciones: A partir del cultivo monospórico de Foc cultivado sobre PDA (2%) durante una semana, se tomaron discos de 10 mm de diámetro y se sembraron en erlenmeyers de 250 ml a razón 1 disco/ erlenmeyer en las siguientes condiciones:

Condición # 1. Medios de cultivo(en condiciones dinámico):

- 1) Medio de Caldo Czapek .
- 2) " Líquido de Extracto Malta .

Condición # 2. Condiciones de cultivo (en medio Caldo Czapek):

- 1) Cultivo dinámico .
- 2) " estático .

Condición # 3. Luminosidad (en medio Caldo Czapek y cultivo dinámico):

- 1) Luz.
- 2) Oscuridad.

Preparación del filtrado crudo del hongo: A intervalos de cuatro días de cultivo durante 28 días, se procedió al filtrado y esterilización del medio mediante gasa, papel de filtro y filtros millipores de 0. 22 micras en cada una de las condiciones descritas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aprecia la presencia de un máximo de absorción en la zona cercana a los 220 nm y en 270 nm de longitud de onda siendo mayor en este último, a los 16 días de inoculado el patógeno en el medio Caldo Czapek, lo cual nos indica la presencia de metabolitos producidos por Foc en el medio de cultivo, no comportándose así en el cultivo líquido de Extracto Malta.

Novak (1991) plantea que el cultivo de la raza 1 y raza 4 de *Fusarium oxysporum* var. *cubense* han sido utilizado para la preparación de filtrados crudos en medio Caldo Czapek incubado en la oscuridad a 25 °C y condiciones estático, detectándose en los mismos un máximo de absorción entre los 270 - 274 nm.

Se obtuvo un comportamiento similar al descrito, también con un máximo de absorción de producción de metabolitos producidos por el patógeno, en la zona cercana a 220 nm y 270 nm, en condiciones de cultivo dinámico y luz, durante el período evaluado. Por su parte Tapia et al. (1998) encontraron a los 21 días de cultivo de *Fusarium subglutinans* en filtrados crudos de medio Caldo Czapek en condiciones luz y estático, la presencia de una fuerte absorción en la zona cercana a los 270 nm indicando la presencia de grupos orgánicos con insaturaciones conjugadas.

El filtrado crudo de *Fusarium oxysporum* var. *cubense* mostró una actividad fitotóxica a las 48 horas (Tabla 1) más marcada en las variedades susceptibles que en las resistentes y tolerantes. Dicha actividad se expresó por el tamaño de la lesión y el tratamiento estadístico de los resultados, lo cual nos da la evidencia que el filtrado crudo obtenido bajo las condiciones de cultivo dinámico y luminosidad, puede ser utilizado como herramienta para futuras estrategias en el campo del mejoramiento genético, con el propósito de seleccionar resistencia a Foc en el cultivo del Banano.

Tabla 1. Efecto fitotóxico del filtrado crudo producido por *Fusarium oxysporum* var. *cubense* sobre diferentes cultivares de Banano.

Cultivares	Influencia de filtrados crudos Area de la lesión en mm ²
FHIA-01 (R)	0.1a
Gran Enano (R)	2.5b
FHIA-18 (T)	3.6b
Manzano (S)	9.2c

Experimentos con aislados de *Fusarium solani* han mostrado la presencia en el filtrado del cultivo de una fitotoxina de bajo peso molecular, el cual inhibe la brotación y el crecimiento de las raíces, además de causar necrosis en los tallos y hojas de Soja (Baker, 1994).

BIBLIOGRAFÍA

- Baker, R.A., 1994. Soybean Sudden death Syndrome: Isolation and identification of a new phytotoxin from cultures of the causal agent *Fusarium solani*. (Abstr.) Phytopathology 84: 1144..
- Novak, F. J., 1991. *In vitro* mutation system for crop improvement. En: Plant Mutation Breeding for Crop Improvement. IAEA, Vienna. 2: 327 - 342
- Ploetz, R. C., 1997. The major diseases of banana in the subtropic. Book of Abstracts. International Symposium on Banana in the Subtropics. November: 51.
- Stover, R. H., 1962. Fusarial wilt (Panama Disease) of Bananas and other *Musa* species. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Tapia, R; R. Santos; Magalis Quincose; L. M. Peña; O. Borrás; Bárbara Companioni; María A. Blanco y J. L. González, 1998. Estandarización del proceso para la obtención de metabolitos de *Fusarium subglutinans* y su efecto en callos de piña. Cultivos Tropicales 19(2): 51 - 55.

2-12 Ciclo de la enfermedad, sintomatología e histopatología de la pudrición del corazón de la piña causado por *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* sobre vitroplantas.

Yania Rodríguez, Marais Mosqueda, Orlando Borrás, Maida Arzola, María C. Pérez y Bárbara Companioni.

Centro de Bioplantitas. UNICA. Carretera a Morón Km. 9. CP 69450. E-mail: fisiopat@bioca.edu.cu

Palabras claves: *Phytophthora nicotianae* var *parasitica*, *piña*, *pudrición del corazón de la piña*.

INTRODUCCIÓN

La piña es afectada por múltiples enfermedades, ya sea de índole parasitario o no parasitario, que influyen desfavorablemente en los rendimientos, una de las más importantes es la pudrición del corazón, alcanzando pérdidas considerables. La pudrición del corazón de la piña, causada por *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* fue reportada en Hawai (Coppens y Matos, 1994) y generalmente esta enfermedad aparece en áreas donde se cultiva la piña.

El agente causal es capaz de atacar a plantas de diferentes edades, pero las plantas jóvenes resultan ser las más susceptibles. El microorganismo provoca cambio de coloración en las hojas y olor fétido, en algunos casos el síntoma se hace solo visible cuando las hojas son desprendidas fácilmente (Pegg, 1993). El objetivo de este trabajo fue hacer un estudio sintomatológico, histopatológico, y del ciclo de la enfermedad para profundizar más en el conocimiento de la misma, con vistas a trabajos futuros de resistencia y selección de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del Patógeno

El microorganismo se aisló a partir de plantas que presentaban síntomas de la enfermedad. Las muestras se lavaron con agua corriente durante 15 minutos, se desinfectaron con hipoclorito de calcio al 2 % y se sembraron en cámaras

húmedas durante 72 horas a 28 °C, posteriormente se pasaron a PDA al 2 % a 28 °C durante una semana.

Ciclo de la enfermedad y sintomatología

Para el estudio de las formas de penetración del patógeno, ciclo de la enfermedad, y sintomatología se inocularon vitroplantas de la variedad *Cayena lisa* de la Serrana mediante diferentes técnicas con una dilución de esporangios y zoosporas de 10⁶ esporas/ml (para la obtención de las zoosporas se mantuvo la dilución de esporangios a 4 °C durante 15 minutos). Para el caso de la técnica del pinchazo y corte de raíz las plantas estuvieron sumergidas en la solución durante 24 horas, posteriormente fueron plantadas en macetas con suelo + cachaza (1:1) en casas verdes. Se realizaron observaciones cualitativas diarias a cada uno de los tratamientos hasta la aparición de los síntomas. En el estudio sintomatológico se evaluaron los síntomas típicos de la enfermedad como cambio de coloración en la base de las hojas, olor fétido y desprendimiento de las hojas.

Histopatología

Para el análisis histopatológico se tomaron hojas de vitroplantas de la variedad *Cayena lisa* de la Serrana, inoculadas en el experimento anterior. Las muestras se fijaron 48 horas en FAA (Formol-álcohol-ácido acético), y se lavaron en agua corriente durante 24 horas. La deshidratación se realizó con

TBA (alcohol butílico terciario) (Johansen, 1940). Las muestras se incluyeron en bloques de parafina y se cortaron entre 5 y 8 micras. Se usó la técnica de tinción doble safranina y verde rápido. Los cortes teñidos se montaron en bálsamo de Canadá y se realizaron las observaciones en el microscopio óptico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Phytophthora nicotianae var. *parasitica* presenta un micelio ramificado, plurinucleado, no tabicado cuando es joven, los esporangios son papilados y en forma de limón, también se pueden encontrar clamidosporas de tamaño variable. En vitroplantas de piña inoculadas el hongo germina directamente en presencia de agua y con altas temperaturas, emite un tubo germinativo el cual puede penetrar por las axilas de las hojas, por las raíces y por heridas o de forma indirecta por medio de zoosporas, las que se forman a bajas temperaturas. Después de la penetración dentro de la hoja se forma un micelio ramificado, el cual se disemina por dentro y fuera del tejido a medida que avanza la enfermedad. A vitroplantas de piña que presentaban los primeros síntomas se les eliminaron las condiciones óptimas de temperatura y humedad y la infección se detuvo, por lo que se infiere que el desarrollo de la enfermedad está regido principalmente por la temperatura y la humedad.

Urquijo et al. (1971) en un estudio realizado en papa y tomate señalan que el ataque a la planta por hongos de este género depende en gran medida de las condiciones atmosféricas,

En observaciones realizadas a vitroplantas de piña inoculadas con *P. nicotianae* var. *parasitica* se determinó que en las plantas infectadas el primer síntoma es un cambio de color en las hojas más jóvenes, pasando de verde a verde amarillento, a medida que la enfermedad avanza las hojas pueden ser fácilmente desprendidas de la planta. El tejido blanco de la base de la hoja toma una apariencia húmeda y un olor fétido. Se aprecia una franja carmelita que

separa la parte verde y blanca de la hoja. La parte basal de hojas infestadas muestran lesiones que aumentan rápidamente que pueden llegar a cubrir toda la hoja causando la muerte de la planta. El punto de crecimiento del tallo tiene una apariencia blanda con una coloración amarillo carmelitosa. Todas las plantas infectadas mostraron esta sintomatología Coppens y Matos (1994), plantean que las plantas de piña infectadas por la pudrición del corazón muestran inicialmente alteraciones en el color de la hoja, principalmente aquellas más jóvenes que la hoja D, cambiando del verde al verde amarillento y a carmelita comenzando por la punta. Matos (1995) en un estudio realizado en plantaciones de piña infectadas con *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* plantean que las hojas jóvenes infectadas se desvanecen y elongan, poniéndose cloróticas.

En cortes realizados a las 36 horas se apreció crecimiento del hongo dentro de los tejidos. A las 48 horas se comenzó a observar una franja parda que separaba el tejido sano del afectado. En cortes realizados en esta zona se observa cómo las paredes de la células iban adquiriendo una coloración carmelita, probablemente por la degradación de algunos de los componentes de la pared celular.

BIBLIOGRAFIA

- Coppens. G; A.P. Matos, 1994. Pineapple Compending of Tropical Fruit Diseases. (Eds) Ploetz, R.C; Zwtmyer, W.T; Nishijime; K.G. Rohabach and H.D.Ohr. pp: 45-55.
- Johansen, D.A, 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- Matos, A.P, 1995. Pathological aspect of the pineapple crop with emphasis on the fusariose. Revista de la facultad de Agronomía (Maracay). 21: 179-197.
- Pegg, K.G, 1993. Diseases. Pineapple Pest and Disorders. (Eds) R.H. Broadley, R.C. Wassman, E. Sinclair. pp: 11-13.
- Urquijo. P; J.R. Sardiña; G. Santaolalla, 1971. Patología Vegetal Agrícola. Ediciones Mundi-Prensa. España.

2-13 Caracterización morfofisiológica de aislados de *Alternaria solani* Sor. para su uso en el mejoramiento genético por biotecnología

Miguel Angel Dita Rodríguez, Mayra Acosta Suárez y Novisel Veitía.

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: fitopat@ibp.edu.cu

Palabras claves: Tizón temprano, papa, mejoramiento genético, cultivo filtrado, selección in vitro.

INTRODUCCIÓN

El agente causal del tizón temprano (*Alternaria solani* Sor.) es un patógeno al que sólo se le conoce su estado asexual; no obstante presenta una gran variabilidad bajo las condiciones de Cuba y ha sido reportada por varios autores la presencia de un número variado de biotipos, los cuales difieren en diversos parámetros que van desde su comportamiento en medios de cultivo hasta la virulencia y patogenicidad en condiciones de campo.

Para desarrollar programas de mejoramiento genético a esta enfermedad mediante técnicas biotecnológicas como la selección *in vitro*, utilizando como agente selectivo las toxinas del patógeno, es necesario trabajar con aislados del hongo que presenten alta patogenicidad y virulencia. De lo anterior se deriva la necesidad de realizar estudios para determinar estos parámetros, seleccionar los que mayores índices posean, e introducirlos en los programas de mejora. De esta forma se seleccionarán individuos resistentes a un aislado que presente alta patogenicidad, presumiblemente similar a la encontrada en condiciones de campo.

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado el presente trabajo se tuvo como objetivos estudiar la variabilidad presente en varios aislados de *Alternaria solani* para el establecimiento de parámetros en la selección de aislados para su uso en la selección *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron aislamientos monospóricos de *Alternaria solani* a partir de lesiones de plantas obtenidas en campos comerciales de papa var. Desirée en zonas productoras de las provincias Pinar

del Río, La Habana, Villa Clara y Ciego de Ávila y se identificaron atendiendo a los criterios taxonómicos descritos por Ellis (1971); Barnett y Hunter (1987).

Caracterización y diferenciación de los aislados de *Alternaria solani*

- Determinación de la velocidad media (mm/día) diaria de cada aislado, así como el color, textura superficial y tipo de crecimiento de la colonia, y la pigmentación del medio de cultivo PDA.
- Evaluación de la esporulación *in vitro*. Para ello se utilizó el método propuesto por Izquierdo (1977). Las evaluaciones se realizaron a los 5, 8 y 10 días de incubación y consistieron en contar la cantidad promedio de conidios por 0.5 cm. Se registraron además los conidios en fase de formación.
- Evaluación de la patogenicidad sobre plantas de papa. Una suspensión conidial a una concentración de 10^4 conidios/mL de cada uno de los aislados fue asperjada sobre vitropiantas de papa de la variedad Desirée y la especie *S. chacoense* de 35 días de plantadas. Las cuales fueron colocadas en casa de cristal con condiciones semicontroladas (Temperatura media de 27.6 °C y Humedad relativa media de 80.3%). Las evaluaciones consistieron en determinar el tiempo de aparición de los síntomas, así como el grado de afectación provocado por cada uno de los aislados sobre las variedades estudiadas, según la escala aprobada por el Comité de Expertos de Sanidad Vegetal ampliada a la definición de categoría de ataque citada por Mayea et al., (1990). Se determinó la dinámica de la enfermedad de cada uno de los aislados.

- Estudio del comportamiento en Medio de Richard para determinar el comportamiento y establecer diferencias en cuanto a diferentes parámetros así como una posible correlación entre la patogenicidad de los aislados y la fitotoxicidad del cultivo filtrado.
- Se estudió el efecto del cultivo de filtrado sobre vitroplantas de 30 días de cultivo de la variedad Desirée (susceptible) y la especie silvestre *Solanum chacoense* L. (resistente). El método de aplicación del cultivo filtrado fue el de inmersión de raíces descrito por Hernández et al., (1991). Las evaluaciones se realizaron a las 72 horas y consistieron en determinar el número total de plantas afectadas por variedades y tratamientos, así como el grado de afectación según la escala propuesta por Dita (1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se obtuvieron 8 aislados de *Alternaria solani*. HAs46 (San José, Habana), PAs114 (San Cristóbal, Pinar del Río), VAs4 (Las Antillas, Villa Clara), VAs9 (Valle del Yabú, Villa Clara), CAs241 (ISACA, Ciego de Ávila), CAs242 (Morón, Ciego de Ávila).

Al hacer un análisis integral de los estudios realizados para la caracterización y diferenciación de los aislados, se observó que VAs4 y PAs114 fueron los que mayor velocidad de crecimiento mostraron, produjeron mayor cantidad de conidios, provocaron mayores grados de afectación en la inoculación artificial sobre Desirée y *S. chacoense*. De igual forma al estudiar el comportamiento de los aislados en medio líquido de Richard se apreció que VAs4 y PAs114 mostraron los mayores valores de pH, peso seco, pigmentación del medio de cultivo, así como en el consumo de sacarosa y el efecto de su cultivo filtrado fue el que mayores afectaciones provocó sobre las vitroplantas estudiadas. Esto indica que pudiera existir una correlación entre estos parámetros, los nos sirven como patrones para la selección de aislados patogénicos de interés en la mejora de plantas a esta enfermedad.

