

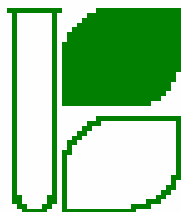
**VI Simposio Internacional de Biotecnología
Vegetal**

**VI International Symposium on Plant
Biotechnology**

Resúmenes / Abstracts



**Instituto de Biotecnología de Las Plantas.
Villa Clara, Cuba
Junio 17-21, 2002**



VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal

VI International Symposium on Plant Biotechnology

Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Villa
Clara, Cuba

Junio / *June* 17-21, 2002

Resúmenes / *Abstracts*

Edición: Lic. Orlando Gregorio Chaviano
Téc: Marta Rodríguez Rodríguez

Impresión: Centro Gráfico de Reproducciones para el Turismo,
Santa Clara, Villa Clara.

© Instituto de Biotecnología de las Plantas, 2002.

Instituto de Biotecnología de las Plantas
Carretera a Camajuaní Km. 5.5. Santa Clara, Villa Clara.
CUBA. CP 54830
Tel: (53) (42) 281257, 2812,68, 281693
Fax: (53) (42) 281329
e-mail: ogregorio@uclv.edu.cu

**VI SIMPOSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA
VEGETAL**

**VI INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT
BIOTECHNOLOGY**

JUNIO/JUNE 17-21, 2002

COMITÉ ORGANIZADOR / ORGANIZING COMMITTEE

Presidente/Chairman: Dr. Daniel Agramonte Peñalver, Director. Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Villa Clara, CUBA.

Vicepresidente/Vicepresident: Dr. Rafael Gómez Kosky, Director de Investigaciones y Postgrado, IBP. CUBA.

Secretario Ejecutivo/Executive Secretary: Lic. Orlando Gregorio Chaviano, Instituto de Biotecnología de las Plantas IBP, Villa Clara, CUBA.

Miembros / Members

Dr. Elio Jiménez González
Dr. Pedro Orellana Pérez
Dr. Miguel Suárez Castellá
Dr. Manuel de Fera Silva
Dr. Ramón Santos Bermúdez
Dr. Marcos Daquinta Gradaille
Dr. Justo González Olmedo
Dr. Evelio Báez Pérez
Lic. Guzmán Cabrales Hernández

TABLA DE CONTENIDO / CONTENTS

Conferencias / 7

Transformación genética y biología molecular / 30

Cultivo de células y tejidos / 50

Embriogénesis somática y semilla artificial / 62

Propagación masiva de plantas / 73

Mejora por variación somaclonal, mutagénesis y selección *in vitro* / 107

Saneamiento y diagnostico de microorganismos patógenos / 116

Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* / 119

Metabolitos secundarios / 127

Información, comercio y propiedad industrial en biotecnología vegetal / 132

Próximos eventos / 137

Indice de autores / *Authors index* 139

Palabras claves / *Keywords* 149

CONFERENCIAS

C-01 La embriogénesis somática en los angiospermas

Wayne Parrott

Department of Crop & Soil Sciences The University of Georgia Athens, GA 30602, USA.

Los últimos 40 años han visto el desarrollo de tecnología para obtener embriones somáticos de un número cada vez más grande de especies. Al tener embriones somáticos disponibles, éstos han encontrado uso en programas de mejoramiento y en la propagación a gran escala de genotipos superiores, especialmente cultivos perennes de alto valor. El uso de la embriogénesis somática para la propagación seguirá aumentado según hayan protocolos más avanzados y refinados, capaces de producir embriones morfológicamente normales, sin variación somaclonal, y con habilidad de germinar y convertirse en plantas rápida y eficazmente. Los protocolos para cada especie exhiben varios factores en común, pero siempre habrá diferencias importantes, por lo cual siempre habrá la necesidad de desarrollar protocolos óptimos para cada especie.

La definición de un embrión somático

Al igual que todo organismo sexual, cada individuo de las angiospermas empieza la vida como cigoto, el cual se divide mitóticamente para formar un proembrión y luego un embrión. Los patrones de desarrollo de los embriones derivados de cigotos han sido bien caracterizados y quitando pequeñas diferencias, son consistentes entre los grupos de angiospermas (1, 2). Sin embargo, es necesario repasar el sistema reproductivo de las angiospermas para darle contexto al proceso embriogénico.

Dentro de los órganos sexuales de la flor, células denominadas megasporangios aumentan de tamaño para formar una célula megaspórica primaria, o megasporocita, que se divide por meiosis para formar cuatro megasporas. A su vez, una de estas se divide por mitosis para formar el megagametofito o saco embrionario. Este último no es un término apropiado, ya que este saco carece de embriones. Una de las células dentro del megagametofito es el oozfero, que al ser fecundado por un núcleo generatriz del polen, forma el cigoto. El megagametofito es envuelto por una o dos capas de tejidos, conocidos como integumentos y por tejido adicional conocido como el nucelo. Todo el conjunto se conoce como el óvulo.

Sin embargo, en las angiospermas, los embriones no necesariamente se forman desde un cigoto. En su lugar, éstos se pueden originar de una variedad de células somáticas, por lo cual se les llama embriones somáticos. El proceso de formación de un embrión somático se conoce como embriogénesis somática.

Uno de los ejemplos mejor conocidos de embriogénesis somática que ocurre naturalmente es el caso de la embriogénesis adventicia. (1), mediante la cual los embriones se forman directamente por mitosis de una o más células de los integumentos o nucelo que envuelven al megagametofito. La embriogénesis adventicia es considerada como una forma de apomixis, un fenómeno que permite la formación de embriones sin fecundación de un oosfero.

También hay otras formas de apomixis. Una forma, llamada aposporia. (o sea, sin espora), células somáticas forman gametofitos femeninos por mitosis, y luego el oosfero se divide para formar un embrión. Hay otro tipo de apomixis, en el cual la meiosis falla durante megasporogénesis, resultando en un oosfero diploide dentro del megagametofito, que a su vez se divide para formar un embrión sin haber sido fecundado. Esta clase de apomixis se llama diplosporia (o sea, de una espora diploide). Finalmente, células haploides dentro del megagametofito, como las sinérgidas, también pueden dividirse mitóticamente para formar un embrión haploide. Este tipo de apomixis se conoce como apogametia (o sea, sin un gameto). A pesar de que el gametofito femenino formado por aposporia se deriva de una célula somática en vez de una espora, los embriones formados por aposporia, diplosporia y apogametia, aunque son de origen asexual, no son embriones somáticos en un sentido estricto, ya que se derivan de células de un gametofito femenino, y no de células somáticas.

Finalmente, la embriogénesis somática de las angiospermas no es limitada a tejidos dentro del óvulo. La orquídea, *Malaxis paludosa*, forma embriones somáticos en las puntas de las hojas, mientras que en especies con hojas suculentas como *Bryophyllum* forman los embriones somáticos a lo largo de las orillas de las hojas (3).

También es factible obtener embriones somáticos de células cultivadas. A diferencia a los embriones somáticos formados *in planta*, los embriones somáticos formados *in vitro* no están rodeados por tejidos maternos y pueden ser propagados en gran número. Por consiguiente, el uso de embriones somáticos facilita el estudio de la embriogénesis (4), la propagación a gran escala, y más recientemente, la transformación genética de los cultivos. Hoy día,

la embriogénesis somática casi siempre se refiere a un embrión formado *in vitro* y no *in planta*.

Embriogénesis somática de células cultivadas

La embriogénesis somática es una de dos formas por las cual células cultivadas pueden regenerarse para formar plantas enteras a falta de células meristemáticas.

La segunda forma se llama organogénesis, y es caracterizada por la formación de raíces o yemas que se alargan para formar brotes. Estos brotes pueden ser enraizados para obtener plantas enteras. En comparación, los embriones somáticos carecen de conexiones vasculares a los tejidos cultivados, pero sí tienen meristemas que les permite germinar y convertirse en plantas.

Ya había indicios de que las células cultivadas podían formar embriones a finales de los 1950s, fenómeno que fue comprobado a principio de los años sesenta. Desde entonces, este fenómeno se ha repetido en un amplio rango de especies. En la última cuenta, se ha documentado la embriogénesis somática en más de 130 especies de plantas, incluyendo tanto angiospermas como gimnospermas (5). Sin embargo, todavía quedan varias especies para las cuales nunca se ha reportado la embriogénesis somática. Aun para aquellas especies en las cuales es posible la embriogénesis somática, los embriones generalmente sólo se pueden obtener de ciertos tejidos en ciertas etapas de desarrollo, o de ciertos genotipos dentro de la especie. La habilidad relativa de un tejido dado de un genotipo dado para formar embriones somáticos se conoce como “competencia embriogénica.”

El origen de los embriones somáticos

En el esquema más sencillo, los embriones somáticos provienen de embriones cigóticos inmaduros que han sido cultivados *in vitro*, en un proceso que a veces se le llama clonaje de embriones. Ya que las células dentro de un embrión cigótico son de por sí embriogénicas, es posible inducir las para que éstas se dividan para formar un embrión somático. En este caso, la embriogénesis se dice ser directa, ya que células pre-existentes se dividen directamente para formar un embrión somático. Éstas se conocen como Células Embriogénicas Pre-Determinadas (CEPDs).

En el esquema más complicado, las células en una planta grande, que ya perdieron su carácter embriogénico, pueden dividirse

mitóticamente bajo condiciones que terminan induciendo un estado embriogénico. En este caso, células pre-existentes se dividen para formar un callo, y el callo a su vez adquiere embriogenicidad, o sea, la embriogénesis es indirecta. Este fenómeno se conoce como Células Embriogénicas Determinadas Inducidas (CEDIs).

Las CEPDs y las CEDIs representan los extremos de un espectro continuo, y tejidos de varios tipos y edades pueden estar en cualquier intermedio entre ambos extremos. Una vez se hayan obtenido CEDIs, éstas tienen habilidades equivalentes a las de las CEPDs. Sin embargo, la palabra 'determinada' no es completamente apropiada, ya que implica que la formación de embriones es inevitable. Por consiguiente, es preferible referirse a las células capaces de formar embriones somáticos como Células Embriogénicas (CEs) (6). Un Tejido Embriogénico es sinónimo a CEs.

La combinación de reguladores de crecimiento necesaria para obtener embriones somáticos depende si el explante consiste de CEPDs o de CEDIs. En el caso de CEPDs, las células ya son embriogénicas, y simplemente necesitan que se les permita dividirse independientemente de las otras células en el mismo tejido. El uso de sólo una citoquinina es comúnmente suficiente.

Al usar tejidos que no están en un estado embriogénico, el uso de una auxina es necesario generalmente para inducir el estado embriogénico. Sin embargo, hay varios otros factores que también pueden inducir el estado embriogénico, incluyendo calor extremo, metales pesados, desecación, y la desintegración de los tejidos, así aislando células o grupos de células. No se sabe a ciencia cierta si todos estos factores tienen un mecanismo en común, pero una posibilidad es que todos estos tratamientos inducen una respuesta general al estrés, durante la cuál cesa la expresión actual de los genes expresados antes de sufrir el estrés. Además, los niveles altos de auxinas pueden causar la metilación del ADN. Dado que células somáticas pueden dividirse meióticamente y dar muestras estructurales en común con un oosfero durante la adquisición de embriogenicidad, es factible que al terminar la expresión de los genes en el explante, ésta es reemplazada por la expresión de genes asociados con esporogénesis y gametogénesis (7, 8). Quizás al obtener una célula con características de una espora o gameto, la formación de un embrión somático no es tan distinto al fenómeno de apomixis.

El aislamiento es otro factor que parece ser importante para la embriogénesis, ya sea por maceración del tejido, necrosis del tejido alrededor de una célula, o la formación de una cutícula alrededor de células destinadas a convertirse en un embrión. Supuestamente, este aislamiento permite que una célula se comporte como un organismo independiente, y no como una célula actuando coordinadamente con otras para formar un tejido (8). Mientras que los embriones cigóticos siempre se forman a partir de una célula (el cigoto), los embriones somáticos no padecen de tal limitación. Un grupo de células puede crecer coordinadamente para formar un embrión somático (9).

El tejido embriogénico se caracteriza por células pequeñas, ricas en citoplasma, y asimétricas. Las células dentro de los tejidos embriogénicos pueden dividirse y mantener su estado embriogénico mientras estén expuestas a suficiente auxina. Conforme estos tejidos van creciendo, llegan a formar masas, conocidas como Masas Pro-Embriogénicas (MPEs), centros embriogénicos, o complejos proembrionales, o masas embriogénicas.

El desarrollo de los embriones somáticos

Cuando el nivel de auxinas en el medio de cultivo baja más de cierto umbral, las células embriogénicas empiezan un proceso de histodiferenciación. Los embriones que se están histodiferenciando crecen debido a división celular, y pasan por las mismas etapas de desarrollo que los embriones cigóticos. La primera etapa es la globular, y consiste de células en una configuración esferoidal. El embrión luego adquiere una simetría bilateral al llegar a la etapa corazón. El embrión sigue alargándose para llegar a la etapa torpedo, y finalmente a la etapa cotiledónea (2, 10).

El transporte polar de auxinas endógenas es necesario para que un embrión somático en vía de desarrollo haga la transición de la etapa globular a la corazón. El balance interno de las auxinas puede ser alterado o destruido debido a auxinas exógenas. Por consiguiente, la presencia de auxinas en el medio de cultivo durante la histodiferenciación, aun a un nivel bajo el umbral que permite la histodiferenciación, interfiere con la histodiferenciación normal, impidiendo la adquisición de simetría bilateral y el desarrollo del meristemo apical (8). Sin embargo, aún bajo condiciones ideales, comúnmente se obtienen embriones somáticos con un número variable de cotiledones u otras anomalías.

Estas etapas de desarrollo son aplicables únicamente a los embriones de dicotiledoneas. Los embriones de monocotiledoneas tienen etapas análogas de histodiferenciación, mas difieren marcadamente en su apariencia debido a la presencia de un solo cotiledón. Por consiguiente, las etapas de desarrollo de éstos embriones se denominan como globular, escutelar, y coleoptilar (11).

Terminada la fase de histodiferenciación, los tanto los embriones cigóticos como los somáticos empiezan la etapa de maduración, durante la cuál crecen debido al agrandamiento celular. Las primeras etapas de maduración se caracterizan por la acumulación de reservas, mientras que las siguientes etapas se caracterizan por la adquisición de tolerancia contra la desecación, y son análogas a la madurez fisiológica de las semillas. El potencial osmótico del medio de cultivo parece ser el factor más importante para inducir la maduración adecuada. Después de haber sido desecados, los embriones son capaces de germinar al haber suficiente humedad (12). Se dice que aquellos embriones que germinan, sobreviven y llegan a ser una planta se han 'convertido' en plantas, y la transición de un embrión en proceso de germinación hasta convertirse en planta es el proceso de conversión.

La histodiferenciación, maduración, desecación, germinación y conversión de los embriones somáticos de angiospermas ocurren sin la presencia de reguladores de crecimiento exógenos. Aun así, muchos de los protocolos para la embriogénesis somática omiten una o más etapas, usan reguladores de crecimiento innecesarios, o condiciones subóptimas de cultivo. Como resultado, los embriones somáticos requieren el uso de reguladores de crecimiento (generalmente citoquinina, ácido abscísico, o giberelina) antes de germinar y convertirse en plantas. Los embriones precozmente germinados pueden parecerse fisiológicamente tanto a un embrión en fase de maduración como a uno en fase de germinación. A éstos se les conoce como embrioplántulas. Finalmente, los embriones somáticos, al igual que sus contrapartes cigóticos, pueden requerir de un período de dormancia, y por consiguiente necesitan de un tratamiento para romper la dormancia, como enfriamiento en húmedo (estratificación), antes de que sean capaces de germinar.

La embriogénesis repetitiva

Como se dijo anteriormente, los tejidos embriogénicos pueden formar embriones globulares cuando el nivel de auxinas exógenas baja más de cierto umbral. Este umbral varía para cada especie, pero el desarrollo

subsiguiente del embrión depende del nivel de auxinas exógenas. En ausencia de auxinas exógenas, la histodiferenciación procede normalmente. Si hay auxinas dentro del umbral que permite la histodiferenciación, ésta procederá, pero anormalmente. Al aumentar el nivel de auxinas exógenas, se llega a un punto en que la histodiferenciación no pasa más allá de la etapa globular. En este caso, embriones nuevos se forman en el embrión original, y éstos a su vez llegan a la etapa globular, donde cesa su desarrollo y forman nuevos embriones. Este proceso se repite indefinidamente mientras el nivel de auxinas exógenas sea lo suficientemente alto. Este fenómeno se conoce como embriogénesis recurrente, repetitiva, accesoria, o secundaria. Muchas veces se le llama 'callo embriogénico' a una masa de embriones en estado de repetición, pero éste es un término incorrecto, ya que los embriones se forman de embriones anteriores y no del callo.

Cuando el nivel de auxinas externas baja más del punto necesario para mantener la embriogénesis repetitiva, se rompe el ciclo de embriogénesis repetitiva, y los embriones terminan su histodiferenciación para desarrollarse en embriones maduros. Existen desviaciones. En algunas especies, los embriones pueden llegar a la etapa corazón, torpedo, o cotilidonaria, o incluso pueden empezar a germinar, antes de empezar el proceso repetitivo (13). En otras especies, la embriogénesis repetitiva puede ocurrir en ausencia de toda auxina externa, en cuyo caso puede ser difícil o imposible romper el ciclo de embriogénesis repetitivo. A veces se le llama 'autoembriónia' cuando la embriogénesis repetitiva ocurre en ausencia de auxinas exógenas (8).

Usos de la embriogénesis repetitiva

La habilidad que tienen los tejidos embriogénicos y los embriones repetitivos facilitan su uso para multiplicación a gran escala. Ya que la embriogénesis somática puede producir un número ilimitado de propágulos con la capacidad de germinar y producir plantas completas sin haber necesidad de etapas adicionales para el enraizamiento, esta tecnología puede ser especialmente útil para la propagación de genotipos élites pero heterocigóticos que no se pueden reproducir por semilla botánica. Esta tecnología también es útil para la propagación de genotipos élites pero estériles, como las uvas sin semilla (14). Además, es quizás factible encapsular los embriones somáticos para usarlos como semillas artificiales (15). En teoría, la encapsulación facilita el manejo de los embriones, prolonga su viabilidad, y facilita la germinación bajo una variedad

de condiciones ambientales ya que se puede incorporar fertilizantes y pesticidas en el material usado para el encapsulamiento.

Tanto el tejido embriogénico como embriones repetitivos se prestan para la transformación genética, proporcionando un mecanismo para la transformación genética de aquellas especies que no son regenerables por organogénesis. Mientras que las CEs se han prestado a varios métodos de transformación, éstas son particularmente útiles para la transformación por medio de microproyectiles. Como carecen de vacuolas grandes, hay mayor probabilidad de que un microproyectil le pegue al núcleo.

La transformación genética es un fenómeno unicelular. En el esquema más sencillo, una célula transgénica se divide para formar un embrión somático. A su vez, el embrión se puede convertir en una planta transgénica, o se puede propagar, usando embriogénesis repetitiva, para obtener varios embriones que se pueden convertir en plantas.

Sin embargo, como se explicó anteriormente, los embriones somáticos no siempre tienen un origen unicelular, en cual caso el embrión será quimérico para el transgén, y sólo aquellas células derivadas de la célula transgénica, entre todas las células que dieron origen al embrión, serán transgénicas. En este caso, todavía se puede obtener un embrión completamente transgénico usando la embriogénesis repetitiva para que se forme otro embrión desde el sector transgénico (14).

Androgénesis y ginogénesis

Hay una última categoría de embriones que provienen de microesporas (androgénesis), ya sea aisladas o que se dejan dentro de la antera. También se pueden obtener a partir de óvulos (ginogénesis). Dado que las microesporas y las células dentro del saco embrionario no son células somáticas, estos embriones técnicamente no son somáticos. Sin embargo, quitando su origen, que es exclusivamente unicelular, estos embriones comparten las mismas características de desarrollo que los embriones somáticos. La embriogénesis a partir de microesporas también se conoce como embriogénesis haploide, embriogénesis gamética, embriogénesis de microesporas, o embriogénesis polínica. Ésta última no se debería de usar, ya que la embriogénesis ocurre antes de que las microesporas se conviertan en polen.

La diferencia más importante entre un embrión androgénico o ginogénico y un embrión somático es que los primeros son haploides, ya que se derivan de células haploides. Se sabe más sobre la androgénesis que sobre la ginogénesis, ya que hay extremadamente

pocos ejemplos de ginogénesis. Los mismos factores que induce la formación de embriones somáticos también inducen la formación de embriones androgénicos. En el transcurso de la microgametogénesis normal, la microespora se divide por mitosis para formar un núcleo vegetativo y una célula generativa. Luego, la célula generativa se divide mitóticamente para formar dos células espermáticas. Bajo condiciones capaces de inducir embriogénesis, la androgénesis puede proceder por uno de estos dos métodos. En el primer caso, el núcleo vegetativo o la célula generativa sigue dividiéndose mitóticamente, hasta llegar a la formación de un proembrión, que sigue su desarrollo como fue descrito anteriormente para embriones somáticos. En el segundo caso, la primera división mitótica de la microespora es simétrica, resultando en dos células idénticas. Estas células luego siguen dividiéndose para formar un proembrión, y luego un embrión (16).

El número de plantas con habilidad androgénica es mucho menor al número de especies con la habilidad para formar embriones somáticos. Hasta la fecha, la androgénesis se ha documentado solo en 34 especies, la mayoría de éstas siendo solanáceas, crucíferas, o gramíneas. Al igual que con la embriogénesis somática, tanto la etapa de desarrollo como el genotipo son sumamente importantes para determinar la habilidad androgénica. Además, no se sabe con seguridad si cada microespora tiene capacidad androgénica (8), o si esta capacidad es limitada a ciertas microesporas con rasgos femeninos (17).

BIBLIOGRAFÍA

- P. Maheshwari, *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*, McGraw-Hill Book Co., New York, 1950
- V. Raghavan, *Embryogenesis in Angiosperms*, Cambridge University Press, New York, 1986
- A. P. Mordhorst, M. A. J. Toonen, and S. C. de Vries, *Crit. Rev. Pl. Sci.* 16, 535-576, (1997)
- V. L. Dodeman, G. Ducreux, and M. Kreis, *J. Exp. Bot.* 48, 1493-1509, (1997)
- T. A. Thorpe, *An. Pl. Sci.* 1, 81-88, (1988)
- J. G. Carman, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26, 746-753, (1990)
- M. Terzi and F. LoSchiavo. "Somatic embryogenesis" in S. S. Bhojwani ed., *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 54-66

T. A. Thorpe, *In Vitro* Embryogenesis in Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995.

E. G. Williams and G. Maheswaran, *Ann.Bot.* 57, 443-462, (1986)

J. L. Zimmerman, *Plant Cell* 5, 1411-1423, (1993)

D. J. Gray and A. Purohit, *Crit.Rev.Pl.Sci.* 10, 33-61, (1991)

A. R. Kermode. "Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: Interactions between the embryo and the seed environment" in J. Kigel and G. Galili ed., *Seed Development and Germination*, Marcel Dekker, Inc., New York Basel Hong Kong, 1995, pp. 273-332

S. A. Merkle, W.A. Parrott, and E.G. Williams. "Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning" in S. S. Bhojwani ed., *Plant tissue culture: Applications and limitations*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990, pp. 67-101

W. A. Parrott, S.A. Merkle, E.G. Williams. "Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer systems" in D. R. Murray ed., *Advanced methods in plant breeding and biotechnology*, CAB International, Wallingford, 1991, pp. 158-200

K. Redenbaugh, *SynSeeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993

T. L. Reynolds, *Plant Mol.Biol.* 33, 1-10, (1997)

E. Heberle-Bors, *Planta* 156, 396-401, (1982)

Figure 1. Somatic embryogenesis.

This figure illustrates the typical sequence of events that can take place during somatic embryogenesis, using soybean, *Glycine max* (L.) Merrill, as an example. In the case of soybean, only cotyledons from immature embryos exhibit embryogenic competence (top left). When these immature cotyledons (the explant tissue) are dissected out and cultured in the presence of high auxin levels, somatic embryos are induced. These somatic embryos are arrested at a globular stage of development due to the presence of a high level of auxin. These globular-stage embryos can undergo a proliferation phase, as which will last indefinitely as long as the auxin levels are sufficiently high (top right). In the absence

of exogenous auxins, the globular-stage embryos can begin the process of histodifferentiation (right side), whereby they gain bilateral symmetry and go through stages known as heart, torpedo, and cotyledonary. Cotyledonary-stage embryos will then begin a process of maturation, whereby they acquire their storage reserves and acquire desiccation tolerance (bottom right). Physiologically mature embryos can be desiccated, much like a seed which naturally desiccates prior to harvest (bottom, center). Desiccated embryos will germinate once moisture and temperature conditions are appropriate. If the germination process continues, plantlets form, and the embryos are said to be converted (bottom left). When the plantlets reach reproductive maturity, they cycle can be repeated. Illustration by Carol G. Hahn.

C-02 Embriogénesis Somática en Especies Tropicales de Interés Agrícola

Rafael Gómez Kosky^{1*}, Marisol Freire Seijo¹, Antonio Barranco², Laisyn Posada Pérez¹, Jorge Vilchez³, Manuel de Faria Silva¹, Maritza Reyes Vega¹, Idalia Herrera Ofarril¹. *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5. Santa Clara. Villas Clara. Cuba. e-mail: koskyrg@yahoo.es

² Universidad de Las Tunas.

³ Universidad del Zulia, Maracaibo. Venezuela.

La embriogénesis somática es uno de los procesos de la morfogénesis *in vitro* de mayor actualidad, por su aplicación tanto en la propagación masiva de plantas como para el mejoramiento genético. Sin embargo, el conocimiento técnico para la producción de un ilimitado número de embriones somáticos con tamaño y forma uniforme y que den lugar a plantas normales, no es todavía alcanzable en muchas especies de plantas.

El desarrollo de protocolos de regeneración de plantas por esta vía en especies de interés agrícola tiene hoy una gran importancia a nivel nacional e internacional. El trabajo desarrollado en especies monocotiledóneas (caña de azúcar, bananos y plátanos) y dicotiledóneas (papaya y guayaba) está enmarcado en la obtención de metodologías que abarcan desde la selección del explante ideal, la obtención de suspensiones celulares embriogénicas, lograr la formación de los

embriones somáticos en medios de cultivo líquidos en agitador orbital, la multiplicación secundaria de los embriones somáticos tanto en medios de cultivo en estado semisólido y líquido, su escalado en biorreactores, altos porcentajes de regeneración de plantas y el estudio en campo del comportamiento agromorfológico de estas plantas.

Los resultados alcanzados durante más de ocho años de estudio se muestran que es posible obtener sistemas eficientes de regeneración de plantas empleando la vía de la embriogénesis somática, el cual pueda ser utilizado tanto para la producción de semilla de alta calidad como para el mejoramiento genético. El comportamiento de las plantas en caña de azúcar y bananos a nivel de campo con niveles muy bajos de variabilidad fenotípica (0-0.2%) permiten plantear que se cuenta con metodologías listas para su uso por laboratorios comerciales.

C-03 Estrategias moleculares para el control de la maduración en papaya

Jimmy R Botella^{1*}, Peter Leeton¹, Phil Labrie¹, Mae Mendoza², Tony Laurena², Pablito Magdalita². *Author for correspondence

¹ Plant Genetic Engineering Laboratory, School of life Sciences, University of Queensland, Brisbane 4072. e-mail: j.botella@botany.uq.edu.au

² Institute of Plant Breeding, University of the Philippines, Los Banos, Laguna 4031, Philippines.

A large percentage of fruits and vegetables crops are lost due to spoilage after harvesting, and the problem is especially acute in sub tropical and tropical countries. Classic technologies such as atmosphere control (CO₂ and humidity) and refrigeration have proven useful in controlling some post-harvest losses, but their implementation requires the development of important infrastructure and specialized personnel in rural areas. In addition, tropical crops are very sensitive to chilling making low temperature storage an unpractical option. Development of new technologies is fundamental in minimizing post-harvest losses.

Ethylene gas is one of the major factors contributing to the spoilage of fruits and vegetables after harvest; therefore considerable effort has been directed to control the rate of ethylene production. We have cloned and characterized ethylene biosynthetic genes involved in the ripening of papaya fruits. Two different ACC synthase and two different ACC oxidase genes show varying patterns of expression

during fruit ripening. We have produced more than 100 independent transgenic lines containing different constructs in sense and antisense orientation for each of the two ACC synthase genes. We have also produced genetic constructs containing RNA interference cassettes with perfect inverted repeats separated by intron sequences. Regulatory approval has been obtained to perform field trials and transgenic lines are now being transplanted to soil. We will discuss our strategy for the field trials and evaluation of transgenic fruits.

C-04 Evaluation of *bar* as a selectable marker and production of herbicide resistant plants

Gil A. Enríquez

Plant Division. Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB). Ave 31 e/ 158 y 190, PO Box 6162, CP 10600, Havana, Cuba. Fax: 53-7-214764, 53-7-336008. e-mail: gil.enriquez@cigb.edu.cu

Selectable marker genes are essential for the production of Genetically Modified Plants. Antibiotic and herbicide resistance are the most commonly used markers in that modification process. They confer resistance or tolerance to plants by overexpressing a natural sensitive or altered insensitive target proteins and detoxifying enzymes. Kanamycin is one of the most widely antibiotic used as selectable marker, but there is a concern related to the transfer of antibiotic resistance to pathogenic organisms, which may reserve drugs for life-threatening diseases. For this reason, the transfer of herbicide resistance genes into economic important crops could have a significant impact on agriculture and the environment. The *bar* gene has been transferred under control of different promoters to plant cells for both transient assays and stable transformation. PPT concentrations for selection purposes can vary between 1 to 100 mg.l⁻¹, depending of plants tissue and culture medium composition. This herbicide can be a useful tool for the screening of transgenic line progenies in plant breeding.

Transgenic potato and sugarcane clones resistant to herbicide BASTA were generated. PPT at 2 mg.l⁻¹ was used to select transgenic potato shoots from leave and stem explants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* carrying binary plasmid pCAMBIA 3301. Stem-derived explants produced more and morfologically better transgenic plants than from leave explants. GUS Assay, PCR and Southern blot confirmed the genetic transformation. Transgenic

clones showed a normal phenotype, and their resistance to BASTA is being evaluated under greenhouse and field conditions.

We describe a selection procedure after transformation of *Agrobacterium* for *in vitro* or field sugarcane meristematic tissues using 4 mg.l⁻¹ of PPT during calli generation. A set of transgenic sugarcane plants, which showed resistance to BASTA herbicide *in vitro* and in greenhouse conditions were obtained. They were evaluated also under field conditions. We identified four lines that had different resistance levels, but at the BASTA field doses, these lines suffered significant damages. Despite this effect, none of them decreased its agronomic parameters (stem diameters, stem numbers per plant), in contrast to control plants, which had a significant decrease of its productivity. Molecular analysis of transformed plants indicated the integration of *bar* gene into the sugarcane genome. The ammonia accumulation in leaves extracts was measured after herbicide treatment.

In the CIGB, an important projects regarding sugarcane and potato genetic transformation using *bar* as selectable marker are currently in progress.

C-05 Production of Active Substances Applying Innovative Plant Biotechnology

André Gerth^{1*}, Elio Jiménez González², Rafael Gómez Kosky², Dirk Wilken¹. *Author for correspondence

¹ BioPlanta GmbH, Benndorfer Landstr. 2, 04509 Delitzsch, Germany.
e-mail: info@bioplanta-leipzig.de

² Instituto de Biotecnología de las Plantas, Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara, Cuba.

Active substances obtained from plants are known for their complex and well-tolerated biological effects. The quality of active substances from plants harvested in nature or cultivated in fields is instable because it depends on the environmental conditions (weather, climate, seasons and soil). Infestation, diseases and the application of pesticides additionally decreases the quality of the active substances.

According to this problems the objective of the work is to develop a technology for stable production of high quality active substances.

For this purpose the development, optimization and application of innovative techniques for metabolite production was necessary.

Applying the Temporary Immersion System, a ten fold increase of the biomass within three weeks can be reached. It was possible to change the spectrum of the active substances by controlling the cultivation conditions. Cell cultures were multiplied in bioreactors up to 500 % within 6 days. A content of active substances up to 1% of the fresh weight was obtained.

The result of the research is a base technology for biotechnical production of active plant substances especially for the pharmaceutical and cosmetic industry. The focus of this technology is on modern techniques to cultivate the whole plant, plant organs and cells in bioreactors and Temporary Immersion Systems. Advantages of the developed technique are high and stable quality of active substances, high multiplication rate of biomass with high content of active substances, no loss due to pests or diseases, the possibility to influence the spectrum of active substances by controlling all cultivation conditions and the possibility to produce genetically altered organisms without endangering the environment. With this technology active substances can be produced successfully in Temporary Immersion Systems with a higher yield and a higher quality than in the field.

C-06 Using the internet to keep abreast of plant tissue culture information

Edwin Herman.

Agricell Report, USA.

Because plant tissue culture is a tool of plant science rather than a science in itself, information about this subject appears in the many journals, meetings and symposia that represent all aspects of plant science. At the present time, plant tissue culture papers are published in over 400 journals.

In the year 2002, such papers were presented at more than 40 meetings and symposia. In addition, plant tissue culture information is exchanged, informally, over the internet.

How then can a plant tissue culture researcher keep abreast of this widely scattered information? A researcher with access to a large corporate or university library can do periodic literature searches to

obtain lists of references, can have access to relevant journals, and can obtain copies of published papers from other associated libraries.

Many plant tissue culture researchers, however, do not have access to such wealthy libraries. In the past it was extremely difficult for such scientists to keep abreast of current information. "Current Contents" has been useful, but this publication provides titles of articles from very few of the journals that publish plant tissue culture-related papers. "Current Advances in Plant Science" is more useful as its literature citations represent a large data bank. "Agricell Report" provides abstracts of important developments in plant tissue culture, a comprehensive monthly list of new plant tissue culture citations and information from meetings and symposia. It is the only publication that provides abstracts of important plant tissue culture papers presented at meeting and symposia as well as e-mail addresses of all authors cited, enabling researchers to obtain reprints.

Even without these publications or the use of sophisticated library facilities, today it is possible, with little or no cost, for any plant tissue culture researcher with access to a computer and the internet to keep abreast of current plant tissue culture-related information. It is, however, a time-consuming process. This presentation will demonstrate how to rapidly access websites, not only of the most important journals in the field of plant tissue culture, but also most of the other journals that publish plant tissue culture-related papers, and how to use these websites to obtain abstracts of most papers as well as e-mail addresses. By using e-mail reprint requests, researchers can often obtain reprints within hours rather than weeks or months as in the past. The presentation will also provide information about (1) internet plant tissue culture discussion groups, (2) publications that provide complete papers on-line without charge, and (3) how to use the internet to obtain information about plant tissue culture-related papers presented at meetings and symposia worldwide.

C-07 Regulaciones de bioseguridad en las plantas transgenicas en Cuba

Julia La Rosa*, Orfelina Rodríguez, Miguel Lorenzo. *Autor para correspondencia

Centro Nacional de Seguridad Biológica, Calle 28 Nro. 502, Miramar, Ciudad de La Habana, Cuba.

El desarrollo biotecnológico en nuestro país, unido a los riesgos de las prácticas asociadas a la liberación de organismos al medio ambiente, han motivado la existencia de una base legal adecuada, que permita que dichas actividades se realicen con niveles aceptables de seguridad, que supongan la protección de la salud humana y el medio ambiente en general. Con la creación del Centro Nacional de Seguridad Biológica la bioseguridad ha alcanzado su mayor grado de organización. La promulgación de un conjunto de normas jurídicas que tienden a regular, entre otros aspectos, la seguridad de la investigación, producción, el uso, la exportación y la importación de las plantas transgénicas lo que ha posibilitado un avance notable en materia de protección al consumidor y del medio ambiente en general. Exponer las experiencias del país en este aspecto constituye el objetivo del presente trabajo.

C-08 Marcadores epigenéticos de interés en procesos agroalimentarios

Berdasco, M¹, Diego, L.B¹, Rodríguez, R^{*1,2}, Fraga, M.F.³, Cañal, M.J.^{1,2}

*Autor para correspondencia

¹ Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo, España.
e-mail: rrodri@correo.uniovi.es

² Instituto Biotecnológico de Asturias, Oviedo, España.

³ Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Carlos III, Madrid, España.

Control de calidad en procesos agroalimentarios y biomédicos

El éxito de cualquier proceso productivo o terapéutico va a estar condicionado por el rendimiento del mismo, entendiendo por rendimiento la cantidad y/o calidad del producto o la reversión de determinadas situaciones patológicas hacia estados normales. Esta situación ha impulsado el desarrollo de diversas estrategias destinadas a mejorar los rendimientos de procesos biotecnológicos y biomédicos, induciendo la creación y desarrollo de nuevos campos de genéticos, tecnológicos, sanitarios, etc.... Así, los numerosos avances en secuenciación genómica, transgénesis, terapia génica, producción de biomasa o metabolitos secundarios, han facilitado la obtención de nuevas líneas celulares vegetales o animales de gran interés.

