



**IX SIMPOSIO INTERNACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**
20 - 22 de abril de 2010

RESÚMENES / ABSTRACTS



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



**IX SIMPOSIO INTERNACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**
20- 22 de abril de 2010

RESÚMENES / ABSTRACTS

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

AUSPICIADORES



PATROCINADORES



Edición: Yelenys Alvarado-Capó

Diagramación: Marta Rodríguez Rodríguez

Impresión: Imprenta UCLV

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



**IX SIMPOSIO INTERNACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
20 - 22 de abril de 2010**

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente:

Dr.C. Daniel Agramonte

Director

Instituto de Biotecnología de las Plantas

Organizador Profesional de Eventos:

Lic. Osmildo Fernández Tejera

Especialista en Información

Instituto de Biotecnología de las Plantas

COMITÉ CIENTÍFICO

Dr.C. Daniel Agramonte Peñalver
Dr.C. Yelenys Alvarado Capó
Dr.C. Rafael Gómez Kosky
Dr.C. Marisol Freire Seijo
Dr.C. Elio Antonio Jiménez González
Dr.C. Pedro Miguel Suárez Castellá
Dr.C. Orelvis Portal Villafaña
Dr.C. Manuel Alejandro de Faria Silva
Dr.C. Raúl Barbón Rodríguez

Dr.C. Ramón Santos Bermúdez
Dr.C. María Cristina Pérez Peñaranda
Dr. Jorge Sandoval Fernández
Dr. André Gerth
Prof. Dr. Sezai Ercisli
PD Dr. habil. Bettina Eichler-Löbermann

Tabla de contenido / <i>Table of contents</i>	Pag.
Conferencias / <i>Plenary Lectures</i>	1-3
Cultivo <i>in vitro</i> de células, tejidos y órganos / <i>Plant Cell, tissue and organ culture</i>	5-18
Propagación <i>in vitro</i> / <i>In vitro propagation</i>	19-35
Mejora genética / <i>Plant Breeding</i>	37-50
Metabolismo secundario / <i>Secondary metabolism</i>	51-59
Interacción planta microorganismos / <i>Plant-microbe interaction</i>	61-75
Estrés abiótico y nutrición / <i>Abiotic stress and plant nutrition</i>	77-80
Bioteología y biocombustibles / <i>Biotechnology and biofuels</i>	81-82
Biodiversidad y conservación de recursos fitogenéticos / <i>Biodiversity and conservation of phytogenetic resources</i>	83-87
Bioteología y sociedad / <i>Biotechnology and society</i>	89-90

CONFERENCIAS

Avances recientes en la embriogénesis somática de *Musa* spp. en Cuba

Rafael G. Kosky¹*, Borys Chong-Pérez¹, Jorge López Torres², Maritza Reyes¹, Leyanis García-Aguila¹, Miladys León, Idalmis Bermúdez-Caraballosos¹, Dion Daniels³, Pedro Orellana, Zoe Sarria, Robin Triana, Blanca Pérez, Nery Montano², Ayme Rayas Cabrera², Manuel Cabrera Jova², Milagros Rodríguez¹.

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

²Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo 6, Sto Dgo, Villa Clara, CP 53 000, Cuba.

³University of Belize, University Boulevard, P.O. Box 340 Belmopan, Cayo District, Belize, Central América

Los avances en la biotecnología de los bananos y plátanos ofrecen nuevas oportunidades en el campo de la propagación vegetativa y la ingeniería genética. El desarrollo de métodos de propagación clonal, especialmente la embriogénesis somática, tiene numerosas aplicaciones potenciales. Especialmente, debido a su eficacia en la regeneración de plantas y su unión con la facilidad de almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido. La embriogénesis somática se volvió una herramienta indispensable para acelerar el desarrollo de diferentes cultivares. Se han desarrollado algunos protocolos para embriogénesis somática en *Musa* spp. Sin embargo, han sido poco estudiados otros tipos de explantes para la formación de callos con estructuras embriogénicas, la fase de maduración de los embriones somáticos y la evaluación campo de gran cantidad de plantas. En este trabajo se hace énfasis en los progresos recientes en la embriogénesis somática en este importante cultivo en Cuba. Se enfoca, principalmente a las pruebas de campo de plantaciones obtenidas por embriogénesis somática en diferentes cultivares de banano y plátano donde se han detectado bajos porcentajes de variantes.

Recent progress in somatic embryogenesis of *Musa* spp. in Cuba

Advances in banana and plantain biotechnology offer new opportunities in the field of vegetative propagation and genetic engineering. Development of clonal propagation methods, especially somatic embryogenesis, has numerous potential applications. Owing to its efficiency in plant

regeneration, coupled with the ease of long-term storage in liquid nitrogen. Somatic embryogenesis became an indispensable tool for accelerating the development of different cultivars. Some somatic embryogenesis protocols were developed for *Musa* spp., however new explant for callus with somatic embryos formation, somatic embryo maturation stage and the field evaluation of high amount of plant has been very few studied. In this work emphasizes the most recent progress made in somatic embryogenesis in this important crop in Cuba, focusing in field testing of plantations obtain by somatic embryogenesis in different banana and plantain cultivars with low percentages of variants.

Plant nutrition in the context of sustainability

Nils Vagstad

Bioforsk. Norwegian Institute for Agricultural and Environmental Research N-1432 Aas, Norway.
e-mail: nils.vagstad@bioforsk.no

Productivity in agriculture is essential to a number of sustainability indicators. For instance, are loss of biodiversity and the degrading of natural resources, including soils and waters, closely linked to the performance of agricultural production systems. Technologies and strategies to enhance efficient utilisation of nutrients and water are therefore important. But, the key word is nevertheless 'integration', emphasising that plant nutrition, pest and disease management, soil and water management and plant variety adaptations should not be treated separately but need an integrated approach. In this way, it is possible to minimize the environmental impacts by optimizing the utilisation of nutrients and other inputs, and thereby also reducing the need for conversion of forest into agricultural land. This is particularly important when addressing climate change and agricultural adaptations, which cannot be considered separately from the food security issue. In order to achieve such approaches in agricultural practices, different incentives and regulatory measures are likely to be required. With reference to the framework described above, this presentation provides a sustainability perspective on the issues of integrated plant nutrition management and productivity, based on the experiences from Europe and the Scandinavian countries. The integration of agronomic and environmental concerns into a unified management strategy will be exemplified with reference to current EC policy instruments.

Enzyme activities and their effect on P supply of different C3 and C4 crops under drought stress

Maria Caus, Christine Brandt, Bettina Eichler-Löbermann*

University of Rostock, J. von Liebig Weg 6, 18 059 Rostock, Germany. e-mail: bettina.eichler@uni-rostock.de

In a greenhouse experiment the activities of different enzymes and their potential role in plant P uptake under drought stress conditions were studied. Four crop species (amaranthus, sorghum, soybean, and rye) were cultivated on a sandy soil under different water supply (30% water holding capacity (WHC), and 70% WHC). The yield increased significantly with higher soil humidity. For 70% WHC the yield increase in comparison to the 30% WHC treatment was 2.4 times for amaranth, 2.2 times for sorghum, 2.5 times for soybean, and 2.7 times for rye. This increase in yields was correlated with a significant increase of nutrient uptakes. Drought stressed crops showed a significant higher proline accumulation compared to the control in amaranth, sorghum and rye. Also between the crops significant differences were found. Extreme high values were measured for rye under drought stress. The effect of water supply on leaf phosphatases was less pronounced. The enzymatic activity levels in soil (acid phosphatases, AcP; alkaline phosphatases, AIP and phosphodiesterase, PDE) were different, with highest values for AcP. In average, drought stress conditions provoked an increase of activities of AcP (significant differences were found for the C4 crops amaranth and sorghum). The drought effect on the activities of AIP and PDE was less pronounced. Significantly higher AIP and PDE values under water deficiency were only measured for soybean. On average, higher activities of enzymes were found in the rhizosphere of amaranth and soybean. These values were about 2.5 – 3 times higher compared to those found for sorghum and rye. Our results demonstrated that the contribution of AcP within the hydrolysis processes of P compounds in soil was higher than the part of AIP and PDE, and that it is determined by crop type and water content in soil.

Rice as a model to study hormonal defense networking in monocots

David De Vleeschauwer*, Evelien Van Buyten and Monica Höfte

Lab of Phytopathology, Department of Crop Protection, Ghent University, Coupure Links 653, 9000 Ghent, Belgium.
e-mail: David.DeVleeschauwer@UGent.be

As sessile organisms, plants are continuously threatened by a wide variety of microbial pathogens and herbivorous insects. To survive under these hostile conditions, plants have evolved a surprisingly complex innate immune system that is highly flexible in its capacity to detect and counteract potential invaders. Besides, constitutive physical and chemical barriers, plants are equipped with a vast repertoire of defense mechanisms that only become activated following pathogen invasion. These infection-inducible defense responses are regulated by an elaborate matrix of signal transduction pathways within which plant hormones such as salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), ethylene (ET) and abscisic acid (ABA) play central roles. Mounting evidence suggests that these signaling pathways do not function independently, but influence each other through a complex network of synergistic and antagonistic interactions, allowing the plant to activate an appropriate spectrum of defenses depending on the type intruder encountered. Besides, providing the plant with a powerful regulatory potential to adaptively tailor its defense response to the type of attacker, this so-called crosstalk may also allow successful pathogens to manipulate the plant's immune system to their own benefit by shutting down effective defenses through negative network connections. Historically, research aimed at elucidating the molecular mechanisms underpinning hormonal defense networking has been polarized towards the use of experimentally tractable dicot plant species such as *Arabidopsis*. However, the use of rice as an alternative system to study plant innate immunity is now gaining momentum. Primarily fueling this keen interest is the emergence of rice as a model plant for molecular/genetic studies in cereal crops. This new-born status of rice as a central monocot model arises from several key features, including its relatively small and fully sequenced genome, ease of transformation, and the availability of myriad tools for both forward and reverse genetics. Taking advantage of this extensive toolbox available, our research aims to advance our fundamental understanding of the role of various hormones in regulating disease resistance in monocots. As model systems, we are studying the interaction between rice and five of its major pathogens, i.e. *Magnaporthe oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Pythium* spp. and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. In this presentation, the latest discoveries dealing with hormone-mediated defense networking in rice will be outlined, thereby focusing primarily on the role of the ABA and ET response pathways. Using several case studies, the molecular players that orchestrate the crosstalk between the latter conduits will be highlighted and special attention will be paid to the role of this regulatory crosstalk in shaping the

outcome of rice-pathogen interactions. Moreover, details will be presented regarding the putative connections between hormone signaling, rice pathogen defense and microbial virulence and the mechanisms employed by virulent rice pathogens to disarm the plant's weaponry and enforce a successful infection.

The potential of cross-platform expression compendia in systems biology

Kristof Engelen

Department of Microbial and Molecular Systems, Catholic University of Leuven, 3 000 Leuven, Belgium.
e-mail: kristof.engelen@biw.kuleuven.be

The advent of microarrays (a technology that allows measurement of expression levels of thousands of genes simultaneously), has contributed tremendously to the revolutionary developments in *systems biology* over the past decades. Thousands of experiments are currently made available through several databases (e.g. GEO, ArrayExpress), but

the usability of these data as such is minimal. The large heterogeneity between data originating from different labs, experiment sets, and platforms renders it extremely difficult to combine data from different experiments. We've developed a (semi-automatic) system to create and update large, organism specific cross-platform expression compendia: in essence tables that contain, for all genes (rows) of a certain organism, expression values of all publically available microarrays (columns), representing the different conditions in which the experiments were conducted. Moreover, these compendia are supplemented with a structure for formal condition annotation and ontology, so that each condition can be described in an exact manner as a parameterized vector and conditions can be compared unambiguously and in a mathematical context. In this talk we will also demonstrate COLOMBOS: a web based tool to allow researchers to access, explore and analyze available compendia, and we will further show some concrete applications of using cross-platform expression compendia to compare a set of related pathogenic and non-pathogenic *Ascomycetes*.

CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS, TEJIDOS Y ÓRGANOS

***In vitro* culture response of Libyan wheat genotypes using immature embryos**

Noaman Elfishi*, Ahmed Shabaan, Mustafa Salama, Khaled Alhijaji, Bannur Salama

Plant Tissue Culture Department, Biotechnology Research Center, P.O. Box 486. Tripoli, Libya.
e-mail: elnfishinoaman@yahoo.com

Triticale is an important cereal crop grown throughout the world. The study reports somatic embryogenesis from immature embryos of 10 Libyan wheat genotypes. The explants were initially cultured on MS medium supplemented with 2 mg.l⁻¹ 2,4-D, 10 mg.l⁻¹ glutamine, 100 mg.l⁻¹ L-Aspartic acid, 3% sucrose and 7% agar for four weeks in the dark. The temperature was maintained at 24±2°C. Thereafter, the developing embryogenic calli were transferred to MS medium with 0.5 mg.l⁻¹ 2,4-D to achieve embryogenesis under light intensity of 30 000 lux in 16 h light 8 h dark photoperiod at 24±2°C for 4 weeks. Variability was observed among genotypes tested for differentiation and plant regeneration potential. The all genotypes were significantly higher from the control for callus fresh weight (mg). The genotype SHAK and MAKAOY performed better for callusing. Maximum numbers of plants were regenerated on genotype of BLACK TAZIDA, BLACK JAMINA, ARIEZOL and ZALEF then control genotype.

A low-cost strategy for accelerating the plant cell suspension culture of *Momordica charantia* L.

Karthikeyan Sm* and Rajagopal K.

Department of Biotechnology, School of Life Sciences, VELS University, Velan Nagar, Pallavaram, Chennai- 600 0117, Tamil Nadu, India. e-mail: karthi.biotech85@gmail.com

The carbon source in plant cell suspension culture is a very important factor for growth and development. In the present investigation the role of different carbon sources such as analytical grade sucrose (Hi-Media, India), commercial grade sugar, sugarcubes and jaggery (both purchased from local market) were studied in cell growth of *Momordica charantia* in an effort to reduce the cost instead of using high cost carbon source. Studies have revealed that significant improvement was observed in cell growth on a medium containing sugarcubes. More callus could be induced successfully from leaf and shoot tissues when cultured on MS medium supplemented with two combinations of growth regulators influence (Kin+IAA and BA+IAA). More fresh weight and the

best friability of callus was obtained from leaf explants on MS medium containing 1.0 mg.l⁻¹ IAA and 0.5 mg.l⁻¹ Kin. The cell suspension culture promoted the best cell growth in medium containing sugarcubes with biomass of 8.245 g fresh weight and 0.298 g dry weight in 24 days of inoculation. This is the first report using four different carbon sources in plant cell suspension cultures. The results showed that out of four carbon sources tested, sugarcubes could be the best source of carbon and it potentially reduces the cost of using costly carbon sources in cell suspension cultures.

Efecto de la adición del ácido salicílico y quitosana a diferentes concentraciones en la callogénesis y diferenciación de tres clones de *Theobroma cacao*

Lillien Fajardo Rosabal*, Enrique Ramila García, Juan J. Silva Pupo, Yosvel Viera Tamayo.

Universidad de Granma. Carretera vía Manzanillo km 17.5. Peralejo. Bayamo. Granma. e-mail: lfajardor@udg.co.cu

Son pocos aún los estudios en *Theobroma cacao* acerca de la identificación y producción de metabolitos secundarios de interés y de relaciones entre éstos y variables morfológicas dentro del cultivo *in vitro*. Por ello, se realiza este trabajo con el objetivo de evaluar el efecto de elicitors en la formación de callos de *Theobroma cacao*, clones: UF-613, UF-650 y Pound-7. Al medio de cultivo para la formación de callos y diferenciación celular de cacao se adicionó quitosana y ácido salicílico, a concentraciones de 0.02; 0.05 y 1.0 mg.l⁻¹. A los 28 días de cultivo se evaluó el número de callos formados (%), coloración y consistencia. En la diferenciación, se evaluó además, fenolización parcial (%). Posteriormente se realizó la identificación y cuantificación de polifenoles totales en ambas etapas, mediante tamizaje fitoquímico, TLC y espectrometría de absorbancia. Tanto el ácido salicílico como la quitosana promovieron una respuesta de inducción de la callogénesis en los tres clones evaluados. Los callos fueron nodulares, coloración amarillenta y consistencia dura y se desarrollaron a partir de la base del explante. Se obtuvo una mejor respuesta en la formación de callos potencialmente embriogénicos, en el clon UF-613 (90%) con ácido salicílico (1.0 mg.l⁻¹) y quitosana (0.02 mg.l⁻¹). Se logró la identificación de flavonoides, pirocatecatecoles, fenol y ácidos tánicos en muestras seleccionadas en ambas etapas. Los mayores porcentajes de polifenoles se obtuvieron en

etapa de diferenciación: clon UF-613 (5.235 %) con el empleo de ácido salicílico; clon UF-650 con un 4.265% de polifenoles con 0.10 mg.l⁻¹ en ambos elicitores y Pound-7 con quitosana (4.008 %) y ácido salicílico (3.913 %). La respuesta biológica frente al ácido salicílico en los tres clones fue superior a los obtenidos con el empleo de quitosana.

Effect of the addition of salicylic acid and quitosana at different concentrations in the callogenesis and differentiation of three clones of *Theobroma cacao*

There are still few studies in *Theobroma cacao* concerning identification and production of secondary metabolites of interest and the relations of the latest with morphological variables within *in vitro* culture. This work was realized with the objective to evaluate the effect of elicitors in callus formation of *Theobroma cacao* clones UF-613, UF-650 y Pound- 7. To the culture medium for callus formation and cellular differentiation of cocoa was added chitosan or salicylic acid at concentrations of: 0.02, 0.05 y 1.0 mg.l⁻¹. After 28 days of culture the number of formed callus (%), colour and consistency was evaluated. In the differentiation was also evaluated partial phenolization (%). The identification and quantification of the total polyphenols in both stages was realized, by means of phytochemical sieve, TLC and absorbance spectrometry. The salicylic acid as well as the chitosan promoted a response the induction of the callus genesis in the three evaluated clones. The callus were nodular, yellowish coloured and of hard consistency and developed from the base of the explants. A better response in the formation of potentially embryogenic callus was found in the clone UF-613 (90%) with salicylic acid (1.0 mg.l⁻¹) and quitosan (0.02 mg.l⁻¹). The identification of flavonoids, pirocatechols, phenol and tannic acid in samples selected from both stages were achieved. The better values for polyphenols were obtained in the differentiation stage: clone Uf-613 (5.235%) with the use of salicylic acid; clone UF-650 with a 4.265% of polyphenols with 0.10mg.l⁻¹ in both elicitors and Pound-7 with quitosana (4.008 %) with 3.913% of salicylic acid. The biological response of the three clones with the salicylic acid was superior to those obtained with the use of quitosana.

Inducción de embriogénesis somática en hipocótilos del híbrido costarricense de papaya (*Carica papaya* L.) 'Pococi'

Neiva Sánchez-Chiang^{1,2*}, Víctor M. Jiménez¹

¹Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS). 2 060 San Pedro, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. *e-mail: neiva.sanchez@ucr.ac.cr

²Centro para Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC). 2 060 San Pedro, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica

La papaya (*Carica papaya* L.) es muy apetecida para su consumo fresco e industrialización. La Universidad de Costa Rica tiene un programa para la selección de materiales promisorios y el mejoramiento genético de esta planta. El primer producto comercial de ese programa es el híbrido 'Pococi'. Este híbrido produce 50% plantas hermafroditas y 50% femeninas, siendo los frutos de las primeras los preferidos por su forma y el tamaño de su cavidad interna. Sin embargo, las plantas no se pueden seleccionar en el campo sino hasta que formen la primera flor, varios meses después de la siembra, por lo que los agricultores deben sembrar hasta cuatro plántulas por punto, para aumentar la posibilidad de tener al menos una planta hermafrodita. La embriogénesis somática *in vitro*, una alternativa para la propagación clonal de plantas, ha sido realizada con éxito en diferentes genotipos de esta especie, incluyendo varios materiales hawaianos. Sin embargo, no se conocen trabajos exitosos en genotipos centroamericanos de papaya. Para desarrollar un protocolo para propagar clonalmente plantas hermafroditas del híbrido 'Pococi' por medio de embriogénesis somática se realizó el cultivo de embriones cigóticos y secciones de hipocótilos en medio de cultivo compuesto por la mitad de las sales minerales y la concentración normal de las vitaminas de Murashige y Skoog, con varias concentraciones de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y 3% de sacarosa. El cultivo de embriones cigóticos en medio de cultivo con 2 mg.l⁻¹ de 2,4-D produjo la mayor cantidad de embriones somáticos en menor tiempo (ocho semanas de cultivo). Por su parte, las secciones de hipocótilo formaron menos embriones somáticos y tardaron más tiempo en hacerlo (12 semanas de cultivo). En ambos casos, se logró la formación de plántulas. El carácter hermafrodita de las mismas se confirmó en geles de agarosa, al detectar secuencias específicas para plantas hermafroditas o masculinas.

Induction of somatic embryogenesis in hypocotyls of Costa Rican hybrid papaya (*Carica papaya* L.) 'Pococi'

Papaya (*Carica papaya* L.) is highly appreciated for fresh consumption and industrialization. The University of Costa Rica has a program for selection and breeding in this species. The first commercial product of this program was the 'Pococi' hybrid. It produces 50% hermaphrodite and 50% female plants, being the former preferred because of the shape of the fruits and the size of the internal cavity. However, plants cannot be selected at the field until the first flower forms, several months after planting, so farmers must plant up to four seedlings per sowing spot to increase the possibility of

having at least one hermaphrodite plant. *In vitro* somatic embryogenesis, an option to clonally propagate plants, has been successfully conducted in some papaya genotypes, including several Hawaiian ones. However, no appropriate protocols have been reported for Central American papaya genotypes. In order to develop a suitable protocol for clonal propagation of 'Pococi' hermaphrodite plants by somatic embryogenesis, zygotic embryos and hypocotyl sections were cultured on Murashige and Skoog mineral salts and vitamins, supplemented with several concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 3% sucrose. Zygotic embryos cultured on medium with 2 mg.l⁻¹ 2,4-D produced the greatest number of somatic embryos in less time (eight weeks of culture). Hypocotyl sections developed fewer somatic embryos and in a longer time period (12 weeks of culture). In both cases, plantlets were obtained and regenerated. The hermaphrodite nature of the regenerated plants was confirmed on agarose gels, by identifying specific sequences for hermaphrodite or male plants.

Inducción de callos a partir de hojas jóvenes e inflorescencias inmaduras en pejíbaye (*Bactris gasipaes*, *Arecaceae*)

María Viñas-Meneses*; Carlos Arce, Eric Guevara, Víctor M. Jiménez

Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS),
Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica.
*e-mail: maria.vinas@ucr.ac.cr

El pejíbaye es una palma nativa de América tropical que se cultiva comercialmente en el trópico húmedo, principalmente en Brasil, Perú, Colombia y Costa Rica. Tanto los frutos como el corazón de la palma (palmito) son de interés. Los primeros tienen diversos usos (como alimento humano y animal, para la elaboración de harinas, la extracción de aceites y para ensilaje), constituyen una fuente alta de energía y nutrientes. El palmito, por otro lado, es importante en el mercado gourmet y representa una fuente de fibra dietética. Si bien se han identificado y seleccionado genotipos con características muy ventajosas, su reproducción clonal por medios convencionales es muy difícil, ya que los hijos basales mueren luego de ser separados de la planta madre. Los protocolos descritos en los pocos estudios publicados sobre cultivo *in vitro* de pejíbaye son poco reproducibles. La mayoría de las palmas son recalcitrantes al cultivo *in vitro* y el pejíbaye presenta, además, una alta diversidad genética que obliga a adaptar los protocolos a los diferentes genotipos. El presente estudio pretende establecer las bases para lograr la multiplicación *in vitro* de variedades promisorias de pejíbaye presentes en Costa Rica. Para ello, se desinfectaron y colocaron

hojas e inflorescencias inmaduras en medios de cultivo con diferentes tipos, combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento y antioxidantes. Con ambos tejidos se logró la desinfección del 100% del material y se establecieron las mejores condiciones para la formación de callo (tipo de antioxidante, tamaño del explante, condición lumínica y tipo, combinación y concentración de reguladores de crecimiento). Los callos provenientes de hojas fueron friables y de coloración blancuzca, en algunos casos translúcidos; mientras que los callos provenientes de inflorescencias tenían apariencia embriogénica con aglomeraciones redondeadas de colores blanco y verde. Como paso a seguir, se pretende aumentar la tasa de crecimiento de los callos generados a partir de la hoja bandera, así como lograr diferenciación de los callos embriogénicos obtenidos a partir de las inflorescencias inmaduras.

Callus induction from young leaves and immature inflorescences in peach palm (*Bactris gasipaes*, *Arecaceae*)

Peach palm is native to tropical America and is commercially produced in the humid tropics, mainly in Brazil, Peru, Colombia and Costa Rica. Both, the fruits and the palm heart (palmito) are of interest. The former have many uses (as food and feed, for production of flour, oil extraction and silage), being a rich source of energy and nutrients. The palm heart, on the other hand, is important for the gourmet market and is a source of dietary fiber. Even though several genotypes with outstanding characteristics have been identified, their clonal reproduction through conventional means has been very hard because the offshoots die after being separated from the mother plant. Protocols described in the few published studies on *in vitro* culture of the peach palm are not repetitive. Palms are very recalcitrant to *in vitro* culture and in peach palm this is even worse, because its high genetic diversity causes that the protocols must be adapted almost for each individual genotype. The present study aims to establish the basis for the *in vitro* propagation of potentially useful varieties of peach palm that grow in Costa Rica. Therefore, leaves and immature inflorescences were disinfected and cultivated on culture media containing different types, combinations and concentrations of plant growth regulators and antioxidants. Disinfection of 100% of the explants and establishment of the best conditions for the induction of callus (type of antioxidant, height of the explants, light condition, and type, combination and concentration of growth regulators) were achieved for both genotypes. The calluses from leaves were friable and whitish in colour, sometimes translucent, while callus from inflorescences had embryogenic

appearance with rounded clusters of white and green colour. Further work aims at increasing the growth rate of flag leaf-derived callus and at inducing differentiation of the embryogenic callus obtained from immature inflorescences.