Cuando se comparan los resultados obtenidos en este estudio con los de la inoculación artificial se hace notable la coincidencia en los valores de afectación provocados por los aislados en ambos estudios. Los aislados VAs4 y PAs114, que

mostraron las mayores afectaciones en la inoculación artificial con conidios, son a su vez los que mayores afectaciones provocaron cuando se aplicó su cultivo filtrado sobre vitroplantas, en los restantes aislados también se observó cierta correlación. Este resultado sugiere el papel primario que tiene la producción de toxinas por el patógeno en el desarrollo de la enfermedad tizón temprano en papa, esto si tenemos en cuenta que desde el punto de vista fisiopatológico *A. solani* es un parásito necrotrófico. Además evidencia que la selección de genotipos realizada con el cultivo filtrado de *A. solani* puede estar correlacionada con la resistencia a nivel de invernadero y campo. Martínez (1994) plantea que esta resistencia es proporcional y que es altamente heredable en las progenies siguientes.

BIBLIOGRAFIA

- Barnett, H.L.; Hunter, B.B. 1986. Illustrated Genera of imperfect fungi. Fourth Edition. Macmillan, Publishing Company. Collier Macmillan Publisher. London. p 132-133.
- Dita, M.A., Rojas, M. 1998. Estudio del comportamiento *in vitro* de diferentes aislados de *Alternaria solani* Sor. Trabajo de Diploma IBP. 45 pp.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceos, Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey. Englan. p. 464 - 497.
- Hernández, M.M; Kowalski, B; Lorenzo, P y Ortiz, U, 1991. Efectividad del empleo de filtrados de *Alternaria solani* Ellis y Martin (Jones y Grout) en la selección *in vitro* de formas resistentes en papa (*Solanum tuberosum* L.). Cultivos Tropicales, 12 (2): 48-50.
- Izquierdo, F. 1977. Un rápido y sencillo método para provocar la esporulación de *Alternaria solani* en cultivo puro. Revista CENIC. Serie Biológica. 8, :155-162.
- Martínez, P.R.; Sinclair, M, 1994. Selección *in vitro* de resistencia al tizón temprano (*Alternaria solani* Sorauer) en la papa criolla (*Solanum phureja* Junz, et. Buk.) Fitopatología Colombiana, 18 (2): 90-100
- Mayea S., Perdomo, O. 1990. Sistema de lucha integrada contra el tizón temprano (*Alternaria solani* Sor) en la papa (*Solanum tuberosum* L.) Trabajo de Diploma UCLV. 70 p

2-13 Estudio *in vitro* de cuatro nuevos somaclones seleccionados de FHIA-21 (*Musa spp*) usando irradiaciones.

Dion Daniels, Juan N. Pérez Ponce e Idalmis Bermúdez.

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: propag@ibp.edu.cu

Palabras claves: FHIA-21, Musa.

INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos (género *Musa*) están entre los cultivos más importantes en los países tropicales y subtropicales. Juntos ocupan el cuarto lugar de importancia como alimentos después del arroz, trigo y maíz en toneladas de producción (Afza et al, 1994). Sin embargo la producción está seriamente amenazada por varias enfermedades causadas por hongos, bacteria, virus y nemátodos. La inducción de mutaciones significa crear variabilidad genética, que es la base para la selección de características mejoradas (Vuylsteke y Swennen, 1992). La variación somaclonal como tal, no ofrece grandes posibilidades para la mejora y no es superior que la variabilidad por la mutagénesis (Pérez Ponce, 1998). Este trabajo pretendió hacer un estudio de los cuatro somaclones seleccionados del FHIA-21 irradiado y compararlos con el FHIA-21 original.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal en este trabajo se empleó el FHIA-21 (*Musa spp*) que tiene el genoma AAAB y fue desarrollado por la Fundación Hondureña de

Investigación Agrícola (FHIA). También como material vegetal se emplearon los cuatro somaclones (8-14), (14-23), (24-14) y el (17-13) seleccionados en el campo por poseer un bajo porte, cierta resistencia a la enfermedad sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) y altos rendimientos.

Todos los trabajos de laboratorio se realizaron en condiciones estériles. Los instrumentos se esterilizaron en estufa a 180°C durante 2 horas y todas las operaciones de inoculación y transferencia se realizaron en la cabina de flujo laminar.

Para el medio de cultivo en este trabajo se empleó como medio basal las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962). El medio de cultivo fue esterilizado en la autoclave vertical a 121°C de temperatura y una presión de 1.2 Kg/cm² durante 20 minutos. El pH del medio se ajustó a 5.8 previo a la esterilización. El medio de cultivo está compuesto por las sales MS, 3% sacarosa, 4 mg/L de 6-BAP y 0.65 mg/L de AIA. Se emplearon frascos de cultivo de 250mL de capacidad, los cuales contenían 30 mL de medio de cultivo en estado sólido y se colocaron 5

explantes/frasco.

Para las condiciones de incubación se usaron cámaras de cultivo de luz natural y una iluminación entre 2500 y 3000 lux, el fotoperíodo propio de la época del año y a temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Las evaluaciones se realizaron durante tres subcultivos, el 5^{to}, 6^{to} y 7^{mo}. Los parámetros a evaluar fueron: número de brotes, número de raíces, la presencia de multiyemas y el coeficiente de multiplicación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar los cuatro parámetros evaluados durante los tres subcultivos, se pudo apreciar que el somaclon 17-13 tuvo un mejor comportamiento con respecto a los otros somaclones, incluyendo el FHIA-21 original. Este mismo somaclon mostró un coeficiente de multiplicación cerca de 2 y presentó la menor cantidad de multiyemas, una forma de regeneración en la propagación masiva de plantas, la cual no es la más adecuada por la inestabilidad genética que provoca.

El somaclon 24-14 resultó ser el de más bajo coeficiente de multiplicación, sin embargo mostró un aumento progresivo durante los tres subcultivos realizados. En los dos primeros subcultivos el coeficiente fue de 1 y en el último alcanzó 1.61, algo todavía inferior a lo que lograron los otros somaclones estudiados.

El somaclon 17-13 presentó una superioridad *in vitro* en cuanto a los parámetros evaluados, con respecto al resto, incluyendo el FHIA-21 original. Se concluye que el somaclon de más bajo comportamiento fue el 24-14. Estos resultados confirman una vez más la importancia de los estudios *in vitro* de diferentes líneas dentro de un mismo cultivar, para la micropropagación de cualquier genotipo.

BIBLIOGRAFÍA

- Afza, R; N. Roux; H. Brunner; M, van Duren; R. Morpurgo. 1994. *In vitro* Mutation Techniques for *Musa*. En: The improvement and Testing of *Musa*: a Global Partnership. Honduras.
- Murashige, T y F. Skoog. 1962. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Pérez Ponce, J. 1998. Mutagénesis *in vitro*. En: Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología. J. N. Pérez Ponce (Ed.) Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba.
- Vuylsteke, D. y R. Swennen., 1992. Genetic Improvement of Plantain. San José, Costa Rica.

CULTIVO DE TEJIDOS Y CÉLULAS.

3-01 Cinética del crecimiento de callo de *Tilia mexicana* (SCHL).

Blanca Lilia Nader G. y Martín López del Valle

Facultad de Biología (Xalapa), Universidad Veracruzana (Mex). Fax 0128185233 E-mail: nader@edg.net.mex

Palabras claves: *Tilia mexicana*, callos, cinética del crecimiento.

INTRODUCCIÓN

Tilia mexicana (Schl.), es una especie de importancia económica y medicinal (Arqueta et al., 1994). Esta especie se ubica en el estrato arbóreo del bosque mesófilo de montaña (Robert, 1985) y en ocasiones asociadas a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso y en terrenos de cultivo; es originario de México, crece entre los 1000 y 2000 m.s.n.m. Árbol con follaje vistoso, hojas en forma de corazón, flor color amarillento formando ramos situadas en una hoja angosta. Su flor es utilizada para preparar té de "tila" muy empleado en la zona centro del país (Veracruz, Hidalgo, Tlaxcala, etc.) (Arqueta et al., 1994) como calmante de nervios, o contra enfermedades del corazón, presión arterial, contra cólicos menstruales etc.,. Por otro lado, debido a las actividades humanas, el tipo de vegetación de bosque mesófilo de montaña, está tendiendo a desaparecer, principalmente por la ganadería extensiva y estrategias agrícolas de monocultivos.

El cultivo *in vitro* de células vegetales y su rediferenciación hasta plantas completas abre un sinnúmero de posibilidades experimentales a la investigación genética y bioquímica de los vegetales. El potencial es enorme y

las aplicaciones que de ello se deriven revolucionarán la producción agrícola y producción industrial de algunas sustancias naturales (Rzedowski, 1978). Las técnicas del cultivo de tejidos son un importante procedimiento en la multiplicación, el mejoramiento, la conservación de plantas útiles al hombre. La micropropagación es una de las técnicas que se aplican en la actualidad y que reporta muy buenos resultados en la obtención masiva de plantas anuales y bianuales incluyendo hortalizas, frutillas y plantas de ornato. Sin embargo, la micropropagación de especies perennes no ha progresado al mismo ritmo encontrándose que en estos casos los tejidos y órganos altamente diferenciados (maduros) son poco sensibles a condiciones *in vitro*. El interés por micropropagar especies arbóreas es principalmente para disminuir los largos ciclos de vida, mismos que han hecho difícil la aplicación de la genética convencional en el mejoramiento de estas especies (Villalobos, 1985).

Objetivo

Determinar por vez primera los requerimientos nutricionales, hormonales y de factores físicos, que pudieran ofrecer grandes cantidades de

callo de *Tilia mexicana* y contar con antecedentes para futuros estudios biosintéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esquejes de árboles adultos de *Tilia mexicana* fueron colectados en el Municipio de Miahuatlán, localizado a 19° 42' latitud norte y 96° 52' longitud oeste, situado entre el rango de 1200 a 2000 m.s.n.m. con clima templado húmedo, típico de la región en la cual, la vegetación es de bosque mesófilo de montaña, comprendiendo gran variedad de especies leñosas y abundancia de herbáceas y epífitas.

Los esquejes se utilizaron de un tamaño de 7 centímetros de largo, fueron seleccionados de ramas de nuevo crecimiento; se empacaron en bolsas de plástico para transportarlos al laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Biología (Xalapa), donde se preservaron en refrigeración a 8 °C hasta su desinfección.

Desinfección

Los esquejes fueron colocados en alcohol al 70 % durante 2', inmediatamente enjuagados con agua desionizada estéril, a continuación se les aplicó cloro al 10 % adicionado con gotas de Tween 80 y microdín, manteniéndolos en agitación durante 8', se enjuagaron 4 veces por 5' cada vez con agua desionizada estéril, se colocaron en solución fungicida (Benlate) a una concentración de 400 mg L⁻¹ durante 10' y en agitación constante, al final fueron enjuagados 4 veces por cinco minutos, cada vez, con agua desionizada estéril y se colocaron en solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico, ambos en concentración de 2.0 mg L⁻¹.

Extracción de yemas laterales

La extracción de las yemas se efectuó dentro de la cámara de flujo laminar y se realiza con ayuda de escalpelo y pinzas desinfectadas con alcohol al 80 % y flameadas. Se sujetó el tallo por la base, se eliminaron las hojas expandidas, aunque las yemas disectadas pueden llevar de 3 - 4 primordios foliares cercanas al meristemo. Las yemas así obtenidas, se introdujeron en los frascos de cultivo cuidando que la base de la misma (yema), quedara "sentada" sobre la superficie del medio previamente formulado, se colocó una yema por frasco.

Medios de cultivo

El medio MS (Murashige y Skoog 1962) se utilizó para la inducción de yemas laterales complementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 6.2 g L⁻¹ de agar bacteriológico, reguladores de crecimiento como; Benzilaminopurina (BAP) en concentraciones de 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 2.0 mg L⁻¹. Ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0.2, y 0.4 mg L⁻¹, además, se adicionó 100 mg L⁻¹ de mio-inositol 1.0 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 2.0 mg L⁻¹ de tiamina, 1.0 mg L⁻¹ de piridoxina y 20 mg L⁻¹ de adenina sulfatada, como antioxidante se aplicó 10 mg L⁻¹ de ácido cítrico e igual concentración de ácido ascórbico.

El medio WPM (Smith y McCown 1983), utilizado ampliamente para plantas leñosas, fue complementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 6.2 g L⁻¹ de agar bacteriológico, los reguladores BAP y ANA fueron agregados en las mismas concentraciones estipulada para el (MS utilizado), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1.0 mg L⁻¹ de tiamina, 0.5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico y piridoxina, glicina y glutamina en concentración

de 2.0 mgL^{-1} ambas y 20 mgL^{-1} de adenina sulfatada, el antioxidante agregado fue ácido cítrico y ascórbico en las concentraciones semejantes a las usadas en el medio MS, se manejo como regulador alternativo el ácido giberélico en concentración de 1.0 mg L^{-1}

El pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con HCl 1N o Na OH 1N. Los medios fueron autoclaveados a 121°C y 1.2 Kg/cm^2 de presión durante 18 minutos.

Medio para inducción de callo

MS y WPM con las variaciones siguientes: 1.0 mgL^{-1} de Furfuril amino purina (kinetina) y de BAP; (2,4-D) ácido 2,4 - Diclorofenoxiacético, en concentraciones de 4,2 y 1.0 mg L^{-1}

Medio para mantenimiento y aumento de callo

Medio MS, MS + adenina y MS2. Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento para peso fresco, tomando lecturas cada tercer día durante 21 días. Para peso seco sólo se usó una muestra por cada tratamiento tomando datos a los mismos intervalos de tiempo que para peso fresco.

Condiciones de cultivo

Todas las siembras realizadas, se mantuvieron en condiciones de intensidad lumínica de 1000 a 2000 lux, a una temperatura de $26^\circ \text{C} \pm 2$ con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, con una humedad relativa del 80 al 90 % excepto, en la inducción de callo, el cual fue llevado a oscuridad en su primera etapa (inducción) y posteriormente para su proliferación, se mantuvo en la condiciones ya mencionadas.

RESULTADOS

De los medios probados para la inducción de yemas, tanto el MS como WPM con sus complementos y reguladores de crecimiento etc., resultaron tener la misma eficacia en cuanto a liberación de las yemas, pero ninguno generó brotes. En cuanto a los reguladores de crecimiento probados y su correlación con la oxidación de los explantes, se encontró que las concentraciones de 0.4, 0.6 y 0.8 mgL^{-1} de BAP, fueron las que evitaron oxidación no así las altas concentraciones, en donde ésta (oxidación) se sigue presentando.

El medio WPM + ácido giberélico propició a nivel de yemas liberación de hojas rudimentarias protectoras de hojas verdaderas y meristemo, observándose una elongación de éstas hojas verdaderas.

Las yemas que se elongaron, se indujeron a la formación de callo y las combinaciones de Kinetina y 2,4-D reportaron un rendimiento insignificante en la formación de éste, así como la combinación de 1.0 mgL^{-1} de BAP y 2,4-D en el medio WPM, sin embargo, la poca formación de callo en éste medio, al transferirse a MS + BAP + 2,4-D dio como resultado una producción constante y abundante de callo, siendo éste de color verde limón a verde hoja, con algunas partes blancas, su abundancia en comparación con la sembrada fue multiplicada en aproximadamente de 5 a 8 veces su tamaño, es un callo de apariencia uniforme y friable en un periodo de 15 días.

Cinética

Se cuantificó a partir de los resultados obtenidos en los medios MS, MS+ Adenina y MS2. Estas pruebas

arrojaron resultados interesantes como fueron; que con la adición de Adenina sulfatada se observó una eficiencia significativa en cuanto al crecimiento del callo seguido por el tratamiento con el medio MS2 y el de menor rendimiento fue el MS.