La comprensión y posibilidad de manipulación del genoma de los organismos es clave para la optimización de techos productivos, pero se está comprobando que no constituye una panacea sanadora ni aporta parámetros de control de la producción ideal. Por un lado debemos tener en cuenta que las modificaciones genéticas inducidas mediante técnicas biotecnológicas pueden ser transitorias, y en ocasiones disparan modificaciones secundarias que podrían permanecer indetectadas. Además, en cultivos de tejidos (vegetales o animales) es frecuente que individuos genéticamente idénticos no manifiesten los mismos rasgos fenotípicos aún sometidos a las mismas condiciones ambientales, es decir que la clonación de individuos élite no garantiza fidelidad fenotípica al 100% aunque se conserven las características genéticas originales.

Por tanto, urge desarrollar sistemas de control de la calidad de procesos sostenibles, tanto de obtención de biomasa como de aplicación sanitaria. Sólo entonces podremos incrementar la productividad de los sistemas biológicos, certificar las características de los individuos y prever las respuestas de los mismos ante todo tipo de tratamientos.

Metilación del ADN, llave de procesos de desarrollo y diferenciación

Exceptuando situaciones de mixoploidía relativamente frecuentes en determinadas especies vegetales, se admite que la mayor parte de las células de un organismo contienen los mismos genes. La selección de aquellos genes que se van a expresar y de aquellos que son silenciados en un momento dado es el factor que determina las propiedades específicas de una célula. Parte de esta plasticidad genómica puede explicarse mediante mecanismos epigenéticos, o lo que es lo mismo, mediante alteraciones en los patrones de expresión génica sin cambios en la secuencia de bases del material hereditario (Azim, 2001).

Uno de los mecanismos epigenéticos mejor estudiados y asociado con el silenciamiento génico es la metilación del ADN que consiste en la sustitución enzimática del hidrógeno de la posición 5' de la citosina por un grupo metilo ($-CH_3$). La metilación acontece principalmente sobre dinucleótidos CG (islas CpG) o sobre determinados trinucleótidos (islas CpNpG) mediante la acción de metiltransferasas (Lindroth et al. 2001). Cuando estas islas están situadas dentro de regiones promotoras de genes y se encuentran metiladas, el promotor tiende a presentar una menor accesibilidad para los factores de transcripción, y como consecuencia el gen se expresa con menor intensidad, llegando frecuentemente a provocar el silenciamiento total del gen.

La metilación del ADN genómico en plantas relacionada con regulación de la expresión génica y diferenciación celular, está asociada a otros procesos implicados, tales como mantenimiento de la integridad genómica, silenciamiento de transposones (Okamoto y Hirochika, 2001), silenciamiento de transgenes (Neves-Borges *et al.* 2001), transmisión de la impronta parental (Azim, 2001), mantenimiento de la estructura cromatínica (Glyn *et al.* 1997; Kass *et al.* 1997; Caiafa *et al.* 1991), etc...

La metilación de promotores específicos varía a lo largo del desarrollo normal del organismo, y también en el caso de procesos patológicos y todo tipo de anomalías fisiológicas. Esto conduce a la aparición de patrones de expresión génica diferenciales, característicos de cada individuo para un determinado estado fisiológico.

Cuantificación del grado de metilación genómica

Hasta hace poco, la medida del grado general de metilación genómica se realizaba por técnicas cromatográficas (cromatografía líquida de alta resolución) o mediante técnicas basadas en el estudio de patrones de restricción mediante el uso de endonucleasas sensibles e insensibles a la metilación del ADN. Sin embargo, estos métodos permiten obtener sólo información sesgada acerca del estado de metilación de algunos puntos concretos del genoma, no permitiendo cuantificar el grado de metilación genómica global.

Estos problemas han sido superados gracias al trabajo realizado por nuestro grupo de investigación. En el último año se ha desarrollado un método rápido y sencillo, de gran exactitud y reproducibilidad, que permite la cuantificación del grado de metilación del ADN genómico (Fraga *et al.* 2000; 2002d). Este método está basado en electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) y permite obtener resultados en tiempos inferiores a 10 minutos.

Aplicaciones del análisis de la metilación genómica: Nuestra experiencia en cultivo de tejidos vegetales (*Pinus radiata* D. Don), en tejidos animales (carne de las razas bovinas asturianas) y en tejidos tumorales humanos.

Desde hace más de cuatro años nuestro grupo de trabajo trata de profundizar en la determinación de relaciones específicas entre contenidos globales de metilcitosina en el genoma y estados fisiológicos determinados en *Corylus avellana* (CAICYT PR860-84), *Eucalyptus globulus* (PT-REC-98-01) y *Pinus radiata* D. Don. (UE-FAIR3-CT96-1445, MCT-AGL2000-2126), prestando especial atención a los procesos de envejecimiento, maduración, revigorización, cambio de fase y floración (Fraga *et al.* 2002a,b,c). Así, podemos constatar que:

6to Coloquio Internacional

- 1.- Selecciones adultas (con capacidad de floración) presentan porcentajes de metilación genómica cercanos al 60%.
- 2.- Selecciones juveniles (sin desarrollo reproductivo) presentan valores del 30%.
- 3.- El cambio de fase induce el incremento el grado de metilación global genómico.
- 4.- La revigorización hacia formas juveniles implica reversión gradual de la metilación.
- 5.- El cultivo *in vitro* implica variaciones en la expresión génica mediadas por cambios en la metilación del ADN genómico.

Los resultados obtenidos con tejidos tumorales, fruto del contacto con el Dr. Manel Esteller (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Carlos III, Madrid), junto con los obtenidos en el análisis en el proceso de oreo de la carne de cebón, constatan la validez como marcador de calidad de los porcentajes relativos de metilación en el genoma.

REFERENCIAS

- Azim Surani, M. 2001. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414: 122-128
- Fraga, M.F., Cañal, M.J., Rodríguez, R. 2002a. Epigenetic and physiologic *Pinus radiata* D. Don phase change-related events. *Planta*, en prensa
- Fraga, M.F., Cañal, M.J., Rodríguez, R. 2002b. *In vitro* morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* D. Don trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 00: 1-7
- Fraga, M.F., Rodríguez, R., Cañal, M.J. 2000. Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 54: 2990-2994
- Fraga, M.F., Rodríguez, R., Cañal, M.J., 2002c. Genomic DNA methylation-demethylation during ageing-reinvigoration of *Pinus radiata* D. Don. *Tree Physiology*, en prensa

Fraga, M.F., Uriol, E., Diego, L.B., Berdasco, M., Esteller, M., Cañal, M.J., Rodríguez, R. 2002d. High performance capillary electrophoresis method for the quantification of 5-methyl-2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues. Electrophoresis, en prensa

Glyn, M.C.P., Egertová, M., Gazdova, B., Kovarik, A., Bezdek, M., Leitch, A.R. 1997. The influence of 5-azacytidine on the condensation of the short arm of rye chromosome 1R in *Triticum aestivum* L. root tip meristematic nuclei. Chromosoma 106: 485-492

Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S., Jacobsen, S.E. 2001. Requirement of chromomethylase3 for maintenance of CpXpG methylation. Science 292: 2077-2080

Neves-Borges, A.C., Collares, W.M., Pontes, J.A., Breyne, P., Farinelli, L., de Oliveira, D.E. 2001. Coat protein RNAs-mediated protection against *Andean potato mottle virus* in transgenic tobacco. Plant Science 160: 699-712

Okamoto, H. & Hirochika, H. 2001. Silencing of transposable elements in plants. Trends in Plant Science 6(11): 527-534

C-09 Expresión génica y epigénica diferencial dependiente de estado de madurez en *Pinus radiata* D.Don. Aplicaciones en la propagación de genotipos élite

Diego, L.B.¹, Berdasco, M.¹, Cañal, M.J.^{1,2}, Fraga, M.F.³, Rodríguez, R.^{1,2}

¹ Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo, España. e-mail: rrodri@correo.uniovi.es

² Instituto Biotecnológico de Asturias, Oviedo, España.

³ Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Carlos III, Madrid, España.

Actualmente son numerosas las especies leñosas, tanto forestales como de producción de fruto, en las que la multiplicación clonal, *in vitro* o *ex vitro*, representa la más rentable vía de producción de planta. Las características que constituyen a un individuo *élite* o *plus*, y que lo convierten en un producto de calidad óptima se diluyen cuando la propagación se realiza en base a cruces, aunque sean controlados.

Por esta razón, la producción de árboles a través de semilla se reserva para los programas de mejora genética, en los que una cierta componente de variabilidad resulta imprescindible para el éxito.

Sin embargo, la observación de la mayoría de los caracteres de interés en cuanto a producción queda restringida únicamente a individuos adultos, que ya han entrado en cambio de fase y son por tanto sexualmente maduros. Por lo tanto, el material vegetal que es objeto de la propagación clonal generalmente conserva poco de la competencia morfogénica característica de los juveniles, debido a los efectos negativos del envejecimiento y la maduración (Fraga *et al.*, 2002c).

Por esta razón, desde 1989 estamos involucrados en el estudio de las bases fisiológicas y moleculares del envejecimiento, la maduración y la manipulación de la competencia morfogénica en especies leñosas. Además, hemos desarrollado técnicas que permiten establecer líneas proliferativas a partir de material adulto en pino radiata. Entre ellas se encuentra el microinjerto homofásico homólogo, que ha demostrado ser una eficaz técnica de revigorización (Fraga *et al.*, 2002a)

Ya que la multiplicación de material adulto en *Pinus radiata* está necesariamente supeditada a la previa revigorización del mismo, se hace necesario el desarrollo de herramientas moleculares que permitan predecir el grado de vigor o juvenilidad recuperado. En este sentido, son numerosos los indicadores moleculares de envejecimiento-maduración, cambio de fase y revigorización que se han validado, principalmente en base a los balances de poliaminas y al grado de metilación del ADN genómico (Fraga *et al.*, 2002b). Con este fin, se han desarrollado metodologías específicas altamente resolutivas que permiten cuantificar los contenidos en 5-metilcitosina y 5-metilcitidina en el genoma mediante *electroforesis capilar de alta resolución (HPCE)* (Fraga *et al.*, 2000, 2002e).

Los porcentajes de metilación genómica encontrados en individuos adultos en fase reproductiva son muy superiores a los de árboles en fase vegetativa. La validez de este marcador de cambio de fase fue corroborada mediante revigorización por macroinjerto en cascada, observándose descensos progresivos en los contenidos de 5-metilcitosina asociados a cada etapa de revigorización (Fraga *et al.*, 2002d).

La cada día más apremiante necesidad de comprensión de las bases genéticas del envejecimiento y la revigorización en especies leñosas ha inducido la profundización en el campo de la genética molecular

forestal. Como consecuencia del análisis comparativo de patrones de expresión génica mediante *differential display* - *RTPCR* en tejidos en diferente estado de madurez fisiológica se han obtenido una serie de cDNAs correspondientes a genes candidatos de posible expresión diferencial dependiente de estado de desarrollo y revigorización. La evaluación de los perfiles de expresión de estos candidatos en tejidos juveniles, adultos y revigorizados se está llevando a cabo en la actualidad mediante análisis Northern. Hasta el momento, los análisis han permitido confirmar la expresión dependiente de estado de madurez de RPT5a, una ATPasa integrante de la subunidad reguladora del proteosoma de 26s.

REFERENCIAS

Fraga, M.F., Rodríguez, R., Cañal, M.J. 2000. Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 54: 2990-2994

Fraga, M.F., Cañal, M.J., Aragonés, A., Rodríguez, R. 2002a. Factors involved in *Pinus radiata* D. Don micrografting. *Annals of Forest Science*, en prensa

Fraga, M.F., Cañal, M.J., Rodríguez, R. 2002b. Epigenetic and physiologic *Pinus radiata* D. Don phase change-related events. *Planta*, en prensa

Fraga, M.F., Cañal, M.J., Rodríguez, R. 2002c. In vitro morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* D. Don trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 00: 1-7

Fraga, M.F., Rodríguez, R., Cañal, M.J., 2002d. Genomic DNA methylation-demethylation during ageing-reinvigoration of *Pinus radiata* D. Don. *Tree Physiology*, en prensa

Fraga, M.F., Uriol, E., Diego, L.B., Berdasco, M., Esteller, M., Cañal, M.J., Rodríguez, R. 2002e. High performance capillary electrophoresis method for the quantification of 5-methyl-2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis*, en prensa

TRANSFORMACION GENETICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

1-01 Marcadores bioquímicos para la detección de tolerancia a estrés hídrico en arroz en condiciones *in vitro*

Aymara García^{*1}, Marilyn Florido ², Regla M. Lara² *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Investigaciones de Riego y Drenaje, Apdo. 6090, Cuba.
e-mail: iird@ceniai.inf.cu

² Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba.

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar posibles marcadores bioquímicos que permitan detectar tolerancia al estrés hídrico en arroz a fin de seleccionar las variedades con mayor resistencia a este factor abiótico. Para ello se utilizaron callos de cuatro variedades cubanas de diferente respuesta al estrés hídrico (Amistad-82, Perla de Cuba, Jucarito-104 e INCA LP-7) que fueron obtenidos en medio MS con la adición de 2,4-D y BAP y posteriormente tratados con el agente estresante polietilenglicol (PEG-6000), polímero usado para la inducción del estrés hídrico. Se determinaron los porcentajes de daños medidos por la estabilidad de la membrana celular para establecer el tiempo óptimo de incubación del explante y las concentraciones de PEG-6000 a emplear en la simulación del estrés. Además, se realizaron análisis electroforéticos de los sistemas isoenzimáticos peroxidasas, esterases, anhidraza carbónica y fosfatasas ácidas y asimismo, se evaluó la actividad de la enzima peroxidasa y los contenidos de prolina y proteínas totales. Los resultados permitieron detectar un comportamiento diferenciado de las variedades en estudio corroborándose su grado de tolerancia al estrés lo cual permitió seleccionar a 5 y 7,5% del PEG-6000 para los trabajos de selección *in vitro* y la utilidad de las isoenzimas peroxidasas, esterases y fosfatasas ácidas, la actividad de la enzima peroxidasa y del contenido de proteínas totales para la discriminación de variedades tolerantes y susceptibles al estrés hídrico.

Palabras clave: arroz, estrés hídrico, marcadores bioquímicos

1-02 Assessment of genetic diversity among Iranian wheat cultivars by using rapid-pcr technique

B. Abdollahi Mandoulakani*, A. A. Shahnejat Bushehri, B.E. Tabatabaei

*Author for correspondence

Dept. of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran. e-mail: delbabak2000@yahoo.com

Assessment of genetic diversity in a crop species is prerequisite to its improvement. The use of germplasm with distinct DNA profiles will help to generate genetically diversified breeding populations. The aim of this investigation was to study genetic diversity among Twenty-eight Iranian wheat cultivars and advanced breeding lines. Forty primers of a 10-mer selected randomly and tested for samples. Eight of these primers showed scorable polymorphic bands. The genetic similarity (Sij) ranged from 41% to 91% with an average of 64%. Cluster analysis was performed by simple matching coefficients. Unweighted pair-group method with arithmetic averages dendrogram revealed the existence of two clusters. Each cluster was divided into subgroups. Therefore, this experiment showed that genetic diversity is low and it is necessary to extend the genetic base of Iranian wheat cultivars and advanced breeding lines.

Key words: DNA, genetic diversity, genetic transformation, RAPD

1-03 Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de suspensiones celulares embriogénicas de plátano cv híbrido FHIA 21(AAAB)

Boris Chong*, Dion Daniels, Rafael Gómez Kosky, Idalmis Bermúdez, Maritza Reyes, Bárbara Ocaña. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, C.P. 54830, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Fax: (53-42) 281329, e-mail: boris-chong@yahoo.es

El mejoramiento genético de plátanos y bananos es de gran importancia por el nivel de consumo de estos en el ámbito mundial. La transformación genética constituye una vía alternativa para el mejoramiento genético y ha venido a complementar las metodologías tradicionales. En este trabajo se estudian mediante la expresión transitoria de la β -glucuronidasa algunos parámetros de la transformación genética de plátano cultivar híbrido FHIA-21 mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Se hace un estudio con las cepas AT-2260 y EHA-105, ambas con el plásmido pCambia-3301. Se realizó una comparación entre los tiempos de infección y tiempos de cocultivo. La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* de mejor comportamiento fue la EHA-105. En el estudio del tiempo de infección y de cocultivo la mejor combinación resultó ser la de dos horas de infección y seis días de cocultivo.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*, *FHIA 21*, *plátano*, *suspensiones celulares*, *transformación genética*

1-04 Indicadores bioquímicos y fisiológicos de diferentes hojas de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) para estudios de maduración

Yanelis Capdesuñer*, María Blanco, Janetsy Borroto, Alfredo González, Hipólito Peralta. *Autor para correspondencia

Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón, Km. 9. Ciego de Ávila. Cuba. e-mail: biometab@bioca.unica.cu

En el trabajo se exponen los resultados del análisis del contenido de humedad, azúcares totales y sacarosa, determinaciones enzimáticas de invertasas ácidas y nitrato reductasa de diferentes hojas de la caña de azúcar (Variedad C1051-73) con el objetivo de estudiar comparativamente el comportamiento de algunos procesos fisiológicos y bioquímicos en busca del mejor indicador foliar para estudios de maduración de la caña. Se obtuvieron resultados convenientes en la hoja +1, la más desarrollada de las hojas jóvenes, apareciendo para algunos análisis diferencias significativas con respecto al resto de las hojas analizadas.

Palabras clave: *caña de azúcar*, *indicadores bioquímicos*, *maduración*

1-05 Transformación genética de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y arroz (*Oryza sativa*) mediante un procedimiento común utilizando *Agrobacterium tumefaciens*

Yamilet Coll^{2*}, Pilar Téllez², Maylin Pérez⁽¹⁾, Mercedes Mederos², Camilo Ayra², Lázaro Hernández², Merardo Pujol². *Autor para correspondencia

¹ CIGB Sancti Spiritus, Departamento de Plantas y Enzimas, A.P. 83, C.P. 60200 Sancti Spiritus, CUBA.

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), División de Plantas, A.P. 6162, C.P. 10600, La Habana, Cuba; e-mail: yamilet.coll@cigb.edu.cu

La transformación genética de plantas requiere el uso de procedimientos que son particulares para cada especie o variedad.

Por ello, en los laboratorios que desarrollan trabajos de ingeniería genética con diferentes especies o variedades usualmente se manejan en paralelo diversos procedimientos, lo cual complica sustancialmente el trabajo. Con el objetivo de simplificar el trabajo de ingeniería genética, aquí se describe el establecimiento de un método común para la transformación genética de callos de caña de azúcar y arroz. El referido protocolo aprovecha técnicas particulares de cultivo celular y regeneración de plantas previamente establecidas en nuestros laboratorios para caña y arroz, pero comparte los pasos relativos a la transformación genética en ambas especies. Para ello, se utilizó el gen reportero GUS en la detección de callos transformados, y la resistencia a Basta e higromicina como marcadores de selección para la obtención de plantas transgénicas de caña y arroz respectivamente. Entre los factores que favorecen la plasticidad de este procedimiento se cuenta el uso de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, el empleo de medios de alta eficiencia para la infección y el co-cultivo, así como la incubación a temperaturas óptimas para la infección por *Agrobacterium*.

Palabras clave: arroz, caña de azúcar, transformación genética, *Agrobacterium tumefaciens*

1-06 Expresión transitoria de la β -GLUCURONIDASA en suspensiones celulares del cultivar Híbrido FHIA-21 (AAAB)

Dion Daniels*, Rafael Gómez Kosky, Boris Chong, Leticia Mas, Idalmis Bermúdez, Maritza Reyes Vega, Carlos Pereira Marín. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 $\frac{1}{2}$. CP 54830. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: dion.daniels@belizemail.net

Se realizó el presente trabajo con el objetivo de estudiar algunos parámetros que influyen en la expresión transitoria de la enzima β -glucuronidasa en suspensiones celulares del cultivar híbrido FHIA-21 (*Musa* sp. AAAB). Se realizaron estudios de tres distancias y cuatro presiones de disparo. Los resultados en este experimento revelaron la importancia de la distancia y la presión del bombardeo, con la más efectiva siendo 12 cm y 140 psi respectivamente con diferencia estadística entre los demás tratamientos. También se

estudiaron diferentes plásmidos y se queda demostrado que no todos se comportan de la misma manera. Los plásmidos bajo el control del promotor de la poliubiquitina del maíz mostraron mejores eficiencias que el promotor 35S CaMV. El factor biológico también es de mucha importancia. La edad fisiológica de las suspensiones celulares confirmó que juega un papel fundamental en la eficiencia de la transformación con mejores resultados cuando se usaron suspensiones celulares de 5 a 10 días después del subcultivo.

Palabras clave: bombardeo, micropartículas, Musa, transformación

1-07 Preliminary results in *Carica papaya* var. Maradol Roja transgenic plants obtaining with delay in fruit ripening

Edrey A. Rodríguez*, Javier Varona, Neyda Bacallao, Elio Jiménez.

*Author for correspondence

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: edrey@uclv.edu.cu.

Papaya constitutes an item of potential economic importance for countries of the Tropical region. However, the post-harvest losses of Maradol Roja cultivar, the most important in Central America, have been up to 80%, due to the quick ripening of their fruits. With the objective of obtaining transgenic plants with a retard in fruit ripening, we have isolated the *accx1* gene encoding for the ACC Oxidase of the Maradol Roja variety and constructed vectors for *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation with this gene in antisense orientation.

Key words: ACC Oxidase, antisense, ethylene

1-08 Caracterización citogenética e isoenzimática de variedades cubanas de tabaco negro (*Nicotiana* sp.)

Enid Pérez^{1*} Clara González² María I. Román³, Xonia Xiqués², Marlyn Valdés², Humberto García¹, Eumelio Espino¹, Vivaldo García⁴ *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Investigaciones del Tabaco e-mail: iitabaco@sap.esihabana.cu

² Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Ciudad Habana.

³ Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales. Villa Clara.

⁴ Estación Experimental del Tabaco de San Juan y Martínez. Pinar del Río.

Con el fin de estudiar la variabilidad genética de cuatro variedades de tabaco negro de interés económico ('Habana-92', 'Habana-2000', 'Criollo-98' y 'Corojo-99') y sus progenitores ('Habana P.R', 'Habana 2.1.1', 'Corojo', 'RxT') se efectuó el análisis isoenzimático para los sistemas peroxidasas, polifenoloxidasas, esterazas, y anhidraza carbónica. Las corridas electroforéticas fueron realizadas en gel de poliacrilamida al 10% con buffer de corrida Tris Glicina 0.04M pH= 8.3. El análisis de los electroforetogramas se realizó utilizando el programa MAT-GEN para obtener la matriz de similitud por el índice de Apóstol o Simple Matching. La matriz de similitud fue procesada por un análisis de agrupamiento. Además se efectuó el análisis de la meiosis de todas las variedades estudiadas en botones florales inmaduros cuyas anteras fueron teñidas con acetorceina al 4%, fueron observadas 100 células por fase con aumento de 400x y 1 000x.

El análisis de Cluster permitió agrupar el material en tres grupos de afinidad: el grupo I formado por las variedades 'Corojo' y 'RxT', el grupo II incluyó las variedades 'Haban P.R', 'Habana 2.1.1' y 'Habana-92' y el grupo III formado por 'Habana-2000', 'Criollo-98' y 'Corojo-99'. El análisis de la meiosis mostró que todas las variedades tienen procesos meióticos regulares y su número cromosómico es $2n=48$.

Palabras clave: anhidraza carbónica, esterazas, isoenzimas, Nicotiana tabacum, peroxidasas, polifenoloxidasas

1-09 Expresión transitoria de la B-glucuronidasa en papaya empleando una pistola de genes de baja presión

Leticia Mas*, Boris Chong, Rafael Gómez, Jorge Gallardo, Idalia Herrera, Maritza Reyes. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní 5 ½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: leticiamas@yahoo.es

El mejoramiento genético de la papaya (*Carica papaya* L.) es de gran importancia por su comercialización en el ámbito mundial. En este sentido la biobalística como método de transformación genética constituye una vía alternativa. Utilizando una pistola de genes de baja presión embriones somáticos de papaya fueron bombardeados con el plásmido pCAMBIA3301. Los ensayos fueron evaluados por análisis histoquímico del gen *gus*. Se llegaron a condiciones óptimas de bombardeo lográndose la expresión transitoria de la B-glucuronidasa en embriones somáticos de papaya con una frecuencia máxima de 77.8 puntos azules por 100 mg de embriones somáticos.

Palabras clave: B-glucuronidasa, bombardeo, microparticulas, papaya

1-10 Fragmentos de ADN obtenidos de mutantes de la variedad B 4362 con resistencia a la roya de la caña de azúcar

María I. Oloriz*, Luis Rojas, Elio Jiménez. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54830. e-mail: moloriz@yahoo.es

La respuesta hipersensible es uno de los mas poderosos mecanismos por el que las plantas resisten el ataque de patógenos, mutaciones realizadas previamente sobre la variedad B4362, de caña de azúcar, originó cinco mutantes que expresan este mecanismo frente al ataque de la roya (*Puccinia melanocephala*). A partir de estas variantes genética fue posible mediante AFLP (amplified fragment length polymorphism) aislar fragmentos del ADN diferenciales con respecto al genotipo donante susceptible. Suponemos que estas secuencias estén involucradas en la respuesta de hipersensibilidad que presentan estos mutantes frente a la infección del patógeno.

Palabras clave: ADN, AFLP, caña de azúcar, roya

1-11 Estudio de la afinidades genéticas en clones de yuca (*Manihot esculenta* crantz) de importancia económica para Cuba

Marlyn Valdés^{1*}, Maria Isabel Román², Clara González¹, Xonia Xiqués¹, Yoel Beovides², Sergio Rodríguez². *Autor para correspondencia

¹ Facultad de Biología Universidad de la Habana. e-mail: cglez@fbio.uh.cu

² Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales.

Se determinan las afinidades genéticas entre 12 clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), a partir del estudio de los sistemas isoenzimáticos peroxidasa, polifenoloxidasas y anhidrasa carbónica. Se empleó para el análisis de los resultados el programa MAT-GEN. Todos los sistemas enzimáticos estudiados resultaron polimórficos, con el mayor grado para las isoenzimas anhidrasa carbónica. El dendrograma mostró la formación de cuatro grupos de acuerdo a las relaciones filogenéticas entre los clones estudiados.

Palabras clave: afinidad genética, clones, yuca, sistemas isoenzimáticos

1-12 Comportamiento de diferentes explantes de arroz en la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Maylin Pérez*, Daymi Abreu, Annerys González, Julio Alfonso, Onel Valdivia, Carlos Hernández, Eduardo Aguiar, Raúl Armas. *Autor para correspondencia.

Grupo de Plantas y Enzimas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus. e-mail: maylin@cigbss.ssp.sld.cu

En este trabajo se describe el comportamiento de cuatro explantes de arroz: coleótilos, callos embriogénicos, callos primarios y embriones maduros, en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*, mediante el protocolo establecido para variedades cubanas en nuestro laboratorio. Como parámetro para evaluar la eficiencia de transformación se utilizó la actividad transitoria GUS. Los mejores resultados se obtuvieron con los callos embriogénicos, con un 37% de eficiencia de transformación y un promedio de 11.20 puntos azules por callo transformado. En los callos primarios y los coleótilos también fue detectada la expresión de la β -Glucuronidasa, no siendo así en los embriones, donde la infección bacteriana causó daños tisulares importantes. Se demuestra la versatilidad del procedimiento de transformación aplicado en diferentes tejidos de la variedad de arroz IACuba-28.

Palabras clave: actividad transitoria, β -Glucuronidasa, callos embriogénicos

1-13 Optimización de los procedimientos de regeneración-selección para la obtención de plantas transgénicas de papa var. Désirée resistentes al herbicida comercial BASTA

Natacha Soto, Alberto Salazar*, Gil A. Enríquez, Milagros Ponce, Kenia Tiel, Merardo Pujol. *Autor para correspondencia

División de Plantas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), P.O. Box 6162, Habana 10600, Cuba.
e-mail: salazar@cigb.edu.cu

La regeneración de plantas transgénicas a partir de explantes transformados es un paso esencial para el mejoramiento genético mediante la utilización de las técnicas de Ingeniería Genética. En la primera parte del presente trabajo se describen los experimentos encaminados a la optimización de los procedimientos de regeneración *in vitro* de papa var. Désirée, a partir de explantes de hojas y tallos. Los brotes obtenidos de segmentos de tallos presentaron mejor definición morfológica que aquellos regenerados a partir de hojas. Para la transformación genética de papa con *Agrobacterium tumefaciens* portando el pCAMBIA 3301 se utilizaron explantes de hojas y segmentos de tallos. Los brotes transgénicos fueron seleccionados en BASTA a 2 mg.l⁻¹. Los explantes de tallo produjeron mayor cantidad de plántulas transgénicas, morfológicamente mejor definidas, que los de hojas. El evento de transgénesis fue comprobado mediante actividad GUS, PCR y Southern blot. La resistencia a herbicida de los clones transgénicos es actualmente evaluada en casas verdes y parcela experimental.

Palabras clave: papa, regeneración, resistencia a herbicidas, transformación genética

1-14 Expresión de proteínas relacionadas con patogenicidad (PRs) en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) inducidas por micorrizas arbusculares y sistemina

Noval, B. M. de la^{1*}, Vázquez, M.S.², Martínez, N.², Délano, J.P.², Olalde, V.² *Autor para correspondencia

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carr. Tapaste, Km. 3.5, Gaveta Postal No 1, San José de las Lajas 32 700, La Habana. Tele/Fax- 0.64.63867. e-mail: bdelanov@inca.edu.cu

²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN, Unidad Irapuato, México.

En el presente trabajo se determinó la expresión de proteínas relacionadas con patogenicidad (PRs) en plántulas, inducidas por el Hongo Micorrízico Arbuscular (HMA) *Glomus clarum* y el polipéptido sistemina en dos variedades de tomate (*L. esculentum* Mill). Se encontró que en el tomate se produce la expresión constitutiva de las PR estudiadas, con un efecto varietal en la expresión de β -1,3-glucanasas, dado por la cuantificación de la actividad enzimática, donde la var. «Amalia» superó a «Río Fuego». La sistemina indujo un incremento transitorio de la actividad β -1,3-glucanasas en raíz a los dos días post germinación, el que fue rápidamente atenuado, para producirse posteriormente un segundo pico de inducción, el cual puede deberse al incremento de la intensidad del hongo en la raíz, que coincide con el % de DV observado. En el tejido foliar, a pesar de que se observa baja actividad, con relación al obtenido en raíz, en la combinación sistemina-HMA se encontró un efecto sinérgico. Con relación a la actividad quitinasa se observó que la colonización con *G. clarum* promovió un incremento, con efecto sinérgico con la sistemina. De forma general, se observó la inducción de las PRs estudiadas de forma sistémica con la combinación del HMA y la sistemina la cual podría contribuir al efecto protector sistémico contra patógenos observado en las plantas micorrizadas.

Palabras clave: *Lycopersicon esculentum*, micorrizas, patogenicidad, quitinasa, tomate

1-15 Production of pineapple transgenic plants assisted by temporary immersion bioreactors

Patricia Espinosa^{1*}, José C Lorenzo¹, Alitza Iglesias¹, Lourdes Yabor¹, Eduardo Menéndez², Janetsy Borroto¹, Lázaro Hernández², Ariel D Arencibia² *Autor para correspondencia

¹ Bioplant Center, University of Ciego de Avila, Carretera a Morón Km. 9, CP 69450, Cuba. e-mail: patricia@bioplasmas.cu

² Plant Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), P.O. Box 6162, 10600 Havana, Cuba. e-mail: ariel.arencibia@cigb.edu.cu

A novel procedure for production of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) transgenic plants was developed involving selection by micropropagation in temporary-immersion bioreactors (TIBs). Pineapple calli ranging 1.5-2.0 mm co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* strains AT2260 (pIG121Hm) and LBA4404 (pTOK233) for 24 hours produced the highest percentage (40%) of GUS⁺ calli. Phosphinotricin and hygromycin, but not kanamycin, were effective selection markers in TIBs. Large-scale transformation experiments with AT2260 (pHCA58) and AT2260 (pHCG59) showed up to 6.6% efficiency of transgenic plant recovery. TIB technology was more efficient for transgenic plant selection than using conventional micropropagation. PCR and genomic Southern blot analysis confirmed the non-chimeric nature of the transgenic plants recovered from TIBs.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, Temporary immersion bioreactor, Transgenic pineapple

1-16 Protocolo de regeneración y transformación transitoria de zanahoria mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Rolando García^{1*}, Bárbaro Usatorres¹, Y. Rosabal², A. López², D. Somonte¹, J. Bacallao², S. Casas¹. *Autor para correspondencia

¹ División de Plantas Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Camagüey. P.O. Box 387, C.P. 70100. Camagüey, Cuba.

² División de Plantas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad Habana. P.O. Box 6162, C.P. 10600. Ciudad Habana, Cuba. Dirección actual: Estación Experimental Forestal, Camagüey. P.O. Box 405, C.P. 70100. Camagüey, Cuba. e-mail: estafor@minag.cmw.inf.cu

La zanahoria es un cultivo de amplio uso en el campo de la biotecnología vegetal debido a su gran versatilidad para ser manipulada *in vitro*. En este trabajo nosotros estudiamos diferentes condiciones para regenerar y transformar eficientemente este cultivo. Los estudios de regeneración incluyeron la evaluación de epicótilos, hipocótilos y peciolo de la variedad New Kuroda para determinar

el mejor tipo de explante. Se evaluaron diferentes combinaciones hormonales que incluyeron la combinación de las citoquinina 6-Benzilaminopurina y las auxinas Acido Naftalenacético y Acido 1,3 Indolacético a diferentes concentraciones. Las mejores frecuencias de regeneración se obtuvieron para los hipocótilos cultivados en medio MS suplementado con Acido Naftalenacético a 0.5 mg/l⁻¹. Los brotes fueron obtenidos a las cuatro semanas de ser plantados los explantes. También, establecimos condiciones eficientes para la transformación de zanahoria mediada por *Agrobacterium tumefaciens* a partir del estudio de varios de los factores que afectan la eficiencia de transformación. Estos estudios incluyeron la influencia del medio de transformación, el tiempo de transformación, el preacondicionamiento de los explantes y la influencia del medio de regeneración.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*, regeneración, transformación genética, zanahoria

1-17 Transformation of *N. benthamiana* with the replicase of Beet western yellow virus

Sofía Valenzuela^{1,2*}, Guido Laucke¹, Joachim Schiemann¹.

* Author for correspondence

¹ Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Messeweg 11/12, 38106, Braunschweig, Germany.

² Present address Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Casilla 160-C Concepción Chile. e-mail: sofvalen@udec.cl

N. benthamiana plants were transformed by means of *A. tumefaciens* with either the viral replicase (ORF1/2), one of two smaller sequences involving the 5' and 3' ends (5'3'S and 5'3'AS) of the genome of BWYV or with the pBin19 vector alone (Kp). In total ca. 120 kanamycin (Km) resistant plantlets were generated. Of these 115 were positive by NPTII ELISA and/or PCR for the transgene (50, 24, 25 and 16 plants containing the ORF1/2, 5'3'S, 5'3'AS and Kp, respectively). Plants were transferred to the greenhouse and allowed to self-pollinate. Seeds from the primary transformants (To) were collected and tested for segregation on different Km concentrations (100 to 300 mg/l). Seeds from ca. 30% of the lines tested did not germinate or had a poor growth at these antibiotic

concentrations. According to different criteria such as levels of NPTII ELISA of To lines, PCR, growth at 200 mg/l of Km and phenotype some lines were chosen as candidates to be tested for resistance against BWYV. 5 lines of each construct were randomly selected. These lines were analysed by Northern blot for expression of the transgene and/or the nptII gene. Different levels of expression of the transgene were found.

Greenhouse resistance tests were performed twice (from June to August 1999 and August to October 1999). 15 transgenic *N. benthamiana* lines (5 per construct) as well as two controls (vector transformed and untransformed plants) were tested. Km resistant plantlets were transferred to the greenhouse and 20 plants from each line were inoculated with BWYV by means of green peach aphids (*Myzus persicae*), while other 20 were kept as uninoculated control. At 4, 6 and 8 weeks post infection (wpi) an BWYV ELISA of the inoculated plants was carried out and the height of each plant was measured, while the weight was determined at the end of the experiment (8 wpi). All 5'3'AS lines tested were susceptible to BWYV. Although plants from line SV 77 had low ELISA values at all times tested their final weight and height were similar as the infected controls.