Histología de callos inducidos a partir de hojas y cotiledones de *Pouteria lucuma* (R. & P.), utilizando combinaciones de reguladores de crecimiento y thidiazuron

Julio Chico-Ruiz*, Shirley Valderrama-Alfaro, Paola Tejada-Castillo, Luis Collantes Silva

Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Av. Juan Pablo II s/n. San Andrés. Trujillo. PERU.
e-mail: jchico22@gmail.com

El 'lúcumo', *Pouteria lucuma* (R&P), obtenido de semillas, muestran variabilidad en la planta como en el fruto además la producción se inicia al cuarto año en plantas injertadas y a los 15 años en plantas provenientes de semillas. Estos problemas agronómicos motivaron la necesidad de aplicar las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para lograr una propagación rápida, masiva y uniforme genéticamente. Para ello, se evaluaron protocolos para obtener plántulas en laboratorio a partir de hojas y cotiledones. Para ambos explantes se utilizó el medio de cultivo basal completo de Murashige y Skoog (MS) el cual además tenía sacarosa (3%), fitagel (0.5%) y pH 5.5. Las observaciones histológicas se hicieron con la técnica de hematoxilina-eosina utilizando parafina para cortes en micrótopo. Para la variedad 'seda', se utilizaron cotiledones maduros e inmaduros y los tratamientos fueron combinaciones de ANA, 2,4-D y BAP. La mayor formación de embriones globulares fue con tratamiento de 5 ppm de BAP y 3 ppm de 2,4-D para cotiledones inmaduros y el tratamiento 5 ppm de BAP y 5 ppm 2,4-D para cotiledones maduros. En el trabajo con hojas se utilizó 2,4-D a concentración de 4.52 µM para inducir callos. Después de 30 días los callos se llevaron a las diferentes combinaciones de BAP, TDZ, ANA y 2,4-D. Se observó nuevo tejido meristemático en callos de var. 'palo' a los 80 días de cultivo y células embriogénicas en callos verdes a los 120 días (ANA 1.07 µM y TDZ 4.54 µM) ocurriendo así organogénesis y embriogénesis en el mismo explante.

Histology of callus induced from leaves and cotyledons *Pouteria lucuma* (R. & P.), using combinations of growth regulators and thidiazuron

The 'lúcumo' *Pouteria lucuma* (R & P), grown from seed, show variability in the plant as well as in fruit production

begins the fourth year in grafted plants and 15 in plants from seeds. These agronomic problems prompted the need to apply the techniques of *in vitro* culture of plant tissues to achieve a rapid spread, massive, genetically uniform. To this end, protocols were assessed for seedlings in the laboratory from the leaves and cotyledons. Explants were used for both the complete basal medium Murashige and Skoog (MS) which also had sucrose (3%), phytigel (0.5%) and pH 5.5. Histological technique was done with hematoxylin-eosin using paraffin microtome. For var. 'seda' were used mature and immature cotyledons and treatments were combinations of NAA, 2,4-D and BAP. The increased formation of globular embryos was treated with 5 ppm of BAP and 3 ppm 2,4-D for the treatment of immature cotyledons and 5 ppm and 5 ppm BAP 2,4-D to mature cotyledons. At work with leaves 2,4-D was used at a concentration of 4.52 µM for inducing callus. After 30 days the calluses were carried different combinations of BAP, TDZ, NAA and 2,4-D. New meristematic tissue was observed in callus of var. 'palo' to the 80 days of age and embryogenic cells in green callus var. 'palo' to the 120 days of age (ANA 1.07 µM and 4.54 µM TDZ) and organogenesis and embryogenesis occurring in the same explant.

Efecto de la luz solar sobre el potencial embriogénico de genotipos cubanos de *Glycine max* (L.) Merrill

Teresa del Socorro Blanco Tirado^{1,2*}, I. Bermúdez-Caraballos², N. Veitia², D. Torres², L.R. García², C. Romero²

¹Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Instituto Universitario de la Paz, Carretera a Bucaramanga km 15. Barrancabermeja, Colombia. e-mail: sanico1@hotmail.com

²Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara, Villa Clara. Cuba, CP 54 830.

A nivel mundial, la embriogénesis somática de soya es una herramienta indispensable en los protocolos de transformación genética. Sin embargo, la sobreexposición de los explantes a las concentraciones del ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) durante las fases de formación y proliferación, es una de las causas de la alta frecuencia de embriones anormales y en consecuencia de la baja tasa de conversión en esta especie. En el cultivo *in vitro*, la luz es uno de los factores que puede afectar el tiempo de inducción y desarrollo de los embriones somáticos y, hasta el momento, para este propósito se emplean lámparas fluorescentes como fuente de iluminación pero no se ha considerado la luz solar. Por tanto, para disminuir el tiempo de exposición de los explantes al 2,4-D, en este trabajo se evaluó el efecto de la luz solar sobre el potencial embriogénico

de las variedades Cubasoy23, Incasoy24 e Incasoy27. La oscuridad constante se empleó como tratamiento control. Cotiledones inmaduros entre 4-5 mm de longitud fueron colocados con el lado abaxial sobre medio de cultivo (MSD40) e incubados en luz solar y oscuridad constante. A los 22 y 30 días de establecidos, se evaluó el potencial embriogénico en términos de la frecuencia de la embriogénesis somática (número de explantes que formaron embriones somáticos/número de explantes cultivados*100) y el número promedio de embriones somáticos por explante. Como resultados se encontró que la luz solar tuvo un efecto significativo sobre la cantidad y frecuencia de formación de embriones somáticos en las variedades estudiadas pero el mayor efecto sobre estos dos parámetros se debió al genotipo. De igual manera, el genotipo es determinante al comparar los resultados del potencial embriogénico en las dos fechas de evaluación, concluyendo que la luz solar puede acelerar el proceso embriogénico únicamente en genotipos con alta capacidad embriogénica.

Effect of sunlight on embryogenic potential of *Glycine max* (L.) Merrill cuban genotypes

Soybean somatic embryogenesis is an essential tool for genetic transformation protocols worldwide. However, the overexposure of explants to growth regulator concentrations, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), during formation and proliferation stages constitute one cause of the high frequency of abnormal embryos and thus the low rate conversion in this species. Light is one factor that may affect the *in vitro* culture time of induction and development of somatic embryos. That is why fluorescent lamps are used as light source while sunlight has not been considered yet. Therefore, to decrease the exposition time of explants to 2,4-D, the effects of the sunlight on the embryogenic potential of cultivars Cubasoy23, Incasoy 24 and Incasoy 27 were evaluated. Constant darkness was used as control treatment. Immature cotyledons 4-5 mm length were placed with the abaxial side on culture medium MSD40 and incubated under sunlight and constant darkness. After 22 and 30 days of establishment, the embryogenic potential was evaluated in terms of the frequency of somatic embryogenesis (number of explants that formed somatic embryos / number of explants cultivated * 100) and the average number of somatic embryos per explant. As a result, sunlight had a significant effect on the amount and frequency of somatic embryo formation in the studied varieties, but the greatest effect on these parameters was due to

genotype. Similarly, the genotype is crucial to compare the results of embryogenic potential in the two dates of evaluation. Concluding, sunlight can accelerate the embryogenic process only for genotypes with high embryogenic capacity.

Diferencias morfológicas y fisiológicas en respuesta al 6-BAP de brotes de *Tectona grandis* L. cultivados en sistemas de inmersión temporal

Elisa Quiala¹, Mónica Meijón², María de Jesús Cañal², Roberto Rodríguez², Maité Chávez¹, Luis Valledor², Manuel de Fera¹ y Raúl Barbón¹

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

²Area de Fisiología Vegetal, Dpto. Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo, C/Catedrático Rodrigo Uría s/n, E-33071, Oviedo, Asturias, España.

Los sistemas semi-automatizados basados en la inmersión temporal (SIT) han permitido mejorar la calidad de las plantas y la eficiencia de la aclimatación en diferentes especies. Sin embargo, es esencial investigar el efecto de la inmersión temporal en la fisiología de las plantas obtenidas para optimizar las condiciones de cultivo en estos biorreactores simples. Aunque se ha descrito el efecto positivo de los SIT para varias especies, existen pocos datos de su aplicación en especies forestales y hay disponible aún menos información acerca de la fisiología de las plantas forestales producidas en estos sistemas semi-automatizados cuando se varía la concentración exógena de citoquinina. Este trabajo tuvo como objetivo investigar el efecto de 6-bencilaminopurina (6-BAP) sobre brotes de *Tectona grandis* L. cultivados en SIT. Como resultado se obtuvo una alta tasa de multiplicación en los tratamientos con 6-BAP y se alcanzó un 100% de plantas con raíces en el tratamiento sin regulador del crecimiento. Sin embargo, el contenido de agua de los brotes se incrementó proporcionalmente con la concentración de 6-BAP. El análisis morfométrico mediante microscopía electrónica de barrido y la tinción con floroglucinol-HCl revelaron que el incremento de la concentración de 6-BAP estuvo acompañado por un incremento del tamaño y el área de todo el complejo estomático y por una disminución gradual de la deposición de lignina en las paredes de las células vasculares. Los SIT mejoraron tanto la proliferación como el enraizamiento de los brotes de teca y el estudio morfo-fisiológico realizado constituye un aporte al conocimiento del efecto del 6-BAP sobre plantas forestales cultivadas en estos sistemas semi-automatizados.

Differences in morphological and physiological responses to benzylaminopurine in *Tectona grandis* L. shoots cultured in temporary immersion system

Semiautomatic system based in temporary immersion conditions (TIS) has been improving plants quality and make acclimatization safer for different species. However, more research on the effects of temporary immersion on physiology is essential to optimize culture conditions in these simplified bioreactors. Although TIS positive effect has been described for different species there are a few reports on forestry micropropagation and even less information is available about the physiological characteristics of *in vitro* produced plants of forestry in this semiautomatic system when the exogenous cytokinin concentration is varieties. The aim of this research work was to investigate the effect of BAP in the morphological and physiological response of *in vitro* *Tectona grandis* L. shoots cultured in TIS. *In vitro* *Tectona grandis* L. shoots cultured in TIS with BAP exhibited a high multiplication rate and a 100% of plants with root were observed in the treatment free-regulator of growth. However, shoots water content increase with the concentration of BAP, proportionally. The morphometric analysis by scanning microscopy revealed that the increment of BAP dose was accompanied by an increase in sizes and area of the whole stomatal complex. Phloroglucinol-HCl staining showed that gradual increment of BAP affected the deposition of lignin in the vascular cells and the level of phenolics. TIS were successful applied for teak propagation and improve both shoot proliferation and rooting. The morpho-physiological study done in this research work constitutes a contribution to the knowledge of the effect of BAP on forest plants cultivated in these semi-automated systems.

Efecto de las dimensiones y la orientación del explante en la embriogénesis somática de *Glycine max* (L.) variedad Incasoy-35

Jorge Pérez-Pérez^{1,2}, LR García², N. Veitía², I. Bermúdez-Carballo², R. Collado²

¹Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Carretera vía Manzanillo, km 17.5, Peralejo, Bayamo, Granma. CP 85 100. e-mail: jperez@udg.co.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. CP 54 830

La soya (*Glycine max*, L.), constituye uno de los 10 cultivos de mayor importancia económica en el mundo, debido a su alto contenido en proteínas, aceite

vegetal, carbohidratos, vitaminas y metabolitos secundarios. Las técnicas de cultivo de tejidos constituyen un paso importante en el establecimiento de programas de mejoramiento genético mediante Ingeniería genética. Sin embargo, las metodologías establecidas a nivel internacional para la regeneración vía embriogénesis somática presentan baja eficiencia y son específicas para determinados genotipos, no existiendo para variedades cubanas. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las dimensiones del explante y su orientación en el medio de cultivo en la embriogénesis somática en la variedad cubana de soya INCASoy-35. Para ello, se utilizaron cotiledones inmaduros (2.0 a 4.0mm), colocados en posición adaxial en medio de cultivo de formación de embriones somáticos con 40mg.l⁻¹ del ácido 2,4-diclorofenoxiacético en condiciones de luz artificial. El 83% de los explantes formaron embriones somáticos en el lado adaxial de cotiledones de tres y cuatro milímetros con aproximadamente ocho embriones somáticos por cotiledón. De un total de 20 embriones somáticos, el 60% lograron una germinación completa, de ellos, el 8.3% logró convertir a planta y fructificar.

Effect of the explant size and orientation in somatic embryogenesis of *Glycine max* (L.) variety Incasoy-35

Soybeans (*Glycine max*, L.), is one of the 10 most economically important crops in the world due to its high content of protein, vegetable oil, carbohydrates, vitamins and secondary metabolites. The tissue culture techniques are a valuable tool for establishing genetic improvement programs through genetic engineering. However, internationally established methodologies for regeneration via somatic embryogenesis have low efficiency and are specific to certain genotypes, not existing for Cuban varieties. For this reason, the objective of this study was to evaluate the effect of explant size and orientation in somatic embryogenesis of soybean variety INCASoy-35. Immature cotyledons were taken (2.0 to 4.0mm), on position adaxial in culture medium with 40mg.l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in artificial light conditions. It was possible to form direct somatic embryogenesis in all treatments. The 83% of the explants formed somatic embryos in adaxial side of cotyledons of three to four millimeters with about eight embryos per cotyledon. Of a total of 20 embryos, 60% achieved complete germination, of these, 8.3% achieving convert plant and fruit.

Regeneración de plántulas de maní (*Arachis hypogaea*, L) a partir de yemas de semillas germinadas *in vitro*

Jaime Ramiro Hidrobo Luna*, Odalys Llorente, Ma. Del Carmen López. e-mail: jaime@inifat.co.cu

Grupo de Recursos Fitogenéticos y Mejoramiento Vegetal, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), Santiago de las Vegas, Ciudad Habana, Cuba.

El objetivo de este trabajo fue la obtención de un protocolo de regeneración y multiplicación de plántulas de maní (*Arachis hypogaea* L.), a partir de explantes provenientes de yemas de semillas germinadas *in vitro* de dos variedades de este grano: 'Cascajal Rosado' (rojo) y 'Villa Clara' (crema), para ser utilizado en programas de fitomejoramiento y conservación de germoplasma. La variedad que mejor se comportó fue la 'Villa Clara'. En primera instancia se habían probado otras fuentes de explante a partir de las hojas primarias, peciolos y nudos de plantas inmaduras de maní, tomándose para este trabajo las yemas que germinaron de las semillas a los 8 días de ser colocadas en las cápsulas por brindar los mejores resultados. Se pusieron 200 semillas de cada variedad en cápsulas Petri, sobre papel filtro humedecido cada tres días con agua destilada. Se produjo una germinación de hasta un 100% de las yemas que posteriormente fueron colocadas en tres diferentes medios de cultivo de los cuales, el que mejor comportamiento tuvo fue aquel que tenía en su composición además de las sales de Murashige y Skoog, 0.33 mg.l⁻¹ de ANA + 0.33 mg.l⁻¹ de BAP + 0.5 mg.l⁻¹ *Azotobacter*, se obtuvo la mayor regeneración de plántulas de hasta un 80%, estas alcanzaron una altura superior a los 20cm, con hojas redondeadas y bien formadas, coloración verde clara y el 20% de ellas poseían abundantes, largas, delgadas y blanquecinas raíces. En este medio de cultivo permanecieron las yemas por un tiempo de 28 días. Posteriormente, las plántulas obtenidas fueron utilizadas para su multiplicación *in vitro*. Seguidamente se seleccionaron las futuras plantas madre, a partir de las cuales se continuará los siguientes experimentos objetivos de este trabajo.

Inorganic nutrient manipulation for improvement *in vitro* plant regeneration in J-104 rice cultivar

Maylin Pérez Bernal*, Magalis Delgado Rigo and Carlos Alberto Hernández Díaz

Research Department. Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Sancti Spiritus. P.O.Box 83, PC 60 200, Sancti Spiritus, Cuba. *e-mail: maylin.perez@cigb.edu.cu

The regeneration potential of plants is known to be influenced by extrinsic supply of nutrients in the tissue culture media. The experimental determination of optimal nutrient levels is complex. Even within a species and cultivars, there may be different nutrients requirements during plant regeneration. Recent reports have described an effective and versatile

regeneration medium applicable to some Cuban rice varieties (IACuba-17, IACuba-19, IACuba-28 and Reforma). But, at present, J-104 is the most important commercial cultivar and the *in vitro* regeneration of plants has been slow and difficult. For that reason, the purpose of this study is the optimization of levels of some inorganic nutrients, during regeneration stage of J-104 rice calli, so as to increase the plant regeneration efficiency. There were proved six inorganic salts (MnSO₄, ZnSO₄, KH₂PO₄, CoCl₂, CuSO₄ and H₃BO₃) in the regeneration medium reported for Cuban rice cultivars. Embryogenic calli were used as explants. The regeneration process took place into 45 days and the shoots were isolated carefully from the calli. The regeneration efficiency was expressed as the number of shoots germinated per callus. Significant improvement in shoot germination was observed with the addition of salts compared with control without them, excepting the H₃BO₃ which caused slow development of embryogenic structures, retarding the shoot formation. The use of 2.5 mg.l⁻¹ of CuSO₄ and 1.25 mg.l⁻¹ of CoCl₂ had the main stimulatory effect on regeneration efficiency. Synergistic effect was observed for both salts and then the regeneration efficiency increased 2.5 times compared with the control. These results allow us to have a specific and efficient regeneration medium for J-104, which must be applied to the genetic transformation of this important rice variety. Therefore, these results revealed the genotype-effect on inorganic nutrient requirements during *in vitro* rice regeneration.

Empleo de nutrientes inorgánicos para optimizar la regeneración *in vitro* de la variedad de arroz J-104

La regeneración *in vitro* de plantas es afectada directamente por el suministro de nutrientes inorgánicos a través del medio de cultivo. La determinación de los niveles óptimos de estos nutrientes puede ser compleja, si se tiene en cuenta que cada especie o cultivar tienen sus requerimientos específicos. Informes recientes han descrito un medio de cultivo de regeneración eficiente y versátil para diferentes variedades cubanas de arroz (IACuba-17, IACuba-19, IACuba-28 y Reforma), pero no resulta efectivo para J-104, que es la principal variedad comercial del país y está sujeta a un proceso de transformación genética. Mediante el manejo de los nutrientes inorgánicos del medio de cultivo podría mejorarse la calidad su regeneración. El objetivo de este trabajo fue ensayar el efecto de varios tratamientos con sales inorgánicas (MnSO₄, ZnSO₄, KH₂PO₄, CoCl₂, CuSO₄ y H₃BO₃) sobre la eficiencia de la regeneración de brotes a partir de callos embriogénicos de J-104. Se utilizó como medio de cultivo de partida el referido

para la regeneración de las variedades cubanas. La eficiencia de regeneración se expresó como el número de brotes germinados por callo. Un incremento significativo en este parámetro fue observado en todos los tratamientos respecto al control, exceptuando el H_3BO_3 que provocó un retardo en el crecimiento de las estructuras embriogénicas. Con 2.5, 5 $mg.l^{-1}$ de $CuSO_4$ y 1.25 $mg.l^{-1}$ de $CoCl_2$ se logró la mayor producción de brotes por callo, notándose, además un efecto sinérgico de ambas sales, que aumentó 2.5 veces la eficiencia de regeneración respecto al control. Estos resultados permiten disponer de un medio de cultivo de regeneración eficiente para la variedad J-104, lo cual es indispensable para establecer un protocolo de transformación genética. Además, es una evidencia del efecto del genotipo en los requerimientos de nutrientes inorgánicos durante la regeneración *in vitro* de arroz.

Indicadores bioquímicos y aspectos de la morfología en genotipos de café tolerantes a la sequía, conservados *in vitro*

María Esther González^{1*}, Yanelis Castilla¹, Argelys Kessel¹, Yuniet Hernández¹ y Ramón Ramos²

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Gaveta Postal 1. San José de las Lajas. La Habana, Cuba. CP 12 700
e-mail: esther@inca.edu.cu

²Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao (ECICC), Cuba.

El café es un producto comercial de gran importancia a nivel mundial, es el cultivo permanente más extendido en regiones tropicales. Su exportación constituye apreciable fuente de ingresos en divisas, resultando necesario su incremento. El estrés hídrico eleva en 45% el índice de granos malformados, reduce significativamente el crecimiento vegetativo y la producción, afectando los rendimientos. Medidas alternativas como prácticas de conservación de humedad del suelo o riego pudieran contribuir a controlar afectaciones por déficit hídrico, pero elevarían los costos. Por ello, el interés de desarrollar programas de mejoramiento genético para la obtención de variedades resistentes a sequía y portadoras de propiedades importantes. Conociendo las ventajas que los métodos biotecnológicos ofrecen, se desarrolló este trabajo relacionado con la inducción de callos a partir de explantes foliares de *Coffea canephora* variedad Robusta, genotipos C-47, C-183 y C-191 resistentes a sequía, y con el estudio de diferentes reguladores, su curva de crecimiento y análisis bioquímicos. Se comprueba la necesidad de combinar 2,4-D y kinetina para inducir callogénesis. Los patrones de crecimiento de callos mostraron comportamiento sigmoidal con cinco fases: Lag, exponencial, crecimiento lineal,

desaceleración y estacionaria, mostrando patrón similar en los genotipos, variando solo en fase Lag, donde C-183 y C-191 mostraron crecimiento más lento que C-47. Las proteínas totales presentaron incremento hasta 70 días, siendo mayores en C-47. A partir de 70 días, se observó reducción de estos valores. Los patrones proteicos de la curva de crecimiento de callos reflejaron polipéptidos entre 27 y 71 kDa en el período de crecimiento. El máximo valor de azúcares reductores se observó el día de inoculación de los explantes, se observó reducción significativa de 0 a 18 días, hasta alcanzar mínimo valor a los 90 días. El análisis morfológico mostró el potencial embriogénico de las células, permitiendo diferenciar las fases de la callogénesis. Por las propiedades favorables que estos genotipos poseen, los resultados son de interés en el proceso de su caracterización.

Regeneración por embriogénesis somática del clon de yuca 'INIVIT Y 93-4'

Víctor R. Medero Vega*, Aymé Rayas, Jorge López, Manuel Cabrera, Milagros Basail, Germán Rodríguez, Marilyn Martínez, Marlenys Torres, Diasnery Arce, Carmen C. Pons

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

En el Programa de Mejoramiento Genético del cultivo de la yuca en Cuba se han obtenido varios clones comerciales y actualmente se encuentra en fase de generalización el genotipo promisorio 'INIVIT Y 93-4', que reúne las características morfológicas y el grado de adaptabilidad necesario para mitigar los efectos de los huracanes. Sin embargo, en algunas regiones del país se afecta su calidad culinaria debido a un ligero sabor amargo provocado por el alto contenido de ácido cianhídrico. En el laboratorio de Biotecnología del INIVIT se ha trabajado en la regeneración de plantas de yuca por embriogénesis somática y se ha encontrado una alta dependencia del genotipo a la respuesta embriogénica *in vitro*. El trabajo se realizó con el objetivo de lograr la regeneración vía embriogénesis somática del clon de yuca 'INIVIT Y 93-4', para el mejoramiento genético y la propagación masiva. Se evaluaron como explantes ápices de yemas apicales y axilares de plantas cultivadas *in vitro*. Para la inducción de callos se utilizó el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (MS) con diferentes concentraciones de 2,4-D y para la germinación de los embriones somáticos el medio de cultivo MS con 0.1 $mg.l^{-1}$ de BAP, 0.01 $mg.l^{-1}$ de ANA, 1 $mg.l^{-1}$ de AG_3 y phytigel. La elevada capacidad para la formación de callos con estructuras embriogénicas mostrada por los ápices de yemas axilares de plantas cultivadas *in vitro* de este genotipo (68.9%), constituye un

resultado novedoso y una alternativa eficaz para la regeneración de plantas por esta vía. Además, se logró un 51.7% de formación de callos con estructuras embriogénicas de alta frecuencia y un 63.3% de germinación de los embriones somáticos obtenidos.

Regeneration by somatic embryogenesis of cassava clone 'INIVIT Y 93-4'

In the Cassava Breeding Program in Cuba have obtained several commercial clones and is been currently carrying out the phase of generalization the promising genotype 'INIVIT Y 93-4', which brings together the morphological characteristics and degree of adaptability required for mitigate the effects of hurricanes. However, in some regions of country the culinary quality is affected due to a slightly bitter taste caused by the high content of hydrocyanic acid. The laboratory of Biotechnology at INIVIT has been worked in the cassava plant regeneration by somatic embryogenesis and has been found a high dependence on genotype embryogenic response *in vitro*. The work was carried out with the objective of regeneration via somatic embryogenesis of clone 'INIVIT Y 93-4', for breeding and mass propagation. Apices of apical and axillary buds of plants grown *in vitro* were evaluated as explants. Murashige and Skoog (MS) culture medium supplemented with different concentrations of 2,4-D was used for induction of callus and culture medium MS supplemented with 0.1 mg.l⁻¹ BAP, 0.01 mg.l⁻¹ NAA, 1 mg.l⁻¹ GA₃ and 'Phytigel' for somatic embryo germination. The high capacity for the formation of callus with embryogenic structures shown by the apices of axillary buds of *in vitro* plants of this genotype (68.9%), is a novel result and effective alternative for the regeneration of plants in this way. In addition, a 51.7% formation of embryogenic callus with high frequency structures and a 63.3% germination of somatic embryos obtained were achieved.

Enraizamiento *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT®). Análisis histológico de la formación de raíces

Mariela Cid Ruíz, Lelurlys Nápoles Borrero, Danilo Pina Morgado, Maritza Escalona Morgado

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

El cultivo *in vitro* de la caña de azúcar mediante la inmersión temporal permite una mayor tasa de

multiplicación y un aumento de la calidad morfológica de los brotes lo cual se traduce en una mayor supervivencia de las plantas en la aclimatización. Sin embargo, la principal insuficiencia de este protocolo radica en que los brotes elongados después de la multiplicación en el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT®) necesitan individualizarse y colocarse en frascos del cultivo convencional en medio líquido para el proceso de enraizamiento *in vitro*, lo que afecta la eficiencia económica así como su calidad fisiológica. Se evaluó la influencia de las formas de cultivo (líquido convencional y BIT®) y el tipo explante (brotes individuales y agregados de brotes) durante la fase de enraizamiento *in vitro* y su efecto en la supervivencia durante la aclimatización. Se realizó, además, un estudio histológico de la formación de raíces. Se demostró que los brotes en los agregados emitieron raíces funcionales (6.6 raíces/brote) lográndose un alto porcentaje de supervivencia (90%) sin diferencias significativas de los brotes individuales. El análisis histológico demostró que las raíces en los brotes que enraizaron de forma individual así como los que enraizaron en agregados presentaron el mismo patrón de origen celular a partir de la continuidad del crecimiento de las células del parénquima perivascular. Los brotes que enraizaron en agregados en el BIT® a diferencia de los individuales, presentaron características estructurales bien definidas y gran desarrollo de la caliptra.