Por otro lado, los resultados de peso seco denotan que el medio MS2 propicia un “arranque” activo en cuanto al crecimiento del callo, pero ese rendimiento disminuye después de 9 días y por último en el medio MS éste “arranque” tarda un poco, pero se incrementa ampliamente superando al tratamiento anterior y se estabiliza después de 15 días.

DISCUSIÓN

En el caso específico de *Tilia mexicana* el medio WPM adicionado con citocininas y auxinas en concentraciones equivalentes o incluso en concentraciones mayores de auxina que de citocina, no ofreció un resultado satisfactorio desde el punto de vista cuantitativo y fenotípico en la producción de callo, aunque si fue el medio (WPM) que adicionado con AG₃ permitió a nivel de yemas; liberación de hojas rudimentarias, verdaderas y meristemo, aspecto que podría tomarse como precedente para una producción constante y abundante de callo en medio MS + BAP+ 2,4,D por lo que se considera el adecuado para tal objetivo en *Tilia mexicana*.

Como en tantos otros cultivos, las altas concentraciones de reguladores, en éste caso 1.0 y 2.0 mgL⁻¹ de BAP nos parece producen habituación, y permiten la presencia de oxidación, por lo que fue necesario buscar las concentraciones adecuadas para evitarla y, que en éste caso fueron las menores (0.4, 0.6 y 0.8 mgL⁻¹ de BAP) El medio MS + BAP+ 2,4-D se

considera el adecuado para la obtención de grandes cantidades de callo con caracteres cuantificables para la especie *Tilia mexicana*.

El medio MS2(1/2 de Macronutrientes) puede ser el efectivo para propiciar el “arranque” de crecimiento de callo en correlación a los primeros días del cultivo, (lo cual podría implicar un ahorro en reactivos).

BIBLIOGRAFÍA

- Argueta, V.A., A.L.M. Cano y M., F. Rodarte., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Vol.III Edit. I.N.I. México D.F. p. 1337.
- Murashige, T., y Skoog., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473 - 497
- Robert, M.L., 1985. El potencial del cultivo *in vitro* de células vegetales en el mejoramiento genético de las plantas (Robert y Loyola comp.). El cultivo de tejidos vegetales en México. CONACYT, México. C.U. pp. 89-108.
- Rzedowski, J., 1978. Vegetación de México. Edit. Limusa México. pp. 432,
- Smith, M.A.L. y McCown, B.H., 1983. A comparison of source tissue for protoplast isolation from tree woody plant species. *Plant Sci. Lett.* 28 : 149 -156
- Villalobos, A.V., 1985. Las bases morfogénicas en la micropropagación de especies perennes (Robert L., y Loyola. comp.) El cultivo de tejidos vegetales en México. Edi. CONACYT. México D.F. C.U. pp. 55 - 63.

3-02 Sistema para el manejo de la información del banco de germoplasma *in vitro* (Bioconser).

Delly Lien González¹, Carmen Pons¹, Osmany Molina¹, Héctor Rodríguez², Víctor Medero¹, Irelio Sánchez¹, Magaly García¹, Jorge López¹, José de la C. Ventura¹ y Marylis Milián¹.

¹Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo. 6, Santo Domingo, CP 53000, Villa Clara, Cuba. Teléf. 4-2344, 4-2103. Fax: 4-2201. E-mail: inivit@quantum.inf.cu

²Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas (UCLV), Cuba.

Palabras claves: conservación, software, banco de germoplasma.

INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos constituyen patrimonio de la humanidad y garantía de la preservación de la vida vegetal y su diversidad en el planeta. Muchos lugares del mundo se dedican a su conservación y entre ellos, en el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) de Cuba, se encuentra uno de los bancos de germoplasma de las raíces y tubérculos tropicales, plátanos y bananos más grandes de América Latina (Rodríguez, 1990). El mantenimiento en campo de estas colecciones resulta muy costoso incluso para países de alto desarrollo económico por lo que se ha tratado de encontrar nuevas y más avanzadas formas de conservación de estos recursos naturales y el cultivo de tejidos constituye una vía de amplias perspectivas (Medero, 1995).

Para contribuir en la puesta a punto de las técnicas de conservación *in vitro* se propone el presente software para el control, almacenamiento, manejo y distribución de la información sobre los caracteres a evaluar desde el punto de vista biotecnológico en la conservación de los cultivos: boniato, yuca, plátano, malanga y ñame.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue desarrollado en el INIVIT, en el período comprendido entre 1997 y 1998.

Para su concepción fue decisiva, en primer lugar, la participación de los investigadores especializados en la aplicación de la biotecnología a los cultivos que se conservan *in vitro* y a los que se encargan de su conservación en condiciones de campo, quienes aportaron sus conocimientos y experiencias y recomendaron la literatura científico-técnica a consultar sobre dichas temáticas. Luego se analizó el tipo de información manejada, sus relaciones y características, la forma de presentarla al hacer la entrada y salida de los datos, la frecuencia de uso que tendría el sistema, las necesidades de los investigadores al usarlo, así como su apariencia final.

La implementación del sistema se hizo sobre una plataforma Windows y se utilizó Borland Delphi, un lenguaje con excelentes posibilidades para la programación visual, que permite diseñar aplicaciones de forma rápida, cómoda y fácil y que ofrece herramientas muy útiles y prácticas para el trabajo con

bases de datos tal y como lo requiere un sistema de este tipo (González, 1997). Los requerimientos técnicos para usarlo son los siguientes:

- Computadora 486 o superior.
- Plataforma Windows 3.1 o superior.
- Contar con las bibliotecas de enlace dinámico (dll).
- 4 Mb de RAM.
- Cierta cantidad de espacio disponible en disco según volumen de información.

RESULTADOS

BIOCONSER contribuye a facilitar el trabajo de controlar la información inherente a los cultivos que forman parte del Banco de Germoplasma *in vitro* del INIVIT. El sistema se concibió utilizando las facilidades de la programación sobre Windows. La aplicación consta de dos formas fundamentales. La primera es la presentación que da paso a la segunda, la más importante, en la cual aparecen los elementos de interacción con el usuario. En ésta aparecen las opciones de entrada de datos sobre los diferentes cultivos, los reportes sobre la información procesada y por último, la posibilidad de concluir la sesión de trabajo o consulta, saliendo del sistema por el botón «Salir».

La entrada de datos se resuelve de forma cómoda captándolos a través de la edición que hace el usuario de la información que sobre cada cultivo y cultivar específico se le pide (Figura 1).

Para la implementación del sistema se utilizaron las herramientas que ofrece la programación visual y Borland Delphi en particular. Entre los

elementos más usados se encuentran: las formas, las multipáginas, algunas de las facilidades para bases de datos como las tablas, la barra de “navegación”, los *ComboBox*, *GroupBox* y *RadioGroup*; los tipos *image* para hacer más agradable la interfaz con el usuario ubicando imágenes del cultivo, las etiquetas y los botones, entre otros.

La información que maneja el sistema está almacenada en los ficheros de bases de datos llamados Bonivit.dbf (boniato), Yucavit.dbf (yuca), Platvit.dbf (plátano), Colvit.dbf (malanga *Colocasia*) y Namevit.dbf (ñame), que se actualizan con los datos que introduce el usuario y cuya estructura es, fundamentalmente, la siguiente: No. introducción, Cultivar, Subcultivo, Explante, Fecha de evaluación, No. de explante, Temperatura, Iluminación, Medio de cultivo, No. de tallos por planta, Hojas activas, amarillas, muertas; Raíces activas, Raíces muertas, Sobrevivencia, Contaminación, Altura de la vitroplanta, No. de entrenudos por tallo, Planta atípica, Callo basal, Fecha de implantación, Multiyemas, Grupo genómico, Grosor de los explantes, Yemas axilares, Yemas adventicias, Grado de oxidación, Microcormo y Fenolización. Dicha estructura varía indistintamente según el cultivo en cuestión pues cada uno tiene sus especificidades, más aún en condiciones de cultivo *in vitro*.

Sobre estos datos almacenados se realizan las acciones que el usuario ejecuta para obtener los resultados deseados. Estos se ofrecen en forma de reportes a través de la consola o la impresora de la manera sugerida por los investigadores (por cultivo, fecha de

evaluación, implantación, etc.). La aplicación de este sistema ofrece la posibilidad de un trabajo de gestión cómodo y rápido a través de una interfaz amigable y agradable al usuario. Como resultado de aplicarlo, se conoce y se mantiene actualizado el estado de los cultivos que se conservan por esta vía biotecnológica.

CONCLUSIONES

- La aplicación informática ofrece la posibilidad de un trabajo de

gestión cómodo y rápido para los investigadores a través de una interfaz amigable y agradable al usuario.

- Constituye una valiosa herramienta para la actualización y consulta del material almacenado y permite una mayor eficiencia en el trabajo de investigación.

Figura 1. Forma donde se capta la información referente al cultivo del boniato.

BIBLIOGRAFÍA

- González, D., 1997. Agrotecnia de Cuba, 27(3)
- Medero, V., 1995. Regeneración por embriogénesis somática en yuca (*Manihot esculenta*, Crantz). Tesis (Master of Science). IBP - UCLV, — 50 p.
- Rodríguez, S., 1990. Mejoramiento de la yuca en la República de Cuba. Cruz das Almas, Brasil, 21-25 Mayo. Taller de Trabajo "Fitomejoramiento de yuca".

3-03 Determinación de las condiciones adecuadas para la obtención de callos en el clon de ñame Blanco o Pelú (*Dioscorea alata*).

Luis A. del Sol, Víctor Medero, Jorge López, Magaly García, José Ventura, Manuel Cabrera, Yadenis Torres, Miguel Álvarez.

Instituto de Investigación en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara. E-mail: inivit@quantum.inf.cu

Palabras claves: ñame, callos, cultivo in vitro.

INTRODUCCIÓN

El ñame comprende más de 600 especies, repartidas desde las regiones templadas hasta las zonas tropicales húmedas (Malaurie, 1995), el que representa el 12% de la alimentación base de las poblaciones de las regiones tropicales húmedas. Este cultivo se encuentra afectado por numerosas enfermedades causadas por virus, nemátodos, hongos y bacterias; por lo cual requiere de técnicas de micropropagación adecuadas que permitan una rápida y eficiente propagación de los materiales libres de enfermedades. El cultivo de callos tiene un amplio rango de aplicaciones, por ejemplo es empleado directamente como fuente de material celular para estudios bioquímicos, producción de metabolitos secundarios o regeneración de plantas para obtener variación somaclonal (con o sin la aplicación de mutágenos). También los callos son muy usados como paso inmediato para la iniciación de suspensiones celulares (Hall, 1991).

MATERIALES Y MÉTODOS

Como fuente de material vegetal se emplearon vitroplantas del clon Blanco o Pelú iniciadas de segmentos nodales de plantas desarrolladas en condiciones controladas (Mederos, 1997). En el primer experimento se probó la influencia de diferentes hormonas (Kinetina, 2,4-D y Picloram) sobre 3 tipos de explantes (segmentos de hojas jóvenes, peciolo y segmentos de tallos). Para lo cual se aplicaron los siguientes tratamientos:

1-Kinetina 5mg/l

2-2,4-D 1mg/l

3-2,4-D 2mg/l

4-2,4-D 3mg/l

5-2,4-D 4mg/l

6-2,4-D 6mg/l

7-Picloram 1mg/l

8-Picloram 2mg/l

9-Picloram 4mg/l

10-Picloram 2mg/l y 2,4-D 3mg/l

Estas hormonas se probaron sobre un medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con Biotina 1mg/l, ANA 1mg/l y AIA 1mg/l. En otro experimento se probó el efecto de la luz en la formación de callos partiendo de secciones de hojas y 2,4-D en concentración de 4 mg/l. Los experimentos se evaluaron a los 60 días de cultivo, analizando la presencia o no de callos compactos y con aspecto nodular. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el procedimiento no paramétrico K-W.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar el efecto de las diferentes combinaciones hormonales sobre los distintos tipos de explantes, pudo comprobarse que existió una respuesta de cada tipo de estos ante las hormonas estudiadas encontrándose diferencia altamente significativa ($X^2=38.53$ $p<0.01$), la hormona 2,4-D en la concentración de 4mg/l fue la que proporcionó el mayor porcentaje de callos (66.6%), como puede verse en la figura 1. De los 3 tipos de explantes

estudiados el más adecuado resultó ser los segmentos de hojas jóvenes (40.9%), seguido de los peciolo (27.5%), como puede verse en la figura 2 ($X^2=3.69$ $p>0.05$). Esta respuesta de los explantes puede explicarse si nos basamos en la edad fisiológica de los mismos y en el grado de diferenciación, ya que las hojas y los peciolo por ser más jóvenes que los segmentos de tallos ofrecen una mejor respuesta (Litz y Jarret, 1993; Gómez, 1998). Al analizar la influencia de la luz sobre la formación de estos callos se pudo comprobar que la oscuridad favorece este proceso, alcanzando niveles superiores a la luz (oscuridad 66% y luz 15% y diferencias altamente significativas entre ellas $X^2=22.34$ $p<0.01$) como se puede apreciar en la figura 3, estos resultados coinciden con las condiciones propuestas por Hall (2) para formar callos a partir de raíces de *Daucus carota*.

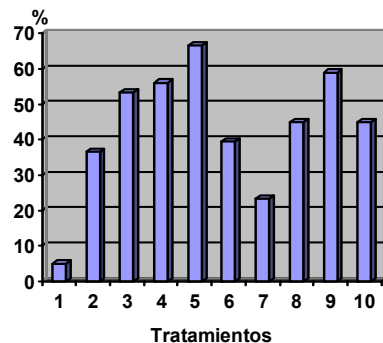


Figura 1: Efecto de los diferentes tratamientos sobre la formación de callos.

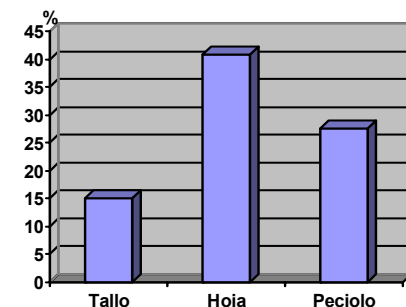


Figura 2: Influencia de los diferentes tipos de explantes sobre la formación de callos.

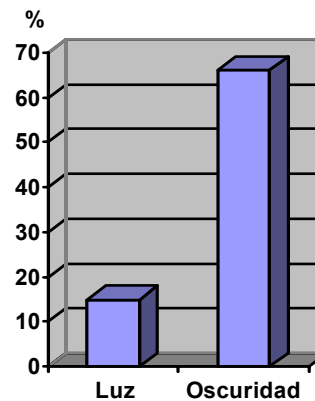


Figura 3: Efecto de la iluminación sobre la formación de callos

BIBLIOGRAFÍA

- Malaurie, Bernard., 1995. Les ignames. En: Biotechnologies végétales. Ed. C. Teisson. CIRAD GERDAT. (Montpellier) pp.49-77.
- Hall, R., 1991. The initiation and maintenance of callus cultures of carrot and tobacco. En: Plant tissue culture manual. Ed. K. Lindsey pp. A2:1-19.
- Medero, V., 1997 Metodología para la propagación *in vitro* del ñame (*Dioscorea alata*). INIVIT. Plegable.
- Murashige, T. y Skoog, F., 1962. Plant Physiol. 15: 473-497.
- Gómez, R., 1998. Cultivo de células y tejidos. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. J. N. Pérez Ponce (ed). Instituto de Biotecnología de Las Plantas. pp. 25-45.
- Litz, R. y Jarret, R., 1993. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos Embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. William Roca y Luis Mrogiski(Eds). pp 143-172.

3-04 Organogénesis directa de *Aporocactus flagelliformis* (Zucc) Lem.