Two 5'3'S transgenic lines (SV 33 and SV 134) were slightly protected against BWYV. Inoculated plants of line SV 33 had lower ELISA values at 8 wpi than at 4 wpi and as the rest of the lines tested. The final height and weight of these plants was ca. 80% of the respective uninoculated plants. A large number of "protected" plants of line SV 134 were found mainly in the second resistance test.

Three ORF1/2 lines (SV 98, SV 108 and SV 117) seemed to have a weak protection against the virus. A large number of inoculated plants of lines SV 98 and SV 108 reached similar final weight and height as the uninoculated control and had low ELISA values at 8 wpi. Line SV 117 had a weak protection in the first greenhouse resistance test, while in the second test ca. 90% of the plants were susceptible to BWYV. It is possible that the different response observed in this line was due to environmental conditions. No correlation was found between levels of expression of the transgene and degree of protection. Only for line SV 108 an inverse correlation was found.

In summary all transgenic *N. benthamiana* lines tested were susceptible to BWYV. Despite these results 3 lines seemed to have a weak protection against the virus (SV 33, SV 98 and SV 108), therefore it should be interesting to further test them.

Keywords: *agrobacterium tumefaciens*, beet western yellow virus, *N. benthamiana*, transformation

1-18 Diversity in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*: Molecular biological studies of a clonal lineage of the *Fusarium* wilt pathogen of banana

Marinda Visser*, Altus Viljoen. *Author for correspondence

Department of Microbiology and Plant Pathology, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, Pretoria 0002, South Africa. e-mail: aviljoen@fabi.up.ac.za

Fusarium wilt of banana, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (*Foc*), has spread with infected planting material from Southeast Asia to almost all countries where bananas are grown. Phenotypic and genotypic analysis of the worldwide population of *Foc* has divided the fungus into three races, 21 vegetative compatibility groups (VCGs), 31 genotypes, nine fingerprinting groups, five clonal lineages, and two clades. The greatest diversity of the fungus can be found in Southeast Asia, and the dominant VCG is VCG 0120. In this study, genetic and molecular approaches were used to compare isolates of *Foc* from South Africa with a set of isolates representing all VCGs and races of *Foc*. All South African isolates belong to VCG 0120. Pseudoperithecia without ascospores were produced on carrot agar when isolates of *Foc* were paired in all combinations as males and females. By using *mat-1* and *mat-2* specific primers, it was determined that only the *mat-2* gene exists in *Foc*. Analysis of the nuclear and mitochondrial regions showed that the South African isolates are similar to VCG 0120 isolates from around the world. This study suggests that diversification of *Foc* is slow and independent of the area where the fungus was introduced. The large number of VCGs present in Southeast Asia probably developed over a very long period, and not because of frequent mutations or sexual recombination.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, pathogen, banana, molecular biology

1-19 Strategies to correct the nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* cry 3A synthetic gene affected by Taq pol polymerization

Irene Alvarez*, Tania Olivera, Rolando Morán *Author for correspondence

Plant Molecular Biology Laboratory. Center for Genetic Engineering and Biotechnology P.O. Box 387 Camagüey 70100. Cuba. e-mail: irene.alvarez@cigbcam.cigb.edu.cu

A strategy to obtain high expression levels of Cry3A toxin in transgenic plants based on ligation and amplification of synthetic DNA fragments was carried out. As a consequence of an amplification process of the previously ligated fragments mediated by Taq Polymerase, several clones were obtained. Every clone had at least more than 99% of homology with the expected nucleotide sequence. Fragments were correctly assembled, however some slight nucleotide differences compared with the expected sequence were observed. Base substitutions were distributed along the gene. Also, some single base deletions were obtained after the amplification process. Some approaches were established to obtain the appropriate sequence. The use of the high fidelity Pfu polymerase having as template the ligation products of component fragments, was the first one. A clone containing the fragments 4-5 with the appropriate restriction pattern was obtained. Sequencing results showed 100% of homology with the expected sequence. Three additional clones containing all five fragments with the expected restriction pattern were also obtained. Sequencing results are still in progress. Site-directed mutagenesis process was performed as another alternative using 22 mer mutagenic oligonucleotides, properly designed for correcting the changes. The Gene Editor Site-Directed Mutagenesis System from Promega was used in this last approach. Sequencing results of the positive clone are in progress.

Keywords: Bacillus thuringiensis, directed mutagenesis, d-endotoxin, Pfu polymerase, synthetic gene, Taq polymerase

1-20 Synthetic construct for high expression levels of cry3A gene in transgenic plants

Rolando Morán*, Irene Alvarez, Tania Olivera, Zurima Zaldúa *Author for correspondence

Plant Molecular Biology Laboratory, Center for Genetic Engineering and Biotechnology. P.O.Box 387. Camagüey 70100 Cuba
e-mail: rolando.moran@cigbcam.cigb.edu.cu

To obtain transgenic sweet potato plants resistant to weevil attack through high expression levels of the bacterial *cry3A* gene, a strategy including a synthetic version of the gene was designed. Five DNA fragments were synthesized. As every DNA fragment had sticky ends to properly match with the following and/or previous fragment, ligation reaction rendered mainly five fragments in the expected arrangement. The amount of DNA was not enough to be cloned directly, so amplification was done by P.C.R using Taq Polymerase. The 1833

bp band obtained as P.C.R. product was cloned in a pBluescript *E.coli* vector. Positive clones were chosen according to the restriction pattern and sequenced using M13 forward, M13 reverse and three internal primers. Nucleotide differences compared with the expected sequence were observed in all clones. It was also observed that some single base deletions, located in a region between positions 1711 and 1726 were obtained. The analysis of the effect of all these modifications is still under study. To obtain a construct with the appropriate sequence, both polymerization with high fidelity Pfu Polymerase as well as site directed mutagenesis were carried out. As result of Pfu polymerization, four clones were selected by restriction and submitted to sequence. The same number of restriction confirmed clones was obtained by combining Taq/Pfu Polymerases. In the case of site-directed mutagenesis, one clone confirmed by restriction was selected for sequencing. Several strategies have been recently designed in order to speed the obtainment of the construct exhibiting the expected sequence.

Keywords: Bacillus thuringiensis, synthetic cry gene, sweet potato, transgenic plants

1-21 Clonación de un Gen Sintético de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* y obtención de Plantas transformadas de Boniato (*Ipomoea batatas*) mediante el empleo de *Agrobacterium tumefaciens*

Zurima Zaldúa*, Alina López, Rolando García, Danalay Somontes, Irene Alvarez, Rolando Morán *Autor para correspondencia

División de Plantas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camaguey. Apartado Postal 387, Camaguey 70100, Cuba.
e-mail: zurima.zaldua@cigbcam.cigb.edu.cu

Las plantas constituyen un enorme destinatario para las aplicaciones de la ingeniería genética. Con el uso de un gen nativo procedente del B.t.t. para conferir resistencia a insectos, se obtuvieron en nuestro grupo de trabajo plantas tolerantes al ataque de insectos del orden Coleóptero. Sin embargo, la expresión de la toxina codificada por este gen resultó muy baja, ya que el uso de codones no era específico de plantas. Por esta razón, se hizo necesario obtener plantas transgénicas con alta expresión de esta endotoxina. En este trabajo se describe cómo se obtuvo una construcción molecular portadora de un gen sintético cry3A, la cual fue producto de la

ligación de cinco fragmentos de ADN de 200 a 400 pares de bases sintetizados en un ensamblador de genes y posteriormente amplificados por P.C.R. También se describe la obtención de su secuencia completa, así como su clonación en los vectores que le confieren las regiones regulatorias y finalmente su clonación en el vector de transformación de plantas pDE1001. Posteriormente se transformó *Agrobacterium tumefaciens* y se procedió a transformar y regenerar plantas de boniato. Con esta construcción, portadora del gen sintético truncado según los resultados de la secuenciación, se obtuvieron 50 clones de plantas transgénicas, las cuales en estos momentos están en fase de adaptación en macetas, con la intención de determinar la actividad biológica frente al ataque del Tetuán.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens, ingeniería genética, insectos*

1-22 Obtención de brotes transformados y regenerados de Boniato (*Ipomoea batatas*) resistentes a basta

Bárbaro Usatorres*, Danalay Somontes, Tamara Alvarez *Autor para correspondencia

División de Plantas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camaguey. Apartado Postal 387, Camaguey 70100, Cuba
e-mail: Bárbaro.Usatorres@cigbcam.cigb.edu.cu

La transformación de plantas se ha convertido en una vía importante para el desarrollo y aplicaciones de la ingeniería genética, con vertientes tan diferentes como la protección ante factores bióticos y abióticos, en el mejoramiento de la producción de frutos, semillas y vegetales o la creación de nuevas variedades de flores y plantas ornamentales, así como también la adaptación a condiciones abióticas extremas.

La búsqueda de una solución para la rápida obtención de brotes de plantas que tengan expresión de un gen de resistencia al ataque del Tetuán del Boniato y su posterior introducción, se ha emprendido en nuestro país. Por esta razón ha surgido la necesidad de establecer una metodología de regeneración y transformación genética para este cultivo. De igual modo, la optimización de las metodologías que se van originando, constituye un objetivo permanente a tener en cuenta en los trabajos de regeneración y transformación que se desarrollan en nuestro laboratorio.

Después de realizar un amplio estudio donde se evaluaron diferentes factores como: combinaciones de reguladores del crecimiento, tipos de explantes y otros, logramos establecer una metodología eficiente de transformación y regeneración de hojas de boniato en un medio suplementado con 0.5 mg.l⁻¹ de ANA y 0.1 mg.l⁻¹ de BAP.

El establecimiento de esta metodología facilita el camino hacia el objetivo final del proyecto: La obtención de plantas transgénicas resistentes al Tetuán del Boniato con una alta eficiencia de regeneración.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens, regeneration, sweet potato, transformation, photoperiod*

1-23 Use of RAPD for study of Genetic diversity in Brassica napus L. cultivars

S.P.Kiani^{1*}, A.A.SH.Booshehrh, B.A.S.Tabatabai *Author for correspondence

M.Sc Student and Associate Professors, Respectively Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tehran. Karaj, Iran. ¹e-mail: spkiani@yahoo.com

50 Single decameric primers of arbitrary nucleotide sequence were used for Investigation of Genetic diversity among 28 *Brassica napus* Cultivars. 9 primers produced polymorphic bands. Amplification reactions resulted in fragment ranging in length from 50-1650 bps. Polymorphic bands were scored for the presence (1) or absence (0) and Proximity Matrix was calculated using Simple matching coefficients. Genetic distance dendrogram drawn using cluster analysis. Cultivars were classified on 3 groups. The production of polymorphic bands resulted in classification of cultivars and identification of polymorphism suggested that RAPD Marker is suited to study polymorphism in *Brassica napus*.

Key words: *Genetic diversity, Brassica napus, RAPD*

1-24 Approaches and progress in molecular plant-pathogen interaction: Basic aspects for plant breeding

Ramón Santos Bermúdez

Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Avila. Carretera a Morón Km 9. Ciego de Avila. CP69450. Cuba. e-mail: rsantos@bioplasmas.cu

Plants possess multiple mechanisms to protect themselves against pathogen attack. Specific pathogen recognition mechanisms, governed by resistance gene products that interact with matching avirulence gene products from the pathogen, usually lead to a hypersensitive response at the site of pathogen invasion, keeping the pathogen isolated from the rest of the plant. Nowadays, various research projects have been carried out involving the isolation of both resistance and avirulence genes as well as the study of different signal transduction pathways. Our topic focuses on plant-fungus interaction at biochemical and molecular level, several approaches developed by a critical mass of researchers and some results to provide a better understanding of basic host-pathogen interaction for plant breeding will be reviewed.

Keywords: pathogen, plant fungus, plant pathogen, virus

1-25 Determinación del probable progenitor masculino del híbrido ‘maribel’ por electroforesis de isoenzimas y proteínas totales

Giselle Sosa*, M. Aranguren, L. Bello, N. del Valle. *Autor para correspondencia

Estación Experimental de Cítricos, Jagüey Grande, Matanzas.

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en lámina vertical se determinó el probable progenitor masculino del híbrido ‘Maribel’, a través del estudio del comportamiento de los patrones isoenzimáticos de peroxidasas, catalasas y proteínas totales, empleando extractos foliares de los tres progenitores masculinos más probables por su cercanía a la planta madre: Tangor ‘Temple’ (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osb.), naranja ‘Shamouti’ (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) y pomelo ‘Star Ruby’ (*Citrus paradisi* Macf.). Se determinó el coeficiente de similitud entre el híbrido y sus posibles progenitores. Los análisis electroforéticos mostraron mayor número de bandas comunes e índice de similitud entre el híbrido y la naranja ‘Shamouti’.

Palabras clave: electroforesis, cítricos, mandarina, transformación

1-26 Expresión de la Proteína Fluorescente Verde (GFP) en Bacterias Nitrofixadoras endófitas de la caña de azúcar

Maria Irene Balbín¹*, Diethelm Kleiner², Eduardo Ortega³, Loiret Fernández³. *Autor para correspondencia

¹ Universidad Agraria de La Habana. San José de Las Lajas. La Habana.

² Universidad. de Bayreuth, Alemania

³ Universidad de La Habana.

La Proteína Fluorescente Verde (GFP) ha sido muy utilizada como marcador visual de varias estructuras o microorganismos. En este trabajo se transformaron con el gen de la GFP, dos microorganismos nitro fijadores endófitos de la caña de azúcar. Para la transformación se construyó, a partir de los plásmidos pBr322 y pMN402, un nuevo plásmido al que denominamos pMIBA. Los microorganismos empleados fueron, una cepa autóctona de Cuba, de *Gluconacetobacter diazotrophicus* y una bacteria Gram negativa también nitro fijadora y endófito de la caña de azúcar, no identificada totalmente, ambos aislados de la variedad ML 318. Los microorganismos fueron transformados mediante el método de electroporación, y expresaron la Proteína Fluorescente. La transformación se comprobó por observaciones al microscopio de fluorescencia donde se observó claramente la luz emitida por los microorganismos transformados.

Palabras clave: caña de azúcar, GFP, Gluconacetobacter diazotrophicus, transformación, electroporación

1-27 Isolation of an ACC Oxidase cDNA fragment expressed during Dwarf Guava fruit ripening

Guillermín Aguero*, Edrey Rodríguez, Neyda Bacallao, Elio Jiménez.

*Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5.5 santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830 Cuba, e-mail: chapin@uclv.edu.cu

Isolation and cloning of a cDNA fragment encoding ACC oxidase from ripe guava fruit by RT-PCR is described in this report. It is the early step to apply antisense technology for ripening control in guava fruits through genetic transformation. ACC oxidase cDNA fragment was isolated using Ready To Go™ RT-PCR Beads system and was cloned into the pGEM T-esay vector. The Sequence analysis showed a high homology percentage (84-94%) with other reported cDNAACC oxidases.

Key words: antisense, ethylene, Psidium guajava, ACC, cDNA, PCR

CULTIVO DE CELULAS Y TEJIDOS

2-01 Regeneración de plantas *in vitro* a partir de diferentes explantes del árbol del Nim (*Azadirachta indica* A. Juss)

Amelia Capote Rodríguez*, Jesús Estrada Ortiz, Odalys Pérez Díaz.

*Autor para correspondencia

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

La capacidad para la regeneración de plantas a partir de diferentes explantes del Nim fue estudiada con el objetivo de proponer una metodología que permita la propagación masiva de esta especie. Se seleccionaron ápices, segmentos nodales y frutos inmaduros, y se evaluó la eficiencia de diferentes tratamientos desinfectantes. Los resultados indican que en los segmentos nodales y ápices se obtienen los mayores porcentajes de contaminación con una alta incidencia de bacterias (64%). La inducción de brotes axilares se obtuvo en el medio MS con 3 mg.l⁻¹ de BAP en ambos explantes (76% y 86% respectivamente) con una tasa de multiplicación de 3,2 nudos/brote. En los cotiledones se indujo desarrollo de brotes adventicios con una eficiencia de regeneración de 6,93 brotes/explante para los medios con BAP y 5,93 en presencia de 2iP. Los callos fueron subcultivados al medio MS con 0,5 mg.l⁻¹ BAP donde se logró la inducción y el crecimiento de 25 a 30 brotes/explante.

Palabras clave: *Azadirachta indica*, Nim, propagación *in vitro*, reguladores del crecimiento

2-02 Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca

Aymé Rayas*, Víctor Mederos, Magaly García, Jorge López, Manuel Cabrera, José de la C. Ventura, Marilín Martínez, Valentina Gutiérrez, Miguel Álvarez, Maricel Bauta. *Autor para correspondencia

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT, Apdo. 6, Santo Domingo, CP. 53000 Villa Clara. e-mail: inivit@ip.etcusa.cu

Los métodos de cultivo de tejido aparecen como vías para la conservación de germoplasma de especies que son propagadas vegetativamente, permitiendo mantener las colecciones en pequeños espacios, libres del

ataque de enfermedades y catástrofes y facilitan el intercambio de germoplasma. En el presente trabajo se estudiaron 11 variantes del medio "MS" con el objetivo de disminuir el número de subcultivos en la conservación *in vitro* de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) que consistieron en diferentes concentraciones de sacarosa (20, 30 y 40g.l⁻¹) y de manitol (0, 10, 20 y 30 g.l⁻¹). Las evaluaciones se realizaron a los nueve meses de la implantación, teniendo en cuenta: altura (cm), número de entrenudos/planta, número de hojas activas, número de raíces activas y porcentaje de sobrevivencia. Los explantes que sobrevivieron, después de la conservación fueron colocados para su recuperación sobre el medio de crecimiento reportado para la yuca. El medio suplementado con 40 g.l⁻¹ sacarosa + 0.02 mg.l⁻¹ BAP + 0.1 mg.l⁻¹ GA₃ + 0.01 mg.l⁻¹ ANA, resultó la mejor variante para la conservación *in vitro* de la yuca, sin diferencias con la variante "MS" + 40 g.l⁻¹ sacarosa + 0.02 mg.l⁻¹ BAP + 0.1 mg.l⁻¹ GA₃ + 0.01 mg.l⁻¹ ANA + 10 g.l⁻¹ Manitol; por comportarse mejor para las variantes evaluadas así como en la recuperación.

Palabras clave: Manihot esculenta, micropropagación, recursos genéticos, conservación in vitro

2-03 Anther and microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L) and production of doubled haploid plants

M. A. Bari*, S. M. S. Islam, J. E. Schmid. *Author for correspondence

Institute of Biological Sciences, University of Rajshahi, Rajshahi-6205, Bangladesh. e-mail: mabaribd@yahoo.com

Pre-treated and cultured anthers containing uninucleate microspores of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties showed callus formation in induction media. Regeneration potentials of the wheat varieties were estimated on the basis of anther response, embryo induction, embryo regeneration and production of green and albino plants. Embryos were obtained when the anthers were grown on media containing high levels of specific amino acids. Barkat produced embryos and green plantlets at the highest frequency followed by Kanchan and Pavon 76. All the responding genotypes also produced albino plants in addition to the green ones. The cold pretreatment for three – five days generated the highest frequency of embryos and green plantlets. All the responding genotypes showed better induction from cold pretreated anthers than the control. The three-day treatment was most effective and significantly different from other treatments and the control. Different chemicals were applied to the mother plants

and supplemented to the induction medium for improving wheat anther culture. Colchicine was applied separately to the anthers and microspores and in case of microspores 69.94% doubled haploid plants were obtained.

Key words: anther culture, double haploid, microspore

2-04 Callogenesis en meliáceas exóticas (*Khaya nyasica* stapf y *toona ciliata*)

Marcos Daquinta*, Yarianne Lezcano, Orlaidis Arias, Romelio Rodríguez, Danilo Trina, Maritza Escalona. *Autor para correspondencia

Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km. 9. CP 69450. Cuba. e-mail: mdaquinta@bioplasmas.cu

Las Meliáceas son de gran importancia para los programas de construcción y de fabricación de muebles, entre otras aplicaciones. La *Khaya nyasica* es una Meliácea originaria de África por lo que en Cuba se le conoce como Caoba Africana y la *Toona ciliata* de Australia en Cuba se le conoce como Cedro de Australia. La regeneración natural de estas especies ocurre estacionalmente por medio de semillas y asexual por injertos. Estas vías de propagación son limitadas, aún más cuando se desea introducir las especies a la producción. El objetivo del presente trabajo fue lograr la formación de callos en *Khaya nyasica* y *Toona ciliata* con vistas a establecer su propagación *in vitro*. Se utilizaron árboles adultos de 20 años de edad de *Khaya*, sin síntomas de necrosis cortical y en el caso de *Toona ciliata* se utilizaron plantas jóvenes. A partir de estas plantas se utilizaron segmentos de hojas jóvenes y raquis de brotes formados en la base del tronco, se siguió el mismo protocolo de desinfección referido para otras Meliáceas y se implantaron en los siguientes medios. MS + 0-2 mg.l⁻¹ Thidiazuron. Los callos obtenidos son nodulares con características morfológicas, en los segmentos de hojas comienza su formación por los extremos cortados al igual que en los extremos de los segmentos de raquis.

Palabras clave: callos, forestales, Meliáceas, thidiazuron, Khaya nyasica,

2-05 Estudio del comportamiento *in vitro* del clon de banano (*Musa* spp) FHIA –01 (AAAB

Daymí Ramírez Aguilar*; Juan N. Pérez Ponce, Daniel Agramonte, Felipe Jiménez, Odalys Gutiérrez, Martha Pérez *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Martha Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5.5. Santa Clara, Cuba.
e-mail: daymi2001@yahoo.es

En el presente trabajo se evaluaron diferentes combinaciones hormonales en el medio de cultivo para la fase de multiplicación del clon FHIA 01 (AAAB) y el gelificante más eficaz en la fase de multiplicación (Fase II) y enraizamiento (Fase III). Se realizaron varios ensayos donde se estudiaron comparativamente diferentes dosis de las auxinas y citocininas más utilizadas en los medios de cultivos en el género *Musa* analizando su efecto en la formación de brotes, el coeficiente de multiplicación, la emisión de raíces y la altura de las plantas en la fase de multiplicación. Además se compararon diferentes gelificantes para la Fases II y III. Como resultado se obtuvo que el 6 Bencil aminopurina (6-BAP) a razón de 4.0mg.l⁻¹ permitió la formación de los caracteres mas adecuados en la fase de multiplicación. Las auxinas por su parte afectaron de forma general el desarrollo de los indicadores evaluados en la propia fase aunque el ácido indolacético (AIA) fue la auxina que tuvo un mejor comportamiento por lo tanto la relación hormonal entre 6BAP: AIA mas favorable fue 4:0 respectivamente y el agente solidificante mas efectivo el fitagel para ambas fases de micropropagación.

Palabras clave: gelificantes, hormonas, multiplicación, Musa spp

2-06 Efectividad del rizobac en el proceso de callogènesis en papa (*Solanum tuberosum*, L) var. Desirèe

Ramiro Hidrobo^{1*}, Eduardo H. Ardisana¹, A. Hernández². *Autor para correspondencia

¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Agraria de la Habana (UNAH), Apartado 18-19, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. e-mail: hidroboluna@yahoo.es

² Departamento de Fitotecnia, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal 1, CP 32 700. San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Este experimento se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de la Habana (UNAH), con el objetivo de evaluar los efectos de diferentes concentraciones de

un nuevo regulador del crecimiento vegetal de origen bacteriano RIZOBAC, en la obtención de mayor masa fresca y buenas características embriogénicas de callos *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum*, L.) var. Desirée, provenientes de vitroplántulas del Banco de Germoplasma del Género *Solanum* perteneciente al Departamento de Genética y Mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), así como valorar la posible sustitución de los reguladores del crecimiento como las auxinas y citoquininas en los medios de cultivo ya establecidos para la callogénesis de este cultivo. Se estudiaron varios tratamientos, utilizando el medio de cultivo ya inicial como control, además de la sustitución de las auxinas (3mg.l^{-1}) y citoquininas (0.5mg.l^{-1}) con el compuesto RIZOBAC, en varias concentraciones (0.5 , 1.0 , 1.5 y 2.0mg.l^{-1}) y en otros casos adicionándolo al medio control en las mismas concentraciones. Se evaluó la masa fresca, los cambios de coloración, la textura y la consistencia de los callos. Se detectaron variaciones en las respuestas de los indicadores evaluados, obteniéndose los mejores resultados al utilizar el RIZOBAC como sustituto de las auxinas a una concentración de 1.5mg.l^{-1} ; además se obtuvieron buenos resultados al incluir el RIZOBAC (1.5mg.l^{-1}) en el medio original el cual contenía los dos reguladores del crecimiento. Con la sustitución de las auxinas y/o citoquininas por el RIZOBAC se pueden ahorrar hasta más de 10 ctvs USD por cada litro de medio de cultivo.

Palabras clave: callogénesis, callos, papa, reguladores del crecimiento vegetal, RIZOBAC

2-07 Efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en la formación de callos de *Cocos nucifera* L. empleando medio de cultivo semisólido

Igor Bidot^{1*}, Manuel de Feria², Alina Capote², Maité Chávez², Elisa Quiala², Raúl Barbón², Naivy Pérez², Juan C. Pérez². *Autor para correspondencia

¹Centro Universitario de Guantánamo. Carretera a Santiago de Cuba Km. 2 ½, Guantánamo, Cuba. e-mail: bidot@cug.co.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera de Camajuaní Km. 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: mdeferia@uclv.edu.cu

El presente trabajo tuvo como objetivos evaluar el efecto de la concentración de 2,4-D y el tipo de explante sobre la formación de callos de *Cocos nucifera* cv. Indio amarillo. Los mayores porcentajes

de explantes con callos se obtuvieron con las secciones clasificadas como tipo uno en todas las concentraciones de 2,4-D estudiadas, con una disminución gradual de este porcentaje a medida que la sección se correspondía con una región más externa de la zona caulinar del embrión cigótico. Los mejores resultados en el proceso de formación de callos se obtuvieron con la concentración de 28 mg.l⁻¹ de 2,4-D, con un 90% de explantes que formaron callos y un grado promedio de desarrollo de estos según la escala utilizada de 3,5 a las diez semanas de cultivo. Con el objetivo de lograr la formación de embriones somáticos, los callos obtenidos con 28 mg.l⁻¹ de 2,4-D se colocaron en un medio de cultivo de similar composición al empleado para la formación de los callos, pero con una concentración menor de 2,4-D (21 mg.l⁻¹) y transcurridas cinco semanas de cultivo se observó como promedio la presencia de siete embriones somáticos por callo y de manera excepcional algunos de ellos se encontraban germinados.

Palabras clave: Cocos nucifera cv., medio de cultivo, formación de callos, embriones somáticos

2-08 Multiplicación *in vitro* y enraizamiento *ex vitro* de brotes de *Ruta graveolens*, L (RUDA)

Karen Alvarado^{1*}, Marcos Daquinta², Enidia Téllez¹, Loexis Rodríguez¹, J. Ramón Vallés¹, Marlene Cala³, Blanco Imbert Albaro¹. *Autor para correspondencia

¹ Centro de Desarrollo de la Montaña. Limonar de Monte Ruz. El Salvador. Guantánamo. Cuba. e-mail: armilde@gtmo.inf.cu

² Centro de Bioplasmas. Ciego de Avila. Cuba.

³ Unidad de Ciencia y Tecnología. Guantánamo. Cuba.

El trabajo se desarrolló en el Centro de Desarrollo de la Montaña en el período comprendido entre los meses Junio del 2000 y Junio del 2001. Con el objetivo de lograr la multiplicación *in vitro* y el enraizamiento *ex vitro* de brotes de ruda se realizó el subcultivo en el mismo medio de establecimiento con diferentes concentraciones de AG₃ solo y combinado con 0.1mg.l⁻¹ de AIA, luego de varios subcultivos brotes de 20-30mm de longitud fueron colocados en casa de vegetación con diferentes sustratos para estudiar su

enraizamiento. Como resultado se logró alcanzar una excelente multiplicación de los brotes los cuales luego fueron enraizados *ex vitro* el consiguiente ahorro de recursos y una mayor supervivencia de los explantes.

Palabras clave: cultivo in vitro, Ruta graveolens L, enraizamiento in vitro, multiplicación

2-09 Efectos de brasinoesteroides sintéticos en la inducción de callos de variedades comerciales de arroz

Lisbet Rodríguez Machado^{1*}, José B. Rodríguez Soria², Miriam Prede Rodríguez². *Autor para correspondencia

¹ Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Autopista Nacional, Km. 246, Villa Clara, Cuba. e-mail: epica@civc.inf.cu

² Facultad de Biología, Universidad de la Habana. J y 25, Vedado, Ciudad de la Habana, Cuba.

El presente trabajo tiene como propósito evaluar el efecto de los brasinoesteroides sintéticos DAA-6, ME y DI-31 en la inducción de callos de arroz (*Oriza sativa* L.) de las variedades comerciales J-104 y Pokkali, Para ello se utilizaron semillas maduras de ambas variedades, empleándose el medio MS suplementado con 10^{-5} mg.l⁻¹ de brasinoesteroide, sólo o combinado con 2.4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (2 mg.l⁻¹) y Kin (Kinetina) (1 mg.l⁻¹). El DAA-6 resultó ser un sustituto de la Kin en la inducción de callos de ambas variedades mientras que el ME tuvo el mismo efecto en J-104, el DI-31 fue inhibitorio.

Palabras clave: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, callogénesis, kinetina, brasinoesteroides

2-10 La estadística multivariada. Riqueza de sus métodos para cultivo de tejido vegetales

Maria Oliva*, V. Medero, Lianet González, J. de la C. Ventura, Manuel Cabrera, Milagro Basail, Arletis Santos, Odalys Arcia, Guillermo Cartalla.

* Autor para la correspondencia

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6 Santo Domingo CP 53 000, Villa Clara. e-mail: inivit@ip.etcscu

En el presente trabajo se expone la explotación se expone la explotación de diferentes métodos de análisis multivariado aplicados a experimentos efectuados en el laboratorio de Biotecnología del INIVIT. Se recomienda que cuando investigues un alto número de variables y no más de cinco tratamientos, utilizar el análisis discriminante. Con el análisis de Cluster, se manipulan un alto número de variables y de tratamientos (más de cinco) dando por resultado la formación de grupos donde se involucra el criterio del investigador.

Palabras clave: analisis, cluster, discriminante, análisis multivariado

2-11 Influencia del *Rhodococcus fascians* y el thidiazuron en la morfogénesis *in vitro* de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y ñame (*Dioscorea alata* L.)

Maylen García Corria^{1*}, Mondher El Jaziri². *Autor para correspondencia

¹ Universidad de Granma, Facultad de Agronomía, Centro de Biotecnología de las Plantas, Granma, Cuba. e-mail: maylengccu@yahoo.es

² Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Libre de Bruselas, Bélgica.

Rhodococcus fascians es una bacteria Gram positiva que infesta un amplio rango de plantas, causando una alteración en el normal crecimiento de las mismas. Las malformaciones producidas varían desde hojas mal formadas hasta brotes múltiples malformados o formación de “escoba de bruja”, el síntoma típico mas conocido es la formación de agalla foliar. Se emplearon extractos procedentes tanto de agalla foliar de explantes de tabaco como bacteria inducida y como cultivo control se usó tidiazuron como citoquinina. La cepa virulenta D 188 de *R. fascians* empleada en este estudio fue cultivada en un medio líquido YEB (Miller, 1972) durante dos días a 28°C. Para este trabajo se emplearon hojas de plantas de cuatro semanas de edad tanto de tabaco como de ñame. Los resultados obtenidos mostraron que los tejidos de hojas y de tubérculos de ñame no fueron afectados por la acción de *R. fascians*. En plantas de tabaco, la cepa D 188 no afectó el desarrollo de brotes, pero se formaron callos y raíces. Los explantes que fueron cultivados en medio MS con tidiazuron formaron múltiples brotes y raíces.

Palabras clave: medio líquido, ñame, tabaco, Rhodococcus fascians

2-12 Conservation of citrus genetic resources by cryopreservation

M.T. González-Arno^{1*}, N. Durán-Vila², C. Ortega², L. Navarro², F. Engelmann³ and C. Urrea⁴. *Author for correspondence

¹ Universidad de La Habana (UH), La Habana, Cuba. e-mail: arno@fbio.uh.cu

² Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, Spain.

³ IPGRI, Rome, Italy.

⁴ Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba.

Cryopreservation of ovules and embryogenic callus of Citrus polyembryonic species has an especial interest for the biotechnology programmes. Some preliminary results have been achieved after cryopreservation of ovules from 7 different species using the encapsulation/dehydration technique. Moreover, an operational cryopreserved embryogenic callus collection is well established at IVIA including more than 20 citrus species. No changes in their growth and regeneration capacity have been noted after a maximum of six-year conservation.

Cryopreservation of shoot-tips from adult citrus cultivars is the most desirable approach, since material regenerated from such tissues do not present juvenility characteristics and produce true to type plants. This research is currently under way. At present, a freezing protocol has been developed for shoot-tips sampled from in vitro juvenile cultures by the encapsulation/dehydration. Survival ranged between 36 and 55% for the three citrus species studied (*Poncirus trifoliata*, citrange 'Troyer' and citrange 'Carrizo').

Key words: Cryopreservation, citrus, embryogenic callus, conservation

2-13 Efecto de la fenolización sobre explantes de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. sp 70-1284) en la generación de callogénesis de alta calidad

Apolonio Valdez Balero^{1*}, Pedro A. Orellana Pérez², Leonardo García Rodríguez², Novisel Veitia Rodríguez², Idalmis Bermúdez Caraballos², Lourdes García Rodríguez². *Autor para correspondencia

¹ Colegio de Postgraduado Campo de Tabasco, Mexico.

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

La caña de azúcar (*Saccharum spp* híbrido), es de los cultivos comerciales que por su importancia económica más se ha trabajado sobre aspectos biotecnológicos. Cuando se utilizan explantes de campo del híbrido ‘SP 70-1284’, una vez que se manipulan, las heridas producidas por la incisión provocan la oxidación de los tejidos. Con el fin de reducir la fenolización que afecta en el desarrollo de callogénesis, se probó un protocolo el cual mostró buenos resultados al seccionar los spindles sumergidos en una solución con 200 mg.l⁻¹ de ácido cítrico como agente antioxidante, así como adicionar al medio de cultivo el mismo ácido a razón de 50 mg.l⁻¹. La sección del explante que generó la mayor cantidad de callo fresco y la mejor calidad del mismo, fueron los segmentos de las hojas más jóvenes situadas en los primeros cinco centímetros por encima del meristemo apical.

Palabras clave: callos, caña de azúcar, cultivo de tejidos, explantes, fenolización

2-14 Nuevo somaclón de plátano vianda (*Musa AAB*) obtenido por técnicas biotecnológicas

José de la C. Ventura*, Jorge López, Julián González, Sonia Altanez, Víctor Medero, Sergio Rodríguez, Magaly García, Aymé Raya, Julio Finalet, Carmen Pons, Lianet González, René Landa, Teresa Ramírez, Manuel Cabrera, Nery Montano, Juan Ramón Gálvez, Damisela Reinaldo, Julia Albert, Marlenis Torres, Jesús García. *Autor para correspondencia

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo, CP 53 000, Villa Clara, CUBA. e-mail: inivit@ip.etecsa.cu

Se presentan los resultados obtenidos por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del INIVIT, en la Mejora Genética de *Musa spp.* desde 1987 hasta la fecha. Se utilizó el procedimiento descrito por Novak y *et al.*, (1991) para la inducción de mutaciones a través del cultivo *in vitro*, con algunas modificaciones. Se aislaron brotes meristemáticos (2-3 mm) de las yemas formadas *in vitro*. Las irradiaciones se realizaron en fuente de Cobalto 60 a una dosis de 50 Gy. Se generaliza un somaclon (‘Z 13’), dadas las evidencias

presentadas de tolerancia a “Sigatoka negra” (*Mycosphaerella fijiensis* var. Morelet), altura promedio de 2,70 m, racimo en forma de cono truncado con 16.5 dedos por mano y sabor astringente predominante, el tallo se encuentra por debajo del nivel del suelo, lo que le permite un mejor anclaje y un mayor rendimiento que el ‘CEMSA ¾’. La caracterización morfológica y molecular demostraron las diferencias entre las tres variantes seleccionadas con respecto al clon donante. El nuevo mutante está propuesto para ser registrado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) como un nuevo cultivar. Los trabajos de selección fueron realizados con la participación de productores de avanzada en Villa Clara y Ciego de Ávila.