***In vitro* rooting of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) in Temporary Immersion Bioreactors. Histology of roots formation**

In vitro culture of sugarcane by Temporary Immersion Bioreactors (BIT) permits increases in multiplication rates and in the morphological quality. The latter allows to achieve higher percentages of plantlets survival during acclimatization phase. However, so far the *in vitro* rooting of elongated shoots can only be developed in liquid culture medium through conventional techniques. Therefore, the physiology of explants and the efficiency of the entire process is affected. The aim of this study was to evaluate the influence of the explant type (individual and aggregates of shoots) and culture system (conventional, BIT). Results obtained in this work showed the induction of functional roots (6.6 roots/shoot) in aggregates with no significant differences when compare to individual shoots. The histological analysis demonstrated the same pattern of cellular origin from perivascular parenchyma in both, aggregates and individual shoots. Rooted shoots coming from

aggregates showed more defined structural characteristics and higher development of caliptra, with respect to individual shoots.

Establishment of embryogenic cell suspension culture in cassava (*Manihot esculenta* C.)

Iris Capote¹, Mayra Osorio², Maritza Escalona, Evelio Báez

¹Laboratorio de Células y Cultivo de Tejidos, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, CP. 69 450, Cuba. e-mail: icapote@bioplasmas.cu

²Instituto de Estudios de Avanzada, (IDEA) Venezuela.

The economical relevant and usability of *Manihot esculenta*, Crantz culture had been increased recently. The organogenesis process has some inconvenient due to low multiplication rate and manipulation operations. The somatic embryogenesis system could avoid these inconvenient. The experimentation was carried out with plantlets from two Venezuela's clones (76 y 92). For embryogenic callus formation was used immature leaves at 8 days age. Different concentrations of Picloram and BA were evaluated. Callus formation was in media culture with 50 μM Picloram and the further subculture every 30 days in 4.44 μM of BA permit the somatic embryos formation. The best response on embryos quality was observed at 30 days in clone 76. The establishment of embryogenic cell suspension culture directly of the explant was achieved from immature leaves at 8 days with 50 μM Picloram. The embryos formation in the liquid medium culture was observed at 20 days using MS medium without plant growth regulator.

Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de yuca (*Manihot esculenta* C.)

El cultivo de *Manihot esculenta* C. ha incrementado su importancia y utilización de forma ascendente. El proceso de propagación vía organogénesis presenta como limitaciones un elevado número de operaciones manuales y bajos coeficientes de multiplicación que repercuten en los costos de producción; mientras que la puesta a punto de un sistema de regeneración por embriogénesis somática disminuye estas dificultades. Con el objetivo de establecer cultivos embriogénicos se utilizaron dos clones de yuca venezolanos (76 y 92). Como explante se emplearon las hojas inmaduras de plántulas *in vitro* de 8 días de cultivo. En la formación de callo embriogénico se evaluaron diferentes concentraciones de Picloram así como BA en la diferenciación de los embriones somáticos. El Picloram 50 μM y el posterior subcultivo a 4.44 μM de BA logró la formación de embriones somáticos en el clon 76 a los 20 días de cultivo con una alta eficiencia. El establecimiento de suspensiones

celulares embriogénicas a partir de hojas inmaduras *in vitro* directamente en medio de cultivo líquido se logró con 50 μM Picloram. La diferenciación de los embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo se alcanzó a los 20 días en medio MS sin reguladores del crecimiento.

Influencia de la sacarosa en las características morfofisiológicas de plantas *in vitro* de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea*

Maité Chávez*, Manuel de Fera, Raúl Barbón, Mariana La O, Marta Pérez, Felipe Jiménez-Terry, Elisa Quiala, Daniel Agramonte

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: maite@ibp.co.cu

El género *Pinus* ha sido clasificado como recalcitrante en relación con la formación de raíces *in vitro*. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la influencia de la sacarosa en las características morfofisiológicas de plantas cultivadas *in vitro* *Pinus caribaea* var. *caribaea*. Se evaluó además, la respuesta de estas plantas en la fase de enraizamiento con diferentes concentraciones de AIB y diferentes concentraciones de nutrientes inorgánicos (50 y 100%). Los mejores resultados se alcanzaron con 50 y 60 g.l⁻¹ de sacarosa, con una menor formación de nuevos brotes y mayores porcentajes de materia seca. Con 60 g.l⁻¹ de sacarosa, se observaron acículas más diferenciadas, muy similares a las desarrolladas en condiciones naturales, las plantas presentaron un color verde más intenso y el olor característico de los aceites esenciales que se percibe al macerar tejidos de árboles adultos. En la fase de enraizamiento, independientemente de la concentración de sacarosa (30-60 g.l⁻¹) que dio origen a las plantas *in vitro*, al incrementarse la concentración de AIB, se incrementó la longitud de las plantas. Para el porcentaje de materia seca, la respuesta fue diferente, pues en las plantas obtenidas con 30 g.l⁻¹ de sacarosa, cuando se incrementó la concentración de AIB disminuyó el porcentaje de materia seca, mientras que, en las plantas obtenidas con 60 g.l⁻¹ ocurrió lo contrario. A las plantas desarrolladas con 60 g.l⁻¹ de sacarosa, y colocadas después en medio de cultivo de enraizamiento con reducción del 50% de los nutrientes inorgánicos, se les cuantificó el mayor porcentaje de residuos de la pared celular (47.95%). Todo lo anterior, evidencia la importancia que tiene estudiar el efecto de la sacarosa en el medio de cultivo en función de obtener plantas más preparadas para lograr el enraizamiento *in vitro*.

Influence of sucrose on the morpho-physiological characteristics of *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* in vitro plants

The genus *Pinus* has been classified as recalcitrant in relation to *in vitro* root formation. This work was carried out to evaluate the influence of sucrose on the morpho-physiological characteristics of *Pinus caribaea* var. *caribaea* in vitro plants. Once in the rooting phase, the effect of different IBA as well as inorganic nutrients concentrations was also evaluated. Best results were obtained when 50 and 60 g.l⁻¹ of sucrose was used leading to a less formation of new shoots and higher percentages of dry matter. With 60 g.l⁻¹ of sucrose, more differentiated needles were obtained, very similar to those observed in natural conditions. In the rooting phase, regardless of the concentration of sucrose (30-60 g.l⁻¹) which gave rise to *in vitro* plants, with increasing concentration of IBA increased the length of the plants. For the percentage of dry matter, plants placed in 30 g.l⁻¹ of sucrose showed a decrement in dry matter when the IBA concentrations increased while the opposite was observed in plants placed in 60 g.l⁻¹ of sucrose. Plantlets coming from a subculture in 60 g.l⁻¹ of sucrose transferred to a rooting culture medium with a 50% reduction of inorganic nutrients showed the highest percentage of cell wall residues (47.95%). Altogether our results pinpoint the importance of using sucrose as an additive during pre-rooting phases to improve *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* in vitro root formation.

Efecto del tipo de explante en la formación de brotes en *Phaseolus vulgaris* L. var. CIAP 7247

N. Veitía^{1*}, R. Collado¹, I. Bermúdez-Caraballoso¹, L.R. García¹, D. Torres¹, C. Romero¹, G. Angenon²

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

²Laboratory of Plant Genetics. Vrije Universiteit Brussel. Belgium. e-mail: novisel@ibp.co.cu

La regeneración de plantas mediante organogénesis directa e indirecta en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) presenta dificultades y varía en dependencia del genotipo. Es por ello, que los protocolos que se han descrito son poco repetibles y se concentran en un grupo limitado de variedades. La producción de brotes a partir de callos se restringe a pocos trabajos y está relacionada con el tipo de explante para su formación. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del tipo de explante en la formación de brotes a partir de callos de la variedad

cubana de frijol CIAP 7247 que se formaron en condiciones de luz artificial y oscuridad. Como explantes se empleó el nudo cotiledonal con un cotiledón y el nudo cotiledonal con los dos cotiledones. Estos fueron colocados en el medio de cultivo para la formación y multiplicación de callos. Durante la formación de los callos se mantuvieron 7 días en la oscuridad y luego fueron transferidos a la luz (artificial) durante 14 días y otros fueron mantenidos en la oscuridad durante los 21 días de cultivo, por lo que se establecieron cuatro tratamientos. Los callos formados en cada tratamiento se colocaron en el medio de cultivo para la formación de brotes. Las evaluaciones consistieron en determinar a los 21 días el número de brotes por callo. Los resultados mostraron que el tipo de explante tuvo una mayor influencia en la formación de brotes que las condiciones de cultivo. Los callos formados en el nudo cotiledonal con un solo cotiledón presentaron mayor número de brotes que los formados en el nudo cotiledonal con los dos cotiledones. Los brotes formados se caracterizaron por presentar pequeño tamaño y la presencia de hojas diferenciadas. Se demostró que es posible la formación de brotes de esta especie y para ello es necesario tener en cuenta el tipo de explante.

Effect of explant type and light condition on shoot formation in *Phaseolus vulgaris* L. var. CIAP 7247

Plant regeneration through out direct and indirect organogenesis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is difficult and varies depending on the genotype. For this reason, the protocols described are hardly repeatable and concentrate on a limited group of varieties. Shoot production from callus is restricted to few publications and it is related to the type of explant for their formation. This study aimed to evaluate the effect of explant type on shoot formation from callus of the Cuban bean variety CIAP 7247 formed in light and dark conditions. Cotyledonal node with one cotyledon and both cotyledons were used as initial explant. They were placed in culture medium for callus formation and multiplication. Calluses were maintained 7 days in darkness, and then transferred to light for 14 days during the formation. Others were kept in dark for 21 days of culture, completing four treatments. Calluses formed in each treatment were placed in the culture medium for shoot formation. Evaluations to determine the number of shoots per callus were carried out to the 21 days. The results showed that the type of explant had a greater influence on the formation of shoots. Callus formed at the cotyledonal node with one cotyledon reached a highest number of shoots than in the cotyledonal node with two cotyledons. Shoots formed are characterized by small size and the presence of differentiated leaves. It is possible to obtain shoot formation in this species taking into account the type of explant.

Influencia del genotipo en la embriogénesis somática en dos especies de caoba: *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. y *Swietenia macrophylla* King

R. Barbón, I. Borroto, R. Collado, M. Pérez, M. La O, E. Quiala, M. de Feria, D. Agramonte, F. Jiménez, M. Chavéz.

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

Swietenia mahagoni (L.) Jacq. y *Swietenia macrophylla* S. son especies maderables más valiosas del mundo y pertenecen a la familia *Meliaceae*. Se conoce con los nombres comunes de caoba. En la actualidad estas especies casi no se comercializan y han sido incluida en el apéndice II de CITES como especies amenazadas. Debido a la creciente demanda de productos forestales se hace cada vez más necesario el establecimiento y desarrollo de métodos de propagación más eficientes. La presente investigación se realizó con el objetivo de estudiar la influencia del genotipo en la embriogénesis somática en dos especies de caobas *S. mahagoni* (L.) Jacq. y *S. macrophylla* K. en medio de cultivo semisólido para lo cual se utilizaron como material vegetal inicial secciones cotiledonales. Los resultados demostraron que en *S. mahagoni* se logró un 95.30% de formación de callo a partir de secciones cotiledonales, mientras que en *S. macrophylla* se obtuvo un 97.02%. En la formación y diferenciación de embriones somáticos el mejor resultado se logró con una concentración de 4.0 mg.l⁻¹; con la cual se obtuvieron los mayores porcentajes de ESAF y ESBF para *S. mahagoni* (55.0% y 92.0%) y de *S. macrophylla* (41.02% y 20.51%). En la especie *S. mahagoni* solo se obtuvo un 36.7% de embriones somáticos por callo y embriones en etapa globular, torpedo y cotiledonal, mientras que *S. macrophylla* fue de un 43.35%. Se demostró la necesidad para ambas especies de una fase de maduración para incrementar el porcentaje de germinación de los embriones somáticos para ambas especies. Los mayores porcentajes de germinación completa (72.0% y 82.8%) y parcial (54.0% y 60.0%) se lograron en un medio de cultivo con 0.25 mg.l⁻¹ de 6-BAP.

Influence of genotype on somatic embryogenesis in two species of mahogany: *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. and *Swietenia macrophylla* King

Swietenia mahagoni (L.) Jacq. *Swietenia macrophylla* and *S.* are most valuable wooded species in the world and belong to the family *Meliaceae*. It is known as the common names of mahogany. Today these species are hardly traded and have been included in Appendix II of CITES as threatened. Due to the

increasing demand for forest products is becoming increasingly necessary to the establishment and development of more efficient methods of propagation. This research was realized with the aim of studying the influence of genotype on somatic embryogenesis in two species of mahogany *S. mahagoni* (L.) Jacq. and *S. macrophylla* K. semisolid culture medium to which were used as starting material cotyledon sections. The results showed that in *S. mahagoni* achieved a 95.30% of callus formation from cotyledon sections, while in *S. macrophylla* was obtained 97.02%. In the formation and differentiation of somatic embryos the best result was achieved with a concentration of 4.0 mg.l⁻¹, which were obtained with the highest percentages of ESAF and ESBF for *S. mahagoni* (55.0% and 92.0%) and *S. macrophylla* (41.02% and 20.51%). In the species *S. mahagoni* only achieved 36.7% of somatic embryos per callus and globular stage embryos, torpedo and cotyledonal, while a *S. macrophylla* was 43.35%. It showed the need for both species in a maturation phase to increase the percentage of germination of somatic embryos for both species. The highest percentages of full germination (72.0% and 82.8%) and partial (54.0% and 60.0%) were achieved in a culture medium supplemented with 0.25 mg.l⁻¹ of 6-BAP.

Enraizamiento in vitro de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrader ex Wendland

Yudith García-Ramírez*, Marisol Freire-Seijo, Blanca Rosa, Ortelio Hurtado

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: yudith@ibp.co.cu

La propagación in vitro de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrader ex Wendland se hace necesaria por el potencial que este tipo de planta posee en la reforestación, conservación de los suelos, en la fabricación del papel y como forraje ganadero. Desarrollar protocolos de propagación vía organogénesis y embriogénesis somática sería una alternativa eficiente para propagar esta especie ya que se adapta bien a las condiciones de Cuba. El cultivo de tejidos constituye una alternativa eficiente para la propagación masiva de bambúes. Con el objetivo lograr el enraizamiento in vitro de *B. vulgaris* se empleó como material vegetal brotes en el quinto subcultivo de multiplicación in vitro. Se adicionó al medio de cultivo TDZ (tidiazurón) (0, 0.3, 0.6 mg.l⁻¹) y AIB (ácido indol-3-butírico) (20 mg.l⁻¹) en dos fases en el enraizamiento in vitro. Se cuantificó a los veinte días de cultivo el número de brotes con raíces, largo de la raíz y porcentaje de supervivencia. Los resultados demostraron que el tratamiento donde se empleó TDZ a una

concentración de 0.6 mg.l⁻¹ se obtuvo el porcentaje más alto de número de brotes con raíces *in vitro* (88.2%) y el mayor porcentaje de supervivencia (50%) de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*.

Obtención de plantas *in vitro* vía organogénesis en sorgo *Sorghum bicolor* L. Moech variedad comercial CIAP-2E-95

Silvio Martínez ^{1,2}, RG. Kosky¹, L. Posada-Pérez¹, R. Barbón¹, M. Acosta-Suárez¹, Maritza Reyes¹, Amado Pérez¹

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

² Sede Universitaria Municipal Camajuaní. Juaduin Paneca 62-TO. Camajuaní. Villa Clara. Cuba. *e-mail: silvio@ibp.co.cu

El presente trabajo se realizó con el objetivo de obtener plantas *in vitro* vía organogénesis directa en sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moech) variedad comercial CIAP-2E-95, para ser utilizadas en la formación de callos. Como explantes iniciales se tomaron semillas maduras de plantas que crecieron en condiciones controladas, las cuales fueron desinfectadas en alcohol 70% por un minuto, hipoclorito de sodio (3%) por 30 minutos, seguido de tres enjuagues con agua esterilizada. Esas fueron pregerminadas en un medio de cultivo que contenía las sales propuestas por Murashige y Skoog (MS), mio-inositol (100 mg.l⁻¹), sacarosa (3%), pH 5.7, fitagel (2.5 g.l⁻¹). Sobre la base de este mismo medio de cultivo se estudiaron diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y kinetina (K), para la multiplicación de los brotes. Empleando 0.15 mg.l⁻¹ de 6-BAP en el medio de cultivo de multiplicación se obtuvo el mayor número de brotes por explante y se estimuló su longitud. Después de siete subcultivos de multiplicación, con una frecuencia de 15 días fueron transferidos a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento con las sales MS, mio-inositol, tiamina, fitagel (2.5 g.l⁻¹), a pH 5.7. En este medio de cultivo se evaluaron tres concentraciones de sacarosa (20, 40 y 60 g.l⁻¹), para estimular el engrosamiento de los brotes. El mayor grosor de los brotes se manifestó de forma significativa a los 21 días del subcultivo, en el medio de cultivo con 40 g.l⁻¹ de sacarosa, donde las plantas también mostraron mayor altura y número de raíces.

Obtention of sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moech), commercial variety CIAP-2E-95 *in vitro* plants via organogenesis

The present work was carried out with the objective of to obtain *in vitro* plants of sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moech), commercial variety CIAP-2E-95, via direct organogenesis for callus formation. Mature seeds of plants grown under controlled

conditions were used as initial explants. They were disinfected in alcohol 70% during one minute, hypochlorite of sodium (3%) for 30 minutes, afterwards three washes with sterilized water. Seeds were pregerminated in Murashige y Skoog (MS) culture medium with mio-inositol (100 mg.l⁻¹) sucrose (3%), pH 5.7, fitagel (2.5 g.l⁻¹). Different concentrations of 6-benzylaminopurine (6-BAP) and kinetin (K) using the same culture medium were studied for buds multiplication. The biggest number of buds by explant was achieved, and their longitude was stimulated, using 0.15 mg.l⁻¹ 6-BAP in the multiplication medium. Buds was transferred to a culture medium free of growth regulators with the MS salts, mio-inositol, thiamina, fitagel (2.5 g.l⁻¹), pH 5.7, after seven multiplication subcultures, with a frequency of 15 days. Three sucrose concentrations (20, 40 and 60 g.l⁻¹) were evaluated in this medium to stimulate and enlarge the buds. The biggest significant bulk of buds was showed after 21 days of subculture adding 40 g.l⁻¹ sucrose to the medium. Explants also showed bigger height and number of roots.

Variabilidad morfológica de embriones somáticos de FHIA-21 (*Musa AAAB*) durante la fase maduración y germinación

Leyanis García-Águila*, Rafael G. Kosky, Yelenys Alvarado-Capó, Zoe Sarria, Maritza Reyes

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

La propagación masiva de plantas a través de la utilización de embriogénesis somática constituye una interesante propuesta para el género *Musa*. Esta brinda la posibilidad de obtener gran cantidad de plantas por la capacidad ilimitada de multiplicación secundaria de los embriones somáticos. El empleo de medios de cultivos líquido aumenta las ventajas de este sistema de regeneración por la reducción de los costos, posibilidad de automatización, manejo de condiciones de cultivo y facilitación de las operaciones (cambio de medio de cultivo, cosecha de embriones, etc). Sin embargo, se ha observado una diversidad morfológica de los embriones somáticos durante la fase de maduración y su efecto en la germinación y formación de plantas. Por esta razón, este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de densidad de inoculación sobre la morfología de embriones de FHIA-21. Para ello, se adicionaron 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 g de masa fresca (MF) en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad que contenían 30 ml de medio de cultivo líquido de maduración. A los 30 días se efectuó la evaluación

morfológica de los embriones a través de la descripción de los cambios observados, determinación de la longitud (mm) y análisis histológico. Posteriormente, los embriones se colocaron en medio de cultivo semisólido de germinación para la formación de plantas. Los resultados demostraron el efecto de la densidad en la variabilidad morfológica de los embriones durante la fase de maduración y su efecto sobre la germinación. Los embriones cultivados en las menores densidades de inoculación (0.2 y 0.4 gMF) presentaron gran variabilidad morfológica dada por la germinación parcial ya sea del primordio apical o radicular y por la diversidad de tamaños. Las secciones histológicas revelaron un crecimiento irregular de la epidermis y la formación yemas de apariencia adventicia. Esto trajo como consecuencia menor porcentaje de embriones germinados y las plantas formadas presentaron malformaciones en el crecimiento (no definición del pseudotallo y ausencia de raíces). Por otra parte, los embriones cultivados a 0.6 gMF mostraron mayor uniformidad del tamaño y evidencias histológicas de formación del meristemo caulinar y radicular, así como estructuras de reserva. Estos Es presentaron mayores porcentajes de germinación y formación de plantas características morfológicas adecuadas (pseudotallo definido, altura de 1.0 a 1.5 cm, de dos a tres hojas abiertas y más de dos raíces) para la transferencia a condiciones *ex vitro*.

Efecto de la densidad de inoculación en la maduración de embriones somáticos de FHIA-21 (*Musa AAAB*) a escala productiva

Zoe Sarriá*, Robin Triana, Leyanis García-Águila, Rafael G. Kosky, Alexis M. Rodríguez, Blanca Pérez, Maritza Reyes, Tereza Salabarría, Elizabeth Peralta, Eloisa Rodríguez, Lisvey Concepción, Yudith Sánchez, Zaida Pérez, Marlon Mesa, Osmani Jacomino. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní. km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830
e-mail: zoe@ibp.co.cu

En plátanos y bananos la embriogénesis somática se ha utilizado como un sistema de regeneración de plantas potencialmente más eficiente que la organogénesis, debido a la presencia de los dos polos, la raíz y brotes en el mismo medio de cultivo que permite obtener mayores volúmenes de plantas en menor período. El objetivo de este trabajo fue

determinar el efecto de la densidad de inóculo en la maduración de embriones somáticos de FHIA-21 (*Musa AAAB*), en medios de cultivo semisólido a escala productiva. Para ello, se adicionaron 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 g de masa fresca (MF) en frascos de 250 ml de capacidad que contenían 25 ml de medio de cultivo semisólido de maduración. A los 30 días de cultivo se cuantificó la masa fresca (g) de los embriones somáticos y posteriormente fueron transferidos a medio de cultivo semisólido de germinación. A los 30 días de cultivo se cuantificó el número de embriones germinados y se calculó el porcentaje. Se comprobó que la densidad de inoculación en la fase de maduración influyó en el número de embriones germinados. Con la menor densidad de inoculación (0.2gMF) se obtuvo el mayor número de embriones germinados. Este aspecto debe tenerse en cuenta para la propagación masiva de plantas de este cultivar de plátano mediante embriogénesis somática, especialmente para la planificación de la producción a gran escala. Se obtuvieron por esta vía 14 500 plantas.

The effect of some hormones and activated charcoal levels on *in vitro* rooting of artichoke (*Cynara scolymus* L. CV. Sakiz)

¹Meliha Temirkaynak* and ²Nurgül Ercan

¹Batý Akdeniz Agricultural Research Institute, Antalya-Turkey

²Akdeniz University, Antalya- Turkey

Artichoke is one of the most important vegetable species in Mediterranean basin. Generally, this species is vegetatively propagated. The *in vitro* propagation of artichoke is used in the world since many years to obtain propagation materials to the farmers. It was researched the possibilities of *in vitro* rooting of artichoke (*Cynara scolymus* L.) cv. Sakiz that is an important standard cultivar of Turkey grown in this study. Murashige and Skoog nutrient medium was used. During *in vitro* rooting studies; IBA (0, 0.1, 0.4, 0.8 and 1.0 mg.l⁻¹), NAA (0, 0.1, 0.4, 0.8 and 1.0 mg.l⁻¹), Activated Charcoal (AC) (0, 1.0, 2.5 and 5.0 g.l⁻¹), GA₃ (0, 1, 5 and 10 mg.l⁻¹) were tested. According to results obtained from this study the most convenient propagation medium was 5 mg.l⁻¹ GA₃ and 1 g.l⁻¹ AC in terms of root number and root quality.

PROPAGACIÓN *IN VITRO*

Establecimiento de un Banco de Germoplasma *in vitro* de Cactáceas Mexicanas

Martha Evelia Pérez Reyes^{1*}, Eugenio Pérez Molphe Balch²,
Laura Ma. De Lourdes de la Rosa Carrillo²

¹Departamento de Química, Área de Biotecnología Vegetal,
Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940,
20 100, Aguascalientes, Aguascalientes, México.
e-mail: marthaeveliarp@yahoo.com

²Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas,
Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Las cactáceas mexicanas son uno de los grupos vegetales más importantes de la flora mexicana. Se encuentran en el territorio nacional desde Baja California y Sonora hasta Yucatán. El territorio mexicano presenta una de las tasas más altas de deforestación lo que presagia la extinción de muchas especies. El objetivo de este banco es preservar el material biológico sin variaciones genéticas por medio de técnicas de cultivo *in vitro* que permiten la conservación del germoplasma con un mantenimiento mínimo en un espacio reducido. Se tiene actualmente establecido el proceso en 179 especies de cactáceas. El cultivo se puede establecer a partir de semillas o individuos adultos; para el caso de las semillas se colocan en medio de cultivo que les permita la germinación y después en otro que contenga auxinas o citocininas para la proliferación. La cantidad de gelificante utilizado es importante ya que no todas las especies requieren la misma cantidad. El medio de cultivo utilizado es el de Murashige y Skoog (MS) a pH 5.7 con 30 ó 50 g.l⁻¹ de Sacarosa y 10 ó 12 g.l⁻¹ de agar bajo luz continua a 25°C. También se estableció el sistema de crecimiento retardado, añadiéndole al medio de cultivo manitol y/o sorbitol donde se observó que son capaces de reducir la tasa de crecimiento en más de un 50%. Algunas de las especies conservadas son de los géneros *Mammillaria*, *Ferocactus*, *Astrophytum*, *Turbinicarpus*, *Echinocactus*, *Thelocactus*. Muchas de estas especies que se consideran en peligro de extinción o que su comercio se autoriza solo en casos especiales (NOM Norma Oficial Mexicana).