Maribel Hernández Torres y Blanca Lilia Nader.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Universidad Veracruzana, México. E-mail: nader@edg.net.mx

Palabras claves: organogénesis directa, cactáceas, cultivo in vitro.

INTRODUCCIÓN

Aporocactus flagelliformis es una planta epífita que pertenece a la familia de las cactáceas, pueden encontrarse tanto en zonas desérticas como semidesérticas, soportando temperaturas extremas, son usadas en la industria medicinal, en el forrajeo, en la industria cosmetológica, etc.

(Bravo, 1978). *Aporocactus flagelliformis* es una especie que dentro del Diario oficial de la Federación está considerada como cómo una especie rara y endémica, posee además importancia médica ya que sus flores en infusión sirven para tratar padecimientos cardíacos.

La micropropagación es una de las técnicas aplicadas en la actualidad con resultados satisfactorios, debido a que a través de ellos se obtiene una multiplicación masiva de plantas anuales y bianuales, incluyendo a las cactáceas y otro tipo de plantas como las orquídeas (Rublou, 1993).

Los primeros intentos de propagación masiva de cactus *in vitro* inició hace más de 30 años (King, 1957). La propagación que se obtiene por técnicas *in vitro* en cactus facilita la reproducción clonal rápida de especies cuyos factores productivos se limitan por efectos tanto ambientales como fisiológicos de la planta ayudándola

con la uniformidad genética y morfológica y al mismo tiempo puede esta producirse bajo estrictas normas fitosanitarias logrando una alta calidad. Los avances en este campo son aún limitados debido a que la metodología es relativamente nueva y a que el conocimiento de la genética y la bioquímica de muchas plantas es muy escaso o nulo.

OBJETIVO

Obtener brotes múltiples a partir de tallo como explante de *Aporocactus flagelliformis* (Zucc) Lem como alternativa para su producción masiva.

COLECTA Y DESINFESTACIÓN

La especie se colectó en la región de Chiconquiaco, zona localizada a una altitud promedio de 2300 m.s.n.m. Fue trasladado a la Facultad de Biología en bolsas de plástico y mantenidos en condiciones de invernadero para su posterior tratamiento.

La desinfestación del explante se inició con lavados superficiales de agua corriente y detergente por 15 minutos, se sumergió en alcohol 70% por un minuto y se enjuagó con agua desionizada estéril, posteriormente se expuso a una solución de cloro al 30% más Tween 80 y Microdin durante 15 minutos, en agitación, se realizaron tres enjuagues de 5 minutos cada uno con

agua estéril, es mantenido en una solución fungicida (Benlate 400 mg L⁻¹) durante 10 minutos y sometido a tres enjuagues como los anteriores, después del último enjuague se le dejó en agua para su posterior siembra.

MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO

El medio utilizado fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0.1 mgL⁻¹ de ANA, 2.0 mgL⁻¹ de BAP, 30 gL⁻¹ de sacarosa, 6.0 gL⁻¹ de Agar bacteriológico. Como antioxidante, al inicio se aplicó 1.0 gL⁻¹ de carbón activado, después ácido cítrico y ácido ascórbico en concentraciones de 2.5 mgL⁻¹ para cada uno, posteriormente esta concentración fue aumentada a 3.25 mgL⁻¹ en ambos reactivos, 1.0 mgL⁻¹ de Glicina e igual concentración de Adenina sulfatada, el complemento vitamínico fue: 100 mgL⁻¹ de Myo-Inositol, 2.0 mgL⁻¹ de Tiamina, 1.0 mgL⁻¹ de Piridoxina e igual concentración de Ácido nicotínico. El pH fue ajustado a 5.7 ± 1 con NaOH 1N o HCL 1N (Cárdenas, 1991), el medio fue esterilizado por 18 min. a 1.2 kg/cm² de presión. Los cultivos fueron llevados para su incubación a las siguientes condiciones de temperatura, 24-28 °C, con un fotoperíodo de 16/8 hrs luz/obscuridad y una humedad relativa de 85 a 90%.

CULTIVO DE BROTES

El explante utilizado fue el tallo, el cual posterior a su desinfección se le realizaron cortes transversales y longitudinales de aproximadamente 1 cm., los cuales fueron colocados sobre frascos que contenían 20 ml de medio MS y subcultivados cada 3 semanas.

INDUCCIÓN DE LA RAIZ

Brotes de 4cm de longitud son transferidos a medio MS adicionado con 1.5mg L⁻¹ de AIB + 1.0mg L⁻¹ de kinetina y colocados en lotes de 10 frascos en oscuridad y otro lote con la misma cantidad de frascos sometidos a fotoperíodo de 18/6h. En el transcurso de un mes, empiezan a aparecer de 2 a 4 raicillas por brote y en algunos se presentaron raíces adventicias.

ADAPTACIÓN AL SUELO

Los brotes fueron retirados del medio de cultivo y lavados con agua destilada estéril para remover restos de agar, se sumergen en solución bactericida formulada por 400 mgL⁻¹ de estreptomina disuelta en agua estéril donde se mantienen por 30', de aquí se pasan a solución fungicida de 400 mgL⁻¹ de Benlate disuelto en agua desionizada estéril por 30'. Los brotes son pasados a recipiente plástico (vaso) de aproximadamente 4 cm de alto y con una mezcla de tierra, arena y arenilla en proporciones en peso 1:1:1 (que previamente había sido autoclaveada a 1,2 kg./cm² por 30'), en donde se conservan cubiertos con bolsas de polietileno por 15 días siendo regadas con solución MS reducida a un tercio en su contenido de sales, las bolsas son perforadas para el libre paso de aire del exterior al interior. En otros 15 días más, este polietileno es retirado y la planta está adaptada y se continúa regando con agua desionizada estéril.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se probó carbón activado como antioxidante con resultados negativos,

al cambiar a ácido ascórbico y cítrico en una concentración total de 5.0 mgL^{-1} los resultados tampoco fueron satisfactorios ya que todas las siembras manifestaron oxidación en la base del explante, se optó por aumentar las concentraciones de estos mismos ácidos en 7.5 mgL^{-1} y los resultados fueron los esperados.

Con respecto a los brotes, cada explante formó aproximadamente 3, los cuales crecieron a diferentes tiempos, es decir, unos emergieron antes que otros; la presencia de estos, se manifestó en 20 días posteriores a su siembra. La longitud de los brotes fue aproximadamente de 1 a 13 mm en su etapa inicial y con concentraciones de 2.0 mgL^{-1} de BAP, sin embargo, cuando se usa una concentración menor es bajo, como es para los casos de 1.0 mgL^{-1} y 0.5 mgL^{-1} .

El enraizamiento de los brotes que se colocaron en oscuridad se etiolaron, pero aportaron mayor presencia de raíces adventicias, en cambio los explantes sometidos a fotoperíodo, reportaron los mejores resultados en cuanto a número de raíces, longitud, así como, menor cantidad de raíces adventicias y se generaban más brotes.

Para establecer la técnica de desinfección se realizó un barrido cloral, encontrando que la mejor concentración fue de 30% por 15min. Debido a la presencia de hongos fue necesario aplicar una solución fungicida. Para controlar la presencia de oxidación en los explantes se usó carbón activado sin embargo, este no controló el problema por lo que se optó usar como antioxidante ácido cítrico y ácido ascórbico en combinación en concentraciones de

5.0 mgL^{-1} y 7.5 mgL^{-1} , siendo la última concentración la que reporta resultados altamente satisfactorios.

La formación de brotes fue mejor a una concentración de 2.0 mgL^{-1} de BAP de y 1.0 mgL^{-1} de ANA, pues fue en esta donde se obtuvo un mayor número. Y para el crecimiento de éstos se usó 0.2 mgL^{-1} de BAP y 1.0 mgL^{-1} de ANA. La presencia de callo en los explantes aún cuando no fue inducido, revela la capacidad de la planta de producirlo. Durante la etapa de enraizamiento se manifestó la presencia de raíces adventicias y la etiolación de los brotes colocados en la oscuridad a diferencia de los sometidos a iluminación.

BIBLIOGRAFÍA

- Bravo, H., 1978. Las cactáceas de México. Segunda edición, UNAM. México.
- King, R.M., 1957. Studies in the tissue culture of cacti. Cactus and succulent Journal (US). 29: 102-104.
- Murashige, T y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Rublou, A.; V, Chávez, P. Martínez y M. Vázquez., 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. Plant Biotechnology and Genetic. Laboratory the botanical Garden Institute, at Biology. UNAM, 163-169.

3-05 Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas adultas de dos nuevos híbridos cubanos de Papaya (*Carica papaya* L.)

Laisyn Posada Pérez, R. Gómez Kosky, Maritza Reyes, J. Pérez Ponce y Niurka González.

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:kosky@ibp.edu.cu

Palabras claves: *papaya, híbridos, fase de establecimiento, desinfección, cultivo in vitro.*

INTRODUCCIÓN

La multiplicación *in vitro* de la papaya solo se justifica económicamente si la misma se realiza para un genotipo híbrido (Drew, 1997). Uno de los grandes problemas que tiene esta metodología es los altos porcentajes de contaminación *in vitro* (bacterias y hongos) cuando se emplea como explante inicial ápices o meristemas de plantas adultas creciendo en campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se emplearon plantas adultas de dos nuevos híbridos obtenidos por el programa de cruzamiento del Instituto de Biotecnología de las Plantas, los cuales tenían 11 meses de plantadas en campo.

Pretratamiento en campo

Antes de la toma de los brotes, las plantas fueron divididas en dos grupos, el primer grupo se le realizó el decapitado de la zona apical de la planta y el segundo grupo quedaron las plantas intactas. Posteriormente a ambos grupos de plantas se les realizaron aplicaciones foliares de una solución compuesta por dos reguladores del crecimiento 500 mg/L de 6-BAP y 1000 mg/L de ácido giberélico, semanalmente, durante 3 semanas consecutivas para inducir el desarrollo de las yemas laterales. Después de 1 mes de la última aplicación se

comenzó la toma de los brotes jóvenes, para ser implantados *in vitro*, realizándose el conteo del número de brotes obtenidos por semana en ambos grupos.

Desinfección

Como primer paso los brotes jóvenes con un tamaño aproximado de 2 cm fueron lavados con agua corriente durante 5 horas de forma continua, posteriormente fueron tratados con una solución con detergente en agitación en zaranda durante 10 minutos. Luego de este tiempo se enjuagó con agua corriente nuevamente durante 10 minutos. Al transcurrir este tiempo se desinfectaron con diferentes productos para lo cual se realizaron varios experimentos utilizando estos solos o en combinación: alcohol al 70 %; Hipoclorito de sodio al 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 % de cloro activo y una mezcla de antibióticos (50 mg/L de gentamicina, 25 mg/L de estreptomicina y 50 mg/L de cefatoxima). Los brotes una vez desinfectados fueron cortados en la cabina de flujo laminar a un tamaño de 1 cm e implantados en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, con 1 mL de agua azucarada estéril (20 g/L de sacarosa). A los 5 días se realizó la evaluación del porcentaje de contaminación por bacterias y hongos. Los ápices libres de contaminantes detectables por observación visual fueron pasados a tubos de ensayo con 10 mL de medio MS líquido, suplementado con 6-BAP, 2 mg/L y ANA 0.1 mg/L sobre soporte de papel de filtro para eva-

luar la supervivencia de los explantes a los 30 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se obtuvieron diferencias significativas respecto al número de brotes cuando las plantas fueron o no decapitadas, alcanzándose un total de 68 y 63 brotes por planta, respectivamente durante 3 semanas. La solución de reguladores del crecimiento aplicada jugó un papel fundamental en el rompimiento del efecto dominante de la yema apical, similares resultados reportan Reuveni y Shlesinger (1990).

Con relación a las sustancias desinfectantes utilizadas durante el trabajo, el mejor tratamiento fue la combinación de Hipoclorito de sodio al 1 % durante 10 minutos y posteriormente la sumersión de los explantes en la solución de antibióticos durante 30 minutos, logrando porcentajes de establecimiento entre 68-75 %. En el caso del alcohol, aunque se aplicó solamente durante 2 segundos, provocó quemaduras en los brotes. Varios autores emplean hipoclorito de sodio para la desinfección de los brotes o yemas de la papaya plantadas en invernadero o campo con concentraciones de cloro activo de 0.3, 1, 1.25 y/o 5.25% (Reuveni y Shlesinger, 1990; Reuvini et. al., 1990; Kataoka e Inoue, 1991; Castillo et al., 1997; De Winnaar, 1997). Singh et. al. (1997) emplean solos o en combinación diferentes antibióticos para eliminar la contaminación bacteriana, alcanzando altos valores de establecimiento (78 %), similares a los del presente trabajo y utilizando brotes de plantas con 14 meses en campo.

El estado juvenil de los brotes empleados con activo crecimiento ayudó en gran medida a los resultados alcanzados en la desinfección y el establecimiento de los mismos, similares resultados plantean Fitch et al. (1997).

BIBLIOGRAFÍA

- Castillo, B.; M.A.L. Smith; D.L.Madhavi., 1997. Interactions of Irradiance level and iron chelate source during shoot tip culture of *Carica papaya* L. HortScience 32 (6): 1120-1123.
- De Winnaar, W. 1997. Micropropagation of *Carica papaya* L.J.Amer. Soc. Hort. Science 156 :735-738.
- Manshardt, R.M.; Drew, R.A., 1997. Biotechnology of Papaya. Proceedings of In. Symp. Biotechnology of Tropical and Subtropical species. R.A.Drew ed. Queensland, Australia. 29 september –3 october. pp 514.
- Fitch, M.; P. Moore and T.Leong., 1997. Progress in transgenic papaya research: transformation for broader resistance among cultivars and micropropagating selected hybrid transgenic plants. Proceedings of In. Symp. Biotechnology of Tropical and Subtropical species. R.A.Drew ed. Queensland, Australia. 29 september –3 october. pp 514.
- Kataoka, I.; H. Inoue., 1991. Rooting of tissue cultured papaya shoots under ex vitro conditions. Japanese Journal of Tropical Agriculture. Vol. 35, no.2. pp. 127-129.
- Reuveni, O.; D.R. Shlesinger; U.Lavi., 1990. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2: 41-46.
- Reuveni, O.; D.R. Shlesinger. 1990. Rapid vegetative propagation of papaya plants by cuttings. Acta Horticulturae, 275: 301-305.
- Singh, S.K.; H.C. Sharma; Singh, S.P., 1997. Antibiotics control endogenous contaminants of papaya. Proceedings of In. Symp. Biotechnology of Tropical and Subtropical species. R.A.Drew ed. Queensland, Australia. 29 september –3 october. pp 514.

3-06 Cultivo *in vitro* de *Ananas comosus* (L.) Merr., (piña), cultivar Cabezona.

Luis Enrique Rodríguez de Francisco, Yerina Santiago Bardón, Yamila Rosales Simonot. Yanet Igarza Castro y Elena Fornet Hernández.

Centro de Biotecnología Vegetal. Holguín. Carretera a Bayamo. Km. 2.5 Holguín, Cuba.
E-mail: jorge@cbv.hlg.sld.cu

Palabras claves: piña, fase de establecimiento, desinfección, cultivo *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

Ananas comosus (L.) Merr., (Piña), es una planta diploide ($2n=50$ cromosomas), con excepción de la Cabezona, la cual es un triploide natural, autoincompatible y sólo produce semillas por cruzamientos entre variedades de diferentes grupos.

La piña es económicamente la más importante especie de la familia *Bromeliaceae*. En 1995 ocupó el séptimo lugar en la producción mundial con 11.7 millones de toneladas, fue la cuarta fruta más exportada y la segunda de mayor popularidad en los países de clima templado.

La propagación vegetativa es el método fundamental de multiplicación, en el cultivo de la piña el hombre ha aprendido a utilizar todos los tipos de materiales de propagación producidos por la planta, pero sólo una parte de ellos se encuentra a disposición del productor. La tasa de multiplicación es muy baja por lo que se ha elaborado todo un arsenal de técnicas que permiten su multiplicación clonal.