Palabras clave: cultivo de tejidos, mutagénesis in vitro, plátanos, variación somaclonal, inducción de mutaciones

2-15 Efecto piramidal en el crecimiento *in vitro* de embriones cigóticos de *Coffea arabica* L. variedad Caturra Rojo

Yilan Fung Boix*, Albys E. Ferrer, Elizabeth Isaac Alemán, Ana M. Botta. *Autor para correspondencia

Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA) Universidad de Oriente (Sede Julio A. Mella). Ave. Las Américas s/n. C.P: 90400. Santiago de Cuba. Cuba. Telf: 643721. e-mail: yilan@cnea.uo.edu.cu; e-mail: yilan26@yahoo.com

Se realizó un estudio del efecto piramidal, en la etapa de establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos de café de la especie *Coffea arabica* L. variedad Caturra rojo. Para ello se utilizó una pirámide de base cuadrada por un período de ocho semanas luego se evaluaron las variables longitud del tallo, longitud de la raíz, número de hojas y ancho de la hoja, obteniéndose como resultados un efecto estimulador para la variable medidas.

Palabras clave: Coffea arabica L., efecto piramidal, embriones cigóticos, establecimiento in vitro

2-16 Anther and Isolated Ovule Culture as Alternative for Pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merrill] Haploid Plants Production

Reinerio Benega*, Julia Martínez, Elizabeth Arias, Miguel Hidalgo, Kirenia Rodríguez, Miriam Isidró *Author for correspondence

Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Avila (UNICA). Carretera a Morón Km. 9, CP.: 69 450. Ciego de Avila. Cuba.

The possibility of producing haploid plant using *in vitro* anther and isolated ovule culture was explored for five pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merrill] genotypes. The experiments included the use of several combination of plant growth regulator (PGR) for callus formation and plantlet regeneration. The best results on callus and haploid embryo formation were obtained using Dicamba as PGR. Thidiazuron 1.0 and 1.5 mg.l⁻¹ was better than other tested cytokinins to achieve plant regeneration from embryogenic callus as anther culture as isolated ovule culture. Haploid plantlets were obtained from 3 of 5 tested genotypes. The plantlets derived from the haploid embryo were different in the morphology or ploidy level from those from non-haploid culture. The use of haploid and doubled haploid (DH) plants in pineapple breeding is discussed.

Key words: pineapple, in vitro anther, cytokinins, plant growth regulator, callus formation

2-17 Efecto de algunos Biorreguladores cubanos en la regeneración de callos

Niurka Coello Bautista^{1*}, Sergio González¹, Reina M Hernández¹, Francisco Coll² *Autor para correspondencia

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Departamento Biología Vegetal, Facultad de Biología. Universidad de la Habana. Calle 25, entre J e I, Vedado, Ciudad Habana.

²Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Química, Universidad de la Habana.

Se estudia análogos de brasinoesteroides cubanos en la regeneración de callos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) previamente estresados con manitol, PEG-1500 estrés y con NaCl. Los medios MS fueron suplementados para cada uno de los tratamientos con diferentes brasinoesteroides: 24- epibrasinólido y los análogos sintéticos Biobras-6 y Biobras-16 como sustituyente de la kinetina . Se evalúa el efecto de estos productos *in vitro* y la recuperación de los callos sometidos a diferentes condiciones de estrés.

Palabras clave: brasinoesteroides, caña de azúcar, Biobras 6, Biobras 16, callos

EMBRIOGENESIS SOMÁTICA Y SEMILLA ARTIFICIAL

3-01 Obtención de embriones somáticos y establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en el clon de plátano 'Navolean' (AAB)

Arletys Santos*, J. López, M. Cabrera, Nery Montano, Damisela Reinaldo, J C. Ventura, V. Medero, Magalys García, Milagros Basail, Ayme Rayas.

*Autor para correspondencia

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT, Apdo. 6, Santo Domingo CP 53 000, Villa Clara. e-mail: inivit@ip.etcscu

En el contexto internacional se reportan suspensiones celulares de bananos y plátanos con resultados muy alentadores, sin embargo, en Cuba no resulta así para los clones del grupo AAB, siendo necesario abordar los objetivos de trabajo siguientes: Multiplicación *in vitro* del material para la toma de los explantes. Obtención de cultivos embriogénicos y suspensiones celulares. Para la multiplicación *in vitro* del material como fuente donante de explantes se estudiaron diferentes concentraciones de BAP y AIA. La inducción de cultivos embriogénicos se realizó a partir de „scalps“, incubados en el medio ZZ sólido. Las suspensiones se establecieron en Erlenmeyers de 10 ml y 25 ml en el medio ZZ líquido. El mejor medio para la multiplicación de los explantes fue el MS, (1962) (sales y vitaminas), tiamina adicional (1 mg.l⁻¹), sacarosa (40 g.l⁻¹), 4.50 mg.l⁻¹ de BAP, 0.88 mg.l⁻¹ de AIA y solidificado con agar (6 gl⁻¹) (Medio 7). Se obtuvo un 4.66 % de formación de callos con cultivos embriogénicos y se logró el establecimiento de las suspensiones celulares a los 20 días de la incubación en Erlenmeyer de 10 ml y cambios de medio cada tres días.

Palabras clave: embriogénesis somática, plátanos, bananos, multiplicación in vitro, suspensiones celulares

3-02 Estudio de la inducción de la embriogénesis somática en la variedad de papaya "INIVIT-2000"

Bárbara Barreto Pérez¹, Luis del Sol Espinosa², Magaly García². *Autor para correspondencia

¹ Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA). Autopista Nacional Km. 246. Ranchuelo. Villa Clara, Cuba. e-mail: epica@civc.inf.cu

² Instituto de investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6., Santo Domingo, CP 53000, Villa Clara, Cuba. e-mail: inivit@ip.etecsa.cu

Se estudió la influencia de algunos factores como: tipo de explante, edad de los frutos y reguladores del crecimiento sobre la inducción de los embriones somáticos de la variedad INIVIT-2000. Los resultados obtenidos demostraron que con la utilización de embriones cigóticos inmaduros y segmentos de tallos de vitroplantas como explantes fue posible inducir la formación de embriones somáticos en la variedad de papaya "INIVIT-2000"; además empleando la auxina 2,4-D (4,7mg.l⁻¹) se obtuvo un proceso eficiente con un 86% de inducción y los frutos con 105 y 120 días fueron los mejores para la inducción de la respuesta embriogénica.

Palabras clave: auxinas, embriones somáticos, explantes, respuesta embriogénica, papaya

3-03 Micropropagación del híbrido Cubano de Papaya (*Carica papaya* L) IBP 42-99

Jorge Gallardo Colina*, Laisyn Posada Pérez, Rafael Gómez Kosky, Leticia Más Castellanos, Maritza Reyes, Idalia Herrera Ofarril. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: jorge_gallardo2002@yahoo.es

El presente trabajo consistió en desarrollar una metodología para propagar híbridos de papaya mediante el cultivo *in vitro*. Como material vegetal se empleó brotes laterales de plantas del híbrido I B P- 42 – 99, los explantes fueron establecidos siguiendo la metodología propuesta por Posada *et al.* (1999). Para la multiplicación se estudió la combinación de 6- BAP (0.225, 0.45, 0.90 mg.l⁻¹) con ANA (0.14, 0.28 mg.l⁻¹). Para el enraizamiento se compararon los medios propuestos por Drew (1988) y Posada (1995). El medio de cultivo MS (1962) suplementado con (0.45 mg.l⁻¹ de 6- BAP y 0.14 mg.l⁻¹ de ANA) resultó ser en este trabajo el más adecuado con un coeficiente de multiplicación de 3.93 y para la etapa de enraizamiento fue el propuesto por Posada (1995) donde se obtuvo un 68% de plantas enraizadas.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, híbridos, papaya, enraizamiento, medio de cultivo

3-04 Estudio de la aclimatización durante la conversión de embriones de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem)

Gerardo González^{1*}, Silvia Alemán¹, Reynaldo Trujillo², Felipe Barredo³, Ernesto Reyes², Enildo Abreu¹, Yunel Pérez¹. *Autor para correspondencia

¹ Centro de estudios Biotecnológicos. Carretera a Varadero Km 3¹/₂ Universidad de Matanzas. e-mail: gerardo@cdict.umtz.edu.cu.

² CICY México.

³ Centro de Bioplasmas. UNICA. Ciego de Ávila.

Este trabajo se realizó debido al poco conocimiento que existe, con relación al comportamiento de las plantas derivadas de embriones de Henequén, germinadas en medio con diferentes concentraciones de 6 BAP sobre la respuesta en la fase de aclimatización. En los resultados se evidencia que el contenido de 6 BAP en los medios de germinación determinó el comportamiento de las vitropasmas en la fase de aclimatización.

Palabras clave: Agavaceae, embriogénesis somática, henequén, aclimatización

3-05 Obtención y regeneración de plantas a partir de embriones somáticos obtenidos *in vitro* de *Lycopersicon esculentum* L.

J.L. Rodríguez De la O^{1*}; M.C. Sánchez Enciso¹; G. González De la Cruz². *Autor para correspondencia

¹ Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México 56230. e-mail: chelozasa@yahoo.com.mx

² Departamento de Física, CINVESTAV-IPN.14-740, México, D.F.

Con el propósito de aprovechar las características de base genética encontradas en diferentes cultivares de *Lycopersicon*, fue promovida la embriogénesis somática en *Lycopersicon* spp. ensayando medios de cultivo, reguladores de crecimiento, coadyuvantes y la influencia de las vitaminas. En plántulas obtenidas con la germinación de semillas se aislaron segmentos de hojas e hipocótilos, los cuales fueron sembrados *in vitro* cultivándose en medios utilizando como base las sales inorgánicas de Murashige y Skoog MS (1962), incorporando coadyuvantes como la galactosa 48 g.l⁻¹ y extracto de malta 500 mg.l⁻¹ en combinación con

diferentes niveles de Benciladenina (BA), 20-100 uM. Las respuestas embriogenéticas se presentaron de manera directa e indirecta a partir de la formación de callos, los cuales fueron caracterizados por su textura y color. Las mejores respuestas en cuanto a la formación de embriones fueron observados en la base de los hipocótilos, que desarrollaron en cuatro y seis semanas estructuras de tipo globular o embrionarias, las cuales fueron separadas y transferidas posteriormente a medios de cultivo para su germinación empleando diferentes niveles de Ac. Giberélico (Ag3) con las sales inorgánicas de MS al 100% y diluidas al 50%. Las plantas obtenidas fueron transplantadas a una mezcla de suelo y peatmoss en relación 1:1. El propósito final de esta investigación será la de presentar una alternativa para la obtención de semilla sintética y como una estrategia para la conservación de recursos genéticamente valiosos.

Palabras clave: embriogénesis somática, Lycopersicon esculentum L., medios de cultivo, formación de callos

3-06 Inducción de embriogénesis somática en función del tipo de tejido usado como explanto inicial en *Eucalyptus globulus* Labill.

Manuel Sánchez-Olate^{1*}, Darcy Ríos L.¹, Cristian Gómez H.², Matilde Uribe M.³ *Autor para correspondencia

¹ Laboratorio de Biotecnología Forestal, Depto. Silvicultura. Fac. Cs. Forestales. Chile. e-mail: msanchez@udec.cl

² Alumno del Programa de Magíster en Ciencias Forestales. Chile.

³ Departamento de Ciencias Básicas, Unidad Académica Los Ángeles.

La embriogénesis somática se perfila como un mecanismo para asegurar la propagación de genotipos selectos en programas de mejora forestal. A gran escala sus potencialidades son el uso de semillas artificiales, la crioconservación de germoplasma y la regeneración de plantas tratadas genéticamente, entre las más importantes. Por ello, se estudió la capacidad de inducir la formación de embriones somáticos en *Eucalyptus globulus* Labill. con la finalidad de aplicarla como una herramienta en programas de mejoramiento genético forestal en Chile. Como explantos iniciales se emplearon semillas, ejes embrionarios, hojas de plantas micropropagadas, hipocótilos y cotiledones maduros en cuatro tratamientos de inducción: I₁ = B5 + 2,4-D + BAP; I₂ = B5 + ANA + BAP; I₃ = MS + 2,4-D + BAP e I₄ = B5 + 2,4-D + Kn. Los resultados de la inducción indicaron una tasa callogénica superior al 70% en todos los tratamientos aplicados,

en los tres primeros tipos de explantos y una tasa callogénica superior al 50% en cotiledones e hipocótilos. Se registraron además, marcadas diferencias en las respuestas macromorfológicas entre tratamientos y explantos. También se observaron respuestas rizogénicas en I_1 , I_3 e I_4 al utilizar semillas, ejes embrionarios y cotiledones maduros; y respuestas caulogénicas en I_2 , para semillas y ejes embrionarios. Por otra parte, los análisis citológicos indican presencia de embrioides en estado globular en dos tratamientos inductores al utilizar cotiledones e hipocótilos y estructuras embriogénicas a partir de semillas y ejes embrionarios. Los estudios citológicos evidenciaron además, que los callos embriogénicos y no embriogénicos, mantienen sus características al ser repicados sucesivamente en medios de proliferación.

Palabras clave: embriogénesis somática, Eucalyptus globulus Labill., semilla artificial

3-07 Multiplicación, histodiferenciación y regeneración de suspensiones celulares embriogénicas en plátanos vianda «navolean» (AAB)

Manuel Cabrera^{*1}, J. López¹, R. Gómez², N. Montano¹, M. Reyes², D. Reinaldo¹, J. C. Ventura¹, V. Medero¹, Arletys Santos¹, M. García¹, Milagros Basail¹, E. Espinosa¹ *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT, Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. e-mail: inivit@ip.etecsa.cu

² Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara Villa Clara. Cuba.

El mejor resultado para la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas en el cv. 'Navolean' se obtuvo al utilizar una densidad celular del 3.0% del Volumen de Células en Suspensión. En la etapa de histodiferenciación se logró la mayor formación de embriones somáticos en etapa globular utilizando como densidad 12.0% de volumen final de células en medio de cultivo líquido. Al emplear 0.5 gMF de embriones somáticos durante 30 días de cultivo en el medio de cultivo de maduración, fue posible lograr la maduración de los embriones e incrementar la germinación. Empleando sistemas de inmersión temporal con 0.5 gMF de embriones somáticos maduros se incrementó el valor de germinación a 77.40%.

Palabras clave: embriogénesis somática, volumen de células sedimentadas (VCS), formación de embriones, sistemas de inmersión temporal

3-08 Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) empleando medios de cultivo líquidos

Marisol Freire*, Rafael Gómez Kosky, Idalia Herrera, Maritza Reyes.

*Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas Carretera a Camajuaní Km. 5^{1/2}. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: mfseijo2001@yahoo.es; mfreire@uclv.edu.cu

La embriogénesis somática, técnica de propagación y herramienta para el mejoramiento genético en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido), ha presentado múltiples inconvenientes que los protocolos de regeneración descritos en la literatura no han sido capaces de resolver. La presente investigación se realizó con el objetivo de desarrollar una nueva metodología para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir de segmentos de la vaina de las hojas de plantas *in vitro*, colocados directamente en medio de cultivo líquido. Los resultados demostraron que es posible formar callos con estructuras embriogénicas a partir del segmento dos de la vaina de las hojas; lo cual reduce el tiempo de cultivo *in vitro* y garantiza la calidad fisiológica y fitosanitaria de las plantas que se regeneran. A partir de los callos con estructuras embriogénicas se establecieron líneas homogéneas de suspensiones celulares formadas por agregados embriogénicos. Los mayores incrementos en la biomasa de las suspensiones celulares se obtuvieron con una densidad celular de 25% de VCS y 0.5 mg.l⁻¹ de 2,4-D; mientras que para desarrollar la fase de diferenciación se redujo la concentración auxínica a 0.25 mg.l⁻¹ y la densidad celular a 10% de VCS. En estas condiciones se formaron hasta 190.93 embriones somáticos. ml⁻¹. El mayor porcentaje de germinación de los embriones somáticos (53.8%) se obtuvo cuando fueron sometidos a una fase de maduración previa a la germinación. Las plantas *in vitro* obtenidas a partir de los embriones somáticos fueron sembradas en campo junto a plantas micropropagadas vía organogénesis y de estacas para realizar los estudios sobre la posible presencia de variabilidad somaclonal. Las plantas procedentes de embriones somáticos mostraron en condiciones de campo características similares a las plantas micropropagadas vía yemas axilares, pero con incrementos en el número de tallos por plantón.

Palabras clave: germinación, líneas celulares, maduración, segmentos de hojas

3-09 Semilla artificial de caña de azúcar. Comportamiento agronómico e industrial

Nadina Nieves*¹; Yumaris Zambrano²; Mariela Cid¹; Danilo Pina¹; Ramiro Castillo¹. *Autor para correspondencia

¹ Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón, Km. 9, CP 69450, Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: nnieves@bioca.unica.cu

² Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Santiago de Las Vegas, La Habana, Cuba, e-mail: cecilia@inica.edu.cu

El establecimiento de plantas, especialmente en el campo, a partir de semilla artificial, ya sean embriones desecados o encapsulados permanece aún problemático. Estos estudios muestran el comportamiento agronómico e industrial de plantas de caña de azúcar var CP-5243 derivadas de semilla artificial comparadas con métodos tradicionales de siembra como el método de estacas de tres yemas y yemas aisladas. Las plantas procedentes de semilla artificial fueron plantadas en campo simultáneamente con los tratamientos control previamente germinados. En los primeros ocho meses de desarrollo la semilla artificial presentó menor diámetro del tallo y mayor altura, lo cual desapareció a los 12 meses. En los análisis de azucarería y rendimiento no se encontraron diferencias entre la semilla artificial y los dos métodos de control. Igualmente, los patrones isoenzimáticos no mostraron diferencias entre los tres métodos ensayados.

Palabras clave: embrión somático, encapsulación, estacas, isoenzimas, Saccharum sp, yemas, caña de azúcar, semilla artificial

3-10 El potencial embriogénico y la expresión de arabinogalactanoproteínas (AGP) en agregados celulares embriogénicos de café bajo la influencia del CO₂

Barbón-Rodríguez, R^{1*}, Preil, W². Jiménez, E.¹, Saare, K. *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: barbon@uclv.edu.cu

² Institut für Zierpflanzenzüchtung, Bornkampsweg 31, D-22926, Ahrensburg, Germany.

El establecimiento y optimización de sistemas de regeneración vía embriogénesis somática se ha centrado tradicionalmente en el estudio de los componentes del medio de cultivo, prestándosele poca atención a otros factores del ambiente *in vitro* como es la composición de la atmósfera gaseosa. Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar el potencial embriogénico y la expresión de arabinogalactanoproteínas (AGPs) en agregados celulares embriogénicos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo bajo la influencia del dióxido de carbono (CO₂). Se demostró que con concentraciones de 2,5 y 5,0% de CO₂ se estimuló en medios de cultivo semisólidos una mayor formación y desarrollo de los embriones somáticos, 307 ES/50mgMF y 277,0 ES/50mgMF respectivamente, con resultados superiores a los controles con intercambio pasivo y ventilación forzada (195 ES/50mgMF y 107 ES/50gMF) mientras que a una concentración de 10,0% de CO₂ se inhibió el proceso de embriogénesis somática (95 ES/50 mgMF). En suspensiones celulares fue mayor la formación de embriones somáticos a una concentración de 2,5% (130x10³ ES.l⁻¹) en comparación con 5,0% y 10,0% de CO₂ (116x10³ ES.l⁻¹ y 15x10³ ES.l⁻¹) y los controles con intercambio pasivo y ventilación forzada. Con una concentración de 2,5% CO₂ hubo una mayor síntesis de AGPs a nivel celular (0,068 mg.gMF⁻¹) y de excreción en el medio de cultivo (2,10 mg.l⁻¹), lo cual coincidió con los valores más altos de producción de embriones somáticos, este hecho unido al efecto inhibitorio del proceso embriogénico en presencia del reactivo de Yariv demostró el papel de las AGPs en la morfogénesis vía embriogénesis somática, abriendo la posibilidad de utilizar estas moléculas como marcadores moleculares de la embriogénesis somática.

Palabras clave: embriogénesis somática, suspensiones celulares, Coffea arabica L., dióxido de carbono

3-11 Estudio comparativo de diferentes biorreguladores en la embriogénesis somática de patrones de cítricos

Reina Margarita Hernández Ortiz^{1*}, Esther Diosdado Salces¹, Niurka Coello Bautista¹, Francisco Coll³. *Autor para correspondencia

¹ Filial Universitaria Isla de la Juventud. e-mail: rmargarita21@yahoo.com

² Facultad de Biología Universidad de la Habana calle 25 entre J e I Vedado, Ciudad Habana

³ Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Química. Universidad de la Habana.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de establecer una línea embriogénica de Mandarino cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan) lo cual es importante en la mejora genética de los cítricos, a la vez que se utilizan algunos biorreguladores sintetizados en Cuba. Las líneas embriogénicas obtenidas se logró a partir del cultivo de óvulos fecundados cultivados en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado en uno de los casos con Pectimorf al 10 mg.l⁻¹ y luego tratados con diferentes biorreguladores del crecimiento, tanto análogos sintéticos de brasinoesteroides DI-31, DAA-6 y Patrón A (24- epibrasinólido), como el oligopeptato OLP-12-4 a diferentes concentraciones, para conocer si su acción acelera los procesos de morfogénesis en el cultivo de tejidos de esta especie.

Palabras clave: cítricos, Citrus reshni Hort. ex Tan, embriogénesis somática

3-12 Embriogénesis somática en banano (*Musa* AAAB, cv. FHIA-18) empleando medios de cultivo líquidos

Luis A. Barranco^{1*}, R. Gómez², M. Reyes², B. Chong². *Autor para correspondencia

¹ Lab. de Biotecnología Vegetal. Centro Universitario Las Tunas. Ave. Carlos J. Finlay. Las Tunas. Cuba. e-mail: lbolivera2@yahoo.es

² Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km.5 ½ Santa Clara Villa Clara. Cuba.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de desarrollar una metodología de embriogénesis somática empleando medios de cultivos en estado líquido en *Musa* (AAAB) cv. FHIA-18. Los resultados demostraron que es posible el establecimiento de suspensiones celulares homogéneas a partir de embriones somáticos en etapa globular y obtener los mayores volúmenes de biomasa celular, al multiplicar dichas suspensiones con una densidad del 3.0% del VCS. A partir del decimoquinto día en el medio de cultivo de formación de embriones comenzaron a formarse estructuras compuestas por proembriones y embriones somáticos en etapa globular,

entre las densidades estudiadas los mejores resultados se obtuvieron con 100 mgMF en la cual se formaron 1 871 ES.l⁻¹ con un peso de 248 mgMF.l⁻¹. Con una densidad inicial de 0.6 gMF en el medio de cultivo para la multiplicación secundaria, se logró un incremento de 42.9 veces la cantidad inicial de masa fresca; después de 60 días de cultivo se lograron 15 985 ES.l⁻¹. Los mayores porcentajes de maduración se obtuvieron con 400 mgMF con 70% de embriones somáticos maduros. Se pudo comprobar el efecto positivo del *Biobras-6*, con una concentración de 0.01 mg. l⁻¹ se obtuvo los mayores porcentajes de germinación en el medio de cultivo líquido y semisólido. La mejor densidad en los RITA fue de 0.5 gMF con 85% de germinación. Las plantas obtenidas de embriones somáticos fueron llevadas al ambiente *ex vitro*, junto a plantas provenientes de la micropropagación convencional para realizar estudios sobre la posible presencia de variabilidad somaclonal. A los seis meses se observó un 1.0% de variantes fenotípicas en campo. Durante el 1^{er} ciclo las plantas provenientes del cultivo *in vitro* mostraron diferencias con respecto a las de semilla asexual en cuanto a la altura, diámetro y número de hijos. En el 2^{do} ciclo de producción las plantas de embriones somáticos mostraron características similares a las plantas provenientes de yemas axilares y semilla asexual, en cuanto a los parámetros morfológicos evaluados, encontrándose solo un 0.2% de plantas con cambios fenotípicos.

Palabras clave: embriones somáticos, densidad celular, germinación, variabilidad somaclonal, medios líquidos, musa

3-13 Efecto del tidiazurón en la formación de callos y embriones somáticos en cuatro clones de cacao (*Theobroma cacao*, L.)

Juan J. Silva Pupo^{1*}, Silvia Montes², Leonardo Acosta¹, Enrique Arias³, Aida García⁴, Mirtha López². *Autor para correspondencia

¹ Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Universidad de Granma.

² INCA.

³ Estación de Cuarentena de Café y Cacao, Velasco, Holguín.

⁴ IIA” Jorge Dimitrov”

Se evaluó el efecto del TDZ en la formación de callos y embriones somáticos a partir de estaminoides en cuatro clones de cacao: UF-613, UF-650, Pound-7 y UF-667. Los botones florales fueron desinfectados

con hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril, se seccionaron los botones y se extrajeron los estaminoides. Se empleó el medio de cultivo con las sales y vitaminas DKW, glucosa 20 g.l⁻¹, phytigel 2 g.l⁻¹ y se utilizaron cuatro niveles de tidiazurón (TDZ) a razón de 0, 11, 22 y 34 nM. El pH se ajustó a 5,7. La incubación se realizó en condiciones de oscuridad durante 21 días. Posteriormente se subcultivaron los explantes en el medio WPM suplementado con las vitaminas de Gamborg, kinetina, glucosa, agua de coco y phytigel 2 g.l⁻¹ con un pH ajustado a 5,7. Se obtuvo la formación de los callos a los 21 días solamente en los tratamientos que incluyó el tidiazurón como citoquinina en los medios de cultivo, no se encontró formación de callos en ninguno de los genotipos en el tratamiento sin TDZ. Solo se observó un abultamiento en la base de algunos estaminoides en los clones UF-667 y UF-650, pero sin crecimiento del tejido. Luego del subcultivo de los explantes en el medio de Li (1998) para el desarrollo de los embriones se observó la formación de embriones globulares.

Palabras clave: cacao, formación de callos, embriones somáticos, tidiazurón

PROPAGACION MASIVA DE PLANTAS

4-01 Empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal para la producción de vitroplantas de caña de azúcar

Aydiloide Bernal^{1*}, Manuel de Feria², Leyanis García², Zenaida Occeguera¹, Mayra Jiménez¹, Odalys Rivera¹. *Autor para correspondencia

¹ Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara. Cienfuegos. Autopista Nacional Km. 246 Ranchuelo. Villa Clara. Cuba. e-mail: epica@civc.inf.cu

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

El presente trabajo se desarrolló en la Biofábrica de la caña de azúcar perteneciente a la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) Villa Clara-Cienfuegos. Tuvo como objetivos estudiar el efecto de la inmersión temporal en el coeficiente de multiplicación de diferentes genotipos de caña de azúcar, evaluar la influencia del número de subcultivos y el tipo de frascos en el coeficiente de multiplicación y establecer las normas de producción para la fase de multiplicación empleando sistemas de inmersión temporal. Los resultados obtenidos evidenciaron que independientemente del genotipo evaluado, el coeficiente de multiplicación se incrementó, observándose en la variedad con menor respuesta valores desde 1,0 en 3,9 en el sistema convencional hasta 1,0 en 31,7 con inmersión temporal. Con respecto al volumen del frasco de cultivo se observó que este tuvo un efecto marcado sobre el coeficiente de multiplicación. Los mejores resultados se obtienen al emplear frascos de 10 litros de capacidad, con coeficientes que oscilaron entre 89,3 hasta 100 unidades, lo cual demostró la factibilidad del empleo de los sistemas de inmersión temporal como parte de una estrategia de semiautomatización del proceso de micropropagación de la caña de azúcar. Al mismo tiempo, se pudo determinar que el tiempo de trabajo se redujo al emplear los sistemas de inmersión temporal y por consiguiente aumentó la productividad del proceso.

Palabras clave: caña de azúcar, coeficiente de multiplicación, inmersión temporal, micropropagación

4-02 Influencia del campo magnético en el contenido fotosintético de plántulas de cafeto aclimatizadas

Albys E Ferrer Dubois*, Yilan Fung Boix, Elizabeth Isaac Alemán. *Autor para correspondencia

Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA). Universidad de Oriente. Ave. Las Américas, s/n. GP: 4078. Santiago de Cuba. e-mail: albys@cnea.uo.edu.cu, e-mail:afd14@yahoo.com

La etapa de aclimatización es fundamental en la micropropagación y se persigue con ella lograr la supervivencia de las plantas al momento del trasplante y el inicio del crecimiento de las mismas. El objetivo de esta investigación fue determinar la acción del agua tratada magnéticamente en la concentración de pigmentos fotosintéticos de plántulas de cafeto (*Coffea arabica* L. variedad Caturra Rojo) aclimatizadas. Se utilizó un magnetizador de imanes permanentes con inducción magnética de 400 Gauss. Los parámetros a evaluar fueron: porcentaje de supervivencia, concentración de clorofila *a* y *b* y carotenoides. Se obtuvo que el uso del tratamiento magnético en el agua de riego permite lograr un mayor contenido de pigmentos fotosintetizadores, lo cual posibilita una mejor adaptación de estas plantas a las condiciones ambientales.

Palabras clave: aclimatización, *Coffea arabica* L, micropropagación, pigmentos fotosintéticos, tratamiento magnético

4-03 Efecto de una optimización de la metodología de desinfección de yemas apicales de *Philodendrum xanadu*

Aliuska Sierra Peña*, Oscar Concepción Laffite, Reinaldo Trujillo Sánchez, Marcos Daquinta Gradaille. *Autor para correspondencia

Centro de Bioplasmas, Laboratorio de Escalado. Universidad de Ciego de Avila (UNICA). Carretera a Morón Km. 9. Ciego de Avila. Cuba. e-mail: aliuska@facagro.unica.cu

La propagación *in vitro* de las Aráceas ornamentales se realiza mediante la organogénesis y la proliferación de brotes axilares. La contaminación es una de las principales causas de pérdidas en los sistemas de cultivo *in vitro* de plantas, ya que causan daños muy severos (Alvarado, 1998). En el laboratorio de Escalado existían problemas de contaminación en el *Philodendron*, que no posibilitaba el establecimiento del explante. El objetivo del presente trabajo es optimizar la técnica de desinfección de yemas de *Philodendron xanadu*, para su implantación *in vitro*. Para la preparación del material vegetal se seleccionaron y cortaron yemas apicales de plantas que crecieron bajo condiciones semi-controladas, después del lavado de las yemas, la desinfección se realizó en condiciones estériles

donde se llevó a cabo un tratamiento con hipoclorito de calcio (2.0%) durante 15, 20, 25, 30, 35 y 40 minutos. El tiempo de desinfección más efectivo fue de 30 - 35 minutos.

Palabras clave: contaminación, cultivo *in vitro*, *Philodendrum xanadu*, organogénesis, desinfección

4-04 Efecto del medio de cultivo en la germinación *in vitro* de semillas de claveles chinos (*Dhiantus chinensis* linn.) y en el desarrollo de las plántulas obtenidas

Ania Pinares de la Fe^{1*}, Dalia Pérez Montesino¹, Clara González², Sonia Xiqués². *Autor para correspondencia

¹Jardín Botánico Nacional. La Habana. Cuba. e-mail: hajb@ceniai.inf.cu

²Facultad de Biología, Universidad de la Habana.

Se estudio el efecto del medio nutritivo en la germinación de semillas de Claveles chinos. Se sembraron en medio sólido de Murashige-Skoog sin hormonas y suplementado con: complejo B, myoinositol, L-glutamina y sacarosa y en medio sólido Knudson. Además se estudio el efecto del medio en el desarrollo de las plantas y en el número de nudos por planta en cada tratamiento.

Palabras clave: claveles chinos, cultivo *in vitro*, germinación, medios de cultivo

4-05 Caña de azúcar: Micropropagación de variedades recalcitrantes

Aldo Noguera*, Elena Díaz, Nora Paz, Jacqueline Ramallo *Autor para correspondencia

Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres. William Cross 3150. 4101 Las Talitas – Tucuman – Argentina. e-mail: aldonoguera25@hotmail.com

La producción de semilla mejorada de caña de azúcar mediante la técnica de micropropagación de ápices caulinares permite una rápida y eficiente multiplicación de nuevas variedades de caña de azúcar y a la vez posibilita la "limpieza de patógenos" de genotipos que se cultivan tradicionalmente. La EEAOE comenzó con la propagación masiva de las variedades CP

65-357 (21.547 plantines) y LCP 85-384 (47.345 plantines) durante el año 2001. Para la campaña 2002 se trabajó con las siguientes variedades: LCP 85-376, TUC 77-42; RA 87-2 y RA87-3, las cuales presentaban “*in vitro*” dificultades tales como elevada oxidación, poca capacidad de regeneración, heterogeneidad de respuesta y escaso macollaje. Estas dificultades mencionadas las convierten en variedades “recalcitrantes”. Para lograr la micropropagación de estas variedades se trabajó en el ajuste de los medios de cultivo en los cuales se modificaron las concentraciones de cinetina (0,1 a 0,3 ppm), 6BAP (0,3 a 0,5 ppm) y ANA (0,025 ppm). Los porcentajes de contaminación durante el proceso fueron elevados fluctuando entre 3 a 41% en la etapa de iniciación y 4,5 a 52% en la de multiplicación, observándose además un elevado porcentaje de bacterias endofitas propias del genotipo cultivado. La tasa de multiplicación fue baja fluctuando desde 3 a 4,2.

Palabras clave: caña de azúcar, micropropagación, oxidación

4-06 Evaluación en condiciones de campo del comportamiento de virtroplantas de Fruta bomba c.v Maradol rojo obtenidas por cultivo *in vitro* en dos agroecosistemas

Ariannys Roque López^{1*}, Eduardo Héctor Ardisana², Héctor Vento Díaz², Antonio Torrez García², Luis Peña Ojeda², Benigno Díaz Rodríguez², Miriam Isidron Pérez², Lienette Godoy del Pozo². *Autor para correspondencia

¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Facultad de Agronomía. Centro Universitario las Tunas (CULT). Ave. Carlos J. Finlay s/n. Las Tunas. Cuba. e-mail: ariannys@isch.edu.cu.

² Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Universidad Agraria de La Habana (UNAH). Autopista Nacional Km. 23 1/2. La Habana. Cuba. e-mail: biotec@isch.edu.cu

Se plantaron posturas provenientes del 3^{er}, 12^{mo} subcultivo obtenidas por el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de fruta bomba (*Carica papaya* L.) c.v. Maradol Rojo, según la metodología propuesta por Roque *et al*, (2001) y plantas control por la propagación sexual, en dos agroecosistemas diferentes, uno ubicado en la zona de Tapaste (provincia Habana), bajo un suelo Ferralítico Rojo, y otro ubicado en la zona de Guanabacoa (provincia Ciudad de La Habana), bajo un suelo Pardo con Carbonato. Al evaluar los resultados obtenidos, los caracteres altura de las plantas, número de hojas, diámetro del tallo, color y tipo de

flor por planta, porcentaje de floración y fructificación, tipo y número de frutos por plantas, se pudo constatar que en las plantas obtenidas por cultivo *in vitro*, no existió diferencia significativa con respecto al control y no se manifestaron variaciones genéticas a los doce meses de plantadas. Sin embargo, en los caracteres de la altura de los primeros frutos y el peso de los frutos, existieron diferencias significativas entre los tratamientos, favoreciéndose las plantas obtenidas *in vitro*. Las plantas bajo suelo Ferralítico Rojo, expresaron un mejor comportamiento agronómico con respecto a las cultivadas en suelo Pardo con Carbonato.

Palabras clave: Carica papaya L., cultivo in vitro, micropropagación

4-07 Avances y perspectivas de la propagación masiva de frutales de clima templado en Bolivia

Carmen L. Villarroel Vogt*, Cecilia Ugarte, Gino Aguirre. *Autor para correspondencia

Laboratorio de Cultivo de tejidos. Fundación PROINPA. Av. Blanco Galindo km 12,5 (Calle C. Prado s/n). Cochabamba, Bolivia. e-mail: cvillarr@proinpa.org

La diversidad de condiciones edafoclimáticas y las grandes superficies de cultivo hacen de Bolivia un país apto para el desarrollo de la fruticultura. En frutales de clima templado (duraznero, manzano y frutilla entre otros) sólo existen plantaciones a pequeña escala, donde los agricultores aún no realizan un buen manejo de los huertos. A esto se suman los problemas fitosanitarios los cuales constituyen los principales factores causantes de los bajos rendimientos y de mala calidad de frutos, como resultado de los sistemas tradicionales de propagación. Las técnicas de cultivo de tejidos, constituyen una alternativa viable para mejorar la producción frutal en Bolivia. El laboratorio de cultivo de tejidos de la Fundación PROINPA, actualmente trabaja en el desarrollo de protocolos de propagación *in vitro* de 5 especies frutales de clima templado con alto potencial productivo y económico (Manzano, Duraznero, Cerezo, Frambueso y Frutilla). Se pretende en un mediano plazo, garantizar el abastecimiento regular y adecuado de material de alta calidad genético-sanitaria que responda a las expectativas del mercado tanto local como internacional, con miras a la implementación de un Sistema Nacional de Producción de Plantas.