Establishment of an *in vitro* germoplasm bank of Mexican Cacti

Mexican cacti are one of the most important plant groups of the Mexican flora. They are widespread in the country, from Baja California and Sonora to Yucatán. The Mexican territory has one of the highest

rates of deforestation which threatens the conservation of many species. The purpose of this bank is to preserve biological material without genetic variation through *in vitro* culture techniques that would allow the preservation of genetic resources with minimal maintenance in a confined space. At the present time, the process it is established in 179 cacti species. The culture can be established from seed or adult individuals. In the case of seeds, they are placed in culture medium that allows them to germinate and then in one containing auxins or cytokinins for proliferation. The amount of gelling agent used is important because not all species require the same amount. The culture medium used is Murashige and Skoog (MS), pH 5.7 with 30 or 50 g.l⁻¹ sucrose and 10 or 12 g.l⁻¹ agar under continuous light at 25°C. It was also established a retarded growth system by adding manitol and/or sorbitol to the medium showing to be capable of reducing the growth rate in more than 50%. Some of the conserved species belong to the genera *Mammillaria*, *Ferocactus*, *Astrophytum*, *Turbinicarpus*, *Echinocactus*, *Thelocactus*. Species that are considered endangered or that their trade is allowed only in special cases (Official Mexican Standard).

Cultivo, multiplicación *in vitro* y aclimatación de pitahaya (*Hylocereus* sp. - *Cactaceae*)

María Viñas-Meneses; Mainor A. Fernández*, Víctor M. Jiménez

Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS),
Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica.

*e-mail: mainor.fernandez@ucr.ac.cr

La pitahaya (*Hylocereus* sp.) es un cactus trepador, perenne, nativo de zonas tropicales de México, Centro y Sur América. Además de su uso como fruta fresca y para la preparación de helados y jugos, posee un gran potencial industrial como fuente de colorantes naturales, específicamente betalaínas. Generalmente se propaga vegetativamente a partir de segmentos de tallo, pero con tasas muy bajas. La multiplicación *in vitro* permite tasas de propagación mayores y, en consecuencia, el establecimiento de plantaciones comerciales a más corto plazo. En ese sentido, la presente investigación pretendió desarrollar una metodología para el establecimiento, la multiplicación *in vitro* y la posterior aclimatación de material vegetativo de pitahaya. Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron areolas provenientes de esquejes jóvenes de 15-20 cm de longitud. Se evaluaron diferentes protocolos de

desinfección. El que dio mejor resultado consistió en una secuencia de lavados con agua, Extran®, etanol, benomil y Agrimycin, y finalmente hipoclorito de sodio. Para la brotación se utilizó medio de cultivo Murashige y Skoog, 5% de sacarosa y diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) (0, 5, 15, 30 y 45 μM). Con 30 μM de BAP se logró la mayor brotación (82% medido a los 75 días después de la introducción). Para el desarrollo de brotes laterales se evaluó el efecto de concentraciones menores de BAP (0, 1 y 2 μM). Con 1 μM , se observó la formación de 2.91 brotes por cada areola, el valor más alto, 75 días después de la transferencia. Finalmente, se evaluó el porcentaje de sobrevivencia y el tamaño de las plantas en diferentes sustratos en invernadero durante la aclimatación. Con la mezcla de vermiculita y turba (1:1) se obtuvo la mayor sobrevivencia (93%) con brotes de 5.4 cm de altura.

***In vitro* culture, propagation and acclimatization of pitahaya (*Hylocereus* sp. - *Cactaceae*)**

Pitahaya (*Hylocereus* sp.) is climbing, perennial cactus, native to tropical Mexico, Central and South America. In addition to its consumption as fresh fruit and for preparation of ice creams and juices, it has a great industrial potential as a source of natural colorants, specifically betalains. Pitahayas are usually vegetatively propagated through stem segments, which renders low multiplication rates. *In vitro* propagation allows obtaining higher multiplication rates and, in consequence, the establishment of commercial plantations in a shorter term. In this sense, this research aimed to develop a methodology for the establishment, *in vitro* propagation and subsequent acclimatization of pitahaya vegetative material. For the *in vitro* establishment, areoles from young cuttings, 15-20 cm in length, were used. Different protocols for disinfection were evaluated. Best results were obtained with a sequence of washes with tap water, Extran®, ethanol, benomyl and Agrimycin and, finally sodium hypochlorite. For bud sprouting, Murashige and Skoog culture medium, supplemented with 5% sucrose and different concentrations of the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) (0, 5, 15, 30 or 45 μM) was used. Use of 30 μM BAP induced the highest sprouting (82% measured 75 days after establishment). For the induction of lateral bud sprouting the effect of lower concentrations of BAP (0, 1, 2 μM) were evaluated. Use of 1 μM BAP produced 2.91 shoots for each areole, the highest value, 75 days after transfer. Finally, the survival rate and size of the plants were evaluated in the

greenhouse during acclimatization. The mixture vermiculite and peat moss (1:1) showed the highest survival rate (93%) with plants 5.4 cm in height.

Evaluación morfoagronómica en campo de plantas de ñame (*Dioscorea alata* L.) obtenidas de los microtubérculos formados en Sistema de Inmersión Temporal

Manuel Cabrera Jova^{1*}, Rafael G. Kosky², Aymé Rayas Cabrera¹, Manuel De Fera², Jorge López Torres², Víctor Medero Vega¹, Milagros Basail Pérez¹, Germán Rodríguez Rodríguez¹, Arletys Santos Pino¹

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

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

Los microtubérculos en algunas especies de plantas constituyen una importante alternativa como material vegetal de plantación. Se definió como objetivo de este trabajo evaluar en campo la respuesta morfoagronómica de plantas obtenidas de microtubérculos formados en Sistema de Inmersión Temporal. Como variantes experimentales se plantaron microtubérculos clasificados según su masa fresca: de 0.5 – 0.9 g, de 1.0 – 2.9 g, e igual o mayor de 3.0 g, plantas *in vitro* previamente aclimatizadas y coronas de tubérculo. Se determinó el efecto de la masa fresca de los microtubérculos sobre su brotación y sobre la supervivencia y el posterior desarrollo de las plantas obtenidas de ellos en campo. Se alcanzó, entre los materiales que se produjeron *in vitro*, con los microtubérculos de ñame con una masa fresca igual o superior a 3.0 g, el más alto porcentaje de brotación (91.30%) y supervivencia de las plantas (96.50%). En las plantas de los microtubérculos de ñame no se detectaron diferencias en los caracteres morfológicos cualitativos que se evaluaron en campo, sin embargo, entre las plantas de los microtubérculos, las plantas de los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 3.0 g, mostraron las mejores respuestas en los caracteres cuantitativos que se evaluaron en campo. Estos resultados confirmaron la importancia de la masa fresca de los microtubérculos para ser empleados como material vegetal de plantación directo en campo.

Micropropagación del bambú gigante *Dendrocalamus giganteus* (Poaceae: Bambusoideae)

Andrea Holst*, Tatiana Vega, Eric Guevara, Víctor M. Jiménez Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS),

Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica. *email: andrea.holst@ucr.ac.cr

Dendrocalamus giganteus es uno de los bambúes más grandes del mundo. Es importante por su gran tamaño y la fortaleza de sus tallos, que tienen diversos usos. Además, su cultivo reduce la erosión de suelos. Sin embargo, su baja tasa de reproducción es la principal limitación para su producción a gran escala. El método más común es la subdivisión del rizoma, que por su gran tamaño resulta de difícil transporte y manejo. También la propagación por semilla es poco factible, ya que tiene una floración muy espaciada en el tiempo (se estima que ocurre cada 30-40 años). Por su parte, la propagación *in vitro* del bambú permite altas tasas de multiplicación a un costo relativamente bajo; sin embargo, ha sido poco exitosa en esta especie. Este trabajo pretendió el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de *D. giganteus*. Para ello se tomaron yemas axilares (2 cm de largo) a partir de plantas de invernadero. Luego de la desinfección (10 min en 0.1% Extran®, 50 min en 2 g.l⁻¹ de benomil y Agrimycin y 15 min en 1.3% hipoclorito de sodio y Tween 80), los explantes fueron colocados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) con 0, 0.1, 0.3 o 0.5 mg.l⁻¹ de tiazuron (TDZ) y 2 ml.l⁻¹ de Plant Preservative Mixture®. Los explantes se mantuvieron en oscuridad por dos días y luego fueron transferidos a un fotoperiodo de 12 h (50-60 µmol/m²s⁻¹). El tratamiento con 0.5 mg.l⁻¹ de TDZ indujo el mayor número de brotes de mayor altura. Para el enraizamiento, las plantas se subcultivaron en medio de cultivo con 3, 6 ó 12 mg.l⁻¹ de ácido indol butírico (AIB). Únicamente se logró el enraizamiento de algunas plantas a los 15 días con 12 mg.l⁻¹ de AIB, lo cual indica que se requieren más estudios al respecto.

Micropropagation of the giant bamboo *Dendrocalamus giganteus* (Poaceae: Bambusoideae)

Dendrocalamus giganteus is one of the largest bamboos in the world. It has a significant economic potential due to the size and hardness of its culms, which have many uses. Moreover, its culture reduces soil erosion. However, its low reproductive rate is the main limitation for large-scale cultivation. The most commonly used method is the subdivision of rhizomes, which due to their large size, are difficult to transport and handle. Furthermore, propagation by seed is difficult because this species flowers every 30-40 years. On the other side *in vitro* propagation of bamboo allows high multiplication rates at a relatively low cost; however, this has not been successfully accomplished in this species. This study aimed the

in vitro establishment and propagation of *D. giganteus*. Therefore, single node stem segments (2 cm in length) with an axillary bud and internodal portions on either side were excised from young branches of greenhouse growing plants. After disinfection (10 min in 0.1% Extran®, 50 min in 2 g.l⁻¹ each of benomyl and Agrimycin, followed by 15 min in 1.3% sodium hypochlorite supplemented with Tween 80), explants were cultured on Murashige and Skoog's medium (MS) supplemented with 0, 0.1, 0.3 or 0.5 mg.l⁻¹ thidiazuron (TDZ) and 2 ml.l⁻¹ Plant Preservative Mixture®. Explants were cultured in the dark for two days and were then transferred to a 12 h photoperiod (50-60 µmol/m²s⁻¹). The highest number of the longest axillary shoots was obtained with 0.5 mg.l⁻¹ TDZ. For rooting, plants were subcultured on MS medium supplemented with 3, 6 or 12 mg.l⁻¹ indolebutyric acid (IBA). A few plants rooted after 15 days of culture on medium with 12 mg.l⁻¹ IBA, indicating that more studies are needed on this area.

Establecimiento y desarrollo inicial en suelo de plantas generadas *in vitro* de especies de interés forestal (*Litsea glaucescens* y *Quercus* spp.)

María Guadalupe Mata Pérez^{1*}, Eugenio Pérez Molphe Balch¹, Francisco Morales Domínguez¹, Oscar Grageda Cabrera²

¹ Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, 20131, Aguascalientes, Aguascalientes, México. e-mail: gmataperez@hotmail.com

² INIFAP Campo Experimental El Bajío, Celaya, Guanajuato, México.

La cubierta forestal está siendo reducida rápidamente de la superficie de la Tierra. Los encinos (*Quercus* spp.) y el laurel silvestre (*L. glaucescens*) son especies forestales no maderables importantes en México; ésta última está declarada en peligro de extinción de acuerdo con la norma oficial mexicana. A nivel mundial, en los bosques de encino, hábitat de las especies antes mencionadas, se ha detectado que el 'declinamiento' es uno de los problemas más serios que contribuyen a disminuir la salud del árbol y a incrementar su susceptibilidad hacia los patógenos y organismos oportunistas; además, las semillas de las especies *Quercus* muestran varios grados de recalcitrancia y pueden ser almacenadas sólo por un período corto debido a su sensibilidad a la desecación. La transferencia de las plántulas generadas *in vitro* al invernadero es uno de los pasos cruciales en la adaptación y se sabe que la simbiosis micorrízica aumenta el vigor de las plantas, así como también le confiere resistencia ante patógenos de la raíz. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar

protocolos eficientes para el establecimiento en suelo de plantas de encino (*Quercus* spp.) y laurel silvestre (*L. glaucescens*) generadas *in vitro*. La micropropagación para *Quercus* spp. se realizó utilizando explantes provenientes de plántulas germinadas *in vitro* en medio de cultivo MS con 4 mg.l⁻¹ de BA, los cuales se enraízan en medio de cultivo MS_{1/2} con 10 mg.l⁻¹ de AIB. Para *L. glaucescens* la germinación se realizó en medio de cultivo MS con 4 g.l⁻¹ de CA y para el enraizamiento se utilizó medio de cultivo MS con 0.5 mg.l⁻¹ de ANA. Los brotes enraizados de *Q. eduardii* se transfirieron a macetas con turba, turba con la micorriza comercial *Glomus intraradices* o con suelo de bosques de encino, mostrando como mejor resultado las de micorriza comercial.

Establishment and soil initial development of plants generated *in vitro* of interesting forestry species (*Litsea glaucescens* and *Quercus* spp.)

Forest cover is being reduced rapidly from the surface of the Earth. The oaks (*Quercus* spp.) and Mexican bay (*L. glaucescens*) are important non-timber forest species in México; the last one is declared endangered according to Mexican Official Standard. Globally, in oak forests, habitat of the species mentioned above, 'declination' has been identified as one of the most serious problems reducing tree health and increasing their susceptibility to pathogens and opportunistic organisms; additionally, *Quercus* species seeds have been shown varying degrees of recalcitrance and can be stored only for a short period time due to their sensitivity to desiccation. The transfer of seedlings generated *in vitro* to greenhouse is one of the crucial steps in the adaptation and it is known that mycorrhizal symbiosis increases plant vigor, and also confers resistance to root pathogens. The aim of this work was to develop efficient protocols for the establishment of *in vitro* generated plants of oak (*Quercus* spp.) and Mexican bay (*L. glaucescens*). Micropropagation for *Quercus* spp. was performed using explants from seedlings germinated *in vitro* in MS culture medium added with 4 mg.l⁻¹ BA, which are rooted in MS_{1/2} with 10 mg.l⁻¹ of IBA. For *L. glaucescens*, germination was performed on MS medium with 4 g.l⁻¹ AC and for rooting is used MS medium with 0.5 mg.l⁻¹ NAA. The rooted shoots of *Q. eduardii* were transferred to pots with peat moss, peat moss added with commercial mycorrhizal *Glomus intraradices* or oak forest soil, showing as the best result with commercial mycorrhizal.

Propagación *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99 a escala comercial

Laisyn Posada Pérez*, Rafael G. Kosky, Maritza Reyes, Robin Triana, Zaida Pérez, Teresa Salabarría, Elizabet Peralta, Eloisa Rodríguez, Lisvey Concepción, Amado Pérez, Milagros González, Leonardo Rivero.

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

La principal variedad de papaya (*Carica papaya* L.) que se cultiva en Cuba es la Maradol roja, la cual tiene más de 50 años de explotación, de aquí la necesidad de obtener nuevas variedades e híbridos. A partir del mejoramiento genético tradicional se obtuvo el híbrido IBP 42-99, el cual fue clonado, una vez obtenido, empleando las técnicas biotecnológicas. El presente trabajo tuvo como objetivo propagar *in vitro* a nivel comercial el híbrido de papaya IBP 42-99 mediante la metodología desarrollada previamente. Se establecieron 40 brotes de plantas del híbrido crecidas en casa de cultivo y se llevaron a escalado (multiplicación) en Biofábrica (laboratorio comercial) después del tercer subcultivo. Se determinó el coeficiente de multiplicación y el porcentaje de pérdidas en cada subcultivo. Posteriormente, las plantas fueron colocadas en el medio de cultivo de elongación y se evaluó a los 25 días la altura y el número de hojas. El medio de cultivo en todos los casos fue esterilizado con la adición de Vitrofur® al momento de la preparación y un pH de 5.8. En la fase de aclimatación se estudió el uso de *Trichoderma* en el sustrato y dos condiciones ambientales (Fitotrón y casa de cultivo). A los primeros 15 días se determinó la supervivencia en los distintos tratamientos y a los 60 días la altura y el número de hojas en las plantas obtenidas. Fue posible establecer una metodología para la propagación *in vitro* a escala comercial del híbrido de papaya IBP 42-99, a partir de ápices de plantas de 2 meses de cultivo crecidas en casa de cultivo, que abarcó desde el establecimiento hasta la aclimatación con 60% de supervivencia.

***In vitro* propagation of papaya hybrid IBP 42-99 at commercial scale**

The major variety of papaya (*Carica papaya* L.) grown in Cuba is the Maradol roja, which has over 50 years of operation, hence the requirement for new varieties and hybrids. The papaya hybrid IBP 42-99 was obtained by traditional breeding and cloned using biotechnological techniques. The aim of this study was to *in vitro* propagate at commercial level the papaya hybrid IBP 42-99 by the methodology previously developed. Forty buds from papaya plants growing in greenhouse conditions were propagated in a Biofactory after the third subculture. In each subculture the multiplication coefficient and the

percentage lost was determined. Later, the shoots obtained were placed in elongation culture medium and plant height and number of leaves was measured after 25 days. In all cases the culture medium was sterilized by means the addition of Vitrofur® at the preparation time with pH 5.8. During the acclimatization of the plants, the use of *Trichoderma* in the substrate was tested in two environmental conditions (phytotron and greenhouse). Fifteen days after transplanting, the survival of the papaya plants in the different treatments was determined as well as the height and number of leaves of the surviving plants after 60 days. It was possible to establish a methodology for *in vitro* propagating, at commercial scale, of papaya hybrid IBP 42-99 from apexes of plants with two months of culture in greenhouse. It include all the stages from establishment to acclimatization. The survival was 60%.

Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*

Avalos E. R. E.^{1*}, De la Rosa C. Ma. de L.¹, Vasco M. N. L.¹, Pérez Molphe Balch. E.¹*Autor para correspondencia.

¹Departamento de Química. Área de Biotecnología Vegetal. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad No. 940 Aguascalientes, 20131 México.
e-mail: becky_elena@hotmail.com

Las cactáceas son autóctonas del Continente Americano; distribuidas en regiones áridas y semiáridas desde Canadá hasta Argentina. México alberga la mayor cantidad de especies. Los frutos de la mayoría son comestibles; su importancia alimenticia radica en su alto contenido de azúcares y vitaminas. El interés en *Hylocereus* y *Selenicereus*, ha aumentado por su potencial económico prometedor en cosechas de frutas exóticas. Conocidas como pitahayas, estas especies están bien establecidas en los mercados domésticos e internacionales. El objetivo de este proyecto es contribuir a mejorar y explotar racionalmente especies de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus* (*Cactaceae*) a través del desarrollo de métodos biotecnológicos que permitan su cultivo y propagación masiva *in vitro*. Se ha establecido un protocolo para desinfección e inoculación, logrando el establecimiento de tejidos *in vitro* de *Selenicereus validus* y de *Hylocereus undatus*. Se han desarrollado sistemas para la propagación masiva *in vitro* a través del establecimiento de los tejidos en medios de cultivo tratados con varios reguladores de crecimiento: CIN, 2iP, TDZ, mT y BA; probando el tipo y la concentración óptima de citocinina para generación de brotes. Se han obtenido brotes de *S. validus* que a su vez se han enraizado *in vitro* y se pretende la elongación *ex vitro*. En todos los casos experimentales se ha utilizado medio MS de cultivo al 100%, pH 5.7, 3% de sacarosa, gelificado con 11 g.l⁻¹

de agar. De acuerdo con los resultados del ANOVA, se establece como mejor tratamiento *in vitro* sobre *S. validus*, el que contiene 2iP, a concentraciones de 1.0 mg.l⁻¹ y 1.5 mg.l⁻¹; observando que no influye la posición del explante. Se obtuvieron 20 brotes promedio por explante. *Hylocereus undatus* y *Selenicereus validus* han sido poco estudiadas, lo cual ha frenando su mejoramiento genético y aprovechamiento; la Biotecnología Vegetal podría aportar herramientas valiosas en este sentido.

Culture and *in vitro* propagation of cacti *Hylocereus* and *Selenicereus* genera

Cacti are native to the Americas; distributed in arid and semiarid regions from Canada to Argentina. Mexico hosts the higher number of species. The majority of cacti fruits are edible, their importance lies in their high sugars and vitamins content. Interest in *Hylocereus* and *Selenicereus*, has increased its economic potential promise in exotic fruit harvest. Known as pitahayas, these species are well established in domestic and international markets. The objective of this project is to improve and exploit rationally species of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (*Cactaceae*) through the development of biotechnological methods to allow cultivation and mass propagation *in vitro*. It has established a protocol for disinfection and inoculation, making the establishment of tissues *in vitro* *Selenicereus validus* and of *Hylocereus undatus*. Systems have been developed for *in vitro* propagation through the establishment of tissues in media treated with various growth regulators: CIN, 2iP, TDZ, BA and mT; testing the optimal type and concentration of cytokinin for shoot generation. Outbreaks have been obtained from *S. validus* which in turn are rooted *in vitro* and *ex vitro* elongation aims. In all cases experimental MS medium was used at 100%, pH 5.7, 3% sucrose, gelled with 11 g.l⁻¹ agar. According to the results of the ANOVA, the better *in vitro* treatment for *S. validus* has been proven to be the 2iP, at concentrations of 1.0 mg.l⁻¹ and 1.5 mg.l⁻¹, without influence of the position of the explant. An average of 20 shoots were obtained by explant. *Hylocereus undatus* and *Selenicereus validus* have been little studied, which has halted its improvement and exploitation. Plant Biotechnology could provide valuable tools in this regard.

Establecimiento de una metodología para propagar *in vitro* malanga (*Colocasia esculenta*)

Aura Suchini*, Luis Molina²

¹Investigadora, Unidad de Cultivo de Tejidos, Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ICTA. km 21.5 Carretera al Pacífico, Bárcenas, Villa Nueva, Guatemala. e-mail: asuchini@icta.gob.gt, asuchini@gmail.com.

²Encargado Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ICTA. km 21.5 Carretera al Pacífico, Bárcenas, Villa Nueva, Guatemala.
e-mail: biotecnologia@icta.gob.gt.

La malanga, *Colocasia esculenta*, es una planta comestible de la cual se utilizan las raíces, cormos, y hojas. Las hojas son ricas en vitaminas y minerales. Los cormos tienen alto contenido de almidón y son una rica fuente de fibra, vitamina B6 y manganeso. La inversión en este cultivo ha sido estimulada por los buenos precios y la demanda permanente en los mercados internacionales de Estados Unidos, Costa Rica y Puerto Rico. Con esta investigación se pretendía establecer una metodología para su propagación *in vitro*. Se sembraron yemas provenientes de cormos, luego de la desinfección se sembraron en medio de cultivo Murashige y Skoog con bencilaminopurina (BAP) (1, 3 y 5 mg.l⁻¹). Luego de tres meses el medio de cultivo con 3 mg.l⁻¹ de BAP formó tres brotes por yema, respecto de las otras concentraciones de BAP (1 y 5 mg.l⁻¹) que dieron lugar a la formación de 2 y 2.5 brotes, respectivamente. Posteriormente se enraizaron las plántulas obtenidas en medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento. Cuando alcanzaron una altura de dos centímetros se trasladaron al invernadero, se sembraron en camas de arena previamente desinfectada, se regaron dos veces por semana. Luego de dos meses las plantas se trasladaron a macetas de plástico previo a su siembra en el campo.

Evaluación de la actividad de la superóxido dismutasa en plantas *in vitro* de café bajo un campo electromagnético

Elizabeth Isaac Alemán^{*1}, Andrew Mboghli², Justo González-Olmedo², Yilan Fung Boix¹, Guillermo Azanza¹, Carlos Aragón².

¹Laboratorio Biotecnología Vegetal, Dpto. Bioelectromagnetismo. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Universidad de Oriente. Apartado 4078, Santiago, CP 90 400, Santiago de Cuba, Cuba.
e-mail: elizabeth@cnea.uo.edu.cu

²Lab. Micropropagación. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera Morón, Km 9, Ciego de Ávila, Cuba

Las especies reactivas al oxígeno son producidas en las células normales y en las que son sometidas a estrés y dentro de ellas la superóxido dismutasa (SOD), constituye la primera línea de defensa contra estas especies reactivas del oxígeno. De igual forma, se han referido alteraciones bioquímicas como resultado de la exposición a campos electromagnéticos de baja frecuencia; y algunos autores plantean los efectos biológicos de los campos electromagnéticos sobre las reacciones redox a nivel celular. Aunque estos efectos parecen

ser reversibles y no hay un patrón característico de respuesta bien definido, tampoco se ha determinado si estos cambios son resultados directos o indirectos de la exposición. Por tal razón, este trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad de la enzima superóxido dismutasa en plántulas de café cultivadas *in vitro* sometidas a la acción de un campo electromagnético. Para ello se emplearon vitroplantas de *Coffea arabica* var. Caturra en tres fases de micropropagación, siguiendo la metodología de micropropagación e identificación Bioquímica de plántulas de café. Estas fueron sometidas a un campo electromagnético de 0.0002T, 60 Hz de frecuencia y tiempo de exposición de 3 minutos, a las que se les evaluó concluidas las fases de establecimiento, la fase de multiplicación y la fase de enraizamiento, la actividad de la superóxido dismutasa, el contenido de proteínas solubles y la actividad específica de SOD. Al evaluar los resultados, se obtuvo que para las vitroplantas que recibieron el tratamiento electromagnético, tanto la actividad de la superóxido dismutasa como la actividad específica de la SOD, fue menor, con diferencias significativas durante las tres fases de la micropropagación, en comparación con las vitroplantas control, lo que pudiera estar relacionado con la acción de los campos electromagnéticos sobre los radicales libres.

Evaluation of the superoxide dismutase activity in coffee *in vitro* plants under an electromagnetic field

The oxygen reactive species are produced in the normal and stress cells. Inside them, the superoxide dismutase (SOD) constitutes the first defense line. Biochemical alterations have been reported as a result of the exhibition to the electromagnetic field of low frequency and some authors reported the biological effects of the electromagnetic fields on the reactions redox at cellular level. Although these effects seem to be reversible and there is not a very defined characteristic pattern of answer, neither it has been determined if these changes are been direct or indirect for electromagnetic field exposition. This work had as objective to evaluate the activity of superoxide dismutase enzyme in coffee *in vitro* plants cultivated under the action of an electromagnetic field. *Coffea arabica* var. Caturra rojo plants were used in three micropropagation phases, following the Micropropagation Methodology and Biochemical identification of coffee plants. It were subjected to an electromagnetic field of 0.0002T, 60 Hz frequency and 3 minutes of exposition time and after the establishment, multiplication and rooting phases,

the activity of the superoxide dismutase, the content of soluble proteins and the specific activity of SOD were determined. It was obtained that for the vitroplants that received the electromagnetic treatment, the activity of the superoxide dismutase like the specific activity of the SOD, were so much smaller, with significant differences during the three micropropagation phases, in comparison with control. It could be related with the action of the electromagnetic fields on the free radicals.

Propagación in vitro de *Zantedeschia* spp. en Sistemas de Inmersión Temporal

Javier Sánchez Marcos Daquinta, Iris Capote.