La multiplicación acelerada por cultivo de tejidos permite incrementar la disponibilidad de material valioso como en caso de la selección clonal, para las especies con multiplicación asexual lenta

(especies leñosas como los frutales y árboles forestales) o para especies heterocigóticas multiplicadas por semillas.

Estas técnicas tienen gran interés por su aplicación en los últimos años, fundamentalmente en plantas con pobre producción de semillas y una insuficiente propagación vegetativa como ocurre con la piña. En este cultivo el método de multiplicación clonal *in vitro* ofrece una nueva dimensión al productor al permitir la rápida propagación de una variedad partiendo de un escaso número de plantas.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar la desinfección y establecimiento de yemas axilares de la corona de piña cultivar Cabezona, para la obtención de explantes asépticos que serán utilizados como punto de partida para la micropropagación masiva del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente trabajo se utilizó la metodología propuesta por Daquinta et al. (1989), para la micropropagación de piña cv. Cayena lisa.

Los materiales (coronas) fueron deshojados con cuidado. Seguidamente se realizó el lavado con detergente comercial con ayuda de una esponja, con el objetivo de eliminar las

suciedades que se adhieren en las partes donde estaban insertadas las hojas, dejándose los troncos de corona 30 minutos en agua corriente, esta operación se realizó tres veces.

Se utilizaron cinco variantes de desinfección, empleando el Hipoclorito de Sodio y Calcio a concentraciones desde 0.5 % hasta 1.5 % durante 10 y 20 minutos, respectivamente, además el Bicloruro de mercurio a razón de 0.2 % durante 2, 3 y 5 minutos.

El medio de cultivo basal utilizado fue el Murashige y Skoog, 1962. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C, a 1.2 Kg / cm de presión durante 15 minutos. El pH se ajustó a 5.7 previo a la esterilización.

El crecimiento de los explantes tuvo lugar en cámaras de luz natural con una intensidad luminosa de 2500- 3000 lux, una humedad relativa de 75 ± 5 % y temperatura de 24 ± 2 °C.

Los medios de cultivo se complementaron con myo-inositol (100 mg / L); vitaminas de Heinz (10 mL / L); sacarosa 3 % y agar 5 % y diferentes variantes hormonales en dependencia de la fase a estudiar.

Para el procesamiento estadístico de los resultados se emplearon análisis de ANOVA simple, auxiliándonos del procesador estadístico CCS. Los datos en porcentajes se transformaron según la ecuación $x = 2 \arcsen \sqrt{v}$ %, si no tenían una distribución normal. Las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento de los diferentes métodos de desinfección de las yemas

La desinfección del cultivo comprende desde la siembra hasta el rompimiento de la latencia, hecho que se manifiesta por el enverdecimiento de las yemas y su aumento de tamaño. Es la etapa más difícil del cultivo, debido a la alta contaminación que presenta ocasionando la pérdida de numerosos explantes.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo en cuanto a la desinfección del inóculo son los siguientes: las concentraciones bajas de NaClO (0.5 %) y CaClO (0.5 %), fueron inefectivas y la concentración de HgCl₂ (0.2 %) durante 5 y 3 minutos fue letal para los explantes. Los tratamientos de HgCl₂ al 0.2 % por 3 minutos y el NaClO al 1.5 % durante 20 y 10 minutos respectivamente dieron los mejores porcentajes de desinfección con 70 y 80 % de efectividad.

Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Daquinta et al. 1989, quienes utilizaron CaClO al 0.5 % durante 20 y 10 minutos (al tronco de coronas y a las yemas) respectivamente, para el cv. Cayena lisa serrana, los resultados antes mencionados se utilizaron como testigo.

Cisneros et al., 1994, obtuvieron resultados satisfactorios utilizando HgCl al 0.2 % durante 3 minutos, obteniendo altos porcentajes de brotación y baja contaminación de las yemas, coincidiendo con el tratamiento 4 del presente trabajo, en el cual se obtuvo un 70 % de eficiencia.

Comportamiento de la brotación de yemas en los diferentes medios de implantación

La iniciación del crecimiento implica el rompimiento de la latencia de las yemas

axilares o laterales de piña, hecho que se ve favorecido por la presencia de sustancias inductoras como las auxinas y las citocininas, planteamiento este que difiere y concuerda indistintamente con diversos autores.

Para la inducción de brotes se utilizaron cinco tratamientos. Los mejores resultados se obtuvieron en los medios libre de hormonas y con 0.3 mg / L de kinetina, aunque no existieron diferencias marcadas en el número de brotes. El porcentaje de brotación fue bajo en todos los casos y el comportamiento de este proceso por efecto de los tratamientos con reguladores no mostró tendencia alguna que permita atribuir a las fitohormonas el desarrollo de las yemas.

Daquinta 1989, obtuvo porcentajes de brotación hasta de un 45 % en yemas de la corona de los cultivars Cayena lisa serrana y Española roja, utilizando el medio MS más 1 mg /L de ANA y BA respectivamente.

Comportamiento de los explantes en los diferentes medios de multiplicación

El mejor comportamiento se obtuvo en el medio de cultivo que contenía 2.1 mg./L de Benciladenina más 0.3 mg/L de Ac. Naftylacético, en el cual se obtuvieron coeficientes de multiplicación de 12. El medio de cultivo suplementado con 1.5 mg/L de Benciladenina más 0.3 mg/L de Ac. Naftylacético fue el de menor niveles de multiplicación con 5. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Daquinta et al. (1998) y similar a los alcanzados por Boxus et al. (1991) y superior a los obtenidos por Smith y Drew (1990) de cuatro brotes en cada subcultivo. Gutiérrez (1988) obtuvo

como máximo cinco brotes en medio sólido, Fitchet (1988) en medio líquido alcanzó siete brotes de cada yema y Guzmán (1988) en medio líquido en movimiento logró hasta 34 brotes.

Comportamiento del enraizamiento *ex vitro* de los brotes

Se logró el 100 % de enraizamiento y de supervivencia de los brotes al utilizar el polvo enraizador a 250 mg/Kg de ANA; aunque no existió diferencias con el de 125 mg/Kg de ANA, este disminuyó a medida que se incrementó la concentración hormonal del polvo. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Daquinta et al (1998), pero en su caso el mejor comportamiento lo obtuvieron con la concentración de 125 mg/Kg.

En el comportamiento del número de hojas emitidas no se encontró diferencias entre los tratamientos, aunque los polvos de menor concentración del regulador presentaron un ligero incremento en el número de hojas emitidas.

CONCLUSIONES

Se pueden obtener plantas de piña cultivar Cabezona a través de las técnicas de cultivo *in vitro*, incrementando el número de plantas en menor tiempo de cultivo.

3-07 Estudio de la interacción genotipo-explante-medios de cultivo en la respuesta *in vitro* de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill).

Amelia Capote, Zoila Fundora, Maribel González-Chávez y Odalys Pérez.

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). Ciudad Habana, CUBA. e-mail: inifat@ceniai.inf.cu

Palabras claves: tomate, callos, interacción genotipo-explante-medios de cultivo, cultivo *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

Muchos sistemas de cultivo de diferentes grados de complejidad pueden ser utilizados como la base de una selección *in vitro* y su elección dependerá de la estrategia de selección que será aplicada y la capacidad de los cultivos para ser manipulados. Para llevar a cabo estos estudios muchos autores estudian la resistencia de los callos propiamente, mientras que otros toman en consideración la resistencia de las plantas regeneradas a partir de éstos o directamente de los explantes seleccionados.

Por tal razón, el conocimiento y control del proceso de crecimiento y regeneración en las células y tejidos cultivados son pre-requisitos indispensables para el uso eficiente de los métodos y técnicas *in vitro* y consecuentemente para una óptima utilización de la genética de las células somáticas en investigaciones relacionadas con el mejoramiento y la obtención de nuevos cultivares.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento *in vitro* de diferentes cultivares de tomate para su posterior utilización en los esquemas de selección a factores bióticos y/o abióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los cultivares empleados fueron Cuba C-2781, Cubanacán-1243 y Campbell-28, los cuales muestran diferentes hábitos de crecimiento y grados de susceptibilidad

al ataque de patógenos. Para la obtención de callos, los segmentos de hojas e hipocótilos de plántulas germinadas *in vitro*, fueron cultivados en el medio MS suplementado con 2 mg/L de ácido naftalén acético (ANA) y 1 mg/L de diferentes citocininas: (M1) 6-bencil amino purina (BAP), (M2): 6-furfuril amino purina (KIN) y (M3) 6 g, g dimetilalil amino purina (2iP).

La capacidad para la callogénesis (inducción y crecimiento) y la rizogénesis espontánea se evaluó de forma cualitativa mediante una escala de rangos, analizándose los datos por dos métodos no paramétricos (Kruskal-Wallis y Friedman) y las diferencias detectadas por la prueba de Student-Newman-Keuls. Se aplicó el estadístico de Spearman para evaluar la correlación entre el crecimiento de los callos y la rizogénesis en cada medio estudiado.

Para inducir la regeneración de plantas directamente a partir del explante se utilizaron segmentos de hojas, hojas cotiledonales e hipocótilos de los tres genotipos, los cuales fueron cultivados en el medio MS suplementado con 0.175 mg/L de ácido indol acético (AIA) y 1.5 mg/L de BAP. La capacidad morfogénica fue evaluada mediante las variables porcentaje de formación de callos, callos morfogénicos y callos con desarrollo de brotes y el número de vástagos/ explante. Los datos fueron evaluados mediante un ANOVA de clasificación doble y las diferencias detectadas mediante la prueba de Newman-Keuls al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que el análisis de Friedman fue más efectivo para detectar las diferencias significativas que el análisis de Kruskal-Wallis en los experimentos realizados, lo cual pudiera deberse a la manera de expresar los rangos.

Se observaron diferencias significativas entre los medios de cultivo y las interacciones genotipo-medio y explante-medio utilizado, tanto para la inducción como crecimiento de los callos. Esta respuesta varió en dependencia del genotipo, ya que aunque no se detectaron diferencias significativas entre ellos, se observó un comportamiento diferencial del cultivar Campbell-28. El cv. Cubanacán-1243 mostró los mejores resultados en la inducción y crecimiento de los callos, correspondiendo al explante hipocótilo las mejores respuestas.

Los mejores medios para la inducción de callos correspondieron a los suplementados con BAP y KIN, mientras que para el crecimiento de los mismos resultó más efectivo el medio con 2iP, el cual se considera que tiene un fuerte efecto como citocinina y por tanto puede producir una mayor estimulación del crecimiento celular.

La correlación de rangos de Spearman mostró una correlación negativa entre los parámetros crecimiento y rizogénesis, siendo solamente significativa cuando se utilizó el medio M2.

En cuanto a los resultados obtenidos al estudiar la capacidad morfogénica se obtuvieron diferencias significativas entre los genotipos, explantes y la interacción de ambos factores, excepto para la variable porcentaje de formación de callos donde no se obtuvieron diferencias significativas entre los explantes utilizados.

Para las variables porcentaje de callos

morfogénicos y callos con desarrollo de brotes se observó un comportamiento similar entre los cvs. Cubanacán-1243 y Cuba C-2781, mientras que para la variable número de vástagos fue evidente la superioridad del cv. Cubanacán-1243. El cv. Campbell-28 mostró el comportamiento más recalcitrante ante la diferenciación *in vitro*.

En cuanto a los explantes, las hojas cotiledonales mostraron una mayor capacidad para el desarrollo de los vástagos, obteniéndose la mayor respuesta con el cv. Cubanacán-1243 (12.9 vástagos/explante).

CONCLUSIONES

- Se demostró que existen diferencias en la inducción y crecimiento de los callos en dependencia de factores como genotipo, explante y medios de cultivo.
- El método estadístico utilizado para el análisis de los resultados obtenidos influye en la respuesta resultando en este caso más efectivo el análisis de varianza de Friedman.
- La capacidad morfogénica difiere significativamente entre los genotipos y explantes utilizados, por lo que es necesario estudiar en cada caso las condiciones adecuadas para lograr el control eficiente del proceso de regeneración en las células y tejidos cultivados *in vitro*.
- Fue evidente el comportamiento diferente del cv. Campbell-28, donde se obtuvieron los valores más bajos en todos los índices evaluados, tanto para la callogénesis como la capacidad morfogénica, independiente del explante utilizado.
- Estos resultados permitieron la caracterización de los materiales objeto de estudio, lo que posibilita la aplicación de las técnicas biotecnológicas con fines de mejoramiento genético.

3-08 Regeneración *in vitro* de especies aromáticas del noroeste argentino.

Maritza Vacca Molina,^{1,3} M.I.C Bonomo de Villa,^{2,3} F. Murature de Sureda²; S. López³ y R. Neumann³

¹Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta. Buenos Aires 177. 4400 Salta. Argentina.

² Cátedra de Introducción a la Biología, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta. Buenos Aires 177. 4400 Salta. Argentina.

³ Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Banco de Germoplasma. EERA- INTA- Cerillos. 4400 Salta. Argentina.

Palabras clave: especies aromáticas, regeneración, fase de establecimiento, cultivo *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

La región del Noroeste Argentino presenta una gran variabilidad ecológica. Las especies aromáticas nativas representan una riqueza potencial alternativa para la reactivación económica de diferentes áreas agroecológicas de la provincia de Salta (Argentina).

De la experiencia acumulada por instituciones nacionales, técnicos y productores, en cuanto al valor económico de algunas especies aromáticas, surgió la necesidad de desarrollar protocolos de regeneración *in vitro* para *Aloysia citriodora* P. (cedrón), *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (té de burro), *Lippia turbinatia* (Griseb.) (poleo), *Lippia alba* (Mill.) Britton (yerba señorita), *Origanum vulgare* L. (orégano), con el objeto de definir una metodología tendiente a lograr una producción masiva de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la iniciación *in vitro* de los cultivos se utilizaron dos fuentes de explantos: ápices meristemáticos y segmentos uninodales.

El crecimiento de los explantos se ensayó sobre distintos tratamientos que contenían las sales y compuestos orgánicos de Murashige – Skoog (MS), completo o reducido a la mitad. Dependiendo de la especie, los medios se suplementaron con diferentes fitorreguladores (6 bencylaminopurina, 2- Isopenteniladenina ácido naftalenacético, ácido indolbutírico), en distintas concentraciones. A los me-

dios de cultivo se adicionó sacarosa al 3% p/v, la concentración de agar empleada fue de 0,7 ó 0,35 % p/v (según la especie). El pH se ajustó a 5,8 antes de la esterilización en autoclave durante 20 minutos a 120 °C. Los cultivos se incubaron a 25°C ± 2°C, con un fotoperíodo de 16 horas (10 W/m²).

Se evaluaron las siguientes variables: longitud promedio del vástago, longitud promedio de raíces, número promedio de yemas, porcentaje de explantos enraizados. Las experiencias se diseñaron en bloques completos al azar (DBCA), se aplicó el test de Tuckey para el análisis de la diferencia entre medias de tratamientos.

En el 60% de los tratamientos ensayados, para orégano y yerba señorita, se obtuvieron plántulas deseables.

RESULTADOS

En cedrón, té de burro y poleo, solo el 10 % de los tratamientos promovió el desarrollo de plántulas, en el 90% restante se observó a lo largo de todo el cultivo, una oxidación permanente, la que no pudo evitarse, con el agregado de carbón activado ni repiques continuos.

Es posible lograr una propagación clonal vía cultivo *in vitro* de *Lippia alba* (Mill.) Britton (yerba señorita) y *Origanum vulgare* L. (orégano) y esta técnica puede ser utilizada en programas de mejoramiento. En *Aloysia citriodora* P. (cedrón), *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (té de burro) y *Lippia turbinatia* (Griseb.) (poleo) se deben ajustar las condiciones para hacer eficiente esta metodología.

3-09 Desarrollo de técnicas biotecnológicas para la conservación de híbridos de papaya (*Carica papaya* L.).

Leyanis García Aguila, Laisyn Posada Pérez, Rafael Gómez Kosky, Elisa Quiala Mendoza, Blanca Pérez, Yudit Martínez y Zoe Sarria.