Palabras clave: cerezo, cultivo de tejidos, duraznero, frambueso, Frutilla, manzano, micropropagación

4-08 Comportamiento *in vitro* de material adulto de *Castanea sativa* Mill. provenientes de genotipos seleccionados en campo

Darcy Ríos L.^{1*}, Manuel Sánchez O.¹, Rodrigo Hasbún Z²., René Escobar R.¹. *Autor para correspondencia

¹ Laboratorio de Biotecnología Forestal, Departamento de Silvicultura. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile. e-mail: drios@udec.cl

² Alumno del Programa de Magíster en Ciencias Forestales, Universidad de Concepción.

Castanea sativa es una especie fruto – forestal que está adquiriendo una gran importancia en Chile como una especie doble propósito. Su gran variabilidad genética en los huertos productivos existentes en el país, hace que la producción y la calidad del fruto sean heterogéneo y por ende un producto exportable de menor calidad. La micropropagación es una alternativa viable para la producción de plantas a partir de individuos seleccionados en campo por sus características macromorfológicas del fuste y de producción de fruto.

El objetivo del presente estudio es el de establecer protocolos óptimos para la micropropagación de individuos selectos de castaños que presenten características deseables en calidad de madera producción de fruto y sanidad, ubicados en huertos productivos de la VIII región de Chile.

La selección de los individuos se realizó por características fenotípicas, como lo son producción y tamaño de frutos, rectitud del fuste, forma de copa, entre otras. De éstos se tomaron ramas laterales de 15 cm de longitud, para la confección de varetas. Las varetas fueron desinfectas, envueltas en papel de aluminio y dejadas en cámara fría a 5°C por un período aproximado de dos meses. Después de este tiempo, se procedió a realizar una desinfección externa con alcohol (70%v/v) e hipoclorito de sodio (2% cloro activo), bajo ambiente estéril, las que fueron dejadas en condiciones de cámara de cultivo inmersas en frascos con agua estéril y protegidas con un plástico transparente, a 25°C y a una intensidad lumínica de 3 000 lux. Una vez producida la brotación de las yemas y alcanzada una longitud de 3 cm aproximadamente, se extrajeron en condiciones estériles y se cultivaron en medio DKW suplementado con BAP y AIB en una proporción de 10/1 hasta la generación de nuevos brotes. Se evaluó la fase de establecimiento al medio de cultivo en base a % de contaminación, nº de brotes y longitud de

los mismos.

Los resultados han indicado un comportamiento diferencial en el material vegetal proveniente de los diferentes individuos seleccionados, por lo que el aspecto genético determina el comportamiento morfogénico de los explantos utilizados. De igual forma, este aspecto se encuentra directamente relacionado en la capacidad rizogénica de los nuevos tallos originados y en su capacidad de aclimatación y endurecimiento a las condiciones *ex vitro*.

Financiado por proyecto FONDEF D97 F1059 y DIUC 99.142.007-1.0

Palabras clave: castaños, contaminación, micropropagación, castanea sativa

4-09 Empleo del BIOBRAS-6 en la micropropagación del plátano (*Musa spp.*) Clon FHIA -21

Felipe Alberto Jiménez Ferry*, Daymí Ramírez Aguilar, Daniel Agramonte Peñalver. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: terryfelipe40@hotmail.com

Con la finalidad de evaluar la efectividad del Biobras-6 (DAA-6) en la micropropagación del cultivar FHIA-21 se llevó a cabo el presente trabajo durante el período enero del 2000 a septiembre del 2001, en el laboratorio de propagación masiva, del Instituto de Biotecnología de las Plantas. En el mismo se estudiaron diferentes dosis (0.05 y 0.01 mg.l⁻¹) y combinaciones de este producto con reguladores del crecimiento para la multiplicación, el enraizamiento *in vitro* y la aclimatización. Se logró como resultado de los experimentos para las diferentes etapas un marcado efecto de reforzamiento auxínico del Biobras-6. En la fase de multiplicación el Biobras-6 (0.05 mg.l⁻¹) combinado con 6-Bap (4mg.l⁻¹) presentó los indicadores superiores del crecimiento de las plantas *in vitro*, al igual que en la fase de enraizamiento a dosis similar como suplemento del medio de cultivo con AIA 0.65 mg.l⁻¹, también se observó un desarrollo superior de las plantas *in vitro* en la fase de aclimatización después de la inmersión de las raíces en la solución de agua común con Biobras-6 (0.05 mg.l⁻¹) y ANA (10 mg.l⁻¹). De forma general el empleo del Biobras-6 en la micropropagación del clon híbrido FHIA-21, incrementó de forma considerable los principales indicadores del crecimiento para las diferentes etapas.

Palabras clave: brasinoesteroide, calidad, biobras-6, micropropagación, reforzamiento auxínico

4-10 Efecto del medio de cultivo y el estado fisiológico de la yema en el establecimiento de la Piña (*Ananas comosus* L. (Merr) variedad MD₂)

Zaida Fundora Licor*, Osbel Mosqueda Frómeta, Maritza Escalona Morgado, Danilo Pina Morgado, Mariela Cid Ruíz. *Autor para correspondencia

Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplasmas, UNICA 69450, Cuba. e-mail: zfundora@bioplasmas.cu

Se determinaron las condiciones necesarias para la implantación de la variedad MD₂. Yemas de coronas y tallos se cultivaron en dos medios de cultivo diferentes. Para la etapa de establecimiento los medios de cultivos MS suplementados con 1 mg.l⁻¹ de BA + 1 mg.l⁻¹ y 1 mg.l⁻¹ ANA y MS + 2.0 mg.l⁻¹ KIN + 2.0 mg.l⁻¹ ANA + 2. mg.l⁻¹ AIB propuestos por (Daquinta 1998) y el Instructivo Técnico del Instituto Tecnológico de Costa Rica respectivamente, logrando el primero un efecto positivo en la posterior proliferación axilar de los brotes. Se logra reducir el costo en 0.01 centavos por planta, por la disminución en la utilización de los reguladores del crecimiento en los medios de cultivo para el establecimiento de la variedad.

Palabras clave: medios de cultivo, piña, reguladores del crecimiento

4-11 Aclimatización de tres genotipos de *Allium sativum* L

Humberto Izquierdo^{1*}, Yovany Quiñones¹, Rosalina Disotuar², Dolores Pedroso², Caridad Pimentel². *Autor para correspondencia

¹ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carretera a Tapaste Km. 3 ½ San José de las Lajas. La Habana. Cuba. C.P. 32700. e-mail: hioviedo@inca.edu.cu, e-mail: hioviedo@hotmail.com

² Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". Carretera Bejucal-Quivicán Km. 33 ½ Quivicán. La Habana. Cuba. C.P. 33500

El trabajo se desarrolló en el Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova" con el objetivo de determinar cuál de los materiales (vitroplantas o microbulbillos) se adaptaba mejor en la

fase de aclimatización a las condiciones ambientales, evaluar la influencia de diferentes sustratos y el efecto de los genotipos en los mismos. Para el estudio se tomaron vitroplantas provenientes del tercer subcultivo y microbulbillos inducidos *in vitro* con 75 g.l⁻¹ de sacarosa de los clones 'Criollo-3', 'Criollo-9' y 'Vietnamita'; se plantaron en un sustrato compuesto por 50% de materia orgánica y 50% de suelo. Posteriormente, se plantaron los microbulbillos en diferentes sustratos, evaluándose en cada caso el porcentaje de sobrevivencia y enraizamiento, altura y número de hojas/plantas. Se obtuvieron como resultados que los microbulbillos se adaptan mejor que las vitroplantas a las condiciones ambientales y alcanzan un porcentaje de sobrevivencia superior y la combinación de zeolita (25%) y materia orgánica (75%) como sustrato fue en la que las plantas provenientes de los microbulbillos obtuvieron mayor sobrevivencia y enraizamiento en los cinco genotipos de ajo.

Palabras clave: aclimatización, ajo, *Allium sativum*, sustratos

4-12 Propagación *in vitro* por organogénesis de la guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40

Israel Caballero González*, Daniel Agramonte Peñalver, Marta Pérez, Daimy Ramírez, Odalys Gutiérrez, Felipe Jiménez. *Autor para correspondencia

Biofábrica de Maleza. Carretera de Maleza, Km 2 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: daniel_agramonte@yahoo.com

Con el empleo de las técnicas convencionales de propagación en la Guayaba (*Psidium guajava* L.) las tasas de multiplicación que se obtienen son muy bajas y se requiere de un período relativamente largo de tiempo para tener plantas listas para el campo. Sobre la base de estas consideraciones se realizó el presente trabajo el cual tuvo como finalidad establecer una metodología para la micropropagación de la Guayaba Enana Roja cubana var. EEA 18-40 a partir de plantas seleccionadas en el campo. Se condujeron experimentos que abarcaron todas las fases desde el pretratamiento del material vegetal hasta la aclimatización. Los resultados mostraron que la aplicación de fungicidas antes del establecimiento incrementó la eficiencia de esta fase. Con el uso de bicloruro de mercurio al 0.05% se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la supervivencia de los ápices, los cuales mostraron su mayor crecimiento cuando se le adicionó al medio de cultivo de establecimiento 1.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP. En la fase de multiplicación

los máximos valores en el coeficiente de multiplicación se obtuvieron con la adición al medio de cultivo de 2.0 y 4.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP. Fue posible lograr hasta un 85% de plantas enraizadas con la dosis 0.5 mg.l⁻¹ de ANA. El mejor comportamiento de estas plantas en la fase de aclimatización se obtuvo cuando las mismas fueron plantadas sobre una mezcla de sustrato compuesta por 85% de humus de lombriz y 15% de zeolita. Los resultados de este trabajo permitieron establecer un conjunto de procedimientos en cada una de las fases, que conforman una metodología para la micropropagación de la guayaba.

Palabras clave: aclimatización, medio de cultivo, micropropagación, Psidium guajaba L.

4-13 CO₂ y luz en la micropropagación de plantas en biorreactores de inmersión temporal

Justo L. González-Olmedo¹, Dagoberto Castro², Maritza Escalona¹, Romelio Rodríguez¹, Yves Desjardins³. *Autor para correspondencia

¹ Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila. (UNICA), Carretera a Morón Km. 9. Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: justo@bioplanta.cu

² Unidad de Biotecnología, UCO, Río Negro, Medellín, Colombia.

³ CRH, Universidad de Laval, Quebec, Canadá.

La influencia del enriquecimiento del aire con CO₂ para favorecer el cultivo autotrófico en los biorreactores de inmersión temporal se estudió en las especies: eucaliptos, piña y caña de azúcar. En el primer caso se evaluaron dos concentraciones de CO₂ (350 y 1200 μmol.mol⁻¹) y dos densidades de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) (80 y 120 μmol.m⁻².s⁻¹). En piña para una concentración de CO₂ de 2 000 μmol.mol⁻¹, se midieron los efectos de dos FFF (80 y 275 μmol.m⁻².s⁻¹); mientras la caña de azúcar se cultivó en condiciones de aire enriquecido con CO₂ (3 000 μmol.mol⁻¹) y de alto FFF (400 μmol.m⁻².s⁻¹). En todos los casos se redujeron las concentraciones de sacarosa en el medio y se comparó con el que contenía 30g.l⁻¹. La evolución del CO₂ en el ambiente interno de los frascos de cultivo permitió interpretar los procesos de intercambio gaseoso favorecidos por las diferentes condiciones. Las respuestas durante el fotoperíodo fueron opuestas: fijación de CO₂ por los brotes cuando estaban iluminados, y acumulación de CO₂ en los frascos durante la oscuridad. La ausencia de sacarosa en los medios nunca favoreció los cultivos; así la mayor cantidad y la mejor calidad de plantas

se logró bajo condiciones fotomixotróficas. En piña se registraron significativos incrementos de fotosíntesis neta, que estimularon distintivamente más brotes cuando $FFF=80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, y mejor calidad de éstos cuando $FFF=275 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para la caña de azúcar se discuten posibles manifestaciones de fotoinhibición o precoz agotamiento del medio, provocados por las mayores condiciones de luz y CO_2 ensayadas.

Palabras clave: CO_2 , biorreactores, enriquecimiento de aire, micropropagación, luz

4-14 Micorrización “*in vitro*” de plántulas de *Coffea canephora* Var Robusta. ¿Una realidad?

Kalyanne Fernández*, Félix Fernández, María Ester González, Eduardo Pérez, Lorelí Mirabal, Mabel Pazos. *Autor para correspondencia

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Carretera a Tapaste Km. 2. San José de Las Lajas. La Habana.

El objetivo de este trabajo fue evaluar algunos efectos provocados por la micorrización sobre el desarrollo *in vitro* de plántulas de café obtenidas por Embriogénesis Somática. Se utilizaron plántulas de café pertenecientes a la especie *Coffea canephora* var. Robusta, en estadio de enraizamiento. A los 30 días de inoculadas las plantas se procedieron a realizar las siguientes evaluaciones: Altura (cm), masa fresca foliar y radical (g), # de pares de hojas y # de raíces; aislamientos microbiológicos; conteo y clasificación de embriones; presencia o no de estructuras fúngicas en el interior radical y actividades enzimáticas Peroxidasa y Polifenoloxidasa. La interpretación de los resultados se realizó mediante un Análisis de Varianza de clasificación simple con posterior Test de Duncan ($p<0.05$). Se pudo apreciar un efecto positivo de la inoculación con cualquiera de los propágulos empleados. La altura, el número de raíces, de pares de hojas y la masa fresca radical y foliar de las plantas inoculadas con micelio fue significativamente mayor que las inoculadas con esporas pregerminadas. Además se encontró en estas plantas una nueva producción de callos embriogénicos. Se obtuvieron embriones en todos los estadios en los tratamientos inoculados, la magnitud que presentó en este estudio por acción de la micorrización resultó obviamente interesante. Además, se observó el micelio penetrando a través de la epidermis y la presencia de haustorios avanzando en las células de la corteza. Finalmente, se

observaron diferencias significativas en las actividades enzimáticas de las plantas inoculadas, corroborándose la presencia del simbiote en el interior radical.

Palabras clave: micorrización, café, embriogénesis somática

4-15 Obtención e implantación *in vitro* de un nuevo híbrido de papaya (*Carica papaya* L.)

Laisyn Posada Pérez^{1*}, Rafael Gómez Kosky¹, Maritza Reyes Vega¹, Idalia Herrera Ofarril¹, Osvaldo Norman Montenegro². *Autor para correspondencia

¹ 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: laisynpp@yahoo.es

² Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara. Cuba.

Este trabajo se realizó con los objetivos de obtener híbridos de Papaya con mejores características que la variedad Maradol Roja y lograr implantar *in vitro* sus ápices. Para seleccionar los mejores progenitores se realizó un estudio de diferentes variedades y un híbrido, para lo cual se evaluaron diferentes parámetros. Las variedades seleccionadas como patrón genético para cruzarlas con la Maradol Roja fueron la Sunrise y la Solo Kapoho, además se incluyó la variedad Strawberry, los cruzamientos se realizaron sobre flores hermafroditas. Las plantas híbridas obtenidas de cada cruzamiento fueron plantadas en condiciones de campo, realizándose las mismas evaluaciones que se le hicieron para la selección de los progenitores. El híbrido F resultado del cruzamiento entre Maradol Roja x Strawberry tuvo un comportamiento superior, según las características buscadas con diferencias con el resto de los genotipos en cuanto a mayor número de frutos por planta, diámetro de los frutos menor y brix. Para el establecimiento de los ápices *in vitro* se emplearon ápices de plantas adultas del híbrido (IBP42-99), las cuales tenían 11 meses de plantadas en campo. Para la desinfección de los explantes se utilizaron diferentes sustancias, solas o en combinación: Hipoclorito de Sodio en concentraciones (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0%), Alcohol al 70% y una mezcla de antibióticos. La mejor desinfección se logró al utilizar

Hipoclorito de Sodio al 1% durante 10 minutos, luego la sumersión en la solución de antibióticos por 30 minutos y utilizando brotes de dos meses de edad, al lograr un 68% de establecimiento.

Palabras clave: papaya, mejoramiento, establecimiento, desinfección

4-16 Propagación *in vitro* del cultivar híbrido FHIA-20 (AABB)

Leyanis García Águila*, Zoe Sarría Hernández, Blanca Pérez Mederos, Yudit Martínez Pérez, Justo Clavero García. * Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de la Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5¹/₂. CP 54830. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: legarcia@uclv.edu.cu

La propagación *in vitro* via organogénica de plátanos y bananos ha permitido la diseminación rápida y masiva de materiales seleccionados. Sin embargo, la influencia del genotipo es determinante en la eficiencia de la propagación. Con la finalidad de evaluar el comportamiento *in vitro* del clon híbrido FHIA-20 para su propagación eficiente fue necesario determinar el tamaño de los ápices y el estado físico del medio de cultivo en la fase de iniciación, así como establecer la dosis de 6BAP y el manejo o cortes de los brotes durante la fase de multiplicación. Como resultado se obtuvo altos porcentajes de regeneración cuando se utilizaron ápices de 1.0 cm² seccionados a la mitad y colocados en medio de cultivo semisólido. La presencia de mortalidad solo se observó en los ápices seccionados y cultivados en medios líquidos. La incidencia de plantas no definidas y con crecimiento en roceta en la fase de multiplicación disminuyó con la reducción de la citoquinina a 2.0 mg.l⁻¹ y con la utilización de brotes de 1.0 cm que fueron individualizados y seccionados a la mitad cuando el seudotallo estuvo formado por más de tres hojas. Estos resultados proporcionaron un incremento en el número de brotes por explantes lo que constituyó un aspecto positivo en la tecnología de propagación *in vitro* de este clon.

Palabras clave: ápices, brotes axilares, Musa spp. propagación in vitro

4-17 Influencia de diferentes factores en la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya labiada*

Loexis Rodríguez¹*, Roberto González¹, Amauri Díaz¹, Gerardo De la Cruz², Jorge González², Esmérida Sánchez¹, Ernesto Fajardo¹. *Autor para correspondencia

¹ Centro de Desarrollo de la Montaña. Limonar de Monterruz. El Salvador. Guantánamo. Cuba.

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

Teniendo en cuenta que *Cattleya labiata* es una especie que ha sido descrita por ser muy difícil de germinar *in vitro*, se concibió esta investigación con el objetivo de evaluar diferentes factores que pueden influir en la germinación asimbiótica *in vitro* de esta especie. Para ello se tuvieron en cuenta los factores siguientes: edad de maduración de las cápsulas, estado físico del medio de cultivo y concentración de carbón activado en el medio de cultivo semisólido. Los resultados obtenidos demostraron que fue posible la germinación, y que para ello fue necesario utilizar cápsulas con 180 días de edad sembrada en medio de cultivo líquido a 100 rpm o medio de cultivo semisólido con carbón activado, a pesar de que los porcentajes de germinación no fueron elevados, estos son suficiente para iniciar satisfactoriamente el proceso de micropropagación de *Cattleya labiata*.

Palabras clave: germinación, carbón activado, Cattleya labiata, medio líquido, micropropagación, orquídeas.

4-18 Enraizamiento ex vitro de *Hibiscus elatus* Sw multiplicados in vitro

Ana G. Trocones Boggiano*¹, Luis A. Delgado Fernández¹, Daniel Agramonte Peñalver², Felipe Jiménez Terry². *Autor para correspondencia

¹ Facultad de Agronomía de Montaña Escambray. Topes de Collantes. Sancti Spiritus. Cuba. e-mail: luis@fame.uclv.edu.cu

² Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV). Carretera a Camajuaní Km. 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

Se presentan los resultados obtenidos en el enraizamiento *ex vitro* de brotes de *Hibiscus elatus* Sw que fueron multiplicados *in vitro* durante cuatro subcultivos. Para el estudio de factibilidad de utilizar esta alternativa se tuvieron en cuenta dos factores fundamentales que fueron el tamaño de los brotes y la aplicación

de reguladores del crecimiento; para lo cual se utilizó un sustrato formado por una mezcla de zeolita (15%) + Casting (85%). Se obtuvo un 80% de supervivencia al emplear brotes con una altura superior 2.5 cm y se comprobó que se puede prescindir de la aplicación de los reguladores del crecimiento.

Palabras clave: enraizamiento ex vitro, hibiscus, multiplicación, reguladores de crecimiento

4-19 Evaluación de la presencia de los serovares I y III de *Xanthomonas albilineans* en plantas procedentes de áreas comerciales y vitroplantas de caña de azúcar

Madyu Matos^{1*}, J.R.Pérez Milian¹, Esther L.Peralta², Leidy Cortegaza¹, Omelio Carvajal¹, Antonio Chinae¹, Omar Santana¹, Yordanka Ruffin¹, Yenima Pellón¹. *Autor para correspondencia

¹ Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Jovellanos, Matanzas. e-mail: epica@atenas.inf.cu

² Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, San José de Las Lajas, La Habana. Cuba.

Se estudiaron tres variantes del tratamiento térmico y cinco variantes del cultivo de tejido partiendo de material infectado por *Xanthomonas albilineans* para determinar la eficacia de estos métodos en el control de la escaldadura foliar de la caña de azúcar. La evaluación del material sometido a saneamiento se realizó a través del aislamiento en medio de cultivo y el UMELISA-DAS. El tratamiento más eficaz para el saneamiento fue el remojo en agua durante 36 horas seguido del tratamiento térmico de 51°C/1 hora. El remojo en agua durante 36 horas seguido del tratamiento de 50°C/3h, la electroterapia y la alternancia de temperaturas a yemas lograron eliminar la bacteria sin embargo la germinación se afectó debido a las altas temperaturas y el estado fitopatológico de las muestras. Se recomienda el uso de estas variantes en la implantación de bancos de semillas y donantes siempre que se parta de un material en buenas condiciones fitosanitarias. En todos los casos hubo total coincidencia en la detección de la bacteria por los métodos utilizados.

Palabras clave: Xanthomonas albilineans, escaldadura foliar, caña de azúcar, medios de cultivo

4-20 Micropropagación de *Mikania glomerata*

Meriele Ana Zan. e-mail: merielez@hotmail.com

Brasil

El guaco (*Mikania glomerata*) pertenece a familia de las Compositae, es comúnmente encontrada en el sur del Brasil. Esta se estudia pues posee gran importancia como planta medicinal y su cultivo es demasiado difícil. En la medicina es utilizada en el trato de complicaciones respiratorias, además presenta en su composición oleos esenciales, cumarinas y ácidos de gran importancia farmacológica. Haya visto la necesidad de hacer una larga producción de la planta para el cultivo y así colaborar con la medicina fue establecido un protocolo de micropropagación del guaco empleando el medio MS (Murashige y Skoog) con la concentración de 0.3mg.l⁻¹ de BAP para la iniciación, MS con 0.5mg.l⁻¹ de BAP para la propagación y MS con 0.5mg.l⁻¹ de BAP acrescido con 1.0mg.l⁻¹ de IBA para el enraizamiento; para la regeneración de callo fue empleado el mismo medio acrescido de concentración 2.0mg.l⁻¹ de BAP más 0.5mg.l⁻¹ de 2,4D. Este protocolo fue desarrollado utilizando tallos y hojas de la planta con el propósito de preservar la misma por su efecto medicinal y tornarla mejor adaptada.

Palabras clave: biotecnología vegetal, Mikania glomerata, micropropagación, planta medicinal

4-21 Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio en la micropropagación de la yuca en Sistemas de Inmersión Temporal

Milagros Basail,* V. Medero, M. Cabrera, Arletys Santos, J. López, J. Ventura, Magaly García, Aymé Rayas, Carmen Pons, Marilyn Martínez, J. García. *Autor para correspondencia

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT, Apdo. 6, Santo Domingo CP 53 000, Villa Clara. Cuba e-mail: inivit@ip.etecsa.cu

La necesidad de producir material de plantación de alta calidad, disponibles para los productores de yuca ha requerido de la búsqueda de alternativas que garanticen el incremento de la eficiencia en los métodos de propagación *in vitro* y su automatización, como el uso de los Sistemas de Inmersión Temporal (RITA®). El presente trabajo fue desarrollado con el objetivo de incrementar el coeficiente de

multiplicación en la propagación masiva de la yuca en Sistemas de Inmersión Temporal. Se utilizó el clon 'CMC-40'. Se estudiaron diferentes volúmenes de medio por explante y densidad de material por unidad a una misma frecuencia de inmersión. Los resultados obtenidos permitieron establecer una metodología mas eficiente para la micropropagación de la yuca, basada en el empleo del Sistema de Inmersión Temporal para incrementar de forma significativa los coeficientes de multiplicación y la producción de vitroplantas de mayor calidad para la fase de enraizamiento y posterior aclimatización a condiciones de campo.

Palabras clave: cultivo de tejidos, medio líquido, yuca, micropropagación, sistemas de inmersión temporal

4-22 Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. 'Cotorrera'

Narciso N. Rodríguez Medina*, Maricela Capote, Bárbara Velázquez.

*Autor para correspondencia

Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. 7ma entre 30 y 32, Miramar, Ciudad de la Habana, Cuba.

In vitro propagation of *Psidium guajava* L. in three culture phases: establishment, propagule multiplication and rooting were done. Contamination and oxidation rates were influenced by explants source and by the epoch for *in vitro* culture. The use of aqueous solutions of polyvinyl pyrrolidone at 5% (w/v), citric acid (75 ppm) and ascorbic acid (50 ppm), before and during surface sterilisation, and the addition of 20 mg.l⁻¹ (w/v) of L – cistein in the culture media, reduced vegetal material oxidation. *In vitro* establishment was effective by culturing nodal explants of 0,6 cm on a liquid Murashige and Skoog (1962) basal medium, with the addition of 1,0 mg.l⁻¹ (w/v) of 6 benzyl adenine (BA) alone, or combined with 0,3 – 0,5 mg.l⁻¹ (w/v) of indol-3-acetic acid (AIA) or with 0,1 mg.l⁻¹ (w/v) of 1 naftil acetic acid (ANA). The combination of 1, 0 mg.l⁻¹ (w/v) of BA with 0,3 mg.l⁻¹ (w/v) of AIA or with 0,1 mg.l⁻¹ (w/v) of ANA permitted the formation of three to eight shoots by explant. Rooting was possible on a half-strength salts of the same basal medium and the addition of 1 g.l⁻¹ (w/v) of activated charcoal and 0,2 mg.l⁻¹ (w/v) of IAA, indole-3-butyric acid (IBA) or ANA, respectively. Plant acclimatisation was higher than 80%.

Key words: propagation, Psidium guajava, multiplication, in vitro establishment

4-23 Nueva tecnología para la fertilización de la Piña en fase IV

Ortelio Hurtado Ribalta

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: hurtadocu@yahoo.es

Con el objetivo de estudiar una variante más eficaz en la fertilización y rápida para el manejo de las vitroplantas de piña y determinar una dosis optima para un periodo menor de su estadía en el área de aclimatización, se planteo una nueva variante de fertilización en este cultivo, con dosis de fertilizantes mayores, empleando como parámetros estándar el sustrato, riego, la intensidad luminosa, condiciones climáticas, bandejas de 70 huecos y tratamiento fitosanitario. Al analizar los resultados se encontró que con la nueva variante los parámetros establecidos para su venta a diferentes empresas se alcanzaban en solo tres meses, que no sucedía así con el método anterior y que con una dosis mayor de la propuesta las vitroplantas no soportan la cantidad su ministrada, muriendo al cabo de los 34 días mueren.

Palabras clave: aclimatización, fertilizante, piña

4-24 Micropropagación *in vitro* de la *Gerbera jamesonii* H. Bolus

Pablo Machado Armas

Biofábrica de las Flores, Desvío del Reparto Universitario Km. 2 ½, Santa Clara. Villa Clara. Cuba. Tel. 281290.

La Gerbera es una de las especies hortícolas de mayor demanda en el mercado interno cubano sin embargo, su explotación ha estado limitada debido a que a través de los métodos tradicionales de multiplicación establecidos en el país, no es posible cumplir con las demandas de "semillas". El presente trabajo se realizó con la finalidad de establecer una metodología que permitiera la propagación comercial de la Gerbera, para esto se estudiaron los medios de cultivo y el manejo de los explantes en las diferentes fases de la micropropagación. Los resultados mostraron que con el empleo de hipoclorito de sodio al 0.5% durante (10 min de aplicación) se logró una alta efectividad en la desinfección de los ápices. Con la combinación del 6 bencilaminopurina (1.0 mg.l^{-1}) y el ácido giberélico (0.1 mg.l^{-1}) en el medio de cultivo fue posible

incrementar el número de brotes por explantes en la fase de establecimiento. En la fase de multiplicación se evidenció un efecto positivo de los reguladores del crecimiento, el manejo de los explantes y el estado físico del medio de cultivo sobre el crecimiento de los explantes y el coeficiente de multiplicación. Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de 6-BAP (2.0 mg.l^{-1}) con AIA (0.65 y 1.3 mg.l^{-1}), subcultivando los explantes mayores de 1.0 cm individualmente y el estado físico semisólido. Una influencia significativa sobre el número de raíces y el crecimiento de los explantes se obtuvo con la adición de ácido indolacético al medio de cultivo de enraizamiento y utilizando para el subcultivo explantes mayores de 3.0 cm . La calidad de los explantes también influyó de forma significativa en los resultados de la fase de aclimatización quedando demostrado que las plantas *in vitro* provenientes de la fase de enraizamiento deben tener más de 3.0 cm de altura.

Palabras clave: enraizamiento, Gerbera, micropropagación, reguladores de crecimiento

4-25 Alternativas del establecimiento *in vitro* en la micropropagación de la Guana

Pablo Peña*, Edgar Acosta, Lydia Galindo, Juan C. Bango, Neisis Pérez, Franklin Arana, Karen Acosta. *Autor para correspondencia

Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro Universitario de Las Tunas. Ave: Carlos J. Finlay s/n. CP: 75200. Las Tunas. Cuba. e-mail: pablolpg70@yahoo.com

Una alternativa que debe ser explotada en especies forestales, para lograr grandes volúmenes de plantas y establecer plantaciones mejoradas es el empleo de métodos biotecnológicos. La Guana (*Hildegardia cubensis* Urb.) es una especie amenazada. En Las Tunas son contados los árboles silvestres de esta especie. La tala para aprovechar sus fibras y la existencia de ganado libre en las zonas boscosas contribuyen a una reducción cada vez mayor de sus poblaciones. Por este motivo se han buscado alternativas de producción de esta especie en forma masiva. Para el estudio se utilizó una planta que reunía los requisitos establecidos como planta donadora, de ella se tomaron las semillas y esquejes de donde extrajimos ápices y segmentos nodales, con el propósito de definir algunas alternativas del establecimiento *in vitro*. Se realizaron dos experimentos, el primero consistió en el establecimiento de ápices y segmentos nodales, unido a

diferentes métodos de desinfección del explante y el segundo consistió en el establecimiento a partir de semillas germinadas *in vitro*. Se comprobó que al utilizar ápices tratados con NaOCl se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la contaminación y la formación de brotes en los explantes. A partir de semillas germinadas *in vitro* se obtuvieron los mejores resultados al utilizar HgCl₂.

Palabras clave: desinfección, forestales, propagación *in vitro*, guana, establecimiento

4-26 Efecto del sustrato en la adaptación a la fase de vivero con condiciones controladas de umbráculo de vitroplantas de *Eucalyptus pellita* F. Muell., *Eucalyptus saligna* Sm. Y *Eucalyptus citriodora* Hook

Leoncio Junco Cruz*, Ana L. Noda Jiménez, Maurilio García López, Dámaris Lorenzo Vila, Rogelio Sotolongo Sospedra, Esteban García Quiñones, Maribel Medina Malagón. *Autor para correspondencia

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

Los eucaliptos constituyen para el occidente de Cuba un potencial productivo significativo, por sus múltiples usos y su adaptación a los suelos silico-arenosos ácidos de la región. Desde 1986 el Instituto de Investigaciones Forestales de Cuba inició un programa de mejoramiento genético, de cuya población seleccionada se pronostican incrementos considerables en la producción de madera, si fuese posible retener por la vía agámica sus características genéticas. El desarrollo de procedimientos eficientes para la micropropagación de ejemplares superiores de *Eucalyptus pellita*, *E. saligna* y *E. citriodora* ha sido obtenido en el Laboratorio de Biotecnología de las Plantas de la Universidad de Pinar del Río. Se evalúa en este trabajo el efecto del sustrato en la adaptación de vitroplantas de las tres especies mencionadas a la fase de vivero con condiciones controladas de umbráculo. Los experimentos se desarrollaron en la Estación Experimental Forestal de Viñales, Pinar del Río. Se estableció un diseño experimental completamente aleatorizado, con arreglo bifactorial, cuatro réplicas y cuarenta vitroplantas por réplica. Los factores evaluados fueron: tipo básico de sustrato (suelo o zeolita) y su mezcla con otros elementos en proporción 1:1 (sin mezcla, carbonilla, arena de río y compost). Se

empleron tubetes plásticos con estrías internas para facilitar el crecimiento direccional de las raíces. Durante las dos primeras semanas se mantuvo el riego por nebulización y la iluminación se disminuyó en un 30%. Posteriormente se incrementó la iluminación y disminuyó la humedad relativa. En estas condiciones a los dos meses la supervivencia fue: 82,8; 80,0 y 87,6% en las especies *E. pellita*, *E. Saligna* y *E. citriodora* respectivamente. En ese mismo orden la altura media de las vitroplantas a esa edad fue: 35,8; 29,0 y 26,6 cm y el diámetro de 2,5; 2,9 y 2,6 mm. Para las tres especies en los tratamientos que contenían suelo se obtuvieron los mejores resultados, siendo la mejor combinación suelo + arena del río. La variabilidad fenotípica para la altura y diámetro de las vitroplantas no excedió el 12%.

Palabras clave: *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus pellita*, *Eucalyptus saligna*, mejoramiento genético

4-27 Cultivo *in vitro* del híbrido *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogani*. Respuesta de diferentes tipos de explantes

Rogelio Sotolongo Sospedra*, Maribel Medina, Maurilio García, Esteban García, Ana L. Noda. *Autor para correspondencia

Laboratorio de Biotecnología de las Plantas. Universidad de Pinar del Río, Cuba. Carretera a San Juan y Martínez Km. 5 "El Vizcaino". Pinar del Río. Cuba. e-mail: soto@af.upr.edu.cu

En el género *Swietenia*, existen varios reportes de diferentes autores sobre la aplicación del cultivo de tejidos con vistas a la propagación clonal *in vitro*, sobre todo de la especie *Swietenia macrophylla*, en cuanto a la micropropagación de las caobas, no se ha reportado aun una metodología completa aplicable a gran escala, sobre todo porque la mayoría de estos reportes refieren la utilización de plántulas asépticas como fuente de explantes. Es objetivo de este trabajo: definir las vías para el establecimiento *in vitro* de yemas apicales de árboles adultos, rebrotes obtenidos a partir de ramas colocadas en agua y hojas, así como determinar los medios de cultivo y las concentraciones más adecuadas de reguladores del crecimiento que permitan la inducción de brotes a partir de yemas o la formación de callos a partir de hojas.

Palabras clave: caoba, micropropagación, *Swietenia macrophylla*, cultivo de tejidos

4-28 Empleo de la micropropagación en la mejora genética y la propagación de la guayaba enana (EEA 18-40)

Raúl Collado*, Daniel Agramonte, Juan N. Pérez Ponce, Marta Pérez, Odalys Gutiérrez, Felipe Jiménez, Daymi Ramírez *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: raulsuleydi@yahoo.com.mx

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de propagar y mejorar genéticamente el guayabo por métodos biotecnológicos empleando semillas botánicas, se realizó el presente trabajo. La selección de progenitores y las evaluaciones de todo el material se efectuaron en la Estación Experimental de Remedios y la micropropagación, en el Instituto de Biotecnología de las Plantas. Los resultados muestran que los esquejes iniciaron la producción a los cinco meses, las líneas clonales entre los 7-14, y que las plantas de semillas a los 17 meses aún no habían comenzado la fase de floración; la poda no influyó en la precocidad; pero sí, significativamente en el número de frutos por planta. Se encontró una fuerte relación entre el área foliar y el peso de los frutos, con una correlación altamente significativa ($p < 0.01$) de 0.746. En el análisis multivariado clúster se encontró que las dos plantas originales pertenecen a grupos distintos junto con sus respectivas líneas clonales, con excepción de la A-9, A-33 y B-48, las cuales fueron superiores a los progenitores en todos los caracteres evaluados y; fueron seleccionadas y recomendadas para los trabajos de micropropagación y mejoramiento genético.

Palabras clave: guayaba, mejoramiento genético, micropropagación

4-29 Un primer ensayo sobre el empleo de minitubérculos de Ñame como material de siembra en campo

Silvio Meneses Rodríguez^{1*}, María Abad Ramírez¹, Maylén García Corría¹, Misterbino Borges García². *Autor para correspondencia

¹ Universidad de Granma, Bayamo. Granma.

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov". Bayamo. Granma.