Centro de Bioplantas, UNICA, Carretera a Morón, km 9 Ciego de Ávila. e-mail: jacksaenz100@yahoo.com

Las Callas (*Zantedeschia* spp.) son plantas de la familia *Araceae* de gran interés como plantas ornamentales en maceteros y como flores de corte. Resulta de gran interés la propagación *in vitro* de las nuevas variedades obtenidas, por la diversidad de colores de sus flores. Cuando se desean introducir nuevos híbridos en el mercado, las técnicas de propagación tradicional son insuficientes, por lo que resultan de gran interés las técnicas de propagación *in vitro*. Con el objetivo de establecer un protocolo para la propagación *in vitro* en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) se evaluaron diferentes formas de cultivo (semi-sólido; líquido e inmersión temporal), diferentes frecuencias de inmersión, el efecto del Paclobutrazol, concentraciones de AG₃ en el crecimiento de los brotes, el volumen de medio de cultivo por explante y su manejo (brotes individuales seccionados y sin seccionar) en la proliferación y calidad de los brotes. En la aclimatación se evaluó el uso de distintos sustratos; cachaza, cachaza + zeolita y zeolita, en la supervivencia de las plantas. La integración de estos experimentos conllevaron al establecimiento de un protocolo para la propagación *in vitro* de la *Zantedeschia* en Sistemas de Inmersión Temporal de mayor eficiencia biológica que los métodos convencionales de propagación (semi-sólido). De los factores que se evaluaron, el uso de los SIT, el volumen de medio de cultivo por explante y el uso del Paclobutrazol como retardante de crecimiento fueron los que mayor incidencia tuvieron en el aumento del coeficiente de multiplicación.

Estudio ecológico y biotecnológico de tres especies de cactáceas del Estado de Aguascalientes, México

Meza Rangel, Ernestina^{1*}; Sigala Rodríguez, José Jesús²; Tafoya Rangel, Felipe¹; Lindig Cisneros, Roberto³; Pérez Molpe Balch, Eugenio¹.

¹Departamento de Química, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México. Av. Universidad 940. C.P. 20 100. Cd. Universitaria. Aguascalientes, Ags. México. *e-mail: ermeza@gmail.com

²Unidad Académica de Biología Experimental, Universidad Autónoma de Zacatecas, México.

³Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia.

México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, con la familia de las cactáceas sobresaliendo con más de 900 especies. Las cactáceas tienen gran importancia económica como plantas de ornato, como fuente de alimento, en la industria y la farmacéutica. Estas plantas son vulnerables debido a su distribución geográfica restringida, sus largos ciclos de vida, sus bajas tasas individuales de crecimiento, la destrucción de su hábitat y el tráfico ilegal. Con la finalidad de aliviar los problemas de conservación que enfrenta este grupo se realizó un estudio ecológico y micropropagación de tres especies de cactáceas amenazadas: *Mammillaria bombycina*, *M. perezdelarosae* y *Ferocactus histrix*. Las tres especies se establecieron *in vitro* partiendo de semilla, usando como medio de cultivo MS al 50%. Posteriormente se realizó la propagación para lo que se utilizó MS al 100% adicionado con 0.5 mg.l⁻¹ BA. Esto dió como resultado 4.9 brotes por explante para *M. bombycina* y dos brotes por explante para *F. histrix*. *M. perezdelarosae* que se encuentra en etapa de proliferación. En cuanto a las características ecológicas se observó que *M. bombycina* forma colonias encontradas al ras del suelo asociadas a rocas, *M. perezdelarosae* se localiza sobre rocas o en grietas formadas por estas y asociadas con musgo, helechos o pastos. *F. histrix* se localiza generalmente en cañadas poco accesibles. El modelado de nicho ecológico se realizó con el programa Maxent y se obtuvieron los mapas de distribución potencial para cada especie. Estos mapas se usarán conjuntamente con información cartográfica y el estudio de hábitat para reintroducir las plantas propagadas en los sitios en el estado de Aguascalientes en donde se tengan condiciones apropiadas para su desarrollo.

Ecological and biotechnological study of three species of cacti from Aguascalientes state, México

México is one of the most biodiverse countries in the world, with the family *Cactaceae* standing out with more than 900 species. Cacti have great economic importance as ornament plants, as food, in the industry and pharmaceutical. These plants are vulnerable due to their restricted geographic

distribution, long life cycles, low rates of individual growth, their habitat destruction and illegal trade. With the goal of improving the conservation status that this group faces, we performed an ecological study and the micropropagation of three threatened cacti species: *Mammillaria bombycina*, *M. perezdelarosae* and *Ferocactus hystrix*. The three species were *in vitro* established starting from seeds using MS at 50%. Then, mass propagation was achieved in 100% MS with 0.5 mg.l⁻¹ BA, resulting in 4.9 shoots per explant in *M. bombycina* and 2 shoots per explant in *F. hystrix*. *M. perezdelarosae* is still in the proliferation stage. Regarding ecological characteristics, it was noted that *M. bombycina* grows close to the ground, associated with rocks; *M. perezdelarosae* was found in rock crevices associated with moss, ferns or grasses. *F. hystrix* is found generally in hard to reach walls of canyons. Ecological niche modeling was carried out with the Maxent software to produce potential distribution maps for each species. Those maps will be used along with cartographic information and the ecological study to reintroduce the propagated plants in the state of Aguascalientes, México when the suitable conditions for their development exists.

***In vitro* establishment and acclimatization of two threatened species of *Eugenia* genus (Myrtaceae)**

G. Montalvo^{1*}, E. Quiala², J. Matos¹, H. Morffi¹, M. de Fera², M. Chávez², M. La O², R. Balbón², M. Pérez².

¹Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna. Villa Clara. Carretera Central banda a Placetas km 306 Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

Eugenia squarrosa Ekman & Urban and *Eugenia subdisticha* Urban (Myrtaceae) are two threatened endemic species from Santa Clara province, Cuba. Their natural populations are damaged by human activity; which has caused the habitats fragmentation. Due to the low percentage of seeds germination the traditional propagation is very difficult. Tissue culture techniques are very attractive for seedlings growing in order to increase the individual population number. The aim of this work was to achieve the *in vitro* establishment and acclimatization of these species. Seeds from plants in its natural habitats, and also young shoots of *E. squarrosa* were collected. Effect of three concentrations (2.0, 2.5 and 3.0%) of Sodium hypochlorite (NaOCl) during 20 minutes was studied for seeds disinfection of *E. squarrosa*. A treatment with alcohol (70%) during two minutes previous disinfection of buds with NaOCl (1, 2 and 3% during ten minutes) was carried out. For disinfection of *E.*

subdisticha seeds the best treatment obtained with *E. squarrosa* was applied. A culture medium with 50% Murashige and Skoog salts was used. A substrate compound of organic material and zeolite (80: 20) was used for acclimatization of both species. The 100% of seeds disinfection of *E. squarrosa* in all the treatments studied was achieved and 99% for *E. subdisticha*, for that we select 2% during 20 minutes as best treatment for the seeds disinfection. Bigger buds percentage free of contaminant (88.6%) was obtained in the treatment with 3% of NaOCl with *E. squarrosa*. However the biggest percentage of survival (47.5%) was obtained when 2% of NaOCl was used. Germination percentage was 45% and 89.5% to *E. squarrosa* and *E. subdisticha* respectively. During acclimatization a 38% survival of *E. squarrosa* and 75.6% of *E. subdisticha* was reached.

Establecimiento *in vitro* y aclimatización de dos especies amenazadas del género *Eugenia* (Myrtaceae)

Eugenia squarrosa Ekman & Urban and *Eugenia subdisticha* Urban (Myrtaceae) son dos especies amenazadas endémicas de Villa Clara, Cuba. Sus poblaciones naturales están dañadas por la actividad humana, lo cual ha causado la fragmentación de sus hábitats. Debido al bajo porcentaje de germinación de las semillas la propagación tradicional es muy difícil. Las técnicas de cultivo de tejidos son muy atractivas para obtener posturas con el objetivo de incrementar el número de individuos en las poblaciones naturales. El objetivo de este trabajo fue lograr el establecimiento *in vitro* y la aclimatización de estas especies. Se utilizaron semillas de plantas en su hábitat natural y también brotes jóvenes de *Eugenia squarrosa*. Se estudió el efecto de tres concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) (2, 2.5 y 3%) durante 20 minutos en la desinfección de las semillas de *E. squarrosa*. Para la desinfección de los brotes se realizó un pretratamiento con alcohol al 70% durante dos minutos y luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio (1, 2 and 3% durante diez minutos). Para la desinfección de las semillas de *E. subdisticha* se empleó el mejor tratamiento obtenido con *E. squarrosa*. Se utilizó un medio de cultivo con el 50% de las sales Murashige y Skoog. Para la aclimatización de ambas especies se empleó un sustrato compuesto por materia orgánica y zeolita (80:20). Se logró el 100% de semillas desinfectadas con todos los tratamientos empleados con *E. squarrosa* y el 99% para *E. subdisticha* por lo que se seleccionó el tratamiento con 2% de NaOCl durante diez minutos como el mejor para la desinfección de las semillas. El mayor porcentaje de brotes libres de contaminantes (88.6%) fue alcanzado con el tratamiento de 3% de NaOCl, sin

embargo el mayor porcentaje de supervivencia (47.5%) fue obtenido cuando se utilizó 2% of NaOCl. El porcentaje de germinación fue de 45% y 89.5% para *E. squarrosa* y *E. subdisticha* respectivamente. Durante la aclimatización se alcanzó el 38% de supervivencia con *E. squarrosa* y 75.6% con *E. subdisticha*.

Priming y biopriming integrados en la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar a través de los biorreactores de inmersión temporal (TIBs)

Aydiloides Bernal^{1*}, Ariel D. Arencibia², Pablo Machado¹, Elva R. Carmona², Odalys Rivera¹, Leidy Cortegaza³, Irenaldo Delgado¹, Carlos Manuel Zayas², Odalis Nodarse², Ignacio Santana².

Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Villa Clara – Cienfuegos. Autopista Nacional km 246 Apartado 20. Ranchuelo. Villa Clara. Cuba.
e-mail: biofábrica@vc.minaz.cu

Por primera vez tanto el priming como el biopriming se han integrado en la tecnología de micropropagación de caña de azúcar a través de biorreactores de inmersión temporal (TIBs). La micropropagación de caña de azúcar en TIBs enriquecido con CO₂ induce a una condición mixotrófica adecuada para la producción de metabolitos fenólicos naturales. Los estudios se han dirigido a los genotipos comerciales C86-56 y C90-317. Mientras que los metabolitos fenólicos actúan como moléculas priming durante el cultivo *in vitro*, las vitroplantas que crecen y enraízan en presencia de los metabolitos fenólicos muestran un vigor mejorado (medido en el tamaño de la planta), emitido raíces funcionales y aumentado su adaptabilidad al ambiente natural. Adicionalmente, cuando se combinó con la inoculación del *Gluconacetobacter diazotrophicus* endofítico durante el trasplante, hubo una mejora significativa del porcentaje de supervivencia vinculado en este paso crítico. En total, los resultados indican un potencial prometedor para la diversificación de la industria de micropropagación de la caña de azúcar por la producción de metabolitos útiles como subproductos.

Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by temporary immersion bioreactors (TIBs)

For the first time both priming and biopriming approaches have been integrated into the sugarcane micropropagation technology by temporary immersion bioreactors (TIBs). Sugarcane micropropagation in CO₂-rich TIBs induces a mixotrophic condition adequate for the production of

natural phenolic metabolites. Scaling up has been conducted in the C86-56 and C90-317 commercial genotypes. While phenolics demonstrate to act as priming molecules during the *in vitro* culture, vitroplantlets growing and shooting in the presence of phenolic metabolites display an enhanced vigor (measure as plant size), emitted functional roots and increase adaptability to the natural environment. Additionally, when combined with the inoculation of the endophytic *Gluconacetobacter diazotrophicus* during transplanting, a significant improvement of the percentage of survival has been attached through this critical step. Altogether, results indicate a promising potential for diversification of the sugarcane micropropagation industry by the production of useful metabolites as byproducts.

Estrategia y perspectivas del programa de producción de semilla biotecnológica de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Cuba

D. Agramonte, F. Jiménez-Terry*, M. de Fera, M. Pérez, M. Leiva-Mora, M. González, M. León, N. Veitía, Z. Sarriá

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

La producción de papa en Cuba tiene en las semillas al principal componente de inversión. Estas se importan de los países desarrollados que tienen una alta tecnología de producción y representan alrededor del 60% del costo total del cultivo. Es por ello que Cuba ha desarrollado un programa para producir sus semillas empleando la biotecnología. Los principales problemas que presentó esta tecnología de producción de semilla fueron las pérdidas en el traslado de las plantas obtenidas *in vitro* hasta el campo, no uniformidad de las poblaciones, rendimientos variables y alto requerimiento de personal calificado para el trabajo en la plantación y atenciones culturales iniciales del cultivo. El Instituto de Biotecnología de las Plantas posee la infraestructura necesaria para la producción nacional de semilla utilizando el cultivo *in vitro*: una biofábrica para propagar grandes volúmenes de plantas y microtubérculos en sistemas de inmersión temporal y dos casas de cultivo con la capacidad necesaria para la producción de los minitubérculos. Estos elementos potenciales de la institución científico-productiva y los inconvenientes señalados anteriormente, justificaron el desarrollo de una estrategia de trabajo con la cual se pretende instaurar gradualmente la producción de semilla a través de la plantación en campo de los minitubérculos producidos en las casas de cultivo; evaluación de diferentes variedades y estudios morfofisiológicos del cultivo. Este programa de desarrollo perspectivo

permitirá lograr elevados rendimientos, reducir o eliminar las importaciones y obtener tubérculos de alta calidad genética y fitosanitaria.

Strategy and prospects of the biotechnology program for potato (*Solanum tuberosum* L.) seed production in Cuba

Potato production in Cuba has in the seeds the main component of investment. Potato seeds are imported from developed countries which have high production technology and represent around 60% of the total cost of cultivation. That is why Cuba has developed a program to produce potato seeds using biotechnology. The main problems for this seed production technology were the losses in the transfer of *in vitro* plants to field, absence of uniformity in populations, variable yield and high requirement of qualified personnel to work in planting and early crop cultural care. The Instituto de Biotecnología de las Plantas has the necessary infrastructure for the national seed production using *in vitro* culture: A Commercial Tissue Culture Lab to spread large volumes of plants and microtubers in temporary immersion systems and two greenhouses with capacity to produce minitubers. These potential elements and the disadvantages outlined above, justify the development of a working strategy aimed to a gradual establishment of seed production through the planting area of minitubers produced in greenhouses; evaluation of different varieties and morphophysiological studies of crops. This perspective program will achieve high efficiencies, reduce or eliminate imports and obtain high genetic quality tubers.

Elongación, enraizamiento y aclimatización de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. regenerados *in vitro*

Lourdes R. García*, Raúl Collado, Idalmis Bermúdez-Caraballoso, Novisel Veitía, Damaris Torres, Carlos Romero

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

Un protocolo de regeneración de plantas es un requisito indispensable para la aplicación de métodos de transferencia de genes en el mejoramiento genético de los cultivos. A pesar de las innumerables investigaciones que se han realizado en las especies de *Phaseolus* todavía estas han permanecido recalcitrantes para la regeneración *in vitro* sobre todo en la especie *Phaseolus vulgaris* L. El trabajo tuvo el objetivo de lograr la elongación, enraizamiento y aclimatización de brotes regenerados de *P. vulgaris*

cv. CIAP 7247. Se adicionaron varias concentraciones de GA_3 y de $AgNO_3$ en los medios de cultivo de elongación, así como se determinó el efecto de AIB en el medio de cultivo de enraizamiento y la influencia de la longitud de los brotes en esta fase. Además, se evaluó la supervivencia de las plantas en la aclimatización. Los resultados mostraron que es indispensable el GA_3 y el $AgNO_3$ en los medios de cultivo para la elongación de brotes regenerados *in vitro*. Las mayores concentraciones de este regulador del crecimiento permitieron obtener brotes elongados con longitudes medias que oscilaron entre 0.94 cm y 1.30 cm. Se demostró, además, que es indispensable el AIB para la inducción de raíces en esta variedad. Se comprobó que los brotes con 1 cm o más de longitud pueden ser transferidos a los medios de cultivo de enraizamiento donde se obtuvieron porcentajes de formación de raíces mayores de 70.6% y supervivencia en fase de aclimatización de 95%. No se encontraron diferencias en cuanto al color y forma de las hojas y tallo y todas las plantas aclimatizadas fueron fértiles.

Elongation, rooting and acclimatization of *Phaseolus vulgaris* L. shoots *in vitro* regenerated

A plant regeneration protocol is an indispensable requirement for the application of genes transfer methods in the plant breeding. In spite of the countless investigations that have been carried in the species of *Phaseolus*, these have remained recalcitrant for the regeneration *in vitro* mainly in the species *Phaseolus vulgaris* L. The work had the aim of achieving the elongation, rooting and acclimatization of regenerated shoots of *P. vulgaris* cv. CIAP 7247. Several concentrations of GA_3 and of $AgNO_3$ in the elongation culture medium were studied, as well as the influence of IBA in the culture medium and the shoot longitude. The survival of the plants in the acclimatization phase was also evaluated and the morphological characteristics and the fertility of the same ones. The results showed that it is indispensable the GA_3 and the $AgNO_3$ in the culture medium for the elongation of *in vitro* regenerated shoots. The biggest concentrations of this growth regulator allowed to obtain shoots elongated with longitudes between 0.94 cm and 1.30 cm. It was also demonstrated that is indispensable the IBA for the induction of roots in this variety. The shoots with 1 cm or more can be transferred to the rooting culture medium where percentages of roots formation of 70.6% and 95% of acclimatization of plants. In the study morphological characteristics of the plants were not different as for the color and form of the leaves and all the plants were fertile.

Incremento de la eficiencia en la propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) en sistemas de inmersión temporal

Jorge Montes de Oca¹, Novisel Veitía², Elio Jiménez²

¹Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Autopista Nacional km 248. Ranchuelo, Villa Clara, Cuba

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54 830

El presente trabajo tuvo como finalidad mejorar la eficiencia del proceso de propagación *in vitro* de la caña de azúcar en sistemas de inmersión temporal (SIT). Se realizaron una serie de experimentos donde se estudió la influencia de la presión de aire en los SIT, la posibilidad de eliminación de la etapa de elongación en la propagación en los SIT, y el efecto combinado de la densidad de inóculo y el tiempo de cultivo. De estos estudios se obtuvo que en la configuración de SIT con liberación de la presión interna (intercambio pasivo) se logró un mejor desarrollo morfológico de las plantas y un incremento en los coeficientes de multiplicación, así como una mayor supervivencia de las plantas en la fase de aclimatización. Igualmente se demostró que es posible eliminar la fase de elongación realizando el último subcultivo de multiplicación en medio de cultivo sin PBZ, lo que permite reducir el tiempo en el esquema de propagación y a la vez incrementar la calidad de las plantas producidas. Con la combinación de la densidad de inóculo de 40 brotes por vaso de cultivo y un tiempo de cultivo de 50 días se logra una mejor utilización de la capacidad del vaso de cultivo y la producción de un mayor número de plantas por SIT, que en términos productivos significa un mejor aprovechamiento de la capacidad instalada y permite manejar un mayor número de explantes por área física de las cámaras de cultivo. El escalado productivo realizado en 3 variedades en la Biofábrica del Ingenio Santa Ana en la República de Guatemala, en la Biofábrica del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (Cuba) y en la Biofábrica 'Gobernador Miguel Arráez', del Centro de Tecnologías Estratégicas del Nordeste, Pernambuco, Brasil, validó los resultados en la presente investigación.

Características foliares anatómicas y funcionales de plantas de *Castanea sativa* Mill, producidas *in vitro* y vivero

P. Sáez^{1*}, L. Bravo², K. Sáez³, M. Latsague⁴, Sánchez-Olate¹ y D. Ríos¹

¹Laboratorio Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, Universidad de

Concepción, casilla 160-C, Concepción, Chile

*e-mail: patrisaez@udec.cl

²Laboratorio de Fisiología. Departamento de Botánica. Facultad Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

³Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Concepción.

⁴Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Católica de Temuco.

La transferencia de microplantas a condiciones de campo constituye un paso crítico para muchas especies cultivadas *in vitro*, mostrando un lento establecimiento y bajas tasas de supervivencia en relación con las obtenidas en cultivos tradicionales. *Castanea sativa*, especie leñosa de interés agroforestal, no escapa a esta problemática. Se ha sugerido que el bajo éxito en el establecimiento *ex vitro* de microplantas de *C. sativa* se debe a una baja capacidad fotosintética e ineficiencia en los mecanismos de disipación del exceso de energía lumínica. Para dar respuesta a esta hipótesis, es primero necesario estudiar los caracteres foliares anatómicos y funcionales relacionados con el desempeño fotosintético de *C. sativa* producida *in vitro* y analizar las diferencias existentes con plantas producidas en vivero a partir de semilla. Se midió la tasa de intercambio gaseoso y parámetros de la fluorescencia de la clorofila en microtallos de *C. sativa*, los que fueron comparados con plantas producidas en vivero. La fotosíntesis máxima *in vitro* fue baja en comparación con plantas de vivero (3.3 y $7.2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente). Igual tendencia se observó en la tasa de transporte de electrones y eficiencia cuántica del PSII. *In vitro* el apagamiento no fotoquímico fue saturado a intensidades lumínicas cercanas a $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ sugiriendo que el grado de fotoprotección por disipación térmica puede ser insuficiente frente a las intensidades de luz encontradas en invernadero o campo. Adicionalmente se analizó el apanto estomático, en donde se observó que más del 90% de los estomas se encontraban abiertos y su frecuencia fue el doble comparada con plantas de vivero, éstos se presentaban redondeados y sobresalientes, más aún, no se observó deposición de ceras, lo que resultó en una alta conductancia estomática y altas tasas transpiratorias. Las características foliares anatómicas y funcionales desarrolladas *in vitro* serían reflejo de las condiciones bajo las cuales se realiza el cultivo y estarían determinando su traspaso a condiciones *ex vitro*.

Anatomical and functional leaf characteristics of *in vitro* cultured microshoots and nursery plants of *Castanea sativa*

The transference of microplants to field conditions is a critical step for many *in vitro* cultured species, which tend to show a slow recovery and low survival rates compare with conventional vegetative propagation. *Castanea sativa*, a hardwood forest species of considerable agro-economic, is not free of this problem. It was therefore suggested that the low success rate in *ex vitro* establishment of *C. sativa* microplants is because a low photosynthetic capacity and inefficient mechanisms for the dissipation of excess light energy. In order to further test this hypothesis it is necessary to evaluate the anatomic and functional leaf characteristics related to photosynthetic performance of *C. sativa* produced *in vitro*, and analyze the differences existing with plants produced in a nursery from seeds. CO₂ exchange and the chlorophyll fluorescence parameter in microshoots of *C. sativa* were measured, which were compared with plants produced in a nursery. The photosynthetic capacity *in vitro* was low in comparison with nursery plants (3.3 and 7.2 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectively). The same tendency was observed in the electron transport rate and effective quantum yield of the PSII. *In vitro* the non-photochemical quenching was saturated at irradiances near to 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ suggesting that degree of photoprotection by thermal dissipation could be limited by sudden large increases in irradiance as in greenhouses or fields. Additionally, the stomatal apparatus was analyzed, in which it was observed that more than 90% of the stomatas were found open, and their frequency was double that of nursery plants, and were spherical, wide open. Furthermore, epicuticular wax was not observed, which resulted in a high stomatal conductance and high transpiration rates. The anatomic and functional leaf characteristics developed *in vitro* are a reflection of the conditions under which the cultivation was carried out and will determine their transplanting to *ex vitro* conditions.

Evaluación en campo de plantas *in vitro* de *Morus alba* L.

J.E. Salas^{1,2*}, D. Agramonte¹, F. Jiménez-Terry¹, R. Collado¹

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

²Colegio de Postgraduados. Campus Tabasco. Carlos A. Molina s/n. C.P. 86 570. Cárdenas, Tabasco, México. Autor para correspondencia. e-mail: salasj@colpos.mx

Se evaluaron en condiciones de campo plantas de morera provenientes del cultivo *in vitro* en medio de cultivo semisólido (SS), sistemas de inmersión temporal (SIT) y estacas (E) (plantas control). Se

utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas por tratamiento. Se determinó como caracteres cuantitativos el porcentaje de supervivencia, altura de la planta, número de hojas y ramas, área foliar y biomasa foliar a los 4, 8 y 12 meses de cultivo y, como caracteres cualitativos la forma, color, superficie, textura y margen de las hojas, a los 12 meses de cultivo. Las plantas procedentes de SS y SIT tuvieron un mejor comportamiento en las variables cuantitativas respecto a las propagadas convencionalmente y no se observó diferencia significativa entre SS y SIT. En las variables cualitativas no hubo diferencias morfológicas en las hojas de las plantas de las distintas procedencias. Fueron evidentes las ventajas que tiene la propagación *in vitro* en relación con la convencional expresadas principalmente en un mayor crecimiento y producción de biomasa foliar sin observarse diferencias fenotípicas con las plantas control.

Field evaluation of *Morus alba* L. *in vitro* plants

Under field conditions mulberry plants from *in vitro* culture in semisolid medium (SSM), temporary immersion systems (TIS) and stakes (E) (control plants) were evaluated. It used a completely randomized design with four replicates per treatment. Quantitative traits were determined as the survival rate, plant height, number of leaves and branches, leaf area and leaf biomass at 4, 8 and 12 months of culture and as qualitative characteristics the form, colour, size, texture and leaf margin at 12 months of cultivation. Plants derived from SSM and TIS had a better performance in regard to quantitative variables from conventionally propagated and there was no significant difference between SSM and TIS. In the qualitative variables no morphological differences in the leaves of plants from SSM, TIS and E. The advantages of *in vitro* propagation in relation with the conventional propagation were evident and it expressed mainly on more growth and leaf biomass production without phenotypic differences observed with control plants.