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: germop@ibp.edu.cu

Palabras claves: conservación, híbridos, papaya, reguladores osmóticos, bajas temperaturas.

INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos constituyen la suma de todas las combinaciones de genes producidas durante el proceso evolutivo de una especie. Comprenden desde las especies silvestres de uso agrícola hasta genes clonados (Anónimo, 1998).

Los recursos fitogenéticos de *Carica papaya* han sido conservados tradicionalmente a través del almacenaje de semillas certificadas, siendo esta además su principal vía de propagación. Por tanto los productos resultantes de los trabajos de mejoramiento genético son vulnerables a la conservación tradicional y resulta necesario establecer alternativas para la conservación de híbridos o nuevas variedades, los cuales deben propagarse vegetativamente.

El desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* ha permitido el establecimiento de nuevos métodos de propagación y con ellos nuevas alternativas para la conservación *ex situ* del germoplasma. El empleo del método de crecimiento mínimo y las técnicas de criopreservación son dos de las estrategias que garantizan la conservación durante períodos medianos y prolongados de tiempo, siendo factible su empleo en especies de propagación vegetativa y semillas recalcitrantes.

Durante el desarrollo de la investigación se persiguió desarrollar el método del crecimiento mínimo en la conservación de híbridos de *Carica papaya*, por lo cual nos propusimos los siguientes objetivos: desarrollar condiciones de cultivo *in vitro*

que permitan conservar ápices de papaya, sin afectarse la supervivencia, a través del estudio de la temperatura de incubación y el empleo de reguladores osmóticos en los medios de cultivos, así como lograr la recuperación del material conservado y su incorporación a la propagación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas y Procedimientos generales

Los ensayos se realizaron con ápices de plantas procedentes de embriones somáticos cultivados *in vitro* y correspondientes a la variedad Maradol Rojo. Los ápices, de 0.5 cm de longitud, contenían la yema apical, una axilar y estaban libres de hojas. Las plantas fueron desarrolladas en medio de cultivo de multiplicación (MM) compuesto por las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), 0.22 mg/L de 6 bencilaminopurina (6-BAP), 0.11 mg/L de kinetina, 1 mg/L de tiamina, 0.66 mg/L de vitamina B 2 y 30 g/L de sacarosa.

Como medio de cultivo basal (MB) para la conservación se utilizó la formulación MS (1962), con 30 g/L de sacarosa, vitamina B 12 y sin la presencia de los reguladores del crecimiento.

Encapsulación de los ápices para la conservación

Durante la realización del ensayo se procedió a la encapsulación de los ápices, utilizando 4 % de alginato de sodio go-teado por un tiempo de 20 minutos en Cloruro de Calcio (CaCl_2), quedando con-

formadas cápsulas de 0.7 mm de diámetro. La composición química de las mismas, incluía el medio basal y reguladores osmóticos como el manitol y el sorbitol en dosis de 0, 5, 10, 20 y 30 g/L, respectivamente. Las cápsulas fueron colocadas en placas de Petri estériles y almacenadas a temperaturas de 15, 18 y 26 °C.

Las evaluaciones se efectuaron cada 30 días, teniendo en cuenta el porcentaje de brotación y el período de conservación (meses). Posterior a la conservación, los ápices fueron transferidos a medio de multiplicación con el objetivo de evaluar el porcentaje de supervivencia y su recuperación en las condiciones normales de crecimiento, a través del análisis del peso fresco y el número de brotes por plantas alcanzado por los mismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La conservación de los ápices de papaya *in vitro* fue posible combinando dosis elevadas de reguladores osmóticos (manitol o sorbitol) y temperatura de incubación de 15 °C.

Durante el desarrollo del ensayo y a partir de los dos meses se observó crecimiento en los ápices y ruptura de la cápsula en los diferentes tratamientos. Los tratamientos que contenían el manitol como regulador osmótico, presentaron los máximos porcentajes de brotación, en las cápsulas almacenadas a 26 °C, independientemente de la dosis utilizada. Sin embargo, los conservados en 15 °C mostraron porcentajes menores de brotación, existiendo la tendencia a disminuir en la medida que se incrementan las dosis del regulador osmótico. Cuando se utilizó el sorbitol, la brotación de los ápices fue reprimida con la dosis de 30 g/L, independientemente de la temperatura a la cual se encontraban incubados.

El menor período de conservación fue de cuatro meses y se obtuvo en los ápices conservados a 26 °C de temperatura, en los cuales se observó clorosis y alta mortalidad. Sin embargo, el mayor período de conservación fue de doce meses y se alcanzó en los ápices conservados a 15 y 18 °C.

Roca (1994) señala el deterioro irreversible

de explantes de papa a los seis meses de conservación en 24 °C, sin embargo a temperaturas de 8 y 10 °C el crecimiento fue lento y se mantuvo alta la viabilidad.

Los máximos valores de supervivencia, de los ápices almacenados a 15 °C, correspondieron a los tratamientos que contenían 30 g/L de los diferentes reguladores osmóticos. Suksa et al (1997) señala un efecto perjudicial del manitol en la conservación de ápices de papaya, por la succulencia proporcionada al material vegetal, este comportamiento no se presenta en este trabajo.

El comportamiento de los mismos después del subcultivo a medio de multiplicación resultó satisfactorio al compararse con ápices sin el estado de conservación. El peso fresco de las plantas después del de la primera transferencia presentó valores en correspondencia con el testigo; pero el número de brotes de las plantas conservadas resultó significativamente superior en los tratamientos que contenían dosis elevadas de reguladores osmóticos. Este comportamiento pudo estar dado por la acumulación, en los tejidos, de aminoácidos como la prolina, el cual proporciona la recuperación rápida de las plantas después que cesa el estrés proporcionado.

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo., 1998. Conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Módulo 4. Copyright IPGRI, Versión 1.1; 16.11: 2-25.
- Murashige, T. y F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473 – 497.
- Roca, W. M., R. Escobar y G. Mafla, 1994. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. 8-12.
- Suksa, P.A., Kataoka, I., Fujime, Y y S. Subhadrabandhu, 1997. Effect of Temperature, growth retardants and osmotic potential on Growth of Papaya Shoots Conserved *in vitro*. *Tropical Agriculture* 41, 1: 7-13.

3-10 Influencia de las vitaminas en la tasa de multiplicación del ñame (*Dioscorea alata* L.)

Gastón F. Saborit V.¹, Gerardo de la Cruz L.², Silvio Meneses R.³, Jorge A. Estrada¹, Zucel Infante¹, Aida García¹, Milvia Fonseca¹ y Aracelis Rodríguez¹.

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov" GP 2140, Bayamo 85 100, Granma Cuba. e-mail: dimitrov@granma.inf.cu

² Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Santiago de Cuba. Cuba.

³ Universidad de Granma, Cuba.

Palabras claves: ñame, vitaminas, cultivo in vitro.

INTRODUCCIÓN

Krikorian (1991) expone que todos los medios parecen beneficiarse en cierto grado con los suplementos vitamínicos, a menos que las células se vuelvan verdes o hasta que ello ocurra; los aditivos mínimos usuales son la tiamina, el ácido nicotínico y la piridoxina. En el presente trabajo, se estudió la influencia de las vitaminas en la tasa de multiplicación del ñame (*Dioscorea alata* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron vitroplantas provenientes de condiciones asépticas, con tres subcultivos en el medio a experimentar. Se empleó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2⁶, replicado un cuarto en bloques de cuatro unidades, donde los niveles fueron ausencia o presencia de las vitaminas. La unidad muestra fue de 96 vitroplantas por tratamiento. Se realizó un análisis de regresión paso a paso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La regresión lineal múltiple obtenida para la tasa de multiplicación, ajustó significativamente ($P < 0.05$) a la siguiente ecuación:

$$Y = 2.59 \pm 0.04 + 0.20 \pm 0.05X_2 + 0.18 \pm 0.05X_3 - 0.20 \pm 0.05X_1X_2 + 0.41 \pm 0.06X_2X_3X_4 - 0.42 \pm 0.07X_2X_3 - 0.44 \pm 0.07X_2X_4 + 0.93 \pm 0.10X_2X_3X_4 - 0.68 \pm X_1X_3X_4$$

$$(r = 0.99; R^2 = 0.98).$$

Cuando se realizó el análisis de la regresión lineal múltiple, para la tasa de multiplicación se observó que los mayores coeficientes estaban dados por la combinación de los reactivos ácido nicotínico, piridoxina y mioinositol ($X_2X_3X_4$), así como la combinación tiamina y mioinositol (X_1X_4). También se pudo observar que las combinaciones de tiamina, piridoxina y mioinositol ($X_1X_3X_4$); ácido nicotínico y piridoxina (X_2X_3); tiamina y ácido nicotínico (X_1X_2) y ácido nicotínico y mioinositol (X_2X_4), fueron inhibitorios de la tasa de multiplicación y que la combinación de dos o más reactivos influyeron más en la misma; o sea por estímulo o inhibición, que un reactivo solo, independientemente a que el ácido nicotínico (X_2) y la piridoxina (X_3) pueden ser utilizadas solas.

3-11 Cultivo *in vitro* del pimiento *Capsicum annuum* cv. 'Verano 1'.

Arlene Rodríguez Manzano, Amelia Capote Rodríguez y Dayamí Pérez.

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Ciudad Habana, CUBA. E-mail: inifat@ceniai.inf.cu

Palabras claves: pimiento, cultivo *in vitro*, desinfección, callos.

INTRODUCCIÓN

El pimiento *Capsicum annuum* constituye la segunda hortaliza de mayor importancia para Cuba, debido a su gran demanda tanto para el consumo fresco como para el uso industrial.

En el INIFAT existen variedades promisorias donde es importante la obtención de semilla original para su extensión y generalización, sin embargo esta puede verse afectada en muchas ocasiones por el área disponible para la siembra, ya que al ser plantas autógamas facultativas las posibilidades de cruzamientos entre las variedades son altas, por lo que se limita el desarrollo acelerado de los programas de mejoramiento genético a la par de la producción de semilla.

Por otra parte, la aplicación de las técnicas de biotecnología en el mejoramiento de esta especie está muy limitada por la baja capacidad de regeneración que muestran sus células y tejidos cultivados *in vitro*. Es por eso que el objetivo del presente trabajo fue estudiar el comportamiento *in vitro* del pimiento cv. 'Verano 1', para su posible propagación y obtención de semilla de alta calidad por vías biotecnológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La desinfección de las semillas de pimiento cv. 'Verano 1' se realizó en condiciones estériles con un tratamiento de alcohol durante 2 minutos y posteriormente con bicloruro de mercurio durante 5', 10' y 15'.

Las plántulas se desarrollaron en medio de germinación Knop, en condiciones controladas y a las cuatro o cinco semanas, los ápices y nudos fueron segmentados y cultivados en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con diferentes concentraciones en forma combinada e independiente, de 6 bencil amino purina (BAP), ácido indol acético (AIA) y ácido indol butírico (IBA). Además se estudió el efecto de la adición de la urea combinada con las auxinas.

A los 30 días de cultivo se determinó el porcentaje de callos y raíces y se evaluaron las variables: índice de multiplicación, altura de las plantas y número de nudos por tratamiento. Estos datos se sometieron a un análisis de varianza con un diseño completamente aleatorizado con 12 repeticiones y las diferencias significativas fueron detectadas por una prueba de Duncan 5%.

Con el objetivo de estimular la regeneración directa de plantas a partir de las hojas, estas se colocaron en el medio MS modificado suplementado con BAP y AIA en las proporciones: 1:1, 1:1.6 y 1:2.5. La capacidad morfogénica de los explantes fue evaluada a los 2 meses de cultivo, analizándose para ello el porcentaje de callos, brotes y el número de brotes mediante una escala cualitativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró la desinfección de las semillas con todos los tratamientos estudiados, por lo que se recomienda el uso del menor tiempo de exposición en bicloruro de mercurio.

Los resultados obtenidos mostraron que los mayores porcentajes de formación de callos se obtuvieron en los medios suplementados con diferentes concentraciones de BAP, cuando se combinó con AIA (0.5 y 0.5 mg/L de AIA), y cuando se utilizaron estas concentraciones de AIA de forma independiente, aspecto negativo cuando se desea obtener la propagación del material vegetal. Sin embargo a concentraciones más bajas de AIA (0.1 mg/L) no se estimuló la formación de callos.

La mejor respuesta en la propagación se obtuvo en los medios MS suplementados con IBA (3mg/L) más Urea (10 mg/L) con un promedio de 3.25 nudos/explante y un índice de multiplicación (IM) de 2.42. Además también se logró la formación de raíces y la adaptación de las vitroplantas a condiciones controladas en bandejas con materia orgánica y suelo (50% c/u). Este

medio no tuvo diferencias significativas en el IM con los medios que se les adicionó 5 mg/L de AIA y 5 mg/L de urea, ni con 1 mg/L de AIA y 10 mg/L de urea.

Los ápices mostraron diferencias significativas en el alargamiento de los brotes y en el IM en comparación con los nudos, por lo que se requieren trabajos más profundos en la interacción tipo de explante con diferentes medios de cultivo para lograr mejores resultados.

En la regeneración directa de primordios a partir de hojas se obtuvieron diferencias en los tres medios de cultivo analizados, obteniendo el mayor número de brotes en el medio MS con la proporción de 1:2.5 (BAP/AIA) entre ellos. El medio con la proporción 1:1 estimuló la formación de callos.

CONCLUSIONES

- El mejor medio de cultivo para la propagación de los nudos y ápices fue el MS suplementado con 3mg/L de IBA más 10 mg/L de Urea.
- Se encontraron diferencias significativas en la propagación entre los ápices y nudos.
- El BAP combinado con el AIA tuvo un efecto negativo en la propagación del cultivar 'Verano 1'.
- Se logró la mayor regeneración directa de primordios a partir de hojas en los medios MS modificado y suplementado con BAP y AIA (1:2.5).

3-12 Influencia del campo electromagnético y el tipo de explante en la callogénesis de *Dioscorea alata* L.

Ana María Botta Gómez, Gerardo de la Cruz Licea, Yilán Fung Boix, Albys Esther Ferrer Dubois, Yaquelin Terrero Lores, Sandra Cots Vicente, Irina Novoa Colás, Elizabeth Isaac Alemán.

Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado - Universidad de Oriente, Avenida Las Américas s/n. GP 4830, Teléfono (0226) – 43721. Santiago de Cuba. Cuba. E-mail: irina@cnea.uo.edu.cu

Palabras claves: callos, campo electromagnético, ñame.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de determinar el efecto de la acción del campo electromagnético de frecuencia e inducción bajas y el mejor tipo de explante en la callogénesis de *Dioscorea alata* L., se realiza el cultivo *in vitro* de esta especie a partir de 40 explantes de tallos y 40 explantes de hojas procedentes de vitropiantas. Para la formación y mantenimiento de los callos se utilizó un medio de cultivo basal constituido por macronutrientes D-567 (de la Cruz, 1992), micronutrientes semiconcentrados Murashige y Skoog (1962), vitaminas Murashige y Tucker (1969), Fe-EDTA, 20 mg/L de cisteína, 4.5 mM de 2,4 - D, sacarosa al 3 % y agar al 0.8 %; el pH se ajustó a 5.8. A las 24 horas de realizarse la siembra, 20 frascos con hojas y 20 frascos con tallos se sometieron a la acción de un campo electromagnético con un nivel de inducción de 40 G, frecuencia 60 Hz y onda trapezoidal. La aplicación electromagnética se efectuó de forma crónica (una hora semanal), con un estimulador electromagnético regional para cultivos *in vitro* BioNaK – 03 diseñado y construido en el CNEA. (Domínguez et al., en proceso editorial). A la cuarta semana se evaluó la variable masa fresca de los callos (g). Para el procesamiento estadístico se realizó un ANOVA de clasificación doble y una prueba aproximada de Welch para igualdad de medias de dos muestras independientes con varianzas desiguales (Sigarroa, 1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar los resultados, se pudo apreciar que los mayores valores de masa fresca (g) se obtuvieron partiendo de explantes de hoja ($P < 0.001$); también se observó un efecto marcadamente positivo del campo electromagnético, tanto en hojas como en tallos se observaron diferencias altamente significativas ($P < 0.001$).