La producción de minitubérculos a partir de vitroplantas aclimatizadas está siendo utilizada en la actualidad como una vía alternativa para la producción comercial de semilla agámica en algunas especies tuberosas. Teniendo en cuenta esta posibilidad, en la Universidad de Granma y el I. I. A. "Jorge Dimitrov" fueron realizadas observaciones en la especie *Dioscorea alata*, sobre el crecimiento de las plantas y la producción de tubérculos comerciales obtenidos a partir de la siembra de minitubérculos. El presente trabajo constituye una primera aproximación a la cuestión. Si bien no permite una exploración a gran escala, sí da lugar a obtener una descripción breve sobre las potencialidades de los minitubérculos para la producción comercial de semilla agámica de ñame. Se emplearon vitroplantas de ñame, pertenecientes al clon "Caballo" o "Jamaicano", que fueron aclimatizadas en la Biofábrica de Granma. El trasplante a las bandejas de poliespuma se realizó en septiembre del 2000 y permanecieron en las mismas hasta su senescencia y desecación en marzo del 2001. Posteriormente se extrajeron los minitubérculos y se conservaron secos en una caja de cartón corrugado a temperatura ambiente durante tres meses. En el momento de la siembra, el 5 de junio del 2001, se conformaron cuatro variantes atendiendo a la masa en gramos de los minitubérculos: I, entre 0,60 y 1,54; II, entre 1,93 y 2,98; III, entre 3,00 y 4,85 y IV, entre 5,07 y 8,91. La siembra se realizó en una parcela experimental que recibió las atenciones agrotécnicas tradicionales. La cosecha se realizó el 27 de febrero del 2002. El crecimiento de las plantas, expresado en las dimensiones de las hojas y los diámetros del tallo no mostró diferencias apreciables entre variantes. La producción de tubérculos comerciales en todas las variantes fue similar a la obtenida en condiciones de producción convencionales. En total la masa de tubérculos producida fue de 52,165 kg, lo que representó un incremento en masa de 279 veces con respecto a la masa de minitubérculos sembrada.

Palabras clave: ñame, aclimatización, minitubérculos

4-30 Sistema de inspección y certificación de semillas obtenidas a través de técnicas biotecnológicas

Vicente Crespo Hernández^{1*}, Leyanis García Águila², Alcides Martínez Torres¹. *Autor para correspondencia

¹ Centro Nacional de Sanidad Vegetal. e-mail: cnsv@ceniai.inf.cu

² Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de la Villas Carretera a Camajuaní km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: leyanis02@yahoo.es

La tecnología de propagación *in vitro* desarrollada para la producción comercial de vitroplantas de diferentes especies ha contribuido al desarrollo de la agricultura cubana. Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas de la producción de semillas por técnicas Biotecnológicas se han presentado dificultades por la presencia de mezclas varietales, variaciones genéticas inducidas por el cultivo de tejidos y la incidencia de microorganismos patógenos en las plantaciones comerciales. Teniendo en cuenta esta problemática el presente trabajo tiene como objetivo establecer un sistema para la inspección y certificación del proceso tecnológico durante la propagación *in vitro* de diferentes especies. Para ello, se creó un sistema de inspección y certificación donde se establecieron normas y requisitos dirigidos al control y supervisión de la micropropagación comercial. En el sistema de inspección se incluye los requisitos para la creación de los bancos de germoplasmas, los aspectos morfológicos y fitosanitarios necesarios en la selección de las plantas donadoras, la multiplicación del material vegetal en el laboratorio y la aclimatización de las vitroplantas previo a su plantación en campo.

Palabras clave: propagación in vitro, certificación, micropropagación comercial

4-31 Determinación de la estabilidad genética en plantas de yuca micropropagadas, mediante AFLPs

Víctor Medero^{1*}, Roosevelt Escobar², Gerardo Gallego², Joe Tohme², Yoel Beovidez¹, Sergio Rodríguez¹, Rafael Gómez³. *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, Apartado 6. Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. e-mail: inivit@ip.etecsa.cu

² Unidad de Biotecnología. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

³ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Se reporta el empleo de la técnica de AFLP para determinar a nivel molecular la estabilidad genética de las plantas de yuca propagadas por diferentes métodos: embriogénesis somática, organogénesis y tradicional en campo. Se utilizaron los clones 'CMC-76', 'CEMSA 74-725' y 'Señorita' del banco de germoplasma del instituto. Se aplicaron dos Kit para AFLPs, uno con una combinación de cebadores de selección

+2/+3 (AFLP® Analysis System II, GibcoBRL®) y otro +3/+3 (AFLP® Analysis System I, GibcoBRL®). Se estudiaron 44 combinaciones de cebadores (*EcoRI*+2 ó *EcoRI*+3 x *MseI*+3) y se seleccionaron cinco como las más eficientes. Se encontró que las plantas procedentes de los diferentes métodos de propagación estudiados dentro de cada clon, resultaron genéticamente idénticas y sólo fueron observadas diferencias entre los tres clones estudiados. Este resultado confirma la utilidad de los AFLPs para el estudio de la estabilidad genética de los materiales micropropagados, conservados a mediano plazo o crioconservados. Además, las plantas obtenidas por estas técnicas pueden ser utilizadas para la producción de material de plantación de alta calidad en este cultivo.

Palabras clave: AFLP, embriogénesis somática, estabilidad genética, organogénesis

4-32 Establecimiento *in vitro* de especies nativas en peligro de extinción

Matilde Uribe*, Luis Cifuentes, Marcelo Garcés *Autor para correspondencia

Universidad de Concepción. Departamento de Ciencias Básicas. Unidad Académica Los Ángeles. Chile. e-mail: muribe@udec.cl

Se reporta un método efectivo para la regeneración *in vitro* de microplántulas de *Beilschmiedia berteroana* (Gay) Kostermans, *Legrandia concinna* (Phill.) Kausel y *Berberidopsis corallina* Hook, especies forestales endémicas de Chile en peligro de extinción.

Se establecieron *in vitro* utilizando yemas axilares con segmentos nodales de plantas juveniles. Mediante un experimento factorial se evaluó la respuesta de los explantes en medios basales MS (Murashige y Skoog, 1962) y DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) y combinaciones hormonales: BAP (0.5 y 1 mg.l⁻¹) más AIB (0,1 mg.l⁻¹). El establecimiento de los explantes ocurre dentro de los primeros 45 días de cultivo con un porcentaje de supervivencia de 70-100%. En *Legrandia concinna* y *Berberidopsis corallina* las mejores respuestas se logran en medio MS y combinación hormonal 0,1/0,5 mg.l⁻¹ AIB/BAP, mientras que en *Beilschmiedia berteroana* la mejor respuesta ocurre en medio DKW y combinación hormonal 0,1/1mg.l⁻¹ AIB/BAP.

Palabras clave: regeneración *in vitro*, *Beilschmiedia berteroana* (Gay) Kostermans, *Legrandia concinna*, *Berberidopsis corallina*, establecimiento *in vitro*

4-33 Micropropagación de *Dioscorea alata* L. conservado por crecimiento mínimo

Misterbino Borges^{1*}, Yoleidis Fernández¹, Narciso Aguilera¹, Silvio Meneses², Joel Vázquez¹, Wilson Ceiro², Zucel Infante¹, Milvia Fonseca¹. *Autor para correspondencia

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

² Universidad de Granma. Apdo 21, Bayamo CP 85100, Granma, CUBA. e-mail: silvio@udg.granma.inf.cu

El presente trabajo tuvo como objetivo lograr la micropropagación del germoplasma de *D.alata* L conservado en condiciones *in vitro* por el método de crecimiento mínimo. Se cultivaron en el medio de multiplicación segmentos nodales procedentes de distintos tratamientos de conservación *in vitro* basados en la modificación del medio de cultivo con diferentes componentes variables (manitol, bencilaminopurina, carbón activado) durante nueve meses. A las cinco semanas se evaluó el proceso de micropropagación mediante la longitud del vástago y el número de nudos de novo por explante. Los resultados obtenidos demostraron la multiplicación normal en condiciones de micropropagación del material procedente de la conservación.

Palabras clave: *Dioscorea alata* L., micropropagación, ñame

4-34 Efectos del brasinoesteroides mh5 en el incremento de la calidad de los explantes de *eucalyptus urograndis* propagados mediante biorreactores de inmersión temporal. Influencia de la talla de las planántulas en la aclimatización

Romelio Rodríguez*, Gerson A. Palhares, Mariela Cid, Danilo Pina, Justo L. González. *Autor para correspondencia

Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplasmas. UNICA. Carretera a Morón Km. 9,5. Cp: 69450, Ciego de Avila, Cuba. e-mail: bioclima@bioplasmas.cu

Entre las técnicas actuales para alcanzar la pronta introducción de nuevas variedades a escala productiva se encuentra la multiplicación mediante Biorreactores de Inmersión Temporal. Plántulas de

Eucalyptus urograndis (*E. grandis* Hill ex Maiden x *E. urophylla*) sirvieron como material vegetal con el objetivo de incrementar la calidad de los explantes en los Biorreactores de Inmersión Temporal y estudiar el efecto que ejerce la talla de las plántulas en la supervivencia durante su tránsito por la fase de aclimatización. La aplicación del brasinoesteroide MH5 a bajas concentraciones (0,01 y 0,1 mg.l⁻¹) en los medios de cultivo durante la etapa de elongación incrementó la altura, el número de hojas, la masa fresca y seca de las vitroplantas en los BIT. Durante la fase de aclimatización, las plántulas de menor categoría (1.1-2.0 cm) alcanzaron los más altos niveles de supervivencia e incrementos en la altura, número de hojas y raíces.

Palabras clave: aclimatización, biorreactores de inmersión temporal, brasinoesteroide

4-35 Micropropagación de porta injertos de vid resistentes a la filoxera y a nemátodos

Vázquez Martínez O^{1*}, Jiménez Díaz F², Pérez-Molphe Balch E. M¹.

*Autor para correspondencia

¹ Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias; Comarca Lagunera, Torreón Coah. México

Se desarrolló un método para la propagación *in vitro* de 11 portainjertos de vid resistentes a la filoxera y a nemátodos a partir de segmentos nodales.

Diferentes concentraciones del medio nutritivo (Chee y Pool, 1987) 50, 75 y 100%; benciladenina (BA; O, 0.5 y 1 mg.l⁻¹) y tres condiciones diferentes de luz (un periodo de una semana de obscuridad previa a la luz continua, un fotoperíodo de 16/8 y luz continua) se evaluaron para su efecto sobre el desarrollo de yemas y brotes. La mejor producción de brotes fue sobre MS (75-100%) para todos los genotipos. La adición de BA al medio demostró importancia para promover la dominancia lateral. Sin embargo, se detectaron pocas diferencias entre 0.5 y 1 mg.l⁻¹ para incrementar la proliferación de brotes. Las condiciones de luz indujeron pocas diferencias cuantitativas entre los genotipos. Sin embargo, el fotoperíodo de 16/8 rindió mejores respuestas cualitativas.

Dos medios (Monette y Roubelakis) se probaron para la inducción de rizogénesis. Ambos indujeron la formación de raíces adventicias. El medio Roubelakis rindió mejores respuestas cuantitativas para la mayoría de los genotipos. Se realizó una prueba ELISA sobre muestras de los cultivos para detectar la presencia de dos virus (GFLV y GLRV).

Palabras clave: nemátodos, propagación in vitro, vid

4-36 Effect of three brassinosteroids on morphological and physiological parameters of *in vitro* plantlets of potato *Solanum tuberosum* L. c.v. Desireé *in vitro* and in the greenhouse

Britta Kowalski¹, Felipe Jimenez Terry^{2*}, Isabel Jomarrón Rodiles³, Daniel Agramonte Peñalver², Francisco Coll Manchado³ *Autor para correspondencia

¹ Faculty of Agricultural and Environmental Sciences. Department of Agroecology. Institute of sustainable crop husbandry. University of Rostock, Rostock, Germany

² Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5.5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

³ Chemical Faculty, Havana University. Havana, Cuba.

The brassinosteroids NH5, Biobras 6, Biobras 16 were applied to the culture medium in concentrations ranging from 0,1 to 0,001 mg.l⁻¹. The plantlets were then transplanted into the greenhouse. Brassinosteroids tended to diminish morphologic parameters such as fresh and dry weight, plant height and node number, both *in vitro* and at acclimatization. Brassinosteroids influenced physiologic parameters such as waterloss after cutting, dry matter content, internode length and root shoot ratio of acclimatized microplants. The adverse effect on biomass production diminished with decreasing concentration of the three brassinosteroids in the culture medium, at the same time maintaining positive effects on physiological parameters. Application of 0,005 mg.l⁻¹ Biobras 6 or MH 5 *in vitro* led to increased tuber production in the greenhouse, in the magnitude of 50 %, both tuber number and tuber yield. A similar effect could be achieved with foliar application in the greenhouse, the increase in yield and tuber number was however lower.

Key words: brassinosteroids, potato, greenhouse, acclimatization, physiologic parameters, biobras 6

4-37 Las normas de trabajo en la propagación masiva de plantas

Miguel Suárez Castellá*, Robin Triana Gutiérrez, Mayelin Rodríguez Urquiza, Daymí Ramírez Aguilar, Zaida Pérez Roque, Alex Rodríguez Concepción. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5.5. Santa Clara, Villa Clara. e-mail: pmsuarez@uclv.edu.cu

El logro de metas productivas en la propagación masiva de plantas con la eficiencia y eficacia que exige la actual competencia del mercado de plantas *in vitro* transita por el incesante incremento de la productividad del trabajo del personal, en especial, los que trabajan en los cuartos de siembra ya que en su desempeño se concentra el peso fundamental de la producción *in vitro* y sus indicadores fundamentales. Las tendencias modernas de la organización del trabajo en los procesos productivos emplean, para medir y incentivar los necesarios incrementos de la productividad del trabajo, la definición de normas de trabajo para cada operación que permita establecer las medidas de trabajo que cada trabajador debe realizar en cada jornada de trabajo. El cálculo de estas normas de trabajo se sustentan, como práctica común según registra la bibliografía especializada y la práctica internacional, en la aplicación de técnicas de Estudio de Métodos y Tiempo. El presente trabajo pretende mostrar los procedimientos metodológicos que se diseñaron para el cálculo de las normas de trabajo en las operaciones de manipulación del material *in vitro* en los cuartos de siembra de las biofábricas en Cuba, los valores que se han establecido en cada caso, siendo valores reconocidos como elevados (entre 1500 y 2500 explantes por trabajador en una jornada laboral), así como los impactos que estos han propiciado en el incremento de la productividad (entre un 15 y 25%) anual y por ende los resultados que estos generan en los costos de producción.

Palabras clave: propagación masiva, normas de trabajo, biofábricas, organización del trabajo

4-38 Enraizamiento *in vitro* de *Agave cocui* Trelease

Yépez G., Lianette M^{1*}, Vargas, Edith², García, Eva. De². *Autor para correspondencia

¹Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Centro de Investigaciones en Ecología y Zonas Áridas. Fax: 00-58-268-2524922. e-mail: cieza@unefm.edu.ve, lianettey@hotmail.com

²Universidad Central de Venezuela, Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

El crecimiento y el enraizamiento *in vitro* de *Agave cocui* fue evaluado mediante la transferencia de vitroplantas que poseían de 3 a 5 cms de altura a medios de cultivo donde se combinaron sales de MS (1965) (50% de la concentración original) y reguladores del crecimiento (AIA y AIB) aplicando un diseño en bloques al azar. Cuatro semanas después se apreciaron valores máximos de 6 ± 1 raíces, 2 ± 0.6 hojas nuevas y 1.5 ± 0.3 cms mas de altura en el medio de cultivo que contenía AIB 0.5 mg.l^{-1} . Los análisis de varianza revelaron que los resultados obtenidos apuntan una tendencia a que las plántulas desarrollan raíces cuando se aplica AIB 0.5 mg.l^{-1} , ganan menos altura en presencia de AIA y AIB y producen al menos 1.2 y 1.7 hojas nuevas con AIB 0.5 mg.l^{-1} y/o sin reguladores de crecimiento. El análisis de componentes principales mostró la afinidad del medio de cultivo complementado con AIB y en ausencia de hormonas con el enraizamiento *in vitro* y la producción de hojas en *A. cocui* mostrando ser variables morfológicas importantes como una expresión del vigor de las vitroplantas, factor indispensable para el éxito de la fase de aclimatación.

Palabras clave: enraizamiento in vitro, medios de cultivo, agave, aclimatización

4-39 Establecimiento de ápices de malanga *Xanthosoma spp*, libres de virus en medios líquidos

Malachy Dottin Pilgrim^{1*}, Felipe A. Jiménez Terry², Daniel Agramonte Peñalver², Juan N. Pérez Ponce², Martha Pérez Peralta², Odalis Gutiérrez Martínez², Daymí Ramírez Aguilar². *Autor para correspondencia

¹ Estudiante de Doctorado (FAO) Granada.

² Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: dagramonte@uclv.edu.cu

En el presente trabajo se realizó el estudio de diferentes medios de cultivo líquidos durante la fase de establecimiento de ápices de malanga *Xanthosoma*, libres del virus DMV (Dasheen Mosaic Virus). Se seleccionaron plantas negativas después de efectuar el diagnóstico a través de las técnicas ultramicro-Elisa sandwich de

doble anticuerpo mediante el kit suministrado por SANOFI (Francia) y confirmación por inmunomicroscopía electrónica (IME) con técnica de captura con anticuerpo contra el DMV según Miine (1986) y contrastándose luego la rejillas con acetato de uranilo al 1%. Posteriormente, a partir de las plantas seleccionadas se extrajeron ápices con dimensiones menores de un centímetro. Durante el establecimiento se estudió la influencia de diferentes concentraciones de 6BAP y el 70 y 100% de las sales en medios líquidos comparados con un testigo en medio semisólido. Se evaluó además, el efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de los explantes con diferentes dimensiones. Los mejores resultados correspondieron al medio de cultivo líquido con 0.5 mg.l⁻¹ de 6BAP y 100% de las sales con un crecimiento de 4.5 cm y cuatro hojas a los 28 días de cultivo *in vitro*. Los explantes de 0.7 cm de dimensiones, sometidos al 2% de hipoclorito de sodio en dos desinfecciones, de 15 y 10 minutos respectivamente alcanzaron valores de supervivencia (98.6%) y contaminación del 0.8%, significativos con relación a los restantes tratamientos.

Palabras clave: malanga, establecimiento, medios de cultivos, Dasheen Mosaic Virus, diagnóstico

4-40 Manejo de hijos y ápices para iniciar la micropropagación y comportamiento durante seis subcultivos en algunos clones de *musa spp*

Pedro Orellana Pérez*, Lourdes García, Idalmis Bermúdez, Novisel Veitía, Carlos Romero. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5.5. Santa Clara. Villa Clara, Cuba. e-mail: porellana@uclv.edu.cu

Al comparar las dos formas de manejo de los hijos de donde se extrajeron los ápices que se implantaron *in vitro*, se encontró que el método de plantar los pequeños cormos en los Canteros Tecnificados(CT), para provocar el rebrote de la yema apical y su desarrollo sobre un suelo desinfectado, favoreció la supervivencia *in vitro*, redujo notablemente el número de ápices contaminados y redujo notablemente el tiempo requerido para su establecimiento. Este proceder hace innecesario el subcultivo de limpieza de los ápices que se realiza al material implantado directamente del campo. Al analizar cualitativamente algunos aspectos de ambas formas de manejo, se

tiene) que en la implantación directa de campo, se produce mayor porcentaje de fenolización, menor crecimiento y muchos ápices no llegan a presentar el color verde característico, así mismo el desarrollo en esta etapa es lento. Cuando se implantaron ápices completos resultó ser donde mayor número de estos lograron establecerse (78 %), a la vez que alcanzaron el mejor desarrollo y coloración verde. Los clones más estables durante el inicio del proceso de la micropropagación fueron el banano híbrido 'FHIA 01' y el plátano híbrido 'FHIA 20', sin embargo este último presentó el menor coeficiente de multiplicación entre todos los clones por lo cual produjo la menor cantidad de brotes acumulados en seis subcultivos. El mayor coeficiente de multiplicación fue alcanzado por el clon híbrido 'FHIA 23', el cual produjo el mayor número de brotes acumulados no obstante presentar una notable variabilidad entre subcultivos (CV = 39,9 %). Con la excepción del híbrido de plátano 'FHIA 04', todos los clones de plátano presentaron el más bajo coeficiente de multiplicación y entre ellos sólo 'FHIA 20' fue inferior significativamente a este. Los clones de banano no presentaron diferencias entre sí, y su coeficiente de multiplicación fue mayor que los clones de plátano con excepción de 'FHIA 04'. Algunos clones como 'FHIA 03', 'FHIA 19', 'FHIA 20'

Palabras clave: plátanos, híbridos, coeficiente de multiplicación, manejo in vitro, fenolización

4-41 Evaluación de dos análogos de brasinoesteroides en la inducción de callos y regenerantes en boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)

Orlando S. González Paneque^{1*}, Miriam Núñez Vázquez², María M. Hernández Espinosa², Juan J. Silva Pupo¹, Angel Espinosa Reyes¹.

*Autor para correspondencia

¹ Universidad de Granma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Apdo. 21. Bayamo. C.P.: 85100. Granma. Cuba. e-mail: ogpaneque@udg.co.cu

² Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Carretera Tapaste-San José de Las Lajas, Km. 3 ½. Gaveta Postal 1. C.P. 32700. La Habana. Cuba. e-mail: mhdez@inca.edu.cu

Con la finalidad de estudiar, en diferentes clones, el efecto de dos análogos de brasinoesteroides como reguladores del crecimiento en la inducción de callos y regenerantes a partir de segmentos de limbos

foliares, fueron recolectadas raíces tuberosas pertenecientes a los clones Cemsa 78-354, Inivit 90-1, Inivit 93-1, Yabú-8 y Jewel; colocados en frascos con agua en el laboratorio para inducir la brotación de las yemas. Posteriormente, se seleccionaron explantes del limbo foliar sembrados en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) con 2,4-D (0.1 mg.l^{-1}) y BAP (0.2 mg.l^{-1}) combinados con los análogos de brasinoesteroides MH-5 y DAA-6 a diferentes concentraciones (0.001 , 0.01 , 0.05 y 0.1 mg.l^{-1}) y el empleo de los análogos de brasinoesteroides independientes para inducir la formación de callos; a partir de la cuarta semana los callos fueron transferidos, para posibilitar la inducción de regenerantes, al medio anteriormente mencionado suplementado con los análogos de brasinoesteroides MH-5 y DAA-6 independientes y combinados con los reguladores del crecimiento AIA (0.05 mg.l^{-1}) y Kinetina (0.2 mg.l^{-1}), mantenidos en condiciones de luz solar a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa de 80-90% y luz de 3 000-5 000 lx. Transcurridas cuatro semanas, se evaluó el comportamiento morfológico de los callos y los regenerantes. Se obtuvieron buenos resultados en la inducción de callos morfogénicos, al emplear los reguladores del crecimiento independientes en el medio de cultivo y al ser combinados con 2,4-D (0.1 mg.l^{-1}) y 6-BAP (0.2 mg.l^{-1}) a la concentración de 0.01 mg.l^{-1} en ambos análogos de brasinoesteroides. La inducción de regenerantes se vio favorecida, de manera general, con el empleo del análogo de brasinoesteroides combinado con AIA (0.05 mg.l^{-1}) y Kinetina (0.2 mg.l^{-1}), que con el empleo de los análogos de brasinoesteroides independientes en el medio de cultivo.

Palabras clave: Boniato, inducción de callos, regeneración de plantas, brasinoesteroides

4-42 Uso de diferentes sustratos y explantes en la aclimatización de dos especies de plantas medicinales

Yovany Quiñones^{1*}, Humberto Izquierdo¹, Iraida López², Rosalina Disotuar², Caridad Pimentel², Pedro Alcántara² *Autor para correspondencia

¹ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carr. Tapaste, Km. 3.5, Gaveta Postal No 1, San José de las Lajas 32 700, La Habana. Tele/Fax-0.64.63867. e-mail: yovany@inca.edu.cu, yovanyquinones@yahoo.es

² Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova"

Dentro de la micropropagación, la fase de adaptación juega un papel decisivo en el posterior desarrollo de las plántulas, ya que se va a

producir el endurecimiento de las mismas aumentando el grosor del tallo y la emisión de raíces verdaderas. Esta etapa ha sido usada por años en la propagación convencional. Existen una serie de factores que son imprescindibles para garantizar los altos porcentaje de supervivencia dentro de los que se encuentra el sustrato, el cual debe poseer ciertas características físico-químicas para facilitar el enraizamiento. En este trabajo nos propusimos analizar la factibilidad de diferentes sustratos en la fase de adaptación en dos especies de plantas medicinales (tilo y menta) de alto consumo en la industria y en la medicina tradicional. El trabajo se realizó en el Departamento de Papa y Fibras perteneciente al Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova” y se utilizaron diferentes combinaciones de sustratos: materia orgánica, zeolita (25 y 50%) y explantes, los cuales se colocaron en condiciones controladas de temperatura, intensidad luminosa y fotoperíodo, como control se utilizó materia orgánica (método tradicional). Se evaluó: el porcentaje de supervivencia y enraizamiento, # de raíces y # de hojas y # de entrenudos. Los mejores resultados en cuanto al desarrollo integral de las plantas fue la utilización de materia orgánica como sustrato para los diferentes explantes en aisladores constituyendo el método más factible económicamente.

Palabras claves: aclimatización, explantes, plantas medicinales, sustratos

MEJORA POR VARIACION SOMACLONAL, MUTAGENESIS Y SELECCION *IN VITRO*

5-01 Inducción de actividad peroxidasa mediada por el filtrado del hongo *Alternaria solani* Sor. en callos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)

Amelia Capote*, Yaneisa Reyes, Esther Diosdado*, Nercy Rodríguez, Odalys Pérez, Norma Marrero. *Autor para correspondencia

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT) * Facultad de Biología (UH). Ciudad Habana, Cuba. e-mail: inifat@ceniai.inf.cu

Se estudió el efecto del filtrado del hongo *Alternaria solani* en la inducción de actividad peroxidasa en callos obtenidos a partir de hojas de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) de cultivares que muestran diferentes grados de susceptibilidad al ataque de este patógeno. Los callos utilizados se expusieron a las concentraciones de 25, 50 y 75% (v/v) del filtrado, durante diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas). La actividad peroxidasa se determinó por el método descrito por Cheni (1989). Los resultados fueron procesados estadísticamente aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, obteniéndose diferencias significativas en los valores de inducción de actividad peroxidasa en los tres cultivares estudiados. Los niveles más elevados de actividad se obtuvieron para el cv. 'Cubanacán - 1243' a las 24 horas de exposición, lo que indica la implicación de esta enzima en los mecanismos de defensa de las plantas.

Palabras clave: *Alternaria solani*, peroxidasa, callos, filtrados crudos, tomate

5-02 Use of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 for rapid and non-destructive differentiation of field-grown banana resistant from susceptible clones

Barbarita Companioni*, Mayda Arzola, Yania Rodríguez, Marais Mosqueda, María Cristina Pérez, Orlando Borrás, José Carlos Lorenzo, Ramón Santos. *Autor para correspondencia

Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Avila, C.P. 69450, Cuba; Fax: 53-33 266340. e-mail: bcompanioni@yahoo.es

A rapid and non-destructive procedure to differentiate field-grown banana resistant from susceptible clones was developed. This procedure implicates inoculation of leaves with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1-culture filtrates. A comparison between Gros Michel (susceptible) and FHIA-01 (resistant) was also performed. The most relevant differences between cultivars were observed at 48 hours of leaf inoculation with the fungus filtrate, and in the middle-aged leaves. The inoculation position in the leaf limb (distal, middle, proximal) was not determinant. A wider comparison among banana cultivars confirmed previous results informed by other researchers using different systems to study this plant-fungus interaction. Such a confirmation validates the effectiveness of the procedure described here to select rapid and non-destructively banana resistance to this disease at field level. This represents a combination example of traditional and biotechnology-assisted banana breeding.

Key words: adult leaf inoculation, culture medium, fungus incubation, Fusarium wilt, Musa spp

5-03 Inducción de actividad peroxidasa mediada por el oligopectato pectimorf en callos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Diosdado, E.¹, Capote A², Reyes, Y.¹, Pérez-Pelea, L.¹, Cabrera, J.C.³, Iglesias, R.³. *Autor para correspondencia

¹ Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba. e-mail: ediosdado@fbio.uh.cu

² Departamento de Genética. Instituto de Investigaciones Fundamentales para la Agricultura Tropical (INIFAT). Cuba. e-mail: inifat@ceniai.inf.cu

³ Departamento de Fisiología Vegetal. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Cuba. e-mail: iglesias@inca.edu.cu

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones del Oligopectato Pectimorf en la inducción de actividad peroxidasa, en callos de tres cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), que muestran diferentes grados de susceptibilidad al ataque del hongo *Alternaria solani*, y se analizó la influencia del tiempo de exposición de los callos al elicitor; obteniéndose diferencias significativas en los valores de actividad de los tres cultivares estudiados.

Se lograron inducir, en presencia del Pectimorf, niveles de actividad peroxidasa superiores al control, registrándose los mejores resultados a una concentración de 0.1 mg.l⁻¹, transcurridas 48 horas de exposición, para el cultivar resistente y a las 24 horas con 10.0 mg.l⁻¹ para los restantes.

Palabras clave: tomate, alternaria solani, Pectimorf, peroxidasa

5-04 Comportamiento agronómico de somaclones de Gros Michel (AAA) resistentes al Mal de Panamá, obtenidos con el empleo de la mutagénesis *in vitro*

Idalmis Bermúdez*¹, Lidcay Herrera Isla², Pedro Orellana¹, Novisel Veitía¹, Carlos Romero¹, Justo Clavelo¹, Leyanis García¹, Mayra Acosta¹, Lourdes García. Rodríguez¹, Y. Padrón¹. *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas Carretera a Camajuaní Km. 5½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: idalbermudez@uclv.edu.cu

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

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) con el objetivo de evaluar el comportamiento agronómico de varios somaclones seleccionados en el laboratorio con posible resistencia o tolerancia al Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* var. *cubense*), razas 1 y 2, desde el clon susceptible "Gros Michel" (AAA). Se estudió la respuesta de las vitroplantas después de las inoculaciones y reinoculaciones con los aislados del hongo durante cuatro fases de desarrollo. Luego de varios ciclos de selección en viveros con sustrato contaminado y en dos zonas a campo abierto con alta incidencia del patógeno, se plantaron en campo 21 selecciones en fases de estudio clonal. Estos se evaluaron durante dos ciclos de cosecha, seleccionándose finalmente nueve somaclones que presentaron índices de infección en el campo inferior al 30%. Los somaclones seleccionados como resistentes y con características agronómicas favorables, se micropropagaron *in vitro* y fueron evaluados en estudios replicados, llegándose a seleccionar tres somaclones (IBP 5-61, IBP 5-B e IBP 12) con características agronómicas y de resistencia muy promisorias.

Palabras clave: fusarium oxysporum var. cubense, Musa sp., variación somaclonal

5-05 Selección *in vitro* a *Ustilago scitaminea* Syd de callos embriogénicos de caña de azúcar

Leonardo García Rodríguez*, Lourdes García Rodríguez, Novisel Veitía Rodríguez, Idalmis Bermúdez Caraballoso, Pedro Orellana Pérez, Yenny Padrón Montesino, Mayra Acosta. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: leogar@uclv.edu.cu

Con el objetivo de incrementar la eficiencia de los métodos de selección *in vitro* a la enfermedad del carbón de la caña de azúcar se obtuvieron callos embriogénicos de los genotipos Ja 60-5, IBP 85-23 (susceptibles) y Ba 43-62 (control resistente) que fueron expuestos a diferentes concentraciones de cultivo filtrado de *Ustilago scitaminea* Syd. (0, 75, 87 y 95 ml) por litro de medio de inducción de embriones. De manera general se observa que en la medida en que aumenta la concentración del cultivo filtrado en el medio, aumenta la afectación en el crecimiento de los callos, en todas las concentraciones la afectación fue menor significativamente para el control resistente Ba 4362. La variedad Ja 60-5 mantuvo una expresión similar en las dos mayores concentraciones, mientras que en el caso del somaclón IBP 85-23 la afectación fue significativamente mayor en la concentración de 95 ml.l⁻¹. Los resultados indican que existe una correspondencia entre la respuesta al cultivo filtrado y los índices de resistencia a la enfermedad en el campo.

Palabras clave: caña de azúcar, selección in vitro, Ustilago scitaminea, carbón de la caña

5-06 Empleo de las radiaciones gamma ⁶⁰Co en la mejora al grosor del tallo del somaclón IBP 89-169 de caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido)

Leonardo García Rodríguez*, Pedro Orellana Pérez, Lourdes García Rodríguez, Novisel Veitía Rodríguez, Idalmis Bermúdez Caraballoso, Juan Nivaldo Pérez Ponce, Apolonio Valdéz Valero, Yenny Padrón Montesino, Carlos Romero Quintana, Justo Clavero García. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas Carretera a Camajuaní Km 5½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: leogar@uclv.edu.cu

Este trabajo se realizó con el objetivo de mejorar el somaclón IBP 89-169 (proveniente de la variedad Ja 60-5) seleccionado como altamente resistente a la enfermedad del carbón de la caña de azúcar (*Ustilago scitaminea* Syd), pero imposibilitado de pasar a la producción por ser demasiado fino. Para ello se obtuvo una población de callos que fue irradiada con 15 Gy de radiaciones gamma (^{60}Co) obteniéndose 10 000 plantas con variabilidad inducida. Las mismas fueron inoculadas con una suspensión conidial de *U. scitaminea* Syd, aclimatizadas en casa de cultivo y luego sembradas en campo. A los 12 meses se realizó una evaluación por secciones en el campo para estudiar el efecto del ambiente en la variabilidad expresada comprobándose que fue bajo. Posteriormente se seleccionaron 12 individuos con valores superiores a los 20.0 mm de diámetro de los tallos, demostrándose la efectividad del agente mutagénico para el incremento de la variabilidad genética sobre el carácter a mejorar. Con estos individuos se desarrolló un estudio clonal, al evaluar las etapas de caña planta y retoño se seleccionaron tres somaclones (IBP 97 01-14, IBP 97 02-51 e IBP 97 36-39) con los cuales se desarrolló una caracterización botánica y morfológica comparándolos con la variedad Ja 60-5. Los tres somaclones resultaron susceptibles al carbón de la caña de azúcar en las Pruebas Estatales de Resistencia a Enfermedades. Los somaclones IBP 97 01-14 e IBP 97 02-51 resultaron superiores a la variedad Ja 60-5 en cuanto a los caracteres grosor del tallo, hábito de crecimiento y resistencia a Roya.

Palabras clave: caña de azúcar, radiaciones gamma, somaclones, mejoramiento genético

5-07 Protocolo de regeneración de plantas vía yemas adventicias en banano (*Musa* sp.) cv. Gran Enano

Lourdes García Rodríguez *, Yeny Padrón; Pedro Orellana Pérez, Idalmis Bermúdez, Novisel Veitía Rodríguez, Leonardo García, Carlos Romero

*Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. Fax 53 (42) 281329. e-mail: lougarcia@uclv.edu.cu

Fue desarrollado un protocolo de regeneración de plantas vía yemas adventicias en banano cv. 'Gran Enano'. Se estudiaron varias citoquininas en los medios de cultivo para la inducción de estas estructuras, evaluándose varios tamaños de explantes para la

multiplicación. Los mayores valores de explantes con desarrollo de yemas adventicias se obtuvieron cuando se utilizó el TDZ en los medios de cultivo, encontrándose en solo dos subcultivos 62-83% de explantes con desarrollo de estas estructuras. Se seleccionaron los explantes de 1mm² para la multiplicación y un medio compuesto por las sales MS suplementadas con 1,0 mg.l⁻¹ de Tiamina y 2,0% de sacarosa para la regeneración de plantas alcanzándose valores de 96% de regeneración. La utilización de este protocolo de regeneración de plantas podría ser una alternativa muy útil en los programas de mejoramiento genético por mutaciones y transformación genética en el cv. Gran Enano.