Desarrollo en fase de aclimatización de plantas *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*

O. Hurtado, Y. García-Ramírez, M. Freire-Seijo, M. Leiva-Mora, M. León.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Santa Clara, Cuba. e-mail: ortelio@ibp.co.cu

Los bambúes, por su rápido crecimiento y sus diferentes usos, han sido de gran utilidad para el hombre a lo largo de la historia. Sin embargo, las

técnicas tradicionales de propagación vegetativa no permiten la multiplicación acelerada de especies de bambú. El cultivo de tejidos representa una opción para la propagación de *B. vulgaris*, pero el conocimiento existente sobre la aclimatación de plantas propagadas *in vitro* de dicha especie es limitado. La presente investigación tiene como objetivo, lograr la aclimatación, formación y brotación de yemas axilares en condiciones de casas de cultivo de plantas enraizadas *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris*. Se realizaron experimentos para seleccionar el material vegetal y describir las características morfo-anatómicas, para obtener plantas con un mejor comportamiento en la aclimatación. El material vegetal utilizado fueron plantas enraizadas *in vitro* que tenían entre 1 cm y 5 cm de altura. Para ello, se empleó un sustrato que contenía 80% de materia orgánica y 20% de zeolita, fueron sembradas en bolsas de polietileno con un volumen de 572 cm³ de sustrato y un riego de 5 minutos con intervalos de 6 horas. Los parámetros evaluados fueron: altura, número de hojas, largo de la hoja, longitud y número de las raíces hasta los 90 días de plantadas. Se obtuvo como resultado que las plantas que mejor desarrollo fisiológico tuvieron, se encontraban entre 3 y 5 cm, de altura, siendo un material vegetal idóneo para la siembra. Se observó que la presencia o no de raíces no era determinante en su comportamiento en fase de aclimatación. Las características morfo-anatómicas de las plantas demostraron que su aclimatación comenzó a los 30 días de sembradas.

Potencialidades de Ácidos Húmicos de vermicompost como sustituyentes de hormonas sintéticas en la micropropagación de plátano (Enano Guantanamero)

Daniel Cabezas Montero¹, Marcia Beatriz Moya¹ Andrés Calderín Garcías¹ Liane Portuondo Frías¹ Dany Marrero López² Lázaro J. Mendoza Mendizábal¹, Luis Enrique Salazar Gómez¹
¹Universidad Agraria de la Habana. San José de las Lajas, Habana Cuba. e-mail: cabezas@isch.edu.cu

²Biofábrica de la Habana. San José de las Lajas, La Habana, Cuba

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal en la Facultad de Agronomía de la UNAH. Se utilizaron vitroplantas de plátano (Enano Guantanamero) en el subcultivo 8. El objetivo fue estudiar las potencialidades de los ácidos húmicos (AH) para estimulación de los procesos de enraizamientos, buscando la posible sustitución parcial o completa de hormonas sintéticas y de alto costo. La multiplicación *in vitro* se realizó en medio de cultivo de Murashige y Skoog donde además de las sales MS, se adicionó tiamina (2 mg.l⁻¹), mio-inositol (100 mg.l⁻¹) y sacarosa (30 g.l⁻¹). Fueron utilizados 4 tratamientos adicionando diferentes combinaciones de ácidos húmicos (T1:BAP

(4 mg.l⁻¹) + AIA (0.65 mg.l⁻¹) + AH (10 mg.l⁻¹); (T2: 6 BAP (4 mg.l⁻¹) + AIA (0.65 mg.l⁻¹) + AH (20 mg.l⁻¹); (T3: 6 BAP (4 mg.l⁻¹) + AIA (0.65 mg.l⁻¹) + AH (40 mg.l⁻¹) y el tratamiento control, (C: 6 BAP (4 mg.l⁻¹) + AIA (0.65 mg.l⁻¹)). El pH se ajustó a 5.8±0.01 previo a la adición del agente solidificante. Los resultados mostraron que en las plantas *in vitro* bajo los tratamientos de AH, se favorecieron los procesos de elongación y multiplicación celular, comprobados por una emisión del número de raíces por plantas, longitud de las raíces, así como la masa seca, las que fueron superiores y diferentes significativamente con respecto al control. Esto permitió que no fuera necesaria la fase de enraizamiento. Los resultados muestran la posible aplicación de los AH como potenciales sustituyentes de hormonas sintéticas, así como la posibilidad de eliminación de una fase en la micropropagación de plátano.

Efecto en las indicadores de crecimiento en el cultivo *in vitro* de plátano (Enano Guantanamero) con el uso del FitoMas-E y ácidos húmicos

Marcia Beatriz Moya¹, Daniel Cabezas Montero^{*1}, Andrés Calderín Garcías¹ Liane Portuondo Frías¹ Dany Marrero López² Lázaro J. Mendoza Mendizábal¹ y Luis Enrique Salazar Gómez¹

¹Universidad Agraria de La Habana. San José de las Lajas, La Habana Cuba. e-mail: cabezas@isch.edu.cu

²Biofábrica de La Habana. San José de las Lajas, La Habana, Cuba

El grupo de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la UNAH ha desarrollado entre sus líneas de proyectos la Selección y multiplicación de plantas élites de plátano macho para su producción en la provincia de La Habana a partir de técnicas biotecnológicas del cultivo *in vitro*. El objetivo de este trabajo fue la evaluación las potencialidades de los ácidos húmicos (AH) y FitoMas E para estimulación de los procesos de crecimiento vegetativo, buscando la posible sustitución parcial o completa de hormonas sintéticas. En el presente trabajo se utilizaron seis tratamientos con diferentes combinaciones de FitoMas-E y ácidos húmicos (AH), T1:(6-BAP (4 mg.l⁻¹) + AIA (0.65 mg.l⁻¹) + FitoMas-E (0.24 ml.l⁻¹); T2:(6 BAP (4 mg.l⁻¹) + AIA (0.65 mg.l⁻¹) + FitoMas-E (0.32); T3:(AIA (0.65 mg.l⁻¹) + FitoMas-E (0.24 ml.l⁻¹); T4:(6 BAP (4 mg.l⁻¹) + AIA (0.65 mg.l⁻¹) + (AH) (10 mg.l⁻¹); T5:(6 BAP (4 mg.l⁻¹) + AIA (0.65 mg.l⁻¹) + (AH) (20 mg.l⁻¹); T6:(6-BAP (4 mg.l⁻¹) + AIA (0.65 mg.l⁻¹) + (AH) (40 mg.l⁻¹). El pH se ajustó a 5.8±0.01 previo a la adición del agente solidificante. Los resultados mostraron que los tratamientos con FitoMas-E fueron los que más favorecieron los procesos de crecimiento vegetativo, comprobados con la emisión del número de hojas, número de

raíces, coeficiente de multiplicación y masa seca. Los resultados mostraron la posible aplicación de FitoMas- E como sustituyen parcial de los reguladores de crecimiento sintéticos.

Comportamiento en campo de plantas obtenidas por embriogénesis somática en cultivares de *Musa* spp., subgrupo Cavendish

P. Orellana *, R.G. Kosky , L. García-Águila, M. Reyes, B. Chong-Pérez, M. León

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

La embriogénesis somática ha sido desarrollada en varias especies de plantas, con diferentes objetivos, pero en pocos casos se ha logrado la producción masiva de plantas y la evaluación de su comportamiento en campo sobre grandes poblaciones. En algunos clones de *Musa* spp. se ha desarrollado la embriogénesis somática (ES) para facilitar protocolos de transformación genética, pero esta técnica puede ser una alternativa que incrementa la eficiencia para la producción masiva de plantas *in vitro* a escala comercial para la siembra en áreas comerciales. En el presente trabajo se informa de los resultados obtenidos al evaluar poblaciones de plantas obtenidas por ES de los cultivares 'Grande naine' (*Musa* AAA) y 'Cavendish enano' (*Musa* AAA), ambos perteneciente al sub grupo Cavendish, durante dos ciclos reproductivos en dos regiones del país. Las evaluaciones se realizaron sobre la estabilidad de los caracteres morfológicos y de caracteres cuantitativos de las plantas relacionados a los componentes del rendimiento y se determinó además, el rendimiento agrícola bajo condiciones de producción, en comparación con plantas obtenidas por organogénesis. Los resultados indicaron que las plantas obtenidas por ES presentaron índices de variación morfológica muy inferiores a los informados por el método de organogénesis en los dos cultivares, en ambos ciclos productivos y el rendimiento agrícola fue superior a 20% con respecto a las plantas obtenidas por organogénesis. En el segundo ciclo el rendimiento agrícola fue superior en 17% al primer ciclo en las plantas obtenidas por ES. Estos resultados derivados de la evaluación de poblaciones de más de 50 000 plantas obtenidas por ES, especialmente en el cultivar 'Cavendish enano', constituyen una evidencia confiable para recomendar este método como una alternativa viable para la propagación masiva de plantas de estos cultivares.

Behavior in field of plants derived of somatic embryogenesis in *Musa* spp. cultivars, subgroup Cavendish

Somatic embryogenesis has been developed in several species of plants, with different objectives, but in few cases it has been achieved the massive production of plants and the evaluation of its behavior in field on big populations. In some cultivars of *Musa* spp. the somatic embryogenesis (SE) has been developed to facilitate protocols of genetic transformation, but this technique can be an alternative that increases the efficiency for the massive production of plantas to great scale for the sown in commercial areas. In these work is informed the results obtained in the evaluation of the plants derived of populations in the cultivars 'Grande naine' (*Musa* AAA) and 'Dwarf Cavendish' (*Musa* AAA), both belonging to the subgroup Cavendish, during two reproductive cycles in two regions of the country. The evaluations were carried out about the stability of the some morphological characters and others quantitative of the plants related to the components of the yield and it was also determined the agricultural yield under production conditions, in comparison with plants derived from organogenesis. The results indicate that the plants derived of SE presented very inferior indexes of morphological variation to those reported by the method of organogenesis in the two cultivars in both productive cycles. The agricultural yield was superior to 20% with regard to the plants obtained by organogenesis. In the second cycle the agricultural yield was superior in 17% to the first cycle in the plants derived of SE. The results of the evaluation of populations of more than 50 000 plants obtained for SE, especially in the cultivar 'Dwarf Cavendish', constitute a reliable evidence to recommend this method like a viable alternative for the massive *in vitro* propagation of plants of these cultivars.

Índices de calidad para la producción de plantas *in vitro* de plátanos y bananos mediante embriogénesis somática en medios de cultivo semisólidos

Robin Triana*, Miguel Suárez-Castellá, Zoe Sarría, Zaida Pérez, Mayelín Rodríguez , Miladis León, Milagros González, Borys Chong-Pérez, Rafael G. Kosky, Maritza Reyes

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba
e-mail: robin@ibp.co.cu

En la actualidad se intensifica la competencia para dominar el mercado de producción de plantas *in vitro* generalmente obtenidas con el empleo de tecnologías de micropropagación vía organogénesis,

donde la variable calidad es un aspecto decisivo en este escenario. La calidad de estas plantas *in vitro* está condicionada a las particularidades de las tecnologías y los procesos productivos y existen múltiples ejemplos de sus sistemas. La presencia de la embriogénesis somática como tecnología para la producción masiva de plantas implica nuevos enfoques, sistemas, métodos y técnicas de calidad. El Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) durante los últimos años viene desarrollando el escalado de tecnologías vía embriogénesis somática para la producción masiva de plantas *in vitro* de plátanos y bananos y como parte de este proceso se determinaron los principales elementos de calidad a tener en cuenta. El presente trabajo muestra los principales índices y variables de calidad definidos para cada proceso de trabajo, así como las exigencias para su control. Se tomaron como base las producciones alcanzadas de plantas *in vitro* de plátanos y bananos en el IBP y con ello se sentaron las bases iniciales para el diseño de un sistema de calidad ajustado a las peculiaridades de estas tecnologías y con ello posibilitar el empleo definitivo de la embriogénesis somática en procesos productivos comerciales.

Planificación de la producción *in vitro* de plantas de plátanos y bananos mediante embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido

Miguel Suárez-Castellá,* Zoe Sarria, Robin Triana, Zaida Pérez, Milagros González, Borys Chong-Pérez, Rafael G. Kosky, Maritza Reyes

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

La producción de plantas *in vitro* mediante tecnología de micropropagación vía organogénesis es una realidad desde hace muchos años y en la actualidad se intensifica la competencia para dominar el mercado. Dado el carácter de estas tecnologías y de los procesos es indispensable la aplicación de técnicas y métodos de planificación para la producción de plantas *in vitro* que permita su dirección y existen valiosos ejemplos de sus particularidades. Aunque la embriogénesis somática como método de regeneración de plantas se reconoce en la literatura especializada como una vía extraordinariamente eficiente dado el alto volumen de plantas que se obtienen y los mínimos de gastos que se incurrir, existen limitadas experiencias internacionales que registran el empleo de estas tecnologías como vía para la producción masiva de plantas y por ende de los sistemas de

planificación que se requieren dentro de un proceso productivo controlado. El Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) durante los últimos dos años viene desarrollando el escalado de tecnologías vía embriogénesis somática para la producción masiva de plantas *in vitro* de plátanos y bananos y como parte de este proceso se precisó cómo debe desarrollarse la planificación de la producción. En este contexto se reconoce, respecto a la organogénesis, un mayor nivel de incertidumbre en los pronósticos de cada proceso. El presente trabajo muestra un método de planificación de la producción empleando estas tecnologías que permita una dirección confiable de los procesos y sus resultados productivos a partir de identificar y caracterizar los principales índices y variables que influyen en su conformación. Este se empleó en las producciones alcanzadas de plantas *in vitro* de plátanos y bananos y constituye una herramienta esencial para la implementación definitiva de las tecnologías de embriogénesis somática en procesos productivos comerciales.

Evaluación morfológica en casa de cultivo de plantas de 'Cavendish enano' (*Musa* AAA) regeneradas por embriogénesis somática

Miladys León *, Rafael G. Kosky, Milagros González, Michel Veitia, Amado Pérez

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

La propagación de varios cultivares de *Musa* por embriogénesis somática es ya una realidad en Cuba. Sin embargo, la variación somaclonal en plantas regeneradas a partir de embriones somáticos obtenidos de suspensiones celulares, puede representar un obstáculo para la aceptación de las plantas como fuente de material vegetal en las plantaciones comerciales. La detección de variantes en las plantas en la fase de aclimatización del proceso de micropropagación constituye un eslabón clave dentro del control del material vegetal que se entregará a los agricultores. Hasta la fecha se habían evaluado en condiciones de aclimatización un limitado número de plantas *in vitro* (1 500-4 000), pero nunca para un escalado productivo de la tecnología. Por ello, el presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar variaciones somaclonales en plantas regeneradas por embriogénesis somática del cv. 'Cavendish enano' (*Musa* AAA) a través de la evaluación morfológica en fase de aclimatización. Para ello, se evaluaron en casa de cultivo las plantas con cambios fenotípicos regeneradas de embriones somáticos. Como resultado se obtuvo que la

incidencia de plantas con cambios fenotípicos en el total de la población (13 000 plantas) de embriones somáticos fue de 0.1%. Los cambios fenotípicos observados fueron plantas con hojas variegadas (0.02), plantas con cambio en el hábito de crecimiento en forma de abanico (0.06) y plantas coreáceas (0.01). Se corroboró, además, que la variación en las plantas regeneradas a partir de células embriogénicas en suspensión no es más frecuente ni diferente tipológicamente a la ya conocida para la organogénesis.

Evaluación de diferentes manejos en el seccionado de brotes sobre el coeficiente de multiplicación en tres cultivares de plátanos y bananos (*Musa* spp.)

Silvio Martínez^{1,2*}, M. Fontes-Leandro³, O. Pérez-Espinosa³, M. Aday -Martínez³, Y. Rodríguez- Cruz³, A. Valdés-Moreno².

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

²Sede Universitaria Municipal Camajuaní. Juaduin Paneca 62-TO. Camajuaní. Villa Clara. Cuba. *e-mail: silvio@ibp.co.cu

³Biofábrica. MINAGRI. Cienfuegos. Carretera a Palmira, km 1.5. Cienfuegos. Cuba.

El trabajo se desarrollo con el objetivo de aumentar el número de brotes axilares durante la propagación *in vitro* vía organogénesis de tres cultivares de plátanos y bananos. Se evaluaron diferentes alternativas de manejo en el seccionado de los brotes. Como material vegetal fueron usados brotes de tamaño uniforme (1.0 cm de altura y 0.5 cm de diámetro del pseudotallo), con dos subcultivos en medios de cultivo de multiplicación que contenía las sales propuestas por Murashigeg y Skoog en estado semisólido (4.0 g l⁻¹ agar), 0.65 mg l⁻¹ de ácido indolacético (AIA), sacarosa 30 g l⁻¹, así como 4.0, 4.0 y 3.0 mg l⁻¹ 6-bencilaminopurina (6-BAP) para los cultivares Grande naine, FHIA-18 y FHIA-21, respectivamente. Se utilizaron siete formas de manejo, observándose durante seis subcultivos los mejores resultados, al utilizar como manejo un corte longitudinal al cormo hasta el domo apical del brote *in vitro*, sin decapitar el sistema foliar y seccionando a la mitad los brotes de más de 0.5 cm de diámetro del pseudotallo. Este manejo aumenta el número de brotes, altura del brote, número promedio de hojas por explante y no se presenta brotes con crecimiento en forma de roseta. Durante el último subcultivo de multiplicación es necesario el seccionado de los brotes y un corte longitudinal al cormo hasta el domo apical, sin decapitar el sistema foliar; lo cual aumenta el número de brotes mayores a 2.5 cm, que pueden ser transferidos a medios de cultivo de enraizamiento en estado líquido. Estas alternativas

incrementaron la eficiencia del proceso de producción en biofábricas de los cultivares de plátanos y bananos estudiados.

Evaluation of different management in the cut of shoots on the multiplication coefficient in three plantain and banana cultivares (*Musa* spp.)

With the objective of increasing the number of axillary buds during *in vitro* propagation via organogenesis of plantain and banana trees, different handling alternatives were evaluated in the cut of the buds. Buds of uniform size (1.0 cm high, 0.5 cm pseudostem diameter), with two multiplication subcultures of the 'Grande naine' (*Musa* AAA), FHIA - 18 (*Musa* AAAB) and FHIA - 21 (*Musa* AAAB) were used as starting material. Seven handling forms were used, observing the best results after six subcultures when using as handling a longitudinal cut to the corm up to the apical dome of the *in vitro* plant, without decapitating the foliar system and splitting the buds into halves bigger than 0.5 cm of pseudostem diameter. This handling increases the number of buds, height, average number of leaves per explants and buds in rosette form are not shown. It is necessary during the last multiplication subculture to chop the buds using a longitudinal cut of the corm up to the apical dome, without decapitating the foliar system; which increases the number of buds higher than a 2.5 cm. Then they can be transferred to rooting liquid culture medium. These alternatives increased the efficiency of the production process in commercial tissue culture laboratories of banana cultivars and the studied banana trees.

Empleo de una mezcla de oligogalacturonidos en la micropropagación de especies vegetales

Ma. Margarita Hernández*, Lorenzo Suárez, Miruldis Valcárcel, Georvis Téllez

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). P.O. Box #1. San José de las Lajas. Habana. Cuba.
e-mail: mhedez@inca.edu.cu

La malanga (*Colocasia* sp.), conocida como isleña, al igual que la yuca (*Manihot esculenta*, Crantz), constituyen una fuente energética tradicional en la alimentación cubana, fundamentalmente en zonas rurales del país. La problemática del material de reproducción es similar al resto de los cultivos de multiplicación agámica, que abarca tanto aspectos relacionados con la disponibilidad como con la calidad fisiológica y fitosanitaria del material de plantación, lo que incide decisivamente en los rendimientos. Las técnicas de micropropagación ofrecen una vía para la obtención rápida de abundante material de plantación de calidad superior. Sin

embargo, para la aplicación a gran escala de estas técnicas se requiere bajar los costos, a fin de abaratar el precio de los propágulos y hacerlos accesibles a los agricultores. De los componentes de los medios de cultivo empleados para la micropropagación de la mayoría de las especies vegetales, las hormonas representan sustancias de elevados precios, además de representar elementos de importación, por lo cual, se montaron una serie de experimentos en el laboratorio de Biotecnología del INCA, a fin de sustituir o minimizar las concentraciones de auxinas, mediante la sustitución o complementación con Pectimorf, un producto con actividad biológica, constituido por una mezcla de oligogalacturónidos de cadena entre 9 y 16, obtenido en el INCA. Las concentraciones empleadas estuvieron entre 1 y 10 mg.l⁻¹, de acuerdo con ensayos anteriores realizados en papa (*Solanum tuberosum*, L.) y especies ornamentales como el *Anthurium andreaeanum* y *Spathiphyllum*. Los resultados mostraron que el Pectimorf adicionado a los medios de cultivo en las diferentes fases del proceso de micropropagación, logró resultados similares o superiores a la auxina empleada en los mismos. Se pudo apreciar el vigor de las plantas *in vitro* obtenidas en presencia de este compuesto, así como el abundante enraizamiento de estas. Como conclusión de estos experimentos se puede plantear que es factible la sustitución de auxinas por Pectimorf en concentraciones entre 5 y 10 mg.l⁻¹ en el medio de cultivo para la obtención de plantas *in vitro* de manera eficiente y a un costo inferior en las especies estudiadas.

Propagación *in vitro* de *Echeveria elegans*, una especie mexicana en peligro de extinción

Juan José Solís^{1*}, Daniel Rojas¹, Manuel de Fera², Mireya Reyna¹, Florentina Zurita¹

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro Universitario de la Ciénega. Universidad de Guadalajara. Avenida Universidad No. 1115, Colonia Linda Vista, CP 47 840. Ocotlán, Jalisco, México. e-mail: jjsm10786@yahoo.com.mx

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830.

El género *Echeveria* cuenta con cerca de 143 especies que son exclusivas del continente Americano, de las cuales 117 están presentes en la República Mexicana, principalmente en los Estados de Hidalgo, Puebla y Oaxaca. La propagación se puede hacer por retoños, esquejes de hojas o semillas, pero estos métodos se muestran insuficientes ante la depredación de muchas

especies. En la NOM-059-ECOL-2001 la especie *Echeveria elegans* se describe en peligro de extinción. Los objetivos del presente trabajo fueron lograr la propagación *in vitro* de esta especie a partir de yemas axilares, como alternativa para su multiplicación y recuperación. Para ello se evaluaron concentraciones y combinaciones de dos reguladores de crecimiento, 6-BAP (2.22, 4.44, 6.66 y 8.88 µM) y á-NAA (1.35 y 2.70 µM) en la formación de brotes a partir de yemas axilares y dos medios de cultivo con diferentes concentraciones de sales MS, para lograr enraizar *in vitro* las plantas obtenidas. Se observó que al combinar 6.66 µM de 6-BAP y 1.35 µM de á-NAA se favoreció la formación y desarrollo de nuevos brotes. En la fase de enraizamiento, los mejores resultados se lograron con el tratamiento que contenía el 50% de las sales MS. Posteriormente las plantas fueron trasplantadas a casas de cultivo y se logró con éxito su aclimatización. Durante esta última fase de desarrollo, no se observaron cambios fenotípicos, ni presencia de variantes somaclonales.

In vitro propagation of *Echeveria elegans*, a mexican species in extinction danger

The genus *Echeveria* has about 143 species that are unique to the American continent, of which 117 are present in the Mexican Republic, mainly in the states of Hidalgo, Puebla and Oaxaca. Propagation can be done by suckers, cuttings or seed leaves, but these methods are inadequate given the depletion of many species. *Echeveria elegans* species are reported as endangered in The Mexican Government Regulations (NOM-059-ECOL-2001). The objectives of this study were achieved *in vitro* propagation of this species from axillary buds, as an alternative to multiplication and recovery. We proved different concentrations and combinations of two growth regulators, 6-BAP (2.22, 4.44, 6.66 and 8.88 µM) and á-NAA (1.35 and 2.70 µM) in the formation of shoots from axillary buds and two culture medium varying concentrations of MS salts, to achieve rooting plants obtained *in vitro*. It was observed that combining 6.66 µM 6-BAP and 1.35 µM of á-NAA favored formation and development of new shoots. In the rooting step, the best results were achieved with the treatment containing 50% of MS salts. Subsequently the plants were transplanted into the houses of culture and was successfully achieved their acclimatization. During this last phase of development, there were no phenotypic changes or presence of somaclonal variants.

MEJORA GENÉTICA

Hybridization between two elite accessions of *Withania somnifera* (L.) Dunal (Solanaceae)

Bilal Ahmad Mir^{1*}, Sushma Koul¹, Arun Kumar¹, M. K. Koul¹ and A. S. Soodan²

¹Biodiversity & Applied Botany Division, Indian Institute of Integrative Medicine, Jammu, India

²Department of Botanical & Environmental Sciences, GNDU, Amritsar, Punjab, India. *e-mail: meerbilal82@rediffmail.com

Withania somnifera (2n = 4x = 48) commonly known as ashwagandha, is a plant of immense medicinal value. Out of the total germplasm collected from different parts of India, two morpho-chemically distinct groups were identified. Floral biology, pollination behaviour, breeding system and reproductive effort of *Withania somnifera* (family: Solanaceae) was studied in two elite contrasting chemotypes. Nuclear and chloroplast genome assays of the two elite populations by AFLP, internal transcribed sequence – cleaved amplified polymorphic sequence (ITS-CAPS), chloroplast DNA-CAPS, and cloning and sequencing of ITS region of ribosomal DNA reinforced the conclusions based on crossability, morphological, pharmacognostical and chemical characterization data. In the present study experimental hybridization of the best performing chemotypes AGB002 (a selectant from wild populations) and AGB025 (cultivated in restricted places as a commercial crop) was performed and the hybrids developed showed positive heterosis with respect to the root biomass and withaferin A content (an anticancer withanolide). Hybridization studies also showed distinctness between these two chemotypes as evident by low fruit and seed set (5-10%). The quantitative dynamics of Withaferin A production in Indian populations and interchemotypic hybrids developed have been studied. An analysis on inheritance pattern based on presence/absence of Withaferin A in hybrid plants and their respective parents is given for future studies on the chemogenetics of this complex species in details. Further studies on repeated backcrossing for the fixation of these traits is underway.