La exposición de células vegetales a campos electromagnéticos puede tener una marcada influencia positiva sobre las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

- A. Millan; G. Saborit; N. Aguilera; A. de la Cruz, G.; M. Labrada; O. Rodríguez; García; Z. Infante; E. Morán; A.M. Botta y M. Fabars., 1992. Metodología para la micropropagación del ñame.
- Murashige, T. y F. Skoog., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 : 473 - 497.
- Murashige, T. y D.P.H. Tucker., 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. pp. 1155 - 1161 in Chapman H.D. (ed.) *Proc. 1st Int. Citrus Symp. Vol. 3.* Univ. Calif., Riverside Publication.
- Sigarroa, A., 1985. *Biometría y Diseño Experimental*, Tomo II. Editorial Pueblo y Educación. Ciudad de La Habana.

3-13 Influencia de la relación N:P:K en el coeficiente de multiplicación para el establecimiento *in vitro* de yemas de boniato (*Ipomea batatas* (L) Lam).

J. Estrada¹; G. Saborit¹; A. Espinosa²; A. Millán³; A. García¹; M. Fonseca⁴; Z. Infante¹ y E. Montero⁴.

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", GP 2140, Bayamo 85100, Granma, Cuba. E-mail: dimitrov@granma.inf.cu

²Universidad de Granma.

³Delegación CITMA, Granma.

⁴Instituto Superior Pedagógico "Blas Roca Calderío", Granma.

Palabras claves: boniato, macronutrientes, fase de establecimiento, cultivo *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

El 80% de los trabajos de cultivo *in vitro* del boniato se han realizado a partir del medio basal de Murashige y Skoog (1962), sin un estudio preliminar de la influencia de la relación de los elementos macronutrientes. El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de la relación N:P:K en el establecimiento *in vitro* de yemas de boniato (*Ipomea batatas* (L). Lam).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron yemas de boniato del clon Jewel, proveniente de macetas bajo condiciones naturales. Las condiciones de cultivo fueron: iluminación natural ($36\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), humedad relativa 80% y temperatura 24 ± 2 °C. Se montó en un diseño completamente aleatorizado con arreglo trifactorial y 24 explantes por tratamiento. Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el análisis de varianza de clasificación triple para contrastes ortogonales establecidos a priori (Oestle, 1974). Los tratamientos consistieron en diferentes concentraciones iónicas de los elementos macronutrientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestra la comparación entre los contrastes seleccionados, donde se aprecia que no existió diferencias significativas en los medios con diferentes niveles de nitrógeno

(Contraste C₁), sin embargo con independencia al nivel de nitrógeno, siempre que el potasio mostró niveles bajos, se obtuvo un mayor coeficiente de multiplicación ($p < 0,001$, contraste C₃). El análisis del fósforo en los medios con bajos niveles de este elemento evidenció mejores resultados en presencia de nitrógeno alto y con independencia de las concentraciones del potasio, con un mayor coeficiente de multiplicación ($p < 0,001$, contraste C₅), lo contrario ocurrió con una concentración baja de nitrógeno, donde los coeficientes de multiplicación aumentaron en los medios con altos niveles de fósforo con independencia a la concentración de potasio sin diferencias significativas entre ellos. La evaluación integral de los contrastes establecidos mostró mayores coeficientes de multiplicación en el

establecimiento de yemas de boniato con las relaciones 30: 1: 10 y 10: 3: 10 (tabla 2).

Las medias obtenidas por tratamientos para la variable analizada se compararon con el medio de Murashige y Skoog (1962), donde se determinó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos 2 y 3, correspondientes a las relaciones planteadas anteriormente, sin embargo se observaron plantas más vigorosas, pigmentadas y en muchos casos enraizadas en el tratamiento 30: 1: 10. Si valoramos que la variable más

importante para determinar el número de plantas que se alcanzará por progresión geométrica es el coeficiente de multiplicación, la utilización de este tratamiento nos permite obtener resultados alentadores en el establecimiento *in vitro* de yemas de boniato. Resultados similares se han reportado por Saborit et al., (1997) en el cultivo del ñame, así como en la papa, lo cual indica que para las plantas que se propagan por tubérculos en condiciones normales, al propagarse *in vitro*, la relación óptima de elementos macronutrientes N: P: K es de 30: 1: 10.

Tabla 1. Análisis comparativo entre los contrastes seleccionados.

Contraste	Niveles	Coeficiente de multiplicación	Significación
C ₁	N _{bajo} vs N _{alto}	2.50 vs 2.72	NS
C ₂	K _{bajo} vs K _{alto} (N _{alto})	3.11 vs 2.34	NS
C ₃	K _{bajo} vs K _{alto} (N _{bajo})	3.50 vs 1.45	***
C ₄	P _{bajo} vs P _{alto} (N _{alto} , K _{alto})	2.50 vs 2.17	NS
C ₅	P _{bajo} vs P _{alto} (N _{alto} , K _{bajo})	4.62 vs 1.60	***
C ₆	P _{bajo} vs P _{alto} (N _{bajo} , K _{alto})	1.40 vs 1.50	NS
C ₇	P _{bajo} vs P _{alto} (N _{bajo} , K _{bajo})	3.00 vs 4.11	NS
	ES _x	0.17	

*** : p < 0.001 ; NS: No significativo.

BIBLIOGRAFÍA

- Murashige, T y F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and biassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum*, 15: 473-495.
- Ostle, B., 1980. Estadística Aplicada, 62 pp. Editorial Científico-Técnica, Cuba.
- Saborit, G. J. Estrada y G. de la Cruz, 1997. Influencia de la relación N:P:K en la micropropagación de la papa (*Solanum tuberosum* L., var Desiree). *Revista Agricultura*, Año 8, no. 47: 34-36, julio-agosto, 1997.

3-14 Aplicación de la Biotecnología en la conservación de los recursos fitogenéticos de caña de azúcar (*Saccharum spp.* Híbrido).

Leyanis García Aguila, Mayelin Rodríguez Urquiza, Yudith Martínez, Blanca Pérez, Zoe Sarria y Tatiana Pichardo.

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: germop@ibp.edu.cu

Palabras Claves: conservación, caña de azúcar, reguladores osmóticos, bajas temperaturas.

INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos permiten desarrollar cultivos productivos, resistentes y de calidad. Ayudan a las naciones a incrementar la productividad y sostenibilidad de su agricultura e incluso a desarrollarse (Anónimo, 1998).

Los recursos fitogenéticos de caña de azúcar constituyen la base del desarrollo de los programas de mejoramiento genético y de producción de semilla.

El Banco de germoplasma en Cuba cuenta con 2 575 formas que incluye especies originales, híbridos nacionales o extranjeros y géneros afines. Esta cifra aumenta sistemáticamente, a partir de las nuevas variedades destacadas que surgen del programa de mejora y del intercambio con otros países. A pesar de los esfuerzos por su conservación, de la colección han desaparecido decenas de genotipos y esto ha sido un problema también en otros países (Pérez, 1997).

El desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* permite el establecimiento de dos estrategias de conservación: el empleo del crecimiento mínimo y con ello se garantiza la conservación a mediano plazo (8 a 12 meses) y la paralización total del crecimiento la cual solo es factible aplicando las técnicas de criopreservación, que garantiza la conservación por períodos de tiempos prolongados.

Durante el desarrollo de la investigación se pretende ampliar los conocimientos sobre la utilización de los métodos biotecnológicos de conservación y su utilización práctica en el mantenimiento de los recursos fitogenéticos de caña de azúcar.

Para lo cual se proponen los siguientes objetivos: desarrollar medios y técnicas del cultivo *in vitro* que permitan retardar el crecimiento de los explantes de caña de azúcar prolongando los períodos de subcultivos a medio fresco y evaluar la recuperación, a través de la tecnología de micropropagación, en el material conservado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas y procedimientos generales.

Las muestras correspondieron a la zona apical o spindle de la variedad IBP 87-100 y la desinfección superficial se efectuó con etanol al 70% durante dos minutos e hipoclorito de sodio al 2% por 15 minutos. La disección de los tejidos y las transferencias a medio de cultivo fresco se efectuaron bajo condiciones asépticas en cámara de flujo laminar.

Las líneas diagnosticadas como negativas a microorganismos fitopatógenos fueron testadas a contaminantes bacterianos que afectan los procesos *in vitro*, a través de la siembra de fragmentos de tejido veg-

etal en medios de cultivo bacteriológicos (Leifert, et al., 1994). Los explantes de las líneas negativas constituyeron el material de partida en los estudios de conservación, seleccionando plantas de 1.5 a 2 cm de altura.

Evaluación del efecto de dos formulaciones de sales en los medios de cultivo para retardar el crecimiento.

Con el objetivo de retardar el crecimiento de los explantes se estudiaron dos formulaciones de sales minerales, las propuestas por Murashige y Skoog (1962) y las sales propuestas por White (1963), en ambas se evaluaron diferentes concentraciones con respecto al 100 % o total de las mismas.

- Concentraciones minerales estudiadas.

Sales MS en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%.

Sales White en concentraciones de 75%, 100% y 125%.

Las diferentes variantes estudiadas contenían 30 g/L de sacarosa y carecían de reguladores del crecimiento. Después de la siembra se incubaron a $18 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura en cámara climatizada, bajo fotoperíodo de 16 horas luz e intensidad luminosa de 3500 a 4000 lux y a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura en cámara de luz natural. Se consideró como réplica 25 plantas por variante, evaluando el estado fisiológico, la supervivencia y el período de conservación.

Influencia de las bajas temperaturas y la adición de reguladores osmóticos a los medios de cultivo en el retardo del crecimiento.

Teniendo en cuenta los resultados del experimento anterior se estudia la incidencia de las temperaturas menores de 18°C en el retardo del crecimiento, evaluando el comportamiento de los explantes a 12 y $15 \pm 2^\circ\text{C}$, respectivamente. La formulación mineral

utilizada en los medios de cultivo fue la MS y se suplementó con diferentes niveles de manitol (0; 10; 20; 30 mg/L), con el objetivo de incrementar el nivel osmótico de los medios de cultivo.

Evaluación de la recuperación del ritmo de crecimiento de los explantes conservados.

En los tratamientos donde se alcanzaron los máximos períodos de conservación fue necesario evaluar la recuperación del material conservado, transfiriéndolos a medio de cultivo solidificado de multiplicación propuesto por Jiménez (1995). Después de los 21 días se procedió a evaluar el comportamiento de los explantes conservados, a través del análisis del coeficiente de multiplicación, la supervivencia y la presencia de variaciones morfológicas propias de los cultivos *in vitro* de caña de azúcar, como son las plantas con crecimiento en rosetas y variegadas. Los explantes recuperados se transfirieron a medio de cultivo líquido suplementado con 1.3 mg/L de AIA, evaluándose después de 15 días el porcentaje de plantas enraizadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del efecto de dos formulaciones de sales en los medios de cultivo para retardar el crecimiento.

Los explantes de caña de azúcar conservados bajo la formulación de sales propuesta por Murashige y Skoog (1962) alcanzaron mayor longevidad y período de conservación que los almacenados en la formulación propuesta por White (1963). La utilización de las sales MS en la conservación de germoplasma ha sido reportada por varios autores en diferentes especies, como papa, yuca, caña de azúcar y papaya. (Roca, 1987; Taylor, 1993; Suka et al., 1997; Toledo et al., 1998 y Pinto de Lemos, 1998).

El comportamiento negativo, en la conservación, de los explantes bajo la formulación de sales White, pudiera estar

dado por los bajos niveles de nitrógeno que presenta, incrementándose la mortalidad a partir de los 2 meses de almacenaje y presentando el 70.7 % de los explantes en mal estado fisiológico. Roca (1994) refiere un efecto perjudicial en el cultivo *in vitro* de la yuca, niveles de nitrógeno por debajo de 10 mM.

La temperatura de incubación resultó determinante en la prolongación de los períodos de conservación, independientemente de las concentraciones minerales estudiadas, en los tratamientos que contenían las sales MS. Los tratamientos donde se combinaron estas sales con la temperatura de 18 °C se alcanzaron los máximos períodos de conservación, sin diferencias estadísticas en el porcentaje de supervivencia. Taylor (1993) reporta la utilización de 18 °C de temperatura en el mantenimiento *in vitro* de caña de azúcar por un período de 8 meses. Mientras que Pinto de Lemo (1998) recomienda la temperatura de 27 °C para la conservación, de esta especie en medios líquidos.

Influencia de las bajas temperaturas y la adición de reguladores osmóticos a los medios de cultivo en el retardo del crecimiento

La supervivencia de los explantes se afectó cuando se incubaron a 12 °C de temperatura, ocurriendo la mortalidad total después de los seis meses de almacenaje. Considerando por tanto, que el grado de susceptibilidad de los explantes de caña de azúcar a las bajas temperaturas se encuentra por debajo de los 12 °C

.Los mayores períodos de conservación se alcanzaron en las variantes conservadas a 15° C de temperatura (doce meses), mientras que los incubados a 18 °C lograron los máximos valores de supervivencia a los seis meses y a partir de los ocho meses se incrementó considerablemente la mortalidad. Este deterioro estuvo dado por mantenerse un alto ritmo de crecimiento durante el

período de almacenaje, alcanzando hasta 6 cm de altura.

Durante la conservación de los explantes de caña de azúcar a 15°C de temperatura se observó, a los 12 meses, un retardo significativo del crecimiento cuando se utilizó la menor concentración de sales, correspondiente al 25 %. Este resultado corrobora lo planteado por varios autores, los cuales afirman que la disminución del contenido mineral en los medios de cultivos favorece el retardo del crecimiento debido a las alteraciones que ocurren en el metabolismo celular.

La presencia de brotes resultó una característica distintiva en cada uno de los tratamientos, de forma general, se observó un estímulo significativo en la inducción de brotes axilares en los tratamientos que contenían las diferentes dosis de manitol, independientemente de la concentración de sales minerales del medio de cultivo. Este regulador osmótico proporcionó a los explantes almacenados a 15 °C de temperatura una relación inversa entre la altura y el número de brotes, permitiendo alcanzar longevidad. Pinto de Lemos (1998) refiere la presencia de brotes axilares en explantes de caña de azúcar a los seis meses de conservados, utilizando el total de las sales MS.

Los resultados alcanzados durante el desarrollo de la investigación le confieren a las condiciones de crecimiento en temperatura de 15 °C la posibilidad de almacenar por un período de 12 meses los explantes de caña de azúcar cultivados *in vitro* de la variedad IBP 87-100. La eficiencia de la conservación se incrementó cuando la concentración mineral del medio de cultivo se redujo a $\frac{1}{4}$ o $\frac{1}{2}$ de su concentración total, alcanzando valores superiores al 80 % de supervivencia.

Evaluación de la recuperación del ritmo de crecimiento de los explantes conservados.

A causa del almacenaje se afectó el coeficiente de multiplicación de los explantes recuperando su ritmo de

crecimiento, de forma paulatina, con las sucesivas transferencias a medio de multiplicación

Durante las dos transferencias realizadas no se observó la presencia de variaciones morfológicas, como plantas con crecimiento en rosetas y variegadas. La respuesta de los explantes en medio de enraizamiento resultó satisfactoria, alcanzando los mejores porcentajes en los tratamientos carentes de manitol sin diferencias estadísticas con el testigo.