Palabras clave: citoquininas, cultivo de tejidos, organogenesis, thidiazuron

5-08 Evaluación en condiciones de campo de somaclones de papa (*Solanum tuberosum* Lin.) de la variedad “Desirée” obtenidos por variación somaclonal y mutagénesis *in vitro*

Novisel Veitía Rodríguez*, Joao Francisco Cardoso, Juan N. Pérez, Lourdes García Rodríguez, Idalmis Bermúdez Caraballosos, Leonardo García Rodríguez, Yenny Padrón Montesinos, Pedro Orellana Pérez, Carlos Romero Quintana, Niurka Hernández. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas Carretera a Camajuaní Km 5½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: novisel@uclv.edu.cu

Con la finalidad de evaluar en condiciones de campo somaclones obtenidos por inducción de mutaciones y variación somaclonal en la variedad Desirée se realizó el experimento en la estación experimental “Pedro Lantigua” ubicada en el municipio de Remedios al norte de la Provincia de Villa Clara. Se evaluaron los somaclones IBP-10, IBP-27, IBP-30 y la variedad original Desirée. Se determinó el rendimiento y su componentes, el comportamiento frente a *Alternaria solani* (Sor.) y *Streptomyces scabiei* (Thaxter) Wakman y las variaciones morfológicas en los tubérculos. Los somaclones IBP-10 e IBP-27 presentaron rendimientos similares a la variedad original, los valores más bajos fueron alcanzados por el somaclón IBP-30. Con respecto a las enfermedades los tres somaclones presentaron niveles de afectación inferiores a la variedad original frente a *Alternaria solani*, en la evaluación del número de tubérculos afectados por la costra común se observó el somaclon IBP-30 presentó el mayor porcentaje

de tubérculos afectados, el IBP-10 el menor porcentaje y el IBP-27 presentó un comportamiento intermedio. Se observaron cambios en el color de la piel y la forma de los tubérculos. El somaclón IBP-10 presentó coloración amarilla en la piel y forma oval pequeña, el somaclón IBP-27 presentó forma oval en el tubérculo.

Palabras clave: *Alternaria solani*, *mutantes*, *Streptomyces scabies*.

5-09 Caracterización de variantes somaclonales en bananos y plátanos (*Musa* spp.)

Maria Isabel Román^{1*}, Xonia Xiqués², Clara González², Marlyn Valdés².

*Autor para correspondencia

¹ Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales. AP 6. Santo Domingo Villa Clara. Cuba

² Facultad de Biología Universidad de la Habana. Calle 25 entre J y K Vedado Ciudad de La Habana

Se realizó el estudio morfoagronómico, citogenético e isoenzimático del clon 'Saba' de plátanos y SH 3436 de bananos y sus respectivos somaclones. El análisis de conglomerados para las variables cuantitativas y cualitativas, muestra la formación de dos grupos genómicos y dentro de ellos, diferencias entre los donantes y sus somaclones. Los resultados obtenidos en los análisis del cariotipo y los sistemas isoenzimáticos, permiten considerar como nuevas accesiones en la colección cubana del género *Musa*, a las variantes somaclonales estudiadas.

Palabras clave: *bananos*, *plátanos*, *análisis isoenzimático*

5-10 Determinación de la concentración adecuada de Juglone para diferenciar dos cultivares de *Musa* spp.

Michel Leiva Mora*, Jean Pierre Busogoro, Phillipe Leproive. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5,5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: leivamichel@uclv.edu.cu

La producción de toxinas por patógenos fungosos puede facilitar la penetración y la colonización del tejido hospedero así como

reproducir fielmente los síntomas característico de una enfermedad. El Juglone es el principal metabolito con acción fitotóxica, caracterizado a partir del filtrado de cultivo de *Mycosphaerella fijiensis*. En el presente trabajo se utilizaron dosis de 10, 25, 50 y 100 ppm de este compuesto y se empleó como control una solución de metanol al 10%. Se realizaron inyecciones foliares en las dos primeras hojas abiertas de los cultivares Gran enano y Fougamou y se evaluó a las 24 h el porcentaje de necrosis foliar por planta. Con la concentración de 100 ppm, se logró obtener síntomas de necrosis foliar en ambos cultivares, sin embargo la concentración de 50 ppm fue la única que permitió establecer diferencias claras entre los mismos. Este resultado permitió establecer una dosis adecuada para la diferenciación de cultivares de *Musa spp* con diferentes niveles de resistencia frente al agente causal de la Sigatoka negra, mediante el empleo de toxinas del agente causal de la Sigatoka negra.

Palabras clave: Juglone, *Musa spp.*, *Mycosphaerella fijiensis*, Sigatoka negra

5-11 Caracterización morfo-agronómica de tres somaclones de bananos cultivados en el INIVIT, Camagüey

Miguel Gómez Calderín¹, Orlando M. Álvarez Tellez¹, Isidro E. Méndez Santos², Julio E. Rodríguez Hernández¹, Yosbel Fandiño Cachemaille¹, María I. Román³, Ana C. Rosabal Guerra¹.

¹ Estación Experimental de Viandas Tropicales (INIVIT), Camagüey.

² Instituto Superior Pedagógico “José Martí”, Camagüey.

³ Instituto Nacional de Viandas Tropicales (INIVIT), Villa Clara.

El trabajo con el clon SH-3436, motivado inicialmente por su resistencia a plagas y enfermedades (sigatoka negra, picudo negro y nemátodos, entre otras), permitió obtener dos variaciones somaclonales por selección de mutaciones en plantas regeneradas a través del cultivo de tejido *in vitro* en el INIVIT (Santo Domingo, Villa Clara). En la Estación Experimental de Viandas Tropicales (INIVIT) de Camagüey, se evaluaron 27 caracteres morfoagronómicos del clon original y de sus variaciones SH-3436 L-6 y SH-3436 L-9. Los resultados promedio, constatados en los tres años que duró la investigación, demostraron que si bien las líneas son fenotípicamente muy similares al clon, ambas lo superan en todos los caracteres cuantitativos, especialmente en aquellos relacionados con el rendimiento (número manos, número de frutos por mano, número de frutos por racimos, largo de los dedos y peso general

del racimo). Ello se tomó como fundamento para la introducción de las dos variaciones somaclonales (especialmente la SH-3436 L-9) en 30 unidades productivas de la provincia, tanto del sector estatal como del sector privado, y para que se incorporaran al programa de multiplicación “*in vitro*” que se desarrolla en el territorio.

Palabras clave: cultivo de tejido, nemátodos, picudo negro, sigatoka negra

SANEAMIENTO Y DIAGNOSTICO DE MICROORGANISMOS PATOGENOS

6-01 Comparación de métodos de diagnóstico para la detección del viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVD)

Lien González*, Marianela Soto, Esther Lilia Peralta. *Autor para correspondencia.

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA. Apartado 10, San José de las Lajas, CP 32700, La Habana, Cuba.; dirección actual: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, IIFT, Calle 7ma No. 3005, entre 30 y 32, Playa, Ciudad de la Habana, Cuba. e-mail: liengo2001@yahoo.es

Se realizó la comparación de diferentes métodos de diagnóstico para la detección del Viroide del Tubérculo Ahusado de la Papa (PSTVd), basados en variantes de la hibridación de ácidos nucleicos, radiactiva o no, y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa por Transcripción Inversa (RT-PCR) mediante Taqman Tiempo Real. Se demostró que los procedimientos desarrollados para su diagnóstico, permiten la detección del viroide con más del 96% de eficacia. Además, para el caso de la hibridación de ácidos nucleicos, se evaluó la impresión de tejido como alternativa para el diagnóstico rutinario y masivo de este patógeno, la cual mostró un 100% de coincidencia entre las muestras en las que se detectó el PSTVd cuando se comparó con los resultados obtenidos en la hibridación por *dot-blot*.

Palabras clave: hibridación de ácidos nucleicos, taqman tiempo real, viroides

6-02 Diversidad y optimización del diagnóstico del fitoplasma asociado al amarillamiento letal del cocotero en Cuba

R. Llauger ^{1*}, E.L. Peralta ², M. Dollet ³, J. Cueto ¹, M Rodríguez ¹, D. Fajardo ¹, V. González⁴ * Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), Ave. 7ma, # 3005 e/ 30 y 32, Playa, C. de la Habana, Cuba. Tel: 2025526, Fax: 204 6794, e-mail: iicit@ceniai.inf.cu

² Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CENSA), Autopista Nacional y Carretera de Tapaste, Apdo 10, San José de las Lajas, Cuba

³ CIRAD, TA 30/G, Campus International de Baillarguet, 344398, Montpellier Cedex 5, Francia

⁴ Empresa del Coco, Carretera del Toa Km 3.5, Mabujabo, Baracoa, Cuba.

Entre los aspectos de mayor interés en el ámbito internacional con respecto al Amarillamiento Letal del Cocotero (LY) se encuentran el estudio de la variabilidad genética del fitoplasma asociado a la enfermedad y el perfeccionamiento de los métodos para su diagnóstico, los que constituyen objetivos de este trabajo. Para la optimización del diagnóstico, se ensayaron diferentes parejas de cebadores empleadas para la detección de la enfermedad en otras regiones del Caribe (LY1F/LY1R y MMR/MMF); distintas concentraciones de $MgCl_2$ y diluciones de las muestras. Se seleccionaron 23 de los aislados positivos procedentes de cinco provincias cubanas y se analizaron por PCR-RFLP empleando los cebadores universales P1 y P6 (Deng & Hiruki, 1991) y las enzimas de restricción *EcoRI*, *RsaI* y *BamHI*. La concentración de 2.5mM de $MgCl_2$ y la dilución de 1/100 resultaron las óptimas para el diagnóstico con los cebadores LY1F/LY1R. Los cebadores MMR/MMF no amplificaron los aislados cubanos. La comparación de los perfiles de restricción, evidenció la diversidad de los aislamientos cubanos, la presencia de entre cinco y siete patrones con cada enzima, así como los perfiles mayoritarios en cada caso.

Palabras clave: amarillamiento letal del cocotero, diagnóstico PCR, diversidad genética, Mollicutes.

6-03 Identificación de serovares y variaciones intraespecíficas entre los aislamientos cubanos de *Xanthomonas albilineans* (ASHBY) Dowson

Esther Lilia Peralta^{1*}, Maricela Díaz¹, Aleika Iglesia¹, Victoria Pazos²

¹ Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apdo 10, San José de las Lajas, Habana. Cuba.

² Facultad de Biología, Universidad de la Habana, C. Habana; *Autor para correspondencia e-mail: varadero01@hotmail.com

El objetivo de este trabajo ha estado encaminado a determinar las variaciones serológicas existentes entre las cepas de *Xanthomonas albilineans* circulantes en Cuba. Los análisis realizados mediante UMEISA-I e inmunodifusión doble con diferentes antisueños y cepas

6to Coloquio Internacional

de referencia, permitieron identificar la presencia de los serovares I y III de esta especie en Cuba, el primero como predominante entre los aislamientos del más reciente brote de escaldadura en el país, y el segundo asociado a los aislamientos latentes que precedieron este brote. Los estudios realizados mostraron además variaciones intraespecíficas dentro de los aislamientos que conforman el serovar I, incluyendo cepas de referencia procedentes de Florida y Texas.

Palabras clave: escaldadura foliar, caña, serovares, UMELISA-I

CONTAMINACION MICROBIANA EN EL CULTIVO *IN VITRO*

7-01 Estudio de contaminantes fungosos en la micropropagación del cafeto (*Coffea sp.*)

María Esther González^{1*}, Luis Manuel Barrios². *Autor para correspondencia

¹ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carretera San José-Tapaste Km 3^{1/2}. San José de las Lajas. La Habana. e-mail: esther@inca.edu.cu.

² Instituto Nacional de Sanidad Vegetal. La Habana. Cuba.

El cafeto es un cultivo de importancia económica para varios países en vías de desarrollo y la aplicación de las técnicas biotecnológicas ofrece ventajas en su propagación. No obstante la contaminación microbiana ocasionada por hongos y bacterias continúa siendo uno de los principales problemas que afectan el cultivo *in vitro*. El presente trabajo tuvo como objetivo identificar hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento de las variedades Caturra y Robusta, así como evaluar el efecto de un biopreparado con efecto fungicida en el control de los mismos. Se realizaron muestreos a callos obtenidos a partir de explantes foliares, desechados por contaminación microbiana y se aislaron e identificaron contaminantes fungosos, considerando sus características culturales y morfológicas. Se realizó un experimento de antagonismo *in vitro* para lo cual se inocularon 100 µl del RIZOBAC en placas con Medio PDA y a las cepas de hongos aisladas se les realizó una suspensión de esporas y se colocó en las placas. La incubación se realizó durante siete días a 28°C. Se midió el diámetro de crecimiento del hongo, se determinó el porcentaje de inhibición. Los porcentajes de contaminación en los explantes oscilaron entre 51 y 73%, existiendo diferencias significativas para las variedades. Se identificaron un total de siete géneros de hongos filamentosos. Los de mayor frecuencia de aparición resultaron ser *Fusarium* y *Cladosporium*. Se demostró el efecto antagónico del RIZOBAC ante los géneros predominantes, provocando un 71 y 45% de inhibición, constituyendo una alternativa viable el empleo de este producto ya que se puede incorporar al medio de cultivo o realizar un tratamiento previo a los explantes, a fin de disminuir los altos índices de contaminación fungosa.

Palabras clave: cafeto, contaminación microbiana, hongos, RIZOBAC

7-02 Detección de contaminantes bacterianos y fúngicos endógenos en el establecimiento de *Musa* spp

Daymí Carrazana García^{1*}, Lidcay Herrera Isla², Niurka Mollinedo Diogo³, Norma Suárez Canino², Hermelinda Castellanos Morales⁴, Idania Arboláez Moré⁴, Teresita Martínez García⁵. *Autor para correspondencia

¹ Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Facultad de Química–Farmacia, Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

² Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: agrosost@uclv.edu.cu

³ Universidad Central de Las Villas “Marta Abreu”, Centro de Bioactivos Químicos, Carretera a Camajuaní Km. 5 ½ Santa Clara, Villa Clara.

⁴ Biofábrica de Villa Clara. Cuba.

⁵ Hospital Provincial Universitario Clínico Quirúrgico Arnaldo Milián Castro, Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

Se probó un método de fijación en formol al 10%, inclusión en parafina y realización de cortes histológicos teñidos diferencialmente de microcorno y raíz de *Musa* spp. para la detección de bacterias y hongos endógenos realizando inoculaciones de *Erwinia chrysantemi* E 84 y *Fusarium oxysporum* 15 en variedades susceptibles. El mejor resultado se obtuvo con la tinción de Safranina – verde brillante para las bacterias y el procedimiento de Schiff – ácido peryódico para los hongos. Se establecieron 35 ápices caulinares de *Musa* spp. clon FHIA– 18, evaluando la aparición de contaminación microbiana visible y realizando un indexing microbiológico a una porción de tejido vegetal adyacente al explante empleando los medios de cultivo ATS, NB, PYA, MS suplementado y AS. Una muestra similar se fijó en formol al 10%. A partir de los tubos de ensayo contaminados se aislaron cultivos puros de los microorganismos presentes y se aplicó el procedimiento de corte histológico y tinción diferencial para la determinación de endogenicidad. Se encontró un bacilo Gram positivo no formador de endosporo y un coco Gram positivo agrupado en forma de sarcina, ambos endógenos. Un hongo de la clase *Deuteromycetes* resultó ser un contaminante endógeno y *Fusarium* sp. un contaminante probablemente introducido durante la preparación del explante.

Palabras clave: *Erwinia chrysantemi*, *Fusarium oxysporum*, *Musa* spp, bacterias

7-03 Caracterización de endobacterias contaminantes en plántulas de cafeto micorrizadas *in vitro* con *Glomus clarum*

Loreli Mirabal^{1*}, Eduardo Ortega², Aniripsa Felipe¹, Kalyanne Fernández¹, Félix Fernández¹. *Autor para correspondencia

¹ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Carretera a Tapaste, san José de Las Lajas, La Habana.

² Universidad de la Habana.

Uno de los microorganismos más estudiados han sido los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), los cuales forman asociaciones micorrízicas, a partir de la unión de estos con las raíces de las plantas. Observaciones morfológicas con colorantes fluorescentes han revelado alrededor de 250 000 bacterias vivas en el interior de cada espora. Este trabajo tiene como objetivo caracterizar las bacterias endosimbióticas contaminantes en plántulas de cafeto cultivadas *in vitro*. Para ello realizamos distintos aislamientos de las bacterias presentes en el interior de las esporas, siendo las mismas endosimbióticas contaminantes del cultivo del cafeto *in vitro*. A los aislados bacterianos le realizamos numerosas pruebas morfológicas y bioquímicas, por ejemplo tinción de Gram, detección de catalasa, requerimientos de oxígeno, hidrólisis del almidón, producción de indol, reducción de nitrato, producción de ácido a partir de carbohidratos, detección de actividad nitrogenasa, crecimiento en: NFB, JNFB, SYP con 3% de NaCl y capacidad solubilizadora de fosfato. A modo de conclusión fueron aisladas y purificadas 13 cepas bacterianas endóspóricas contaminantes, las cuales serán ubicadas taxonómicamente atendiendo a sus características genéricas.

Palabras clave: microorganismos contaminantes, micorrizas, bacterias, cafeto

7-04 Microorganismos contaminantes en la propagación masiva de *Colocasia esculenta* y *Xanthosoma* spp. en la Biofábrica del MINAG en Villa Clara

Maryluz Folgueras^{1*}, Lidcay Herrera², Daymí Carrazana², Reinaldo Quiñónez², Víctor Medero¹, Jorge López¹, Sergio Rodríguez¹, Delly L. González¹, Carmen Pons¹, Norma Suárez², Delia Pérez¹. *Autor para correspondencia

¹Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6. CP 53 000. Santo Domingo. Villa Clara. e-mail: inivit@ip.etecsa.cu

²Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Carretera a Camajuaní km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

En el período comprendido entre febrero y julio del 2000 se realizaron varios muestreos en la Biofábrica del MINAG de Villa Clara, con el objetivo de determinar cualitativa y cuantitativamente la contaminación microbiana presente en vitroplantas de malanga (*Xanthosoma* y *Colocasia*). La identificación de los géneros fungosos presentes se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Central de Las Villas y en la Colección de Cultivos Puros de Hongos del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical (INIFAT). Las bacterias fueron evaluadas de forma cuantitativa. En el género *Xanthosoma* las especies más frecuentes fueron: *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus flavus*, *Rhodotorula glutinis*, *Cladosporium oxysporum*, *A. niger* y *Chaetomium indicum* y en *Colocasia esculenta* predominaron *P. purpurogenum*, *A. flavus* y *Ch. indicum*. En la primera especie las pérdidas oscilaron entre 48.6 y 49.5% y en la segunda 26.5%. El incremento de la contaminación microbiana con respecto a 1999 fue de 5.24% en *Xanthosoma* spp. y 2.73% en *Colocasia* en esta Biofábrica.

Palabras clave: contaminación microbiana, colocasia esculenta, microorganismos contaminantes, xanthosoma

7-05 Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L)

Mayra Acosta^{1*}, Israel Caballero², Yelenys Alvarado¹, Michel Leiva¹ *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas "Marta Abreu", Carretera a Camajuaní Km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: yalvarado@uclv.edu.cu

² Biofabrica de Maleza. Carretera de Maleza, Km 2 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba

Conocer la micobiota contaminante nos permite crear un esquema de tratamientos a las plantas madres y al explante dirigidos a prevenir o eliminar la contaminación fungosa durante la micropropagación de la

guayaba (*Psidium guajava* L.), por ello los objetivos de este trabajo fueron: evaluar cualitativamente la micobiota epifítica de las plantas donadoras de guayaba, var. Enana Roja cubana EEA 18-40, tratadas y no tratadas con fungicidas y aislar, caracterizar e identificar los hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales. Para la identificación de la micobiota se utilizó el método de la cámara húmeda y se realizaron preparaciones directas al microscopio óptico del crecimiento fungoso. Para el aislamiento de los contaminantes detectados en la fase de establecimiento *in vitro* se utilizaron placas de Petri con medio de cultivo PDA y se incubaron a 28°C y oscuridad constante durante 7 a 14 días. En la caracterización e identificación se tuvieron en cuenta sus características culturales y morfológicas. Se identificaron nueve géneros de hongos filamentosos en las plantas donadoras (sin aplicación de fungicidas) los cuales fueron: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium* y *Trichoderma*. La aplicación de los fungicidas no fue efectiva en la eliminación de la micobiota epifítica. Todos estos géneros excepto *Nigrospora* fueron detectados durante la fase de establecimiento del material vegetal. Sin embargo, la desinfección con Hipoclorito de Sodio al 3% durante 10 minutos y con Bicloruro de Mercurio al 0.05 Y 0.1% lograron reducir el 50% de los géneros contaminantes.

Palabras clave: *Micobiota epifítica, contaminantes fungosos, establecimiento, guayaba*

7-06 Evaluación del efecto del complejo carbendazim-b-ciclodextrina para el control de hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas

Mileidy Cruz Martín^{1*}, Mayra Acosta¹, Michel Leiva¹, Yelenys Alvarado¹, Minerva Lezcano². *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: yalvarado@uclv.edu.cu

² Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

La mayoría de los contaminantes que afectan el cultivo de tejido de plantas son las bacterias y los hongos. Estos están comúnmente en las plantas *in vivo* pero pueden provocar efectos devastadores en las plantas en condiciones *in vitro*, la búsqueda de nuevas alternativas para su prevención

y control es una tarea que se impone. El carbendazim es el componente activo de varios fungicidas sistémicos ampliamente utilizados en el mundo para el control de enfermedades fungosas en el campo. Su aplicación para el control de la contaminación fungosa en el cultivo *in vitro* de plantas se ve limitada por su escasa solubilidad en agua, lo cual se soluciona al presentarse en forma de complejo con una β -ciclodextrina. Con el objetivo de evaluar el efecto del complejo carbendazim- β -ciclodextrina sobre hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas se determinó su Mínima Concentración Inhibitoria (MCI). Para ello se empleó el método de dilución en Agar. Se analizaron 34 cepas pertenecientes a 14 géneros de hongos contaminantes. El complejo carbendazim- β -ciclodextrina mostró una adecuada actividad antifúngica frente a los contaminantes expresada en la capacidad de inhibir el crecimiento micelial del 78.78% de los aislados probados a una concentración de 64 mgml⁻¹. Estos resultados pueden constituir una herramienta importante ya que este producto pudiera utilizarse en el control de la contaminación fungosa en el cultivo *in vitro* de plantas.

Palabras clave: contaminación, hongos filamentosos, fungicidas, cultivo in vitro, carbendazim- β -ciclodextrina

7-07 Contaminación bacteriana, una dificultad para el establecimiento del guayabo

Nayanci Portal González^{1*}, Israel Caballero², Yelenys Alvarado Capó¹, Michel Leiva Mora¹. *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” Carretera a Camajuaní Km. 2 ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: yalvarado@uclv.edu.cu

² Biofabrica de Maleza. Carretera de Maleza, Km 2 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

El guayabo (*Psidium guajava* L.) ha demostrado ser una especie recalcitrante a técnicas de micropropagación vía organogénesis, debido a problemas de contaminación y ennegrecimiento de los tejidos. El presente trabajo persigue como objetivos: Evaluar la incidencia y el efecto de la contaminación bacteriana en el establecimiento *in vitro* de Guayabo y aislar e identificar los principales contaminantes. Se trabajó con un total de 34 Segmentos nodales de guayabo que no lograron establecerse *in vitro*. De ellas 28 presentaban visible contaminación sobre el medio de cultivo,

alrededor de la base de los explantes y en ocasiones colonizando los mismos. Se determinó que el 76.47% presentaban contaminación bacteriana, el 5.88% por levaduras y el 17.64% no presentaban contaminantes detectables. El ennegrecimiento del medio de cultivo afectó a todas las muestras analizadas. Los resultados obtenidos indican que la contaminación y la fenolización limitan el establecimiento *in vitro* del Guayabo. Se describieron los caracteres culturales de los microorganismos contaminantes en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro*. Los contaminantes más frecuentes pertenecieron a las familias *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae*. Se observó el efecto nocivo de los contaminantes sobre los explantes de guayabo detectándose necrosis total de los mismos. Poseer información sobre los principales microorganismos contaminantes constituye una valiosa herramienta de trabajo que permite determinar las fuentes de contaminación así diseñar programas de medidas para su control y prevención.

Palabras clave: contaminación microbiana, *Psidium guajava* L., bacterias, cultivo *in vitro*

7-08 Influencia del sulfato de gentamicina sobre el control de contaminantes bacterianos en el cultivo *in vitro* de *Eucalyptus citriodora* Hook

Esteban García Quiñones*, Alaina Sánchez, Ana L. Noda, Maurilio García, Rogelio Sotolongo. *Autor para correspondencia

Laboratorio de Biotecnología de las Plantas. Universidad de Pinar del Río, Cuba. Carretera a San Juan y Martínez Km. 5 «El Vizcaíno». Pinar del Río. Cuba. e-mail: egarcia@af.upr.edu.cu

Uno de de los problemas que a diario se presentan en el cultivo *in vitro* de plantas lo constituyen las contaminaciones microbianas. Las pérdidas en la mayoría de los laboratorios de cultivo de tejidos se calculan entre el 3 y 15%, resultando las causadas por bacterias las más elevadas; 20 y 25% (Leifert *et al*, 1994). Dentro de los métodos utilizados para impedir el desarrollo de las mismas, se destaca el uso de antibióticos específicos con alta capacidad para matar o impedir el crecimiento (acción bacteriostática o bactericida) y que actúan selectivamente sobre determinadas especies de microorganismos. Dentro del grupo antimicrobiano de gran utilidad se destacan los aminoglicósidos donde se incluye la Gentamicina, descubierta en 1964, caracterizada por un

alto poder bactericida y un amplio espectro antimicrobiano que abarca Gram + y Gram - y micoplasmas. En este trabajo se describe la utilización del Sulfato de Gentamicina para el control de contaminantes bacterianos presentes en los tallos y hojas de explantes de campo de *Eucalyptus citriodora* Hook. Los mejores resultados se obtuvieron con la utilización de concentraciones de 80 y 100 mg.l⁻¹.

Palabras clave: contaminación microbiana, cultivo *in vitro*, *Eucalyptus citriodora* Hook., sulfato de gentamicina

7-09 Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de bacterias contaminantes de la micropropagación de la caña de azúcar

Yelenys Alvarado*, Mileidy Cruz, Nayanci Portal González *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: yalvarado@uclv.edu.cu

El estudio de las relaciones entre componentes del ecosistema *in vitro* y las bacterias contaminantes puede contribuir al desarrollo de métodos para el control de la contaminación. Este trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de bacterias contaminantes aisladas de la fase de multiplicación y enraizamiento de la micropropagación de la caña de azúcar. Se elaboraron tratamientos con diferentes concentraciones de sales MS, sacarosa y pH iniciales en los medios de cultivo para la multiplicación y el enraizamiento de las plantas *in vitro*. En los mismos se evaluó a las 24, 48 y 120 horas el crecimiento de seis cepas de bacterias aisladas de la fase de multiplicación y tres de la fase de enraizamiento. Se comprobó que el crecimiento bacteriano se vio limitado en todos los tratamientos durante las primeras 48 horas. Donde hubo crecimiento este observó como finas películas o pequeñas colonias solo distinguibles a trasluz. Todas las cepas crecieron a las 120 horas en ausencia de sacarosa y los pH más altos (6.5 y 7.4) favorecieron el crecimiento desde las 24 horas. Se constató la capacidad de estas bacterias contaminantes de adaptarse a las condiciones del medio de cultivo de las plantas.

Palabras clave: bacterias contaminantes, caña de azúcar, micropropagación, multiplicación, enraizamiento, medio de cultivo

METABOLITOS SECUNDARIOS

8-01 Influencia del tiempo y la concentración de ácido giberélico en la producción de bromelina durante la micropropagación de piña en biorreactores de inmersión temporal

Aurora Pérez*, José Carlos Lorenzo, Martha Hernández. *Autor para correspondencia

Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km. 9, CP 69450. Ciego de Ávila. Cuba. e-mail: aperez@bioplantass.cu

El desarrollo de nuevas técnicas de cultivo en medio líquido basadas en los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) incluye interesantes investigaciones relacionadas con su utilidad como fuente de obtención de enzimas fisiológicamente activas. La planta de piña contiene diferentes cisteíno proteinasas, de las cuales la bromelina es mayoritaria y puede ser aislada como metabolito secundario a partir del medio de cultivo. Se evaluó la influencia de la duración de la fase de pre-alargamiento de los brotes y el efecto de la concentración de ácido giberélico (AG_3) en la excreción de bromelina al medio líquido por vitroplantas propagadas en BIT. Los mayores valores de actividad específica en el medio de cultivo (0,065 U/mg proteína) se lograron a los 21 días, mientras que en la planta no existió diferencia significativa entre los tratamientos. La actividad específica de la enzima en la planta no dependió de la concentración de AG_3 . Los mayores valores de actividad específica en el medio de cultivo (0,052 U/mg proteína) se alcanzaron cuando se empleó $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de AG_3 .

Abreviaturas: Biorreactores Inmersión Temporal (BIT), 6-Bencilaminopurina (BAP), Ácido Giberélico (AG_3).

Palabras clave: inmersión temporal, medio de cultivo líquido, micropropagación, piña

8-02 Establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares de Caña Santa (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf.)

Elisa Quiala^{1*}, Raúl Barbón¹, Elio Jiménez¹, Manuel de Fera¹, Alina Capote¹, Naivy Pérez¹, Maité Chávez¹, Igor Bidot². *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera de Camajuái Km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Fax 53(42)281329, e-mail: quiala@uclv.edu.cu

² Centro Universitario de Guantánamo. Carretera a Santiago de Cuba Km. 2 ½, Guantánamo, Cuba.

Se establecieron suspensiones celulares a partir de callos cultivados en medio de cultivo semisólido de *Cymbopogon citratus* (D.C) Staff, según la metodología descrita por Freire, 1998, para el cultivo de la caña de azúcar y posteriormente modificada por Licea y Gómez, 2000 para el cultivo de callos de caña santa, con el objetivo de analizar el efecto de la densidad celular sobre el crecimiento celular, estudiándose el comportamiento de la masa fresca, masa seca y el pH en tres densidades de inóculo (20, 40 y 60 gMF.l⁻¹). Se estudió el desarrollo de raíces en los agregados celulares y se analizó además la influencia del explante sobre la formación de callos directamente en medio de cultivo líquido, a partir de plantas cultivadas in vitro. El mayor incremento de masa fresca se obtuvo cuando se empleó 20 gMF.l⁻¹, los valores de masa seca se comportaron de manera similar, obteniéndose la mayor tasa de crecimiento en este mismo tratamiento. El pH en las tres densidades de inóculo estudiadas, disminuyó durante los primeros ocho días y se mantuvo estable a partir de este momento. La presencia de raíces solo se apreció en los agregados celulares cultivados en medio de cultivo sin agua de coco. La formación de callos directamente en medio de cultivo líquido solo tuvo lugar en el segmento 1.

Palabras clave: agua de coco, caña santa, producción de raíces, suspensiones celulares

8-03 Síntesis y excreción de metabolitos secundarios en Girasol

Martha Hernández^{1*}, Elena Prats, Jesús Jarrín^{2*} Autor para correspondencia

¹ LAB. Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplasmas, Ciego de Ávila, Cuba.

² Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, ETSIAM, Universidad de Córdoba, España (JJ). e-mail: mhernandez@bioplasmas.cu

Girasol (*Helianthus annuus* L.) sintetiza, entre otros metabolitos secundarios (fenólicos y terpenoides) las 7-hidroxycumarinas simples, escopoletina, su derivado glicosilado, escopolina y ayapina. Dichos compuestos han sido descritos como aleloquímicos en diferentes especies vegetales, incluyendo al girasol. Estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación indican que la síntesis de cumarinas en

girasol y su excreción depende del genotipo, edad y estado de desarrollo de la planta, del tipo de órgano y se induce en respuesta a estreses, tanto de tipo biótico como abiótico.

Palabras clave: girasol, metabolitos secundarios, síntesis

8-04 Establishment of cell suspension cultures of *Mimosa tenuiflora* and accumulation of mimonosides

Pilar Nicasio^{*1}, Lamine Bensaddek², Catherine Lavaud³, Marc-André Fliniaux². *Author for correspondence

¹ Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Argentina No. 1 Centro, 62790 Xochitepec, Morelos, México. Tel and Fax: (777) 3612155. e-mail: pisaliva@yahoo.com.mx

² Laboratoire de Phytotechnologie, Faculté de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France.

³ Laboratoire de Phytochimie, Faculté de Pharmacie, Université de Reims, Reims, France.

Mimosa tenuiflora «tepescohuite», is a tree which bark is used in Mexican traditional medicine to treat skin lesions (Lozoya, 1988). From this bark, three triterpenoid saponins, named mimonosides A, B and C, were isolated, these compounds stimulated the multiplication of mouse and human breast fibroblasts (Anton *et al.*, 1993).

To evaluate the accumulation potential for mimonosides cell suspension cultures were established from friable calluses, using Lismaier and Skoog (LS) medium supplemented with 2 mg.l⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin. Two cell lines were obtained: mt/cc (LS with cysteine), and mt/sc (LS without copper sulfate). Cell growth using 7.5 and 5% fresh weight (FW) inoculums was evaluated in batch cultures, recording fresh and dry weights (DW) and carbohydrate concentrations in the culture medium. Dried cellular biomasses (extracted with methanol) were analyzed by HPLC for quantification of mimonosides A and B.

The best cellular growth (17.4 g.l⁻¹) was obtained with mt/sc cell line using a 7.5% FW inoculum. The obtained kinetic parameters were similar to those reported for other plant species. Biomass yield from carbon source in these cultures (0.51 g.g⁻¹), was of the same order than typical values.

Glucose and fructose as a result of sucrose hydrolysis, were never observed in the culture medium, assuming that sucrose could be hydrolyzed internally by the cytoplasmic invertase.

In suspension cultures, mimonoside A was the only one compound detected in both cell lines mt/sc and mt/cc. The accumulation values for this compound ($0.12\text{--}0.16\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$) were lower to those detected in bark for micropropagated trees (0.95 mg/g DW), and wild trees ($1.0\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$). Mimonoside B was not detected in any organ as it was previously reported ($0.07\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$) in bark of wild trees. It will be necessary to assay other biotechnological strategies to increase and stimulate the production of mimonoside A and B respectively.

Key words: mimosa, cell suspension, callus

8-05 Determinación de algunas propiedades farmacológicas a los metabolitos presentes en los extractos del Jengibre (*Zingiber officinale*)

Remigio Cortés Rodríguez¹, Marialina Romero Hernández², Sulay Loy Acosta², Antonio Pérez Donato¹, Rafael Sosa Martínez¹, Daniel Agramonte Peñalver³

¹ Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

² Departamento de Farmacia. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara.

³ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara.

El Jengibre es una planta que se ha empleado desde antaño en diferentes formas y preparados domésticos como medicamento. Dentro de las propiedades farmacológicas que se le atribuyen se destacan sus acciones sobre el sistema nervioso central, tracto respiratorio, sistema digestivo y sistémico, entre otras. Sin embargo, estas últimas dependen de la presencia de determinado metabolito, y estos a su vez de la región o país del cual es originaria esta planta.

En el caso que nos ocupa evaluamos diferentes efectos farmacológicos al Jengibre Cubano, específicamente de la región central. En el primer caso se determinó la actividad antiinflamatoria medida por el ensayo de la peritonitis y en el segundo por el del

edema plantar, empleando en ambos casos como modelo biológico ratas Wistar. Por su parte la actividad analgésica se realizó mediante pruebas antinociceptivas que se basan en la aplicación de un estímulo doloroso, en este estudio se utilizó como material biológico ratones NMRI. Para valorar la actividad hepatoprotectora, se utilizaron ratas Wistar a las cuales se les midieron el comportamiento de los parámetros hematológicos, hemoquímicos e histológicos. Por último, las propiedades antioxidantes fueron estudiadas indirectamente a través de la Inhibición de la producción del radical súperoxido. Como resultado del trabajo se puede plantear que esta planta presenta propiedades antiinflamatorias, analgésicas, hepatoprotectoras y antioxidantes.

Palabras clave: actividad antiinflamatoria, Jengibre, metabolitos secundarios

INFORMACION, COMERCIO Y PROPIEDAD INDUSTRIAL EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

9-01 Sitio web de biotecnología en *Musa* spp

Carmen Pons*, Delly L. González, Osmany Molina, José Ventura, Jorge López, Ricardo Hernández, Víctor Medero, Héctor Rodríguez, José González, René Landa, Aymé Rayas, Jesús García. *Autor para correspondencia

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT).
Apdo. 6, Santo Domingo, CP: 53 000, Villa Clara, Cuba.
e-mail: inivit@ip.etecsa.cu

Las vías de transmisión de la información en las investigaciones y sus potencialidades han sido ampliamente estudiadas, pero aún no se han logrado cubrir las expectativas en cuanto a biotecnología e informática en la agricultura. En particular el cultivo del plátano en Cuba adquiere cada vez mayor importancia socioeconómica, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, esto implica la necesidad de crear nuevos productos de disseminación de los conocimientos sobre este cultivo; por lo que se realizó una recopilación de información que incluye los resultados de la investigación científica que se han obtenido, donde se establecen diferentes técnicas de cultivo de tejidos para la propagación masiva, el mejoramiento genético, así como el diagnóstico y saneamiento a virus por vía biotecnológica, en un Sitio *Web* que está implementado a través de novedosas herramientas como el macromedia® DREAMWEAVER® 4, macromedia® FLASH™ 5 y macromedia® FIREWORKS® 5, entre otras. El Sitio permite al usuario un acceso fácil y rápido a la información con una interfaz visualmente atractiva. Resulta un excelente medio informativo y didáctico, el cual constituye una amena y novedosa forma de promoción y divulgación de los resultados alcanzados y posibilita el intercambio de información en *Musa* spp.