Plantas transgénicas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens* con tolerancia al herbicida FINALE® y resistencia a *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*

Lourdes Yabor¹, Bárbara Valle¹, Mayda Arzola¹, Martha Hernández¹, Carlos Aragón¹, Carol Carvajal¹, Alitza Iglesias¹, Jesús V. Jorrín Novo², Ariel Arencibia³ & José Carlos Lorenzo¹

¹Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, UNICA. Ciego de Ávila, CP 69 450, Cuba. e-mail: lyabor@bioplasmas.cu

²Grupo de Investigaciones bioquímicas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Córdoba, España e-mail: bf1jonoj@uco.es

³Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) Departamento de Genética y Fitopatología. Carretera CUJAE km 2.5. Boyeros 19 390. La Habana. Cuba. e-mail: ariel.arencibia@inica.edu.cu

Mundialmente, la piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) es la especie económica más importante de la familia Bromeliaceae. La producción anual del 2006 alcanzó 18.2 millones de toneladas. Por lo tanto, programas de mejoramiento genético encaminados a perfeccionar el comportamiento agrícola general están justificados. Esta investigación se enfocó en el establecimiento de una metodología para la transformación genética del cv. Cayena Lisa Serrana, mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Se demostró la factibilidad del uso de los Biorreactores de Inmersión Temporal para la selección de líneas transgénicas resistentes a fosfinitricina. El agente de selección fue efectivo a concentraciones menores en comparación con los frascos convencionales de micropropagación. Por otra parte, se evaluó la tolerancia de líneas transgénicas (*bar*, *quitinasa*, *AP24*) ante el herbicida FINALE® y la resistencia a *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. Se identificaron en aclimatización las líneas 90, 40, 44, 46 y 27 con tolerancia al herbicida; mientras las líneas 90, 79, 41, 1 y 20 mostraron protección frente al ataque del patógeno. Adicionalmente, se evaluó en campo la primera generación vegetativa de la línea promisorio 90. Se analizó su perfil proteómico, indicadores bioquímicos y caracteres agronómicos. En comparación con los testigos, las proteínas mayoritarias del proteoma de la línea 90 no variaron, y se mantuvo con 50 cromosomas. Se observaron diferencias estadísticas en cuanto a niveles de fenoles, clorofilas, proteínas; actividad fenilalanina amonio liasa, superóxido dismutasa, glutamina sintetasa; masa del fruto sin corona; altura de la corona; y altura y diámetro de la planta. Sin embargo, tales variaciones inesperadas no justifican el rechazo de la transgénesis como una herramienta importante para el mejoramiento genético de la piña.

Generation of F_1 doubled haploid lines and evaluation for salinity tolerance at seedling stage in indica rice

MA Javed^{1,2*} and S Misoo²

¹School of Biological Sciences, University of the Punjab, Lahore 54590, Pakistan

²Lab. of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Kobe University, Kobe 657-8501, Japan. e-mail: mirpur87@gmail.com

Production of F_1 DH populations to improve the salinity tolerance in rice is limited. Previous studies usually aiming the production of doubled haploids by using the cross combinations, including *japonica* parent (s). Production of doubled haploid lines from *indica* x *indica* crosses including Pokkali has not been reported yet. Green shoot productivity and doubled haploid productivities were very low except two cross combinations, Pak 221 x Pokkali and KS 282 x Pokkali. For the evaluation of salinity tolerance of F_1 DH lines, twenty days old seedlings were subjected to salinity (EC 10 dS/m) for 5 days. Salinity was increased to an EC of 15 dS/m and 20 dS/m after an interval of 5 days. The seedlings were differentiated on the basis of morphological traits and physiological traits. Significant differences for all traits were observed among the DH lines including their parent cultivars. In normal conditions, an average of all the DH lines were close to the mid parent values. The DH lines derived from Pak 221 x Pokkali, showed an improvement in dry shoot weight and sodium accumulation in leaves. The average of each trait in DH lines derived from KS 282 and Pokkali cross, exhibited a superior value as compare to mid parent value, except potassium accumulation in leaves. The correlations between the traits in saline environment, showed a highly significant relationship between salt injury score and accumulations of sodium in leaves. However, the accumulation of potassium in leaves did not exhibit any relationship with salt injury score. Another negative significant correlation was observed between dry shoot weight and sodium accumulation in leaves among the DH lines derived from Pak 221 x Pokkali, indicated the influence of sodium contents on seedling vigor. A high negative correlation between dry shoot weight and potassium accumulation in leaves was observed in DH lines derived from KS 282 x Pokkali. These results indicated that the use of Pokkali, as a source of salt tolerance in the production of doubled haploid lines, could improve the salt tolerance at seedling stage. The level of salinity tolerance could become higher, if another parent cultivar possessed the moderate level of tolerance because of additive gene actions. Present findings showed that salinity tolerance depend on an appropriate combination of morphological and physiological traits, rather than one of them,

particularly a combination of high dry shoot weight, and the ability to accumulate low sodium and high potassium ions in leaves, could be a salinity tolerance determinant at seedling stage in rice. Moreover, some DH lines produced in the present studies showed short stature and low SIS, indicating the possibility to develop ideal plant types to grow in saline conditions.

'Lorita' y 'Bella Lorena', primeros genotipos de orquídeas terrestres (*Spathoglottis*), obtenidos en Cuba mediante las técnicas biotecnológicas y participativas

Lorenzo Suarez*, Ma. Margarita Hernández, Miruldi Valcárcel, Georvis Téllez, Miladys Sánchez y Argelys Kessel

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Dpto. Genética y Mejoramiento de Plantas. Carretera Tapaste km 3.5. San José de las Lajas, La Habana. CP 32 700
e-mail: lguerra@inca.edu.cu

Spathoglottis plicata Blume, es un ejemplo de orquídea terrestre naturalizada en Cuba; esta especie, es un género nativo del sureste asiático y la costa del este de Australia. Se consideran de fácil crecimiento y se han naturalizado en algunas de las islas Hawaianas y del Caribe. Según reportes de la Sociedad Hortícola Real responsable del registro internacional de orquídeas híbridas, existen hasta la fecha más de 92 híbridos de *Spathoglottis* registrados a nivel mundial. El primer *Spathoglottis* híbrido fue registrado en 1932, *Spathoglottis Aureo-vieillardii* realizado por Veitch en 1897, un cruce entre *Spa. aurea* y *Spa. vieillardii*, éste último sinónimo de *Spa. plicata*. En este trabajo se presentan las principales características de dos genotipos cubanos de este género, obtenidos por un grupo de investigadores del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) mediante el empleo de las técnicas biotecnológicas y participativas. El primero *Spathoglottis plicata* 'Lorita', variante somaclonal de *Spa. plicata* var. Rosea y el segundo *Spathoglottis* 'Bella Lorena', primer híbrido de orquídea terrestre producido en Cuba, producto del cruzamiento interespecífico entre *Spa. plicata* y *Spa. kimballiana*. Estas nuevas especies contribuirán a la diversificación de esta familia y constituirán un valioso aporte a la agricultura ornamental cubana. 'Bella Lorena' actualmente está registrada en la base de datos de la Sociedad Hortícola Real de Inglaterra y ambas publicadas en la Lista Oficial de Variedades del Ministerio de la Agricultura.

'Lorita' and 'Bella Lorena', firsts terrestrial orchid genotype (*Spathoglottis*), was obtained in Cuba by means of the biotechnical and participative techniques

Spathoglottis plicata is a non epiphytic orchids naturalized in Cuba, it is original from the southwest of Asia and the coast of the east of Australia, it is considered as a plant of an easy growth and has a great importance among the amateurs around the world; that were the reasons that motivated this work. According to the Royal Horticultural Society, there exist up to date, more than 92 hybrids of *Spathoglottis* registered in the world. The first was reported in 1932, the *Spa. Aureo- vieillardii*, obtained by Veitch in 1897, a cross between *Spa aurea* and *Spa vieillardii*, this last synonym of *Spa. plicata*. This work reports the main characteristics of two Cuban genotypes of this genus (*Spathoglottis*). This was obtained by a group of researchers of the Biotechnology Laboratory of the Genetic Department of the National Institute of Agricultural Science in Havana. *Spathoglottis plicata* 'Lorita', somaclonal variant of *Spa. plicata* var. Rosea and the second *Spathoglottis* 'Bella Lorena', a first cuban hybrid of non epiphytic orchid, it was obtained from a cross between *Spa plicata* and *Spa kimballiana*. Actually it is registered Sander's List of database the Royal Horticultural Society. *Spa. 'Lorita'* and *Spa 'Bella Lorena'* was published in the Official List of Varieties of the Ministry of Agriculture.

Transformación genética de papaya Maradol con el gen truncado *p1* de PRSV-P

Liz García-Zare*¹, Pedro Valadez-Ramírez ², Salvador Guzmán-González³ y Laura Silva-Rosales⁴

¹Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
e-mail: liz_garciaz@hotmail.com

^{2,3}Laboratorio de Biotecnología, Universidad de Colima-México.

²e-mail: pvaladez84@yahoo.com.mx,

³e-mail: sguzman@ucol.mx

⁴Laboratorio de Interacciones Planta-Virus, CINVESTAV-IPN, Campus Guanajuato, México⁴ e-mail: lsilva@ira.cinvestav.mx

El cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) es uno de los frutales más importantes en las regiones tropicales y subtropicales del mundo sin embargo, es altamente susceptible al *Virus de la mancha anular de papaya* (PRSV), por ello se planteó la obtención de plantas transgénicas de papaya resistentes a PRSV mediante ingeniería genética: Se empleó el gen *p1* del potyvirus PRSV proveniente de aislamientos de plantas infectadas locales e, incorporado en el vector de clonación pCR@2.1-TOPO (Invitrogen), a partir de esta construcción se realizaron las subclonaciones hasta pCAMBIA 1301, este plásmido se constituye por el exón que codifica para *GUS* y que es dirigido por el promotor 35S CaMV y terminador NOS polyA; además de

los genes *npt II* (neomicina fosfotransferasa) y *hpt* (higromicina fosfotransferasa), que confieren resistencia a kanamicina e higromicina en la selección de bacterias y de tejido vegetal, respectivamente; Este estudio se realizó con la finalidad de optimizar la presión de disparo necesaria para los ensayos de transformación genética de embriones cigóticos y somáticos de papaya Maradol con el sistema Helios™ Gene Gun de Biorad y con el cassette de expresión que contiene el promotor 2X 35S del virus del mosaico de la coliflor, el gen truncado *p1* de *Papaya ringspot virus-P* y el terminador pA 35S. Ensayos histoquímicos con GUS y de supervivencia en medio de cultivo complementado con higromicina sirvieron como parámetros de evaluación de tal factor físico. La mayor expresión de GUS y el mayor porcentaje de supervivencia en medio de cultivo con higromicina ocurrieron con 200 lb/pulg². La aportación de este consiste en el uso del sistema biobalístico antes mencionado en papaya, además del gen viral empleado, como caso novedoso.

Genetic transformation of Maradol papaya with truncated gene *p1* of PRSV-P

Papaya (*Carica papaya* L.) is one of the most important fruit in tropical and subtropical world, however, is highly susceptible to *Papaya ringspot virus* (PRSV), so it proposed the production of transgenic plants of papaya with PRSV-resistant, through genetic engineering. We used the *p1* gene of PRSV potyviruses from local isolation and incorporated into the cloning vector pCR@2.1-TOPO (Invitrogen), from this construction were made subcloned in the plasmid pCAMBIA 1301, this plasmid is constituted by exon that codes for *GUS* and is mediated by the CaMV 35S promoter and NOS polyA terminator beside the genes *npt II* (neomycin phosphotransferase) and *hpt* (hygromycin phosphotransferase), conferring resistance to kanamycin and hygromycin in the selection of bacteria and plant tissues, respectively; This study was conducted in order to optimize the helium-based shot pressure applied in the current assays of particle bombardment using zygotic and somatic embryos of papaya Maradol as targets with the Helios™ Gene Gun from Biorad and with an expression cassette containing the 2X 35S promoter mosaic virus cauliflower, *p1* truncated gene of *Papaya ringspot virus*-and the terminator pA 35S. Histochemical analyses with *GUS* and survival percentage count up of bombarded explants in culture media with hygromycin were the key evaluation parameters for this physical factor. The highest *GUS* expression and the highest survival percentage were correlated with the optimal shot pressure. Results showed

that 200 lb/pulg² were the optimal value. This work provides and reinforces the ordinary use of this biolistic device in papaya in our labs and the novel application of a non-structural gene of PRSV.

Evaluación fenotípica de plantas transgénicas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) en cuanto a tolerancia al herbicida FINALE®, indicadores bioquímicos y caracteres agronómicos

Bárbara Valle*, Carlos Aragón, Carol Carvajal, Martha Hernández, Lourdes Yabor, José Carlos Lorenzo

Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila. Cuba. CP 69 450
e-mail: bvalle@bioplasmas.cu

La piña es la especie económica más importante de la familia *Bromeliaceae*. En la actualidad se desarrollan proyectos de investigaciones básicas y aplicadas para la obtención de mejores variedades en el cultivo. En Cuba se estableció un protocolo de transformación de la piña mediante *Agrobacterium tumefaciens* como parte del programa de mejoramiento genético. El presente estudio se enfoca en la atención de la evaluación de la primera generación vegetativa de plantas transgénicas de piña. Se compararon tres materiales de plantas de piña: el control macropropagado (no transformado), control micropropagado (no transformado), y plantas transformadas micropropagadas. A los tres meses de iniciado el experimento se le aplicó al 50% de las plantas de cada grupo el herbicida FINALE. La caracterización fue realizada después de un año de crecimiento en campo. Se comprobó la sobrevivencia de las plantas transformadas después de aplicado el herbicida. Entre las plantas micropropagadas transformadas aplicadas con el herbicida FINALE y las plantas control micropropagadas se observaron las siguientes diferencias: modificaciones en los niveles de fenoles de la célula, asociados a la pared, libres y totales, así como también las proteínas totales. Además, también se aprecian los cambios en la masa de la fruta sin corona. Entre las plantas transformadas micropropagadas que se les aplicó el herbicida FINALE y las plantas controles macropropagadas las diferencias se marcaron en los niveles de clorofila b, pigmentos totales de clorofila y las proteínas. Por otra parte, las actividades de la enzima amonio del fenilalanina – liasa, superóxido dismutasa y glutamina sintetasa fueron diferentes entre estos grupos de plantas. La altura de la planta, el diámetro, y la altura de la corona fueron también diferentes. Las variaciones encontradas en algunos indicadores bioquímicos no son lo suficientemente relevantes, porque los análisis bromatológicos de los frutos no mostraron

diferencias significativas al compararse los frutos de plantas transformadas con los de las no transformadas.

Phenotypic evaluation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) transgenic plants including herbicide tolerance FINALE®, biochemical side effects and agronomic traits

The pineapple is the most important economic species of the family *Bromeliaceae*. It is currently developing projects in basic and applied research to produce better crop varieties. In Cuba established a transformation protocol using *Agrobacterium tumefaciens* pineapple as part of the breeding program. The present report focuses on the evaluation of the first vegetative generation of transgenic plants. Three plant materials were compared: macropropagated controls (non-transformed), micropropagated controls (non-transformed), and micropropagated transformed plants. From each group, 50% of the plants were sprayed with FINALE® 3 months after initiation of the experiment. The characterization was performed after one year of field growth. It was proved the survival of transformed plants after application of the herbicide. Between the micropropagated transformed plants sprayed with FINALE® and the micropropagated control plants, the following differences were observed: modifications in levels of cell wall-linked, free and total phenolics, as well as, total proteins. Moreover, changes of the fruit mass without crown were also recorded. Between the micropropagated transformed plants sprayed with FINALE® and the macropropagated control plants, levels of chlorophyll b, total chlorophyll pigments and proteins were different. Furthermore, activities of phenylalanine ammonia – lyase, superoxide dismutase and glutamine synthetase were dissimilar. The plant height and diameter, and the crown height were also different. Until now we have evaluated transformed pineapple plants during hardening and field growth. Although some unexpected variations were recorded, we believe that they are not relevant enough to justify rejection of transgenesis as an important tool for pineapple genetic improvement.

Plantas de *Ipomoea batatas* transformadas con una versión vegetalizada del gen *cry7Aa1* de *Bacillus thuringiensis* var *galleriae*

Irene Álvarez*, Rolando Morán, Bárbara Usatorres, Danalay Somonte, Sonia Casas, Yordanka Verde, Aylin Nordelo

Laboratorio de Biología Molecular de Plantas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Circunvalación Norte y Avenida Finlay. Apartado postal 387. Camagüey 70 100. Cuba.
irene.alvarez@cigb.edu.cu

La actividad insecticida de la toxina Cry7Aa1 (de *B. t. var galleriae*) contra varias especies del género *Cylas* se ha descrito recientemente en bioensayos de laboratorio. Resultados de ensayos de unión con esta toxina confirman la afinidad a receptores en Vesículas de Membrana de Borde en Cepillo (BBMVs) de *Cylas formicarius*. Estos antecedentes se tomaron en cuenta para obtener plantas transgénicas de *I. batatas* resistentes a *C. formicarius*. En Cuba, más del 45% de las cosechas de este cultivo se ven afectadas por esta plaga. A través del servicio de síntesis de ADN de GeneArt (www.geneart.com) se obtuvo una versión vegetalizada del gen *cry7Aa1*, optimizada para la expresión en *I. batatas*. Se ensambló a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se clonó en el pMK-RQ (kan R) (Vector estándar de GeneArt) y se transformó en *E. coli*. La construcción final se verificó mediante secuenciación (DAC GeneArt-0900065). Se realizaron dos construcciones moleculares con *cry7Aa1* para la transformación de plantas. La primera en el vector binario pCambia 3301, que contiene el promotor mejorado de 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (2x35S-CaMV), la región 5' de inicio no traducible del Virus del Grabado del Tabaco (5'TEV), y el terminador 3' Poly A del CaMV (ter-CaMV). La segunda contiene la misma unidad transcripcional, flanqueada por Regiones de Asociación a la Matriz (MAR) del genoma del tabaco. Al incluir esta región se pretende evaluar su influencia en la expresión de la toxina en las plantas transgénicas e incrementar la estabilidad del transgén. Ambas construcciones son portadoras del gen *bar*. Este confiere resistencia a la fosfotricina y puede utilizarse como marcador de selección. Con estas construcciones moleculares se transformaron plantas de *Ipomoea batatas* vía *Agrobacterium tumefaciens*. Se seleccionaron en medio de cultivo que contenía fosfotricina los clones más resistentes y se comprobaron por PCR, confirmándose en todos los casos la presencia del gen *bar*. Otras pruebas moleculares como PCR para el gen *cry7Aa1*, 'Northern', 'Southern' genómico, y 'Western' blotting se encuentran en curso.

Transformed *Ipomoea batatas* plants with a plant-like version of *cry7Aa1* gene from *Bacillus thuringiensis var galleriae*

The Cry7Aa1 toxin (from *B. t. var. galleriae*) insecticide activity against several species belonging to *Cylas* ssp has been recently described in laboratory bioassays. Results of binding assays with Cry7Aa1 toxin confirm the affinity to Brush Border Membrane Vesicles (BBMVs) receptors of *Cylas formicarius*. These antecedents were taken into account for our

research group with the aim to obtain transgenic *I. batatas* plants resistant to *C. formicarius* attack. In Cuba, around 45% of this crop is affected by this pest. Through the DNA synthesis service of GeneArt (www.geneart.com), a synthetic version of *cry7Aa1* gene was obtained. It was optimized for expression in *I. batatas*. It was assembled from synthetic oligonucleotides and Polymerase Chain Reaction (PCR) products. Was cloned into pMK-RQ (kan R) (GenArt Standard Vector) and transformed in *E. coli*. The final construct was verified by sequencing (QAD GeneArt 0900065). Two molecular constructs carrying the *cry7Aa1* gene were obtained for plant transformation. The first one in pCambia 3301 11to evaluate its influence on protein expression of the toxin in transgenics plants, and to improve transgen stability. Both constructs carry the *bar* gen that confers resistant to phosphinothricin in transgenic plants and can be used as selection marker. Through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation several clones have been obtained with *cry7Aa1* molecular constructs. Clones resistant to phosphinothricin *in vitro* were tested by PCR, confirming the presence of the *bar* gene. Other molecular tests like PCR for *cry7Aa1* gene, Northern, Genomic Southern, and Western blotting are in progress.

Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa para el diagnóstico molecular de potyvirus en el cultivo del pimiento

Acela Díaz^{1*}, Madelaine Quiñones², Yanelis Acebo¹, Gloria del Barrio¹, Annia Hernández¹

¹Departamento de Microbiología y Virología. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 esquina J, Ciudad Habana, Cuba CP 10347. e-mail: acela@fbio.uh.cu

²Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba.

Las enfermedades causadas por potyvirus no pueden ser controladas una vez que la planta es infectada, al igual que ocurre en otras enfermedades virales. Por otro lado, la transmisión no persistente por áfidos representa un desafío para las estrategias de prevención y control de las enfermedades virales en cultivos de importancia económica. Sin embargo, un conjunto de medidas de manejo integrado de las enfermedades que afectan a los cultivos, pudieran evitar la introducción de virus a plantaciones sanas y jardines o evitar su diseminación. No obstante y a pesar de todo el trabajo realizado, en los últimos años se ha comenzado a observar un fuerte incremento de los síntomas asociados a estos virus en el pimiento, lo que supone la incidencia de nuevos potyvirus circulantes o variantes recombinantes de los virus ya presentes, comportamiento que es muy

frecuente en esta familia viral. Por ello, este trabajo tuvo como objetivo estandarizar una técnica para el diagnóstico molecular de potyvirus mediante el empleo de la RT-PCR con cebadores genéricos. Se realizó un análisis *in silico* de la capacidad de los cebadores CP1 y CP2 para detectar la presencia de potyvirus en el cultivo del pimiento, y demostrar la amplificación de una región conservada que contiene el gen que codifica para la proteína de la cápsida viral y posteriormente se procedió a la estandarización de ensayo de RT-PCR en una sola etapa. Los resultados muestran que la técnica empleada es altamente sensible y específica para el diagnóstico genérico de potyvirus en el cultivo del pimiento. Además, los resultados de este trabajo constituyen los primeros de este tipo para el país, ya que por primera vez se asiste al programa de mejoramiento genético del pimiento con un método de diagnóstico molecular.

Standardizing the polymerase chain reaction with reverse transcription for the molecular diagnose of potyvirus in pepper

The diseases caused by potyvirus, as many other viral plant diseases, cannot be controlled once the plant is infected. On the other hand, the non persistent transmission by aphids is a challenge for the prevention and control strategies of viral diseases in economically important crops. However, some integrated management of the diseases could prevent the introduction or spread of viral diseases to healthy plants and orchards. In spite of all the work that has been done, in the last years, it has been observed a rise in potyvirus-associated symptoms in pepper crop, which suggests the incidence of new potyvirus or recombinant potyvirus strains, which are very frequent in this family. This work is aimed to the standardization of a technique for the molecular diagnose through RT-PCR with generic primers. It was carried out *in silico* analysis to determine the ability of primers CP1 and CP2 to detect potyvirus in pepper and to prove the amplification of a conserved region that contains the gene for the viral coat protein. Then the standardization of the one-step RT-PCR assay was achieved. The results showed that this technique is highly sensitive and specific for the generic diagnose of potyvirus in pepper. This is the first report in Cuba for such results, since it is the first time to incorporate a molecular diagnose method for the Program for the Genetic Improvement of pepper crop.

Hibridación somática en limón mexicano para incorporar resistencia a factores bióticos

Alma Delia Hurtado Mercado*, M. Manuel Robles González, y Eugenio Martín Pérez Molphe Balch.

Universidad Autónoma de Aguascalientes.- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Tecomán. Km 35 Carretera Colima-Manzanillo, Colima, México. e-mail: adhmjem08@hotmail.com

El limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] es altamente sensible al *Virus de la tristeza de los cítricos* VTC. El desarrollo de variedades resistentes es la mejor opción para el control de la enfermedad. Algunas especies de cítricos pueden ser relativamente tolerantes a este virus. La hibridación somática vía la fusión de protoplastos es una alternativa viable para incorporar genes que confieran algún grado de tolerancia. Para la hibridación somática es necesario contar con callo embriogénico de alguno de los progenitores. En este trabajo se evaluó el potencial para desarrollar callo embriogénico de óvulos no desarrollados de limón mexicano y tres variedades de limón verdadero (*C. limón* Burm.), cultivados en medio de cultivo MT con sacarosa (EME+S), MT con 5 ml.l⁻¹ de Cinetina (DOG), y MT con 0.775 g.l⁻¹ de L-glutamina (H+H), todos adicionados con 500 mg.l⁻¹ de extracto de malta. La producción de callo embriogénico también se estudió en tejido de estilo estigma de limón mexicano cultivado en medio de cultivo MS adicionado con 500 mg.l⁻¹ de extracto de malta y 13.3µM de BAP. El medio de cultivo DOG resultó ser el mejor para inducción de callo utilizando óvulos como explantes. La fusión de protoplastos se realizó utilizando una suspensión de callo embriogénico en medio de cultivo H+H y hojas de plantas germinadas *in vitro* de ambos progenitores, haciendo fusiones en ambos sentidos.

Mexican Lime somatic hybridization to incorporate resistance to biotic factors

The Mexican Lime (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle) is highly sensitive to the citric tristeza virus. The improvement of resistance varieties is the best option to control the disease. Some citric varieties could be relatively tolerant to this virus. The somatic hybridization via protoplast fusion is viable to incorporate genes that confer some grade of tolerance. For somatic hybridization is necessary to have embryogenic callus from one of the parents. In this work we evaluated the potential to develop embryogenic callus from ovules from Mexican Lime and three varieties of true lime (*C. Limon* Burm), cultivated in MT media with sucrose (EME+S), MT with 5ml.l⁻¹ Kinetin (DOG) and MT media with 0.775 g.l⁻¹ L-glutamine (H+H), all with 500 mg.l⁻¹ of malt extract. We studied the production of embryogenic callus from stile and

stigma tissue too from Mexican Lime cultivated in MS media added with 500 mg.l⁻¹ of malt extract and 13.3µM of BAP. The DOG media was the best media for callus induction in ovules tissue like explants. The protoplast fusion were using an embryogenic callus suspension in H+H media and leaves from *in vitro* plants from both parents, making fusions in both senses.

Obtención y caracterización molecular del híbrido somático *Solanum tuberosum* x *Solanum mochiense*: I. Cultivo de protoplastos

Julio Chico-Ruiz*

Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n. Trujillo-Perú. e-mail: jchico22@gmail.com

En este trabajo se ajustaron las condiciones para la regeneración de plántulas a partir del cultivo de protoplastos, proceso indispensable para avanzar hacia la obtención de híbridos somáticos. Se realizó el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de plántulas *in vitro* de *S. tuberosum* y *S. mochiense*, estos explantes fueron sumergidos en solución CPW13M para inducir plasmólisis. Posteriormente se colocó en solución de enzimas celulasa R-10 al 1% y pectinasa Y-23 al 0.05% en la cual resultaron 6.48 x 10⁶ y 4.60 x 10⁶ protoplastos viables/500mg.l⁻¹ de tejido para *S. tuberosum* y *S. mochiense* respectivamente. Las mejores densidades de cultivo para los protoplastos fueron 5 x 10⁴ protoplastos/ml.l⁻¹ para los obtenidos de *S. tuberosum* y 1,5 x 10⁵ /ml.l⁻¹ para los aislados de *S. mochiense* empleando el sistema de cultivo en gotas de medio de cultivo KM8p solidificados con agar al 0.6% y recubiertas con medio de cultivo líquido KM8p con 100 g.l⁻¹ de glucosa y cefotaxim 300 ug.l⁻¹. Con las primeras divisiones celulares, se empezó a disminuir el nivel osmótico al renovar el medio de cultivo líquido con la mezcla de medio de cultivo KM8p:KM8 en proporción 3:1 y se continuó cada siete días en proporciones 2:1, 1:1 y 1:3 hasta la obtención de colonias y callos.