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo., 1998. Conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Módulo 4. Copyright IPGRI, Versión 1.1; 16.11: 2-25.
- Jiménez, E., 1995. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp* Híbrido). Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Facultad de ciencias Agropecuarias. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Cuba.
- Leifert, C., C.E. Morris y W.M. Waites, 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plant: reason for contamination *in vitro*. Critical Reviews in Plant Sciences 13:139- 183.
- Murashige, T. y F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473 – 497.
- Pérez, O.G., Bernal, L.N., Chinea, M.A., O'Reilly, L.J. y E.F. De Prada, 1997. Conservación del germoplasma. En: J.F. Valdes (Ed.). Recursos Genéticos de la caña de azúcar, pp 22-25.
- Pinto de Lemos, E.E. y M. Souza, 1998. *In vitro* conservation of sugar cane (*Saccharum spp.*). Universidade Federal de Alagoas, CECA, Brazil. En: Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 98. Junio/1-5. Palacio de Convenciones. Habana. Cuba.
- Roca, W. M., 1987. Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. En: EDITORES Cultivo de tejidos de la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT.
- Roca, W. M., R. Escobar y G. Mafla, 1994. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. 8-12.
- Srenivasan, T.V. y J. Srenivasan, 1985. *In vitro* sugarcane germplasm storage. Sugar Cane Jan/Feb: 1-2.
- Taylor, P.W.J. y S. Dukin, 1993. Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum ssp.* Hybrid germplasm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34: 217-222.
- Toledo, J. y A. Golmirzaie, 1998. Conservación *in vitro* de *Solanum spp* bajo condiciones de estrés osmótico y ambiental. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 98. Junio/1-5. Palacio de Convenciones. Habana. Cuba.
- White, P.R., 1963. The cultivation of animal and plant cell. Ronal Press, New York.

3-15 Establecimiento clonal *in vitro* de explantes procedentes de rebrotes de *Swietenia mahagoni* x *Swietenia macrophylla*. Inducción de callogénesis.

Lucia Maribel Medina y Rogelio Sotolongo Sospedra.

Laboratorio de Biotecnología de las Plantas. Universidad de Pinar del Río. Carretera a San Juan y Martínez. Km. 5 "El Vizcaíno". Pinar del Río 20100. Cuba. E-mail: bioplan@upr.edu.cu

Palabras claves: caoba, callogénesis

INTRODUCCIÓN

Las caobas son unas de las especies de madera valiosas más codiciadas en el mercado por su calidad y utilidad. Procedentes de Centroamérica se introdujo en Cuba la especie *S. macrophylla*, King; ésta introducción conllevó a la formación de un híbrido interespecífico cuando las dos especies (*S. macrophylla* y *S. mahagoni*) se encontraban próximas y con cierto grado de heterosis que ha demostrado poseer cualidades superiores a sus progenitores en cuanto a crecimiento, rendimiento y susceptibilidad al taladrador de brotes de las Meliaceas (Betancourt, 1987). El objetivo del presente trabajo consistió en el establecimiento de hojas procedentes de rebrotes de esta especie, el uso de un medio apropiado para lograr la callogénesis así como el estudio histológico de las masas celulares obtenidas como punto de partida para conocer la posibilidad de su diferenciación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de las Plantas de la Universidad de Pinar

del Río. Se usaron como explantes hojas provenientes de rebrotes de estacas de *Swietenia macrophylla*, King x *Swietenia mahagoni*, Jacq.

Experimento 1. Establecimiento de explantes.

Este experimento tuvo como objetivo establecer asépticamente los explantes, para ello se realizaron fumigaciones preventivas cada dos días a las estacas, esto permitió, disminuir los niveles de contaminación una vez establecidos los explantes. Para el establecimiento se utilizó un medio MS con el doble de los macronutrientes, como medio de base y se mostraron 2 tratamientos uno con carbón activado 1g/L y otro sin carbón activado ni caseína hidrolizada, se utilizó PVP como antioxidante en los medios de cultivos.

Experimento 2. Inducción de callogénesis.

Los explantes establecidos fueron transferidos a un medio MS y se desarrollaron soa tratamientos hormonales con 0,5mg/L de 2,4-D y 1mg/L de 2,4-D, respectivamente. Se usó PVP como antioxidante en el medio de cultivo.

Una vez logradas las masas celulares

se realizaron cortes histológicos para su estudio y determinación de tejidos embriogénicos.

RESULTADOS

Para el establecimiento de los explantes utilizados resultó que las variantes que incluyó las sales de MS con el doble de los macronutrientes, caseína hidrolizada 250mg/L, carbón activado 1g/L y el PVP como antioxidantes; fue la mejor. Se pudo apreciar que los explantes (hojas entre 16mm- 20mm de longitud) al cabo de 15 días aún conservaban su coloración verde tierno e incluso se produjo una activación del crecimiento de las hojas utilizadas, al parecer por la inclusión de caseína hidrolizada en el medio de cultivo ya que ésta influye positivamente en procesos de síntesis a nivel celular, otro constituyente del medio que favoreció el resultado es el carbón activado, el cual redujo los niveles de oxidación fenólica ya que es capaz de absorber estos compuestos que se liberan al medio de cultivo y que es una de las principales dificultades

para establecer el cultivo en especies forestales (Mier-Dinkel, 1993).

En la formación de callos resultó favorable la variante en que se usó 1mg/L de 2,4-D al parecer ésta concentración fue factible para activar la división celular y formar las masas celulares, obteniéndose callos a los cuales se le hicieron cortes histológicos para determinar la capacidad de diferenciación de las células, resultando éstas con características anatómicas favorables que hacen factible la posibilidad de regenerar plantas a partir de estos callos formados.

BIBLIOGRAFÍA

- Betancourt, B.A., 1987. Silvicultura Especial de Árboles Maderables Tropicales. Editorial Científico-Técnica. Ciudad de la Habana. 432p.
- Mier-Dinkel, A.; Becker, D.B., 1993. Micropropagation and *ex vitro* rooting of several clones of late-flushing *Quercus robur* Lin. En: Annales des sciences forestieres.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y SEMILLA ARTIFICIAL.

4-01 Influencia de diferentes factores en Embriogénesis somática de *Coffea canephora* P.

María Esther González¹, Nancy Santana², M. Ferrer¹ y Mireya Cabrera¹

¹ Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao, Finca La Mandarina, Cruce de los Baños, Santiago de Cuba. CP 92700. CUBA. E-mail: iagl@ecicc.ciges.inf.cu

² Instituto nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Carretera San José-Tapaste Km. 3 1/2. Gaveta Postal 1. San José de las Lajas, La Habana. E-mail: inca@ceniai.inf.cu

Palabras claves: embriogénesis somática, café, influencia del genotipo, callos.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de cultivo de tejidos y dentro de ellas, la embriogénesis somática, constituyen una herramienta versátil para el estudio de problemas básicos y aplicados de la biología de plantas y ofrecen aplicaciones prácticas como la multiplicación masiva de genotipos promisorios, considerando esta posibilidad y teniendo en cuenta la importancia para la práctica productiva de cuatro clones seleccionados de la variedad Robusta, especie *Coffea canephora* P. caracterizada por su alta potencialidad productiva que oscila entre 1.5 y 2 t/ha de café comercial, su rusticidad, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia al estrés hídrico, entre otras; se realizó el presente trabajo con el objetivo de evaluar la incidencia de diversos factores en el procesos de embriogénesis somática, tales como: efecto de la auxina Picloram en la inducción de la callogénesis, influencia del genotipo y de la época del año en que se tomaron las hojas sobre la inducción de callos embriogénicos de alta frecuencia de formación de embriones, además de la edad del callo y la densidad del inóculo inicial para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del trabajo se utilizaron explantes foliares procedentes de los clones C-R, M-229, K-234 y M-28 de plantaciones establecidas en campo, las colectas, desinfección y disección de las hojas se realizaron según la metodología propuesta por Santana (1983). Como medio de cultivo basal se utilizó el Murashige y Skoog (1962). Se estudiaron dosis de Picloram comprendidas entre 0.1 y 1 g/L con la finalidad de evaluar la factibilidad de sus usos en el medio de cultivo como agente inductor de la callogénesis a través de las variables peso fresco y niveles de proteínas totales (determinados por el método de Bradford (1976), se inocularon 15 explantes por tratamiento. Para el estudio del efecto del genotipo las hojas fuente de los explantes se colectaron en el mes de julio y fueron cultivadas sobre los medios de formación de callos MFC⁻¹ (0.5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP) y MFC⁻² (0.5 mg/L de Picloram y 2 mg/L⁻¹ de BAP). Para evaluar el efecto de la época del año las colectas se realizaron durante los meses de enero, marzo, abril, junio, julio, octubre, noviembre y diciembre a partir de los clones C-R y M-229, los explantes se inocularon en el medio MFC⁻², en ambos casos se utilizaron 15 explantes por tratamiento y se realizaron observaciones semanales hasta los 60 días de cultivo.

Para determinar la densidad óptima de inóculo inicial se utilizaron callos de 28 y 35 días de edad de los cuatro clones estudiados. Las siembras en medio sólido se incubaron a la oscuridad bajo condiciones de temperatura de 28 °C y humedad relativa de 70-80%. Para el estudio en medio líquido se utilizaron erlenmeyers de 100 mL de capacidad, una vez inoculados se colocaron en zaranda orbital a 110 r.p.m., 27 °C de temperatura y fotoperíodo de 16 horas luz. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con arreglos bi y trifactorial. Los datos se procesaron estadísticamente realizándose un ANOVA y docimándose las medias según Duncan en caso de significación al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles de peso fresco obtenidos en cada uno de los tratamientos evaluados difirieron significativamente para las combinaciones hormonales estudiadas. La combinación hormonal 3 que contenía 2mg/L⁻¹ de BAP y 0.5 mg/L⁻¹ de Picloram fue la de mejor resultado con un valor de 1.5 g de peso fresco del callo en el clon M-229, seguido por este mismo tratamiento para el clon C-R (1.40 g). Los menores valores correspondieron a las combinaciones 5 y 7 (0.1 y 1.0 mg/L de Picloram). Se pudo observar que la incorporación del Picloram en el medio de cultivo favoreció notablemente la formación del callo embriogénico de alta frecuencia, sin embargo el comportamiento de los clones sobre cada medio evaluado (MFC⁻¹ y MFC⁻²) difirió significativamente, siendo el clon M-229 el que mayor capacidad de formación de callos expresó en ambos medios (89 y 98.7%, respectivamente). En cuanto a la época del año en que fue tomado el explante, pudo observarse variación en los dos clones en estudio desde 59 a 99% para el clon C-R obteniéndose los mejores resultados con explantes colectados en abril y junio y para el clon M.229 valores entre 61 y 99% durante los meses abril, junio y julio, esto coin-

cide con el período de floración y fructificación temprana de los materiales evaluados lo cual pudiera atribuirse a la presencia de hormonas endógenas y otros compuestos en concentraciones favorables debido a la movilización interna de nutrientes que tiene lugar en la planta.

Los clones M-229 y K-234 mostraron una mayor concentración de células en las suspensiones celulares difiriendo el resto de los materiales y aunque no hubo diferencia significativas entre estos dos clones es bueno destacar que no se alcanzó la mayor concentración de células en el mismo momento de desarrollo del callo.

Las densidades del inóculo inicial comprendidas entre 0.5 y 1.0 g MFL⁻¹ resultaron las más efectivas para la multiplicación y producción de células embriogénicas en medio líquido.

BIBLIOGRAFÍA

- Berthouly, M y N.M Michaux-Ferrieri., 1996. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell Tissue and Org. Culture*, 44, 169-176.
- Curvetto, N, J. Desh y P. Marinangeli., 1998. Inducción de callos y regeneración en *Lilium longiflorum*. En: Libro de Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología vegetal, REDBIO 98, La Habana 1-5 Junio de 1998. 516 P.

4-02 Análisis morfométrico de la embriogénesis somática en *Coffea canephora* P. var Robusta.

Marcelo Cevallos V¹., Silvia Montes ² y Esperanza Niubó³

¹Universidad Agraria de la Habana, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba. E-mail: marcelo@main.isch.edu.cu

²Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba

³Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba.

Palabras claves: café, embriogénesis somática, análisis morfométrico.

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática de plantas consiste en la obtención de embriones somáticos a partir de una célula o un grupo de células, esta vía de regeneración en la actualidad se ha logrado inducir en unas 140 especies procedentes de 86 géneros y 34 familias (Luskse et al., 1997).

En el café varios trabajos describen la obtención de embriones somáticos a partir de la inducción de callos embriogénicos formados de segmentos de hojas (Van Bostel y Berthouly, 1996). Esta vía de regeneración todavía no está totalmente dilucidada y aún faltan por dilucidar algunos eventos morfológicos, bioquímicos y moleculares (Menéndez et al., 1994). Una de las etapas más cruciales en el proceso embriogénico es la sincronización de poblaciones embriogénicas homogéneas, así como la búsqueda de marcadores tempranos relacionados con el potencial embriogénico que permitan predecir la formación de los embriones somáticos antes que estén presentes, especialmente al inicio del cultivo donde el número de las células embriogénicas es pequeño y deben ser seleccionadas para obtener frecuencias de regeneración adecuadas (Sterk y De Vries, 1993). Es por ello que resulta indispensable el estudio morfométrico del proceso morfogenético., nuestro trabajo por lo tanto se propuso analizar

morfométricamente la embriogénesis somática de *C. canephora* var. Robusta, mediante el empleo de un sistema para el procesamiento digital y análisis morfométrico de imágenes IMAGCELL (Vinarde et al., 1995).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los embriones somáticos fueron obtenidos a partir de suspensiones celulares establecidas en un medio MS suplementado con Tiamina (4 mg/L), Inositol (100 mg/L), Cisteína (25 mg/L), Sacarosa (20 g/L), ANA (0.5 mM) y Kinetina (2.3 mM). Se cultivaron en erlenmeyers de 250 ml de capacidad con 70 ml de medio, los mismos fueron colocados en una zaranda orbital termostata a 110 r.p.m., $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y 16 h luz. El análisis morfométrico se realizó en cada estadio de desarrollo de los embriones somáticos (células, agregados, preglobulares, globulares, acorazonados, torpedos y cotiledonares) con el empleo del sistema IMAGCELL, evaluándose cinco variables: diámetro (variable 1), área (variable 2), perímetro (variable 3), talla (variable 4) y compacidad (variable 5). Con los valores obtenidos de las mediciones morfométricas de las cinco variables, se realizó un análisis factorial discriminante (Linares et al., 1986). Se utilizó el paquete estadístico STATISTICAL para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza evidenció diferencias significativas en la mayoría de los casos. Se encontró que en el estadio acoazonado no existían diferencias significativas para la variable 2 (área) y para la variable 4 (talla). Así como en el estadio células y globulares para la variable 5 (compacidad). El comportamiento de esta última variable en estos dos estadios (células y globulares) es lógico ya que la medida de la compacidad refleja la forma espacial que tienen estos y que mientras más se acerque al valor máximo de 1, el cuerpo tiende a ser una esfera, y por tanto las células embriogénicas y los embriones globulares toman casi esta forma, puesto que los valores medios están muy cercanos a 1.

El comportamiento de los valores medios del diámetro en las diferentes fases estudiadas fueron superiores a los encontrados por Cevallos (1995) cuando caracterizó la embriogénesis somática de *C. arabica* var. 9723 en estadios tempranos utilizando un sistema semiautomatizado para medición e interpretación de imágenes.

Los resultados del análisis factorial discriminante, para cada estadio se presentan en la Tabla 1a y b.

Para el estadio células, agregados, preglobulares, globulares, torpedos y cotiledonares las diferencias mayores estuvieron dadas para la talla (variable 4). En todos estos estadios se tomó el eje 1 por tener una contribución a la variabilidad superior al 68%.

En la revisión bibliográfica no se han encontrado trabajos antecedentes con relación a la morfometría de la ES. La aplicación de sistemas semiautomatizados o automatizados para el monitoreo de los cultivos *in vitro* se han limitado únicamente a la interpretación de imágenes, tal es el caso de un sistema señalado por Guevara y Castillo (1998) quienes utilizaron un sistema de interpretación de imágenes para clasificar embriones somáticos de caña de azúcar. Otros sistemas automatizados han hecho énfasis en el conteo de células o estructuras que permitan sustituir el conteo visual humano, así se refleja en un sistema automatizado para el conteo y clasificación de células en suspensiones de caña de azúcar obtenido por Báez et al. (1998).