Palabras clave: diagnóstico, informática, mejoramiento genético, plátano, saneamiento

9-02 CiteLivePro: Servicio Web para la Organización Bibliográfica y Generación de Fuentes Secundarias de Información

Milton García Borroto, Guzmán Cabrales Hernández*, Cosme Santiesteban Toca, Evelio Báez Pérez, Magday Santos Jiménez, Luis Miguel Noa. *Autor para correspondencia

Centro de Bioplasmas. Carretera a Morón Km 9. Ciego de Avila, Cuba. Tel: (5333) 24016/25768, Fax: (5333) 266340. e-mail: gcabral@bioplasmas.cu.

Tomando en consideración el estado actual de la sociedad de la información se desarrolla un servicio de organización bibliográfica en ambiente web que permite la búsqueda bibliográfica en bases de datos, la generación automática de bibliografías, la adición online de nuevas normas de catalogación bibliográfica, genera un boletín electrónico de citas, descargas de fuentes a texto completo e incluir opinión crítica. Este servicio dota al Portal Cubano para la Biotecnología Vegetal de un servicio de nuevo tipo, basado en una web que tiene como base el desarrollo de la filosofía de la Web Inteligente. Se obtienen como subproductos de información fuentes secundarias de información de amplia utilidad en la investigación científica.

Palabras clave: normas bibliográficas, organización bibliográfica, productos de información, Servicios Web, sistemas automatizados

9-03 Portal de la Biotecnología Vegetal Cubana

Milton García Borroto, Guzmán Cabrales Hernández*, Cosme Santiesteban Toca, Evelio Báez Pérez, Magday Santos Jiménez, Luis Miguel Noa. *Autor para correspondencia

Centro de Bioplasmas. Carretera a Morón Km 9. Ciego de Avila, Cuba. Tel: (5333) 24016/25768 Fax: (5333) 266340. e-mail: gcabral@bioplasmas.cu

Se presenta el Portal Cubano de la Biotecnología Vegetal midiendo aspectos intrínsecos a los portales en Internet: calidad, objetividad, actualidad y exclusividad, basado en el axioma de la generación de información y la prestación de servicios únicos. Diseñado con el empleo de dos marcos: la cabecera y el cuerpo (donde se pueden acceder a las principales opciones que brinda), de forma que el acceso a la información, sitio Web nacional o internacional...sea realizada dentro del Portal. También se brindan facilidades de navegación e interconexión, manteniendo los vínculos a los temas de mayor interés como: la página de inicio del Portal, las bases de datos bibliográficas, las herramientas para la Biología Molecular, centros de financiamiento y los enlaces a productos único acerca de la biotecnología de las plantas.

Palabras clave: bioinformática, biotecnología Vegetal, herramientas bibliográficas, patentes, portal web, productos de Información, publicaciones, servicios de Información

9-04 Sitio WEB: biotecnología y enfermedades virales en *Carica papaya* L

Delly Lien González^{1*}, Carmen Pons¹, Osmany Molina¹, Héctor Rodríguez², Magaly García¹, Aymé Rayas¹, Ricardo Hernández¹, José E. González¹, René Landa¹, Sergio Rodríguez¹, Jesús García¹. *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo, CP 53000, Villa Clara, Cuba. e-mail: inivit@ip.etecsa.cu Fax: (053) (42) 42201.

² Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Se presenta un Sitio *WEB* sobre la aplicación de la biotecnología y las principales enfermedades virales o producidas por otros agentes, su forma de diagnóstico y control epidemiológico en el cultivo de la fruta bomba o papaya (*Carica papaya* L.). Se implementó con novedosas herramientas como el macromedia® DREAMWEAVER® 4, macromedia® FLASH™ 5 y macromedia® FIREWORKS® 5, entre otras. El Sitio posibilita el acceso fácil y rápido a una gran cantidad de información obtenida de la literatura científico técnica actualizada y la consulta con los expertos en la rama, que combina textos, imágenes, gráficos y esquemas, e incluye los más novedosos resultados de la investigación alcanzados en el ámbito nacional e internacional, sobre todo en el INIVIT, cuna de la variedad 'Maradol Roja', una de las más cultivadas y gustadas en Latinoamérica. Las páginas pueden ser consultadas desde cualquier *browser* como *Microsoft Internet Explorer* o *Communicator*. El trabajo resulta un excelente medio informativo y didáctico y constituye un novedoso medio de divulgación e intercambio de información sobre esta fruta de gran importancia económica para Cuba y el mundo.

Palabras clave: diagnóstico, embriogénesis somática, informática, papaya

9-05 Acercamiento al estudio de las patentes cubanas en Biotecnología Vegetal

Magday Santos Jiménez, Guzmán Cabrales Hernández*, Orlando Gregorio Chaviano, Milton García Borroto. *Autor para correspondencia

Centro de Bioplantitas. Carretera a Morón km 9. Ciego de Avila, Cuba. Tel: (5333) 24016/25768, e-mail: gcabrales@bioplantitas.cu

Se presenta un estudio de las patentes cubanas en el campo de la biotecnología, sin otro objeto que dar una visión del estado actual de este tipo de documento en el campo de la biotecnología. ¿Qué se ha patentado en Cuba en este controvertido campo de la propiedad intelectual?, ¿Cuáles han sido lo mayores resultados innovativos obtenidos en el campo de la biotecnología?, ¿Qué investigadores cubanos más productivos en el campo de la innovación tecnológica?, las respuestas a estas y a otras preguntas se presentan en este trabajo informétrico.

Palabras clave: patentes, información, producción científica, ciencia de la información

9-06 Propuesta para el diseño de servicios personalizados y de valor añadido en los centros de información al servicio de los centros de investigación

Orlando Gregorio Chaviano^{1*}, Magday Santos Jiménez², Guzmán Cabrales Hernández², Yuniel Rojas Mesa³. *Autor para correspondencia

¹ 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: ogregorioch@yahoo.com

² Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km. 9. Ciego de Ávila. e-mail: gcabrales@bioplasmas.cu

³ Universidad Médica de Cienfuegos. Cuba.

Se exponen los criterios de los autores acerca de la masificación de los servicios personalizados y de valor añadidos en los centros de información al servicio de los centros de investigación, así como las posibilidades inmediatas de la implementación de estos servicios y la consecuente elevación de las prestaciones en los centros de información. Se analizan los criterios que fundamentan la propuesta, la forma de implementación y las posibilidades de aplicación teniendo en cuenta realidades como la cubana. Una vez planteada la filosofía de trabajo a utilizar, se realiza un análisis pormenorizado de los tipos de servicios a implementar. Se señalan las potencialidades de la informetría a la hora de implementar estas modalidades de trabajo que hemos denominado servicio por la obligación que impone la convención.

Palabras clave: centros de Información, servicios de valor añadido, servicios personalizados, centros de investigación

9-07 Estudio preliminar sobre la influencia en la comunidad de la violación de medidas sanitarias en instalaciones con riesgo biológico

José M. Machado Rodríguez^{1*}, Freddy Pérez Perera², Heriberto Cárdenas Pérez¹, Jaquelin Luna Carvajal². *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, Villa Clara.

² Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de Las Villas, Villa Clara.

El número de laboratorios, instituciones de investigación y diagnóstico ha crecido en los últimos años en todo el territorio nacional. Se aplican técnicas y tecnologías que requieren el uso de reactivos, sustancias químicas y productos biológicos que poseen características, muchos de ellos, agresivas para las personas y/o el medio ambiente.

La instauración de medidas para la protección de la comunidad y el medio ambiente es una responsabilidad de la seguridad biológica en las instalaciones que generan un riesgo determinado. Sin embargo, hay casos en que no es suficiente el trabajo especializado si no existe una cultura en la población sobre dicha temática.

En este trabajo se describe la problemática estudiada en una región donde se encuentran varias instalaciones de investigación y docentes y su relación con la comunidad circundante, además de dar los resultados primarios de las encuestas efectuadas con relación a incidentes repetidos y su posible repercusión en la salud de los integrantes de dicha comunidad.

Como conclusión exponemos la necesidad de llevar a cabo un programa de capacitación de la población para concientizarlos acerca de los riesgos a los cuales están expuestos al violar los mecanismos de contención que provienen de las instalaciones con riesgo biológico.

Palabras clave: medio ambiente, productos biológicos, riesgo biológico, seguridad biológica

PROXIMOS EVENTOS

TALLER INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL BIOVEG 2003

Se celebrará en Ciego de Ávila, Cuba, del 14 al 19 de abril del 2003. Su objetivo principal : *Biotechnología Vegetal y desarrollo sostenible*".

El Comité Organizador convoca a la organización de los siguientes talleres:

- Propagación de plantas asistida por biotecnología.
- Mejoramiento genético de plantas asistido por biotecnología.
- Otras aplicaciones de la biotecnología vegetal.
- Biotecnología vegetal y ciencias de la información.

Además de los talleres oficiales, se concibe la realización de otros talleres durante el evento previa consulta con el Comité Organizador.

Contacto: Dr. Justo González Olmedo.

Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. CP 069450,
Fax:(5333)266340, e-mail: rsantos@ceniai.inf.cu, rsantos@bioplantitas.cu

INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT BIOTECHNOLOGY, BIOVEG 2003

BIOVEG 2003 will be held in April 14-19, 2003 in Ciego de Avila, Cuba. The main purpose of BIOVEG 2003 will be:
"Plant Biotechnology & sustainable development".

The Organizing Committee of BIOVEG 2003 is calling for the organization of the following workshops:

- Biotechnology-assisted plant propagation.
- Biotechnology-assisted plant breeding.
- Other uses of plant biotechnology.
- Plant biotechnology and information science.

In addition to official workshops, other ones may be arranged during the Meeting with the assistance of the Organizing Committee.

Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Avila, Cuba. CP 069450,
Fax: (5333)266340, e-mail:rsantos@ceniai.inf.cu, rsantos@bioplantitas.cu

6to Coloquio Internacional

VII SIMPOSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Cuba
Junio 21-25, 2004

TEMÁTICAS

- Transformación genética y biología molecular
- Cultivo de tejidos y células
- Embriogénesis somática y semilla artificial
- Propagación masiva de plantas
- Mejora por variación somaclonal, mutágenesis y selección *in vitro*
- Saneamiento y diagnóstico de microorganismos patógenos
- Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro*
- Obtención de metabolitos secundarios
- Información, comercio y propiedad industrial en Biotecnología Vegetal

Contacto: Lic. Orlando Gregorio Chaviano
Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu"
de Las Villas, Santa Clara. Villa Clara. Cuba. Fax: (5342)281329,
e-mail:ogregorioch@yahoo.com

Índice de autores / Authors Index

A. Shahnejat	30
Abad Ramírez, María	94
Abreu, Daymi	37
Abreu, Enildo	64
Acosta, Edgar	91
Acosta, Karen	91
Acosta, Leonardo	71
Acosta, Mayra	109, 110, 122, 123
Agramonte Peñalver, Daniel	52, 79, 81, 86, 94, 100, 102, 130
Agüero, Guillermin	49
Aguiar, Eduardo	37
Aguilera, Narciso	98
Aguirre, Gino	77
Albert, Julia	59
Alcantara, Pedro	105
Alemán, Silvia	64
Alfonso, Julio	37
Altanez, Sonia	59
Alvarado Capó, Yelenys	122, 123, 124, 126
Alvarado, Karen	55
Álvarez Tellez, Orlando M.	114
Alvarez, Irene	43, 44, 45
Álvarez, Miguel	50
Alvarez, Tamara	46
Arana, Franklin	91
Aranguren, M.	48
Arboláez Moré, Idania	120
Arcia, Odalys	56
Ardisana, Eduardo H.	53, 76
Arencibia, Ariel D	39
Arias, Elizabeth	60
Arias, Enrique	71
Arias, Orlaidis	52
Armas, Raúl	37
Arzola, Mayda	107
Ayra, Camilo	32
Bacallao, Neyda	34, 49
Bacallao, J.	40
Báez Pérez, Evelio	132, 133
Balbín, Maria Irene	48
Bango, Juan C.	91
Barbón, Raúl	54, 68, 127

6to Coloquio Internacional

Bari, M. A.	51
Barranco, Luis A.	17, 70
Barredo, Felipe	64
Barreto Pérez, Bárbara	62
Barrios, Luis Manuel	119
Basail, Milagros	56, 62, 66, 88
Bauta, Maricel	50
Bello, L.	48
Benega, Reinerio	60
Bensaddek, Lamine	129
Beovides, Yoel	36, 96
Berdasco, M	23, 27
Bermúdez Caraballos, Idalmis	31, 33, 58, 103, 109, 110, 111, 112
Bernal, Aydiloide	73
Bidot, Igor	54, 127
Blanco, María	32
Booshehrh, A.A.SH.	47
Borges García, Misterbino	94, 98
Borrás, Orlando	107
Borroto, Janetsy	32, 39
Botella, Jimmy	18
Botta, Ana M.	60
Bushehri, A. A	30
Busogoro, Jean Pierre	113
Caballero González, Israel	81, 122, 124
Cabrales Hernández, Guzmán	132, 133, 134, 135
Cabrera, Manuel	50, 56, 59, 62, 66, 88
Cabrera, J.C	108
Cala, Marlene	55
Cañal, MJ	23, 27
Capdesuñer, Yanelis	32
Capote, Maricela	89,
Capote, Alina	54, 127
Capote, Amelia	50, 107, 108
Cárdenas Pérez, Heriberto	136
Cardoso, Joao Francisco	112
Carrazana García, Daymí	120, 121
Cartalla, Guillermo	56
Carvajal, Omelio	87
Casas, S.	40
Castellanos Morales, Hermelinda	120
Castillo, Ramiro	68
Castro, Dagoberto	82
Ceiro, Wilson	98
Chávez, Maité	54, 127
Chinea, Antonio	87

Chong, Boris	31, 33, 35, 70
Cid Ruíz, Mariela	68, 80, 98
Cifuentes, Luis	97
Clavero García, Justo	85, 88, 109, 110
Coello Bautista, Niurka	61, 69
Coll Manchado, Francisco	61, 69, 100
Coll, Yamilet	32
Collado, Raúl	94
Companioni, Barbarita	107
Concepción Laffite, Oscar	74
Cortegaza, Leidy	87
Cortés Rodríguez, Remigio	130
Crespo Hernández, Vicente	95
Cruz Martín, Mileidys	123, 126
Cueto, J.	116
Daniels, Dion	31, 33
Daquinta Gradaille, Marcos	52, 55, 74
de Fera, Manuel	17, 54, 73, 127
de la Cruz, Gerardo	85
del Sol Espinosa, Luis	62
del Valle, N.	48
Délano, J.P	38
Delgado Fernández, Luis A.	86
Desjardins, Yves	82
Díaz Rodríguez, Benigno	76
Díaz, Amaury	85
Díaz, Elena	75
Díaz, Maricela	117
Diego, L.B	23, 27
Diosdado, Esther	69, 107, 108
Disotuar, Rosalía	105
Disotuar, Rosalina	80,
Dollet, M	116
Dottin Pilgrim, Malachy	102
Durán-Vila, N.	58
El Jaziri, Mondher	57
Engelmann, F.	58
Enríquez, Gil A.	19, 38
Escalona Morgado, Maritza	52, 80, 82
Escobar R, René	78
Escobar, Roosevelt	96
Espino, Eumelio	34
Espinosa Reyes, Ángel	104
Espinosa, Patricia	39
Estrada Ortiz, Jesús	50
Fajardo, D.	116

6to Coloquio Internacional

Fajardo, Ernesto	85
Fandiño Cachemaille, Yosbel	114
Felipe, Aniripsa	121
Fernández, Kalyanne	83, 121
Fernández, Félix	83, 121
Fernández, Loiret	48
Fernández, Yoleidis	98
Ferrer Dubois, Albys E	60, 73
Finalet, Julio	59
Fliniaux, Marc-André	129
Florida, Marilyn	30
Folgueras, Maryluz	121
Fonseca, Milvia	98
Fraga, MF	23, 27
Freire, Marisol	17, 67
Fundora Licor, Zaida	80
Fung Boix, Yilan	60, 73
Galindo, Lydia	91
Gallardo, Jorge	35, 63
Gallego, Gerardo	96
Gálvez, Juan Ramón	59
Garcés, Marcelo	97
García Águila, Leyanis	73, 85, 95, 109
García Borroto, Milton	132, 133, 134
García Corria, Maylen	57, 94
García López, Maurilio	92, 93, 125
García Quiñones, Esteban	92, 93, 125
García Rodríguez, Lourdes	58, 103, 109, 110, 111, 112
García Rodríguez, Leonardo	58, 110, 111, 112
García, Jesús	59, 132, 134
García, Magalys	50, 59, 62, 66, 88, 134
García, Aida	71
García, Aymara	30
García, Eva de	101
García, Humberto	34
García, Rolando	40, 45
García, Vivaldo	34
Gerth, André	20
Godoy del Pozo, Lienette	76
Gómez Calderín, Miguel	114
Gómez H., Cristian	65
Gómez Kosky, Rafael	17, 20, 31, 33, 35, 63, 66, 67, 70, 84, 96
González De la Cruz, G.	64
González Paneque, Orlando S.	104
González, Clara	34, 36, 75, 113

González, Jorge	85
González, José E.	134
González, Lianet	56, 59
González, Roberto	85
González, Alfredo	32
González, Annerys	37
González, Delly Lien	121, 132, 134
González, Gerardo	64
González, José	132
González, Julián	59
González, Lien	116
González, María Ester	83, 119
González, Sergio	61,
González, V.	116
González-Armao, M.T.	58
González-Olmedo, Justo L.	82, 98
Gregorio Chaviano, Orlando	134, 135
Gutiérrez, Odalys	52, 81, 94, 102
Gutiérrez, Valentina	50
Hasbún Z., Rodrigo	78
Herman, Edwin	21
Hernández Espinosa, María M	104
Hernández, Reina M	61, 69
Hernández, A.	53
Hernández, Carlos	37
Hernández, Lázaro	32, 39
Hernández, Martha	127, 128
Hernández, Niurka	112
Hernández, Ricardo	132, 134
Herrera Isla, Lidcay	109, 120, 121
Herrera Ofarril, Idalia	17, 35, 63, 67, 84
Hidalgo, Miguel	60
Hidrobo, Ramiro	53
Hurtado Ribalta, Ortelio	90
Iglesia, Aleika	117
Iglesias, Alitza	39
Iglesias, R	108
Imbert Albaro, Blanco	55
Infante, Zucel	98
Isaac Alemán, Elizabeth	60, 73
Isidron Pérez, Miriam	60, 76
Islam, S. M. S.	51
Izquierdo, Humberto	80, 105
Jarrín, Jesús	128
Jiménez Díaz, F	99
Jimenez Gonzales, Elio	20, 34, 36, 49, 49, 127

6to Coloquio Internacional

Jimenez Terry, Felipe	52, 79, 81, 86, 94, 100, 102
Jiménez, Mayra	73
Jomarrón Rodiles, Isabel	100
Junco Cruz, Leoncio	92
Kiani, S.P.	47
Kleiner, Diethelm	48
Kowalski, Britta	100
La Rosa, Julia	22
Labrie, Phil	18
Landa, René	59, 132, 134
Lara, Regla M.	30
Laucke, Guido	41
Laurena, Tony	18
Lavaud, Catherine	129
Leeton, Peter	18
Leiva Mora, Michel	113, 122, 123, 124
Leproive, Phillipe	113
Lezcano, Minerva	123
Lezcano, Yarianne	52
Llauger, R.	116
López, Iraidia	105
López, Jorge	50, 59, 62, 66, 88, 121, 132
López, A.	40
López, Alina	45
López, Mirtha	71
Lorenzo Vila, Dámaris	92
Lorenzo, José Carlos	39, 107, 127
Lorenzo, Miguel	22
Loy Acosta, Sulay	130
Luna Carvajal, Jaquelin	136
Machado Armas, Pablo	90
Machado Rodríguez, José M.	136
Magdalita, Pablito	18
Mandoulakani, B.Abdollahi	30
Marrero, Norma	107
Martínez García, Teresita	120
Martínez Pérez, Yudit	85
Martínez Torres, Alcides	95
Martínez, Julia	60
Martínez, Marilín	50, 88
Martínez, N	38
Mas, Leticia	33, 35, 63
Matos, Madyu	87
Mederos, Mercedes	32, 59
Mederos, Víctor	50, 56, 62, 66, 88, 96, 121, 132

Medina, Maribel	92, 93
Méndez Santos, Isidro E.	114
Mendoza, Mae	18
Menéndez, Eduardo	39
Meneses Rodríguez, Silvio	94, 98
Mirabal, Loreli	83, 121
Molina, Osmany	132, 134
Mollinedo Diogo, Niurka	120
Montano, Nery	59, 62, 66
Montes, Silvia	71
Morán, Rolando	43, 44, 45
Mosqueda Frómeta, Osbel	80
Mosqueda, Marais	107
Navarro, L.	58
Nicasio, Pilar	129
Nieves, Nadina	68
Noa, Luis Miguel	132, 133
Noda Jiménez, Ana L.	92, 93, 125
Noguera, Aldo	75
Norman Montenegro, Osvaldo	84
Noval, B. M. de la	38
Núñez Vázquez, Miriam	104
Ocaña, Bárbara	31
Ocagueira, Zenaida	73
Olalde, V	38
Oliva, Maria	56
Olivera, Tania	41, 43
Oloriz, María I.	36
Orellana Pérez, Pedro	58, 103, 109, 110, 111, 112
Ortega, C.	58
Ortega, Eduardo	48, 121
Padrón Montesinos, Yenny	109, 110, 111, 112
Palhares, Gerson A.	98
Parrot, Wayne	7
Paz, Nora	75
Pazos, Mabel	83
Pazos, Victoria	117
Pedroso, Dolores	80
Pellón, Yenima	87
Peña Ojeda, Luis	76
Peña, Pablo	91
Peralta, Esther Lilia	87, 116, 117
Peralta, Hipólito	32
Pereira Marín, Carlos	33
Pérez Díaz, Odalys	50, 107
Pérez Donato, Antonio	130

6to Coloquio Internacional

Pérez Mederos, Blanca	85
Pérez Milian, J.R.	87
Pérez Montesino, Dalia	75
Pérez Peralta, Martha	81,
Pérez Perera, Freddy	136
Pérez Ponce, Juan N.	52, 94, 102, 110, 112
Perez Roque, Zaida	101
Pérez, María Cristina	107
Pérez, Neisis	91
Pérez, Aurora	127
Pérez, Delia	121
Pérez, Eduardo	83
Pérez, Enid	34
Pérez, Juan C.	54
Pérez, Marta	52, 94, 102
Pérez, Maylin	32, 37
Pérez, Naivy	54, 127
Pérez, Yunel	64
Pérez-Molphe Balch, E. M	99
Pérez-Pelea, L	108
Pimentel, Caridad	80, 105
Pina Morgado, Danilo	68, 80, 98
Pinares de la Fe, Ania	75
Ponce, Milagros	38
Pons, Carmen	59, 88, 121, 132, 134
Portal González, Nayanci	124, 126
Posada Pérez, Laisyn	17, 63, 84
Prats, Elena	128
Prede Rodríguez, Miriam	56
Preil, W	68
Pujol, Merardo	32, 38
Quiala, Elisa	54, 127
Quiñones, Yovany	80, 105
Quiñónez, Reinaldo	121
Ramallo, Jacqueline	75
Ramírez Aguilar, Daymí	52, 79, 81, 94, 101, 102
Ramírez, Teresa	59
Rayas, Aymé	50, 59, 62, 88, 132, 134
Reinaldo, Damisela	59, 62, 66
Reyes Vega, Maritza	17, 31, 33, 35, 63, 66, 67, 70, 84
Reyes, Yaneisa	107, 108
Reyes, Ernesto	64
Ríos L., Darcy	65, 78
Rivera, Odalys	73
Rodríguez Concepción, Alex	101
Rodríguez De la O, J.L.	64

Rodríguez Hernández, Julio E.	114
Rodríguez Machado, Lisbet	56
Rodríguez Medina, Narciso N.	89,
Rodríguez Morales, Sergio	36, 59, 96, 121, 134
Rodríguez Soria, José B.	56
Rodríguez Urquiza, Mayelin	101
Rodríguez, Edrey	34, 49
Rodríguez, Héctor	132, 134
Rodríguez, Kirenia	60
Rodríguez, Loexis	55, 85
Rodríguez, R	23, 27
Rodríguez, Romelio	52, 82, 98
Rodríguez, M	116
Rodríguez, Nercy	107
Rodríguez, Orfelina	22
Rodríguez, Yania	107
Rojas Mesa, Yuniet	135
Rojas, Luis	36
Román, María Isabel	34, 36, 113, 114
Romero Hernández, Marialina	130
Romero Quintana, Carlos	103, 109, 110, 111, 112
Roque López, Ariannys	76
Rosabal Guerra, Ana C.	114
Rosabal, Y.	40
Ruffin, Yordanka	87
Saare, K.	68
Salazar, Alberto	38
Sánchez Enciso, M.C.	64
Sánchez, Esmérida	85
Sánchez, Alaina	125
Sánchez-Olate, Manuel	65, 78
Santana, Omar	87
Santiesteban Toca, Cosme	132, 133
Santos Bermúdez, Ramón	47, 107
Santos Jiménez, Magday	132, 133, 134, 135
Santos, Arletys	56, 62, 66, 88
Sarría Hernández, Zoe	85
Schiemann, Joachim	41
Schmid, J. E.	51
Sierra Peña, Aliuska	74
Silva Pupo, Juan J.	71, 104
Somonte, D.	40
Somontes, Danalay	45, 46
Sosa Martínez, Rafael	130
Sosa, Giselle	48
Soto, Marianela	116

6to Coloquio Internacional

Soto, Natacha	38
Sotolongo Sospedra, Rogelio	92, 93, 125
Suárez Canino, Norma	120, 121
Suárez Castellá, Miguel	101
Tabatabaei, B.E.	30
Tabatabai, B.A.S.	47
Téllez, Enidia	55
Téllez, Pilar	32
Tiel, Kenia	38
Tohme, Joe	96
Torres García, Antonio	76
Torres Marlenis	59
Triana Gutierrez, Robin	101
Trina, Danilo	52
Trocones Boggiano, Ana G.	86
Trujillo Sánchez, Reinaldo	64, 74
Ugarte, Cecilia	77
Uribe M, Matilde	65, 97
Urre, C.	58
Usatorres, Bárbaro	40, 46
Valdés, Marlyn	34, 36, 113
Valdéz Balero, Apolonio	58, 110
Valdivia, Onel	37
Valenzuela, Sofía	41
Vallés, J. Ramón	55
Vargas, Edith	101
Varona, Javier	34
Vázquez Martínez, O	99
Vázquez, Joel	98
Vázquez, M.S.	38
Veitía Rodríguez, Novisel	58, 103, 109, 110, 111, 112
Velázquez, Bárbara	89,
Vento Díaz, Héctor	76,
Ventura, J. de la C.	50, 56, 59, 62, 66, 88, 132
Vilchez, Jorge	17
Viljoen, Altus	43
Villarroel Vogt, Carmen L.	77
Visser, Marinda	43
Wilken, Dirk	20
Xiqués, Sonia	34, 36, 75, 113
Yabor, Lourdes	39
Yépez G., Lianette M	101
Zaldúa, Zurima	43, 45
Zambrano, Yumaris	68
Zan, Meriele Ana	88

Palabras claves / Keywords

d-endotoxin	44, 45
ACC Oxidase	34, 49
acclimatization	100
ácido 2,4-diclorofenoxiacético	56
aclimatización	64, 74, 81, 82, 90, 95, 99, 102, 106
actividad antiinflamatoria	131
actividad transitoria	38
ADN	36
adult leaf inoculation	108
afinidad genética	37
AFLP	36, 97
Agavaceae	64
Agave	102
Agrobacterium tumefaciens	32, 33, 40, 41, 42, 46, 47
agua de coco	128
ajo	81
Allium sativum	81
alternaria solani	107, 109, 113
amarillamiento letal del cocotero	117
análisis discriminante	57
análisis isoenzimático	113
análisis multivariado	57
anhidraza carbónica	35
anther culture	52
antisense	34, 49
ápices	85
arroz	30, 33
auxinas	63
Azadirachta indica	50
Bacillus thuringiensis	44, 45
bacterias	120, 121, 125
bacterias contaminantes	126
banana	43
bananos	62, 113
beet western yellow virus	42
Beilschmiedia berteriana	97
Berberidopsis corallina	97
Biobras 6	61, 80, 100
Biobras 16	61
Biofábricas	101
bioinformática	133
biorreactores	

6to Coloquio Internacional

biorreactores de inmersión temporal	99
biotecnología vegetal	88, 133
bombardeo	34, 36
boniato	105
Brasinoesteroides	56, 61, 80, 99, 105
Brassica napus	47
brassinosteroids	100
brotes axilares	85
cacao	72
café	84
cafeto	119, 121
calidad	80
callogénesis	54, 56
callos	52, 54, 59, 61, 107
callos embriogénicos	38
callus	130
callus formation	61
caña de azúcar	32, 33, 36, 49, 59, 61, 68, 73, 76, 87,
	110, 111, 118, 126
caña santa	128
caoba	93
carbendazim-b-ciclodextrina	124
carbón activado	86
carbón de la caña	110
Carica papaya L	77
castanea sativa	79
castaños	79
Cattleya labiata	86
cDNA	49
cell suspension	130
centros de Información	135
centros de investigación	135
cerezo	77
certificación	96
ciencia de la información	135
citoquinas	112
cítricos	48, 70
citrus	58
Citrus reshni Hort. ex Tan	70
claveles chinos	75
clones	37
cluster	57
CO ₂	83
Cocos nucifera cv.	55
coeficiente de multiplicación	73, 104

Coffea arabica L.	60, 69, 74
colocasia esculenta	122
conservación <i>in vitro</i>	51
conservation	58
contaminación	75, 79, 124
contaminación microbiana	119, 122, 125, 126
contaminantes fungosos	123
Cryopreservation	58
cultivo <i>in vitro</i>	56, 63, 75, 77, 124, 125, 126
cultivo de tejidos	59, 60, 77, 89, 93, 112, 115
cultivo in vitro	75
culture medium	108
cytokinins	61
Dasheen Mosaic Virus	103
Densidad celular	71
desinfección	75, 85, 92
diagnóstico	103, 132, 134
diagnóstico PCR	117
Dioscorea alata L.	98
dióxido de carbono	69
directed mutagenesis	44
diversidad genética	117
DNA	31
double haploid	52
duraznero	77
efecto piramidal	60
electroforesis	48
electroporación	49
embriogénesis somática	62, 64, 65, 66, 69, 70, 84, 97, 134
embrión somático	68
embriones cigóticos	60, 72
embriones somáticos	55, 63, 71
embryogenic callus	58
encapsulación	68
enraizamiento	63, 91, 126
enraizamiento ex vitro	87
enraizamiento <i>in vitro</i>	56, 102
enriquecimiento de aire	83
Erwinia chrysantemi	120
escaldadura foliar	87, 118
estabilidad genética	97
establecimiento	85, 92, 103, 123
establecimiento <i>in vitro</i>	60, 97
estacas	68
esterazas	35
estrés hídrico	30

6to Coloquio Internacional

ethylene	34, 49
Eucalyptus saligna	93
Eucalyptus citriodora Hook.	93, 126
Eucalyptus globulus Labill.	66
Eucalyptus pellita	93
explantes	59, 63, 106
fenolización	59, 104
fertilizante	90
FHIA 21	32
filtrados crudos	107
forestales	52, 92
formación de callos	55, 65, 72
frambueso	77
Frutilla	77
fungicidas	124
fungus incubation	108
Fusarium oxysporum	43, 109, 120
Fusarium wilt	108
gelificantes	53
Genetic diversity	31, 47
genetic transformation	31
Gerbera	91
germinación	67, 71, 75, 86
GFP	49
girasol	129
Gluconacetobacter diazotrophicus	49
greenhouse	100
guana	92
guayaba	94, 123
henequén	64
herramientas bibliográficas	133
hibiscus	87
hibridación de ácidos nucleicos	116
híbridos	63, 104
hongos	119
hongos filamentosos	124
hormonas	53
<i>in vitro</i> anther	61
In vitro establishment	89
indicadores bioquímicos	32
Inducción de callos	105
inducción de mutaciones	60
información	135
informática	132, 134
ingeniería genética	46
inmersión temporal	73, 127

insectos	46
isoenzimas	35, 68
gengibre	131
Juglone	114
Khaya nyasica	52
kinetina	56
Kostermans	97
Legrandia concinna	97
líneas celulares	67
luz	83
Lycopersicon esculentum L	39, 65
maduración	32, 67
Malanga	103
mandarina	48
manejo <i>in vitro</i>	104
Manihot esculenta	51
manzano	77
marcadores bioquímicos	30
medio ambiente	136
medio de cultivo	55, 63, 65, 75, 80, 82, 87, 102, 126
medio líquido	57, 71, 86, 89, 127
mejoramiento	85
mejoramiento genético	93, 94, 111, 132
Meliáceas	52
metabolitos secundarios	129, 131
Micobiota epifítica	123
micorrización	84
micorrizas	39, 121
microorganismos contaminantes	121, 122
micropartículas	34, 36
micropropagación	51, 73, 74, 76, 77, 79, 80, 82, 83, 86, 88, 89, 91, 93, 94, 98, 126
micropropagación comercial	96
microspore	52
Mikania glomerata	88
mimosa	130
minitubérculos	95
molecular biology	43
Mollicutes	117
multiplicación	53, 56, 87, 126
multiplicación <i>in vitro</i>	62
Multiplication	89
Musa spp	34, 53, 71, 85, 108, 109, 114, 120
mutagénesis <i>in vitro</i>	60
mutantes	113
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	114

6to Coloquio Internacional

N. benthamiana	42
ñame	57, 95, 98
nemátodos	100, 115
Nicotiana tabacum	35
Nim	50
normas bibliográficas	133
Normas de trabajo	101
organización bibliográfica	133
Organización del trabajo	101
organogénesis	75, 97, 112
orquídeas	86
oxidación	76
papa	38, 54
papaya	36, 63, 85, 134
patentes	133, 135
pathogen	43, 48
patogenicidad	39
PCR	49
Pectimorf	109
peroxidasas	35, 107, 109
Pfu polymerase	44
Philodendrum xanadu	75
photoperiod	47
physiologic parameters	100
picudo negro	115
pigmentos fotosintéticos	74
piña	80, 90, 127
pineapple	61
plant fungus	48
plant growth regulator	61
plant pathogen	48
planta medicinal	88, 106
plátanos	32, 60, 62, 104, 113, 132
polifenoloxidasas	35
Portal web	133
potato	100
producción científica	135
producción de raíces	128
productos biológicos	136
productos de Información	133
propagación <i>in vitro</i>	50, 85, 92, 96, 100,
Propagación masiva	101
propagation	89
Psidium guajava	49, 82, 89, 125
publicaciones	133
quitinasa	39

radiaciones gamma	111
RAPD	31
recursos genéticos,	51
reforzamiento auxínico	80
regeneración	38, 41, 47, 97, 105
reguladores del crecimiento	50, 54, 80, 87, 91
resistencia a herbicidas	38
respuesta embriogénica	63
Rhodococcus fascians	57
riesgo biológico	136
RIZOBAC	54, 119
roya	36
Ruta graveolens L	56
Saccharum sp	68
saneamiento	132
segmentos de hojas	67
seguridad biológica	136
selección <i>in vitro</i>	110
semilla artificial	66, 68
serovares	118
servicios de Información	133
servicios de valor añadido	135
servicios personalizados	135
Servicios Web	133
sigatoka negra	114, 115
síntesis	129
sistemas automatizados	133
sistemas de inmersión temporal	89
sistemas isoenzimáticos	37
Sitio web	133
somaclones	111
β -Glucuronidasa	36, 38
Streptomyces scabies	113
sulfato de Gentamicina	126
suspensiones celulares	32, 62, 69, 128
sustratos	81, 106
sweet potato	45, 47
Swietenia macrophylla	93
synthetic cry gene	45
synthetic gene	44
tabaco	57
Taq polymerase	44
Taqmqn tiempo real	116
temporary immersion system	40
thidiazuron	112
tidiazurón	52, 72

6to Coloquio Internacional

tomate	39, 107, 109
transformación	34, 48, 49
transformación genética	32, 33, 38, 41
transformation	42, 47
Transgenic pineapple	40
transgenic plants	45
tratamiento magnético	74
UMELISA-I	118
Ustilago scitaminea,	110
Variabilidad somaclonal	71
variación somaclonal	60, 109
Vid	100
viroides	116
virus	48
Xanthomonas albilineans	87
xanthosoma	122
yemas	68
yuca	37, 89
zanahoria	41