Obtention and molecular characterization of somatic hybrid *Solanum tuberosum* x *Solanum mochiense*: I. protoplast culture

In this paper we adjusted the conditions for regeneration of plantlets from protoplast culture, a process essential for progress towards obtaining somatic hybrids. We performed the isolation of protoplasts from the leaves of plantlets *in vitro* of *S. tuberosum* and *S. mochiense*, these explants were submerged in solution CPW13M to induce plasmolysis. Subsequently placed in enzyme solution cellulase R-10-1% and pectinase Y-23 to

0.05% which were 6.48 x 10⁶ and 4.60 x 10⁶ protoplasts viables/500mg of tissue for *S. tuberosum* and *S. mochiense* respectively. The best crop densities of protoplasts were 5 x 10⁴ protoplasts / ml for those from *S. tuberosum* and 1.5 x 10⁵ / ml for isolates of *S. mochiense* culture system using the half medium KM8p drops solidified with 0.6% agar and liquid medium KM8p coated with 100 g.l⁻¹ glucose and cefotaxime 300 ug.l⁻¹. With the first cell divisions, began to lower the osmotic level in renewing the liquid medium with half the mixture KM8p: KM8 in 3:1 ratio and continued every seven days in proportions 2:1, 1:1 and 1:3 until the acquisition of colonies and callus.

Avances recientes en el mejoramiento genético del aguacatero (*Persea americana* Mill) para la resistencia a *Phytophthora* spp. en Cuba

O. Coto^{*1}, A. Alvarez², M. Machado¹, C. Collazo¹, M. Peña¹, J.L. Fuentes², L. Santiago², V. Zamora¹, M.O. López³, R.I. Cabrera¹ y M. Ramos Leal⁴.

¹Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), Ave. 7ma, 3 005, Playa, C. Habana. Cuba

²Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear (CEADEN), 30 e/ 5ta y 7ma. Playa, C. Habana

³Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV).

⁴Facultad de Biología, Universidad de La Habana (UH), Dpto. de Microbiología, 25 y J, Vedado, C. Habana. Cuba

A pesar de su gran aceptación por los consumidores, enfermedades como la pudrición de la raíz causada por especies de *Phytophthora* han limitado la producción intensiva de aguacatero. El mejoramiento genético tradicional de este frutal es muy lento y el trabajo con *Phytophthora* resulta complicado. En Cuba solo se dispone de un cultivar bien identificado como única fuente de patrones de aguacatero el cual se refiere, además, como medianamente resistente a la pudrición de la raíz causada por *P. cinnamomi*. El objetivo de este trabajo consistió en utilizar técnicas biotecnológicas (marcadores moleculares e inducción de mutaciones) para asistir al programa de mejoramiento genético del aguacatero en Cuba. Para ello, se conformó, identificó y caracterizó, mediante marcadores morfológicos y moleculares, un banco de aislados de *Phytophthora* colectados en jardines de aguacatero y otras especies de frutales. Se utilizaron Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCRs) para la rápida y correcta identificación de tres especies de *Phytophthora*: *P. cinnamomi*, *P. palmivora* y *P. nicotianae* que permitieron informar por primera vez para Cuba la interacción *P. palmivora*-aguacatero y confirmar a nivel molecular la interacción *P. nicotianae*-aguacatero; la secuenciación de los productos de amplificación obtenidos mediante cebadores de la

región ITS confirmó los resultados anteriores. Se determinaron posibles cepas efectivas para la producción de toxinas mediante ensayos de patogenicidad *in vivo* utilizando ramas laterales e *in vitro* mediante ensayos conductimétricos utilizando hojas y raíces de plantas sanas obtenidas *in vitro* a partir de embriones cigóticos e incubadas en extractos crudos de los aislados obtenidos, estrategia que permitió confirmar las potencialidades patogénicas de varios de los aislados ensayados. Se determinaron las dosis letales medias a radiaciones Gamma para tres cultivares, resultado de gran interés para el mejoramiento genético y posibles mutantes están siendo evaluados en condiciones controladas para la resistencia a extractos crudos del patógeno.

Recent advances in breeding avocado (*Persea americana* Mill) for the resistance to *Phytophthora* spp. in Cuba

Despite the great demands of avocado fruits by consumers the intensive production has been limited because *Phytophthora*. On the other hand, breeding avocado by traditional methods is a time consuming task and the work with *Phytophthora* is complicated. In Cuba, only one well characterized cultivar is been used to obtain buds for the production of rootstocks; however that cultivar is reported showing a middle resistance level to root rot caused by *P. cinnamomi*. Our objective is to use biotechnological techniques (molecular markers and mutation induction) to assist the avocado breeding program in Cuba. In this sense, a *Phytophthora* collection was created from soil samples and fruits collected from avocado and other fruit trees orchards; the isolates obtained were identified and characterized using morphological and molecular markers. In this sense, Polymerase Chain Reactions were used for a rapid and accurate identification of three *Phytophthora* species: *P. cinnamomi*, *P. palmivora* and *P. nicotianae*, the results permitted to send the first report of the interaction *P. palmivora*-avocado in Cuba and also to confirm at molecular level the *P. nicotianae*-avocado interaction; the sequencing of the amplified products obtained using ITS primer pairs confirmed those results. *In vivo* and *in vitro* pathogenicity assays using lateral branches of avocado and conductimetric studies with leaves and roots of healthy plants obtained from zygotic embryos were employed respectively to determine possible strains for the production of toxins. These approaches permitted to confirm the pathogenic potentiality of some strains. Lethal doses (LD_{50}) to Gamma radiation were determined for three avocado cultivars and putative mutants are been evaluated for their resistance to crude extracts in greenhouses.

Efecto del daño con carborundum en la regeneración de yemas múltiples y en la expresión transitoria de β -glucoronidasa en nudos cotiledonales de *Phaseolus vulgaris*

I. Bermúdez-Carabaloso*, R. Collado, L.R. García, N. Veitía, D. Torres, C. Romero, G. Angenon¹

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

¹Laboratory of Plant Genetics. Vrije Universiteit Brussel. Belgium.

El frijol, presenta serias dificultades para la transformación genética. Los tratamientos físicos al tejido vegetal aumentan la posibilidad de infección por *Agrobacterium tumefaciens* y ha sido referido como un factor importante para el aumento de la eficiencia en la transferencia de los genes. Con el objetivo de determinar el efecto de la aplicación de carborundum a nudos cotiledonales de *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247 en la regeneración de yemas múltiples y en la expresión transitoria de β -glucoronidasa, se estudiaron diferentes tiempos de aplicación de una solución de agua con carborundum, combinada con la agitación en el vortex durante 0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 minutos. Los resultados mostraron que la duración del tratamiento por dos minutos afectó notablemente la zona de regeneración de la yema múltiple en el nudo cotiledonal. Cuando se aplicaron tiempos de 0.5, 1.0 y 1.5 minutos no se encontraron diferencias con el control sin tratar en la formación de una yema múltiple. La mayor expresión transitoria GUS se logró, con los tiempos de agitación de 1.5 y 2.0 minutos, expresada en el número de puntos azules en la zona de regeneración, con diferencias significativas con los tiempos de 0.5, 1.0 minutos y el control. A pesar de que la aplicación de la solución de agua con carborundum durante 1.5 minutos, logró la regeneración de una yema múltiple en el nudo cotiledonal y en muy pocos casos dos yemas múltiples, sí permitió aumentar la cantidad de puntos azules en esta zona, lo que se traduce finalmente en un aumento de la eficiencia de la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247.

Effect of damage with carborundum in the Regeneration of multiple buds and transient expression of β -glucoronidase in cotyledonary node of *Phaseolus vulgaris*

Beans, presents serious difficulties for genetic transformation. The physical treatment plant tissue increases the possibility of infection by *Agrobacterium tumefaciens* and has been referred to as an important factor for increasing the efficiency of gene transfer.

In order to determine the effect of applying to carborundum in cotyledonary node of *Phaseolus vulgaris* var. CIAP 7247 in the regeneration of multiple buds and transient expression of β -glucuronidase, we studied different time of application a water solution with carborundum, combined with the vortex agitation for 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 minutes. The results showed that the duration of treatment for two minutes affected the regeneration zone in the cotyledonary node. When applied times of 0.5, 1.0 and 1.5 minutes did not showed differences with the control in the multiple bud formation. Most transient GUS expression was achieved, with shaking times of 1.5 and 2.0 minutes, expressed in number of blue spots in the regeneration zone, with significant difference of 0.5, 1.0 minutes and the control. These results concluded that the application of the carborundum solution for 1.5 minutes, achieved at least a regeneration of multiple bud and average 9.68 blue spot in bean variety CIAP 7247, genetically transformed via *Agrobacterium tumefaciens*.

Nudos cotiledonales como blanco para la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247

R. Collado^{1*}, L.R. García¹, G. Angenon², I. Bermúdez-Caraballoso¹, N. Veitia¹, D. Torres¹, C. Romero¹, N. Bacallao¹

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

²Instituut Voor Moleculaire Biologie en Biotechnologie. Vrije Universiteit Brussel. Belgium.
e-mail: raulc@ibp.co.cu

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), es una de las leguminosas más difundida en el mundo, en particular en países de Asia, África y América Latina, donde representa una de las mayores fuentes calórico-proteica para cerca de 500 millones de personas. El frijol, como la mayoría de las leguminosas, presenta dificultades para la transformación genética. Estas dificultades van desde la introducción del gen hasta la regeneración de plantas, pasando por problemas como la falta de reproducibilidad, aplicabilidad para todas las variedades y la baja eficiencia de transformación. En el Instituto de Biotecnología de las Plantas se ha logrado tener un elevado porcentaje de regeneración organogénica vía directa en un importante cultivar cubano. Esto permitió desarrollar un trabajo con el objetivo de aplicar el nudo cotiledonal como explante blanco para la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. Los nudos cotiledonales fueron inoculados con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA101,

portando un vector binario con los genes, nptII como marcador de selección y gusINT para chequear expresión GUS. Varios parámetros relacionados con la transferencia de ADN vía *Agrobacterium tumefaciens* tales como, concentración de la bacteria, temperatura, fotoperíodo y período de co-cultivo, y la concentración de Acetosyringona fueron definidos. La temperatura, el fotoperíodo y el período de co-cultivo tuvieron un efecto significativo en la transferencia de ADN vía *Agrobacterium tumefaciens*. Además, la adición de acetosyringona al medio de cultivo para la inducción de la bacteria incrementó la expresión GUS en nudos cotiledonales. Sin embargo, las concentraciones de la bacteria estudiadas no presentaron diferencias significativas. Combinando los mejores resultados de cada parámetro evaluado, fue establecido un procedimiento para la transferencia de ADN vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. Este protocolo puede ser aplicado para analizar otros parámetros en la transformación genética de esta especie.

Cotyledonary nodes as the target for transformation via *Agrobacterium tumefaciens* in *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), is one of the most defunded legumes in the world, in particular in countries from Asia, Africa and Latin America, where it represents one of the biggest caloric- proteinic source for about 500 millions of people. Common bean, like most of legumes, is recalcitrant to the genetic transformation, passing by problems as the lack of reproducibility, applicability for all variety and low transformation efficiency. At the Instituto de Biotecnología de las Plantas, a high percentage of regeneration by direct organogenesis has been achieved in an important Cuban cultivar. It allows developing a work with the objective to apply the cotyledonary node as a target for *Agrobacterium*-mediate transformation in *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. Cotyledonary nodes were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 strain harboring a binary vector nptII gene as selectable market and gusINT gen to check GUS expression. Several parameters involved *Agrobacterium* DNA transfer such as, bacteria concentration, temperature, photoperiod and period of co-culture and the Acetosyringone concentration were defined. The co-culture temperature, photoperiod and period had a significant effect on *Agrobacterium* DNA transfer. Besides, the Acetosyringone addition into bacteria induction culture medium increased the GUS expression in cotyledonary nodes. However the bacteria concentrations studied did not show significant differences. By combining the best results from every evaluated parameter an *Agrobacterium* DNA transfer procedure was established for *Phaseolus vulgaris* L. cv. CIAP 7247. This protocol can be applied to

analysis other parameters in the genetic transformation of this specie.

Heat shock induced excision of selectable marker gene in transgenic banana by the Cre-lox site-specific recombination system

Borys Chong-Pérez^{1,2*}, Rafael G. Kosky¹, Maritza Reyes¹, Luis Rojas¹, Barbara Ocaña¹, Marisol Tejeda¹, Blanca Pérez¹ and Geert Angenon²

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

²Laboratory of Plant Genetics, Institute for Molecular Biology and Biotechnology, Vrije Universiteit Brussel, B-1050 Brussels, Belgium. *email: borys@ibp.co.cu

Selectable marker genes are frequently used as a powerful selection tool for transgenic event production, but, after selection process these genes are not longer needed. Moreover, they may cause public concern and technological problems. Several excision systems exist but few have been optimized or shown to be functional for clonally propagated crops. Marker free transgenic banana cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) plants have been obtained using a Cre-loxP auto-excision strategy. We used a binary expression vector in which the recombinase gene *cre* under the control of a heat shock promoter and selectable markers genes cassettes were placed between two loxP sites in direct orientation, while the gene of interest was inserted outside of the loxP sites. Heat shock promoters GmHSP17.6-L and AtHSP18.2, from soybean and *Arabidopsis* respectively, were tested. The results showed that a transient heat shock treatment of primary transgenic embryo is sufficient for inducing *cre* and excising the *cre*, *hpt* and *codA* genes. Excision efficiency, as determined by PCR and Southern hybridization was 59.7 and 44.0% for GmHSP17.6-L and AtHSP18.2 promoters, respectively. Spontaneous excision was not observed in 50 plants derived from untreated transgenic embryos. The system described here is simple and might be extensively applicable for the production of marker-free transgenic plants of many crop species.

Análisis molecular de la estabilidad de transgenes en plantas de banano cv. Cavendish Enano (*Musa AAA*) micropropagadas durante largos periodos

Luis Rojas, Rafael G. Kosky, Maritza Reyes, Blanca Pérez, Borys Chong-Perez

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

Los plátanos y bananos constituyen fuente de alimento y de ingresos para millones de personas en el mundo. Estos cultivos son afectados por varias plagas y enfermedades. La transformación genética es una de las vías más importantes para el mejoramiento genético debido a las dificultades que se presentan por poliploidía, esterilidad y largo ciclo de vida en los cultivares de interés agronómico. En este trabajo se presenta la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* del cultivar de banano 'Cavendish Enano' (*Musa AAA*) y se hace un estudio de la estabilidad de los transgenes en cinco líneas micropropagadas durante doce meses. Las plantas fueron analizadas en el primer subcultivo mediante ensayo histoquímico GUS, PCR e hibridación por Southern. En este último ensayo se demostró que las líneas contenían entre uno y tres copias del t-ADN. En los subsiguientes subcultivos se tomaron cinco plantas al azar por cada línea y fueron analizadas por PCR, demostrándose durante los 12 subcultivos que todas las plantas contenían ambos transgenes.

Desarrollo de una metodología para la inducción de mutaciones en el cultivar 'CEMSA 3/4' (*Musa AAB*) a partir de suspensiones celulares embriogénicas

Jorge López Torres^{1*}, Rafael G. Kosky², Nery Montano Pérez¹, Damicela Reinaldo Álvarez¹, Manuel Cabrera Jova¹, Aymé Rayas Cabrera¹, Víctor Medero Vega¹, Milagros Basail Pérez¹, Arletys Santos Pino¹, José Ventura Martín¹, Germán Rodríguez Rodríguez¹

¹Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP. 53 000, Villa Clara, Cuba. *email: jlopez@inivit.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830

Los bananos y platanos representan una fuente estable de alimentos para varios millones de personas en el trópico y subtropico. En Cuba, este cultivo constituye una alta prioridad en el programa nacional alimentario, debido a su capacidad de producir durante todo el año, alta demanda y diversidad de usos. Sin embargo, la enfermedad de la Sigatoka Negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, las plagas y las condiciones climáticas adversas, han ocasionado pérdidas significativas en los rendimientos de este cultivo. Teniendo en cuenta lo anterior se trabajó en los objetivos siguientes: determinar la Dosis Letal Media (DL₅₀) para la irradiación con rayos gamma de suspensiones celulares embriogénicas (SCE) en el cultivar 'CEMSA 3/4'. Se utilizaron por cada tubo de Ependorf irradiado 0.4 ml de células ajustada a 25% de Volumen de Células Sedimentadas en fase de multiplicación, después

de transcurridos cuatro días del subcultivo. Se evaluó el total de variantes (%) en relación con las SCE no tratadas. Basado en caracteres agronómicos deseables, tales como disminución de la altura de la planta, reducción de los días a florecer, mayor rendimiento y tolerancia a la Sigatoka Negra, fueron seleccionadas posibles mutantes. Las irradiaciones realizadas propiciaron el desarrollo de plantas con menor altura y con disminución del ciclo de floración. Se obtuvieron además plantas del tipo French plantain.

Development of a methodology for mutation induction of cultivar 'CEMSA 3/4' (*Musa* AAB) from embryogenic cell suspensions

Bananas and plantains represent a major staple food for many millions of people in the tropics and subtropics. In Cuba, this crop constitutes a high priority of the national food program because of its capacity of producing fruit all year round, high demand and diversity of use, however, Black Sigatoka disease, caused by the leaf pathogen *Mycosphaerella fijiensis*, and pests and stress climatic conditions, has resulted in significant yield losses in this crop. Taking into consideration the previous information, the following research objectives are being developed: to determine the lethal dose at 50% for irradiation (gamma rays) and mass mutagenesis (single dose) on embryogenic cell suspensions from cultivar 'CEMSA 3/4'. From embryogenic cell suspensions (ECS) in the multiplication stage, suspensions were selected four days after the subculture. Later, the settled cell volume (SCV) was adjusted to 25% and 0.4 ml of cells was added to each Ependorf tube for irradiation with gamma rays. Total frequency variants (%) in relation to non-treated ECS were evaluated. Based on desirable agronomic traits such as low height, early flowering, high yield and increased tolerance towards Black Sigatoka, potential improved variants were selected. Irradiations with gamma rays to embryogenic cell suspensions resulted in a shorter stature in regenerated plants, as well as, a reduction in their flowering cycle. Besides, plants of French plantain type were obtained, so, it is necessary to look for new alternatives to fulfill this important objective for the future genetic breeding programs in bananas and plantains.

Empleo de las radiaciones ionizantes (Co60) para la obtención de mutantes de porte bajo en *Musa* spp. cv. 'Zanzibar' (*Musa* AAB)

José de la C. Ventura*, Jorge López, Danney Armario, Sergio Rodríguez, Juan R. Gálvez, Teresa Ramírez, Lianet González, Damisela Reynaldo, Nery Montano, Marleny Torres, Yadelys Figueroa, Julia Albert.

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

Los esfuerzos en el Mejoramiento genético de *Musa* usando métodos tradicionales están cargados de obstáculos. En la aplicación de la mutagénesis *in vitro* combinado con el cultivo de tejidos, existen pocos resultados en la obtención de mutantes de porte bajo en plátanos, para evitar los daños ocasionados por las tormentas tropicales, las que representan un 30% de pérdidas. La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y áreas de campo del INIVIT a partir del año 1987 hasta el 2009. Se utilizó el procedimiento descrito por la OIEA para la inducción de mutaciones, con algunas modificaciones. Se aislaron brotes meristemáticos (2 - 3 mm) de las yemas formadas *in vitro*. Las radiaciones ionizantes se aplicaron a una dosis de 50 Gy/min. Se generaliza un mutante 'INIVIT PV 06 30' (AAB), dadas las evidencias de convivencia con la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), altura promedio de 2.26 – 2.65 m, racimo en forma de cono truncado con 12 - 16 dedos por mano y 30 por racimo, con sabor astringente predominante. El rendimiento agrícola oscila entre 20.10 y 26.6 kg/racimo. Las caracterizaciones morfológicas y moleculares demostraron las diferencias entre las tres variantes seleccionadas con respecto al cultivar donante. El nuevo mutante está propuesto para ser registrado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) como un nuevo cultivar. Los trabajos de multiplicación y selección fueron realizados con la participación de biofábricas y productores de avanzada de Guantánamo, Granma, Holguín, Villa Clara, Cienfuegos y Ciego de Ávila, Cuba.

Differential expression analysis of selected genes from the gibberellin signaling pathway during seed germination of the Costa Rican papaya hybrid 'Pococi'

Katrin Mueller^{1,3}, Luis Barboza¹, Neiva Sanchez², Víctor M. Jiménez^{1*}

¹Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS). Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica

²Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC). Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica

³Technische Universität Carolo Wilhelmina zu Braunschweig. 38104 Braunschweig, Germany

Carica papaya is a tree-like, semi wooden herb, native to Central America and the Caribbean. Nowadays it is cultivated throughout the tropical and subtropical regions for its sweet fruits and, to a lesser degree, for industrial papain production. A problem for commercial production of papaya hybrids is the,

sometimes, slow and irregular germination process. By application of gibberellic acid, germination has often been improved in this species. The aim of this study was to characterize seed germination in the Costa Rican papaya hybrid 'Pococi' and some underlying molecular mechanisms of gibberellin signaling during the process. Therefore, the effects of seed after-ripening, of gibberellic acid treatments and of inhibiting the gibberellin biosynthesis by paclobutrazol, on germination were evaluated. Four genes, putatively homologous to key genes of the DELLA dependent gibberellic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*, *gibberellin-20-oxidase-3*, *Sleppy1*, *RGA-like2* and *serine-type carboxypeptidase like 44*, were found in *Carica papaya* using BLAST. The expression of these genes during germination was also analyzed. The fact that testa rupture was positively influenced by exogenous gibberellic acid application and seed after-ripening, while the radical protrusion was not influenced by the latter, indicate that 'Pococi' had only some signs of seed dormancy, the seeds not being truly dormant. Additional outputs of this work were setting up most favorable gibberellic acid and paclobutrazol concentrations for the germination assays of this genotype, and finding a protocol for RNA isolation from papaya seeds. Moreover, all studied genes were found to be expressed in imbibed papaya seeds, using reverse-transcription PCR. Results obtained up to now support the hypothesis, that germination signaling in *Carica papaya* is based on the same mechanisms that are known for *Arabidopsis thaliana*. Within the next weeks, we will be able to quantify the expression of these genes by quantitative real-time PCR.

Análisis de la expresión diferencial de genes seleccionados asociados a la vía de señalización de las giberelinas durante la germinación de semillas del híbrido costarricense de papaya 'Pococi'

Carica papaya es una planta semi-leñosa, nativa de América Central y el Caribe. Actualmente es cultivada en regiones tropicales y subtropicales para la producción de frutas y papaína. Un problema durante la producción de híbridos de papaya, es la germinación lenta e irregular de semillas que han sido almacenadas. Consecuentemente se ha aplicado ácido giberélico (AG_3) para mejorar la germinación en esta especie. El objetivo del trabajo fue caracterizar la germinación del híbrido costarricense 'Pococi' y evaluar la expresión de ciertos genes asociados a la vía de señalización de las giberelinas. Para esto se evaluaron los efectos del almacenamiento, la aplicación de AG_3 y de paclobutrazol (inhibidor de la biosíntesis de giberelinas) en la germinación de semillas de papaya Pococi. Los genes *gibberellin-20-oxidase-3*, *Sleppy1*,

RGA-like2 y *serine-type carboxypeptidase like-44*, putativamente homólogos a genes de la vía DELLA de señalización de las giberelinas en *Arabidopsis thaliana*, fueron encontrados en papaya por medio de BLAST. y su expresión fue evaluada durante la germinación. El hecho de que la ruptura de la testa fue positivamente influenciada por la aplicación exógena de AG_3 y el almacenamiento de las semillas, así como que la brotación de la radícula no fue influenciada por este último factor indican una latencia incipiente en 'Pococi'. Adicionalmente, se estimaron las concentraciones óptimas de AG_3 y de paclobutrazol para las pruebas de germinación, así como el protocolo más eficiente para el aislamiento de ARN de semillas de papaya. Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR) se encontró que todos los genes estudiados se expresaron en semillas imbibidas. Resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que los mecanismos de señalización en papaya son los mismos que en *Arabidopsis*. A futuro se espera cuantificar la expresión de estos genes por medio de PCR en tiempo real.

Genotypic competition among elite wheat breeding lines under irrigated and rainfed conditions

Ayaz Khan and Fida Mohammad

Department of Plant Breeding and Genetics. Faculty of Crop Production Sciences NWFP Agricultural University, Peshawar-Pakistan

Development of high yielding cultivars is one of the prime objectives of all wheat breeding programs. The experiment was conducted during 2008-09 at NWFP Agricultural University Peshawar. Fifteen elite wheat breeding lines were evaluated for yield and yield contributing traits under irrigated and rain-fed field conditions. Genotypes showed significant ($P \leq 0.01$) differences for days to heading, days to maturity, plant height, spikes ha^{-1} , grains spike $^{-1}$, grain weight spike $^{-1}$, biological yield, grain yield and 100-grain weight except harvest index. The G x E interaction were significant ($P \leq 0.05$) for plant height and spikes ha^{-1} and non-significant ($P \geq 0.05$) for rest of the traits. Mean data ranged from 121 to 109 days, 166 to 152 days, 108.14 to 93.95 cm, 3060000 to 2260000 spikes ha^{-1} , 46 to 64 grains spike $^{-1}$, 2.90 to 1.92 g, 10489 to 13311 kg ha^{-1} , 2933 to 4044 kg ha^{-1} , 33.16 to 25.90 %, 5.31 to 3.93 g for days to heading, days to maturity, plant height, spikes ha^{-1} , grains spike $^{-1}$, grain weight spike $^{-1}$, biological yield, grain yield, harvest index and 100-grain weight. Correlation analysis revealed that days to maturity with days to heading, spikes ha^{-1} , 100-grain weight, biological yield and grain yield were significantly positive.

Associations of plant height with grains spike⁻¹ and grain weight spike⁻¹ were significantly positive. Correlations of spikes ha⁻¹ with days to maturity, biological yield and grain yield were significantly positive. Significantly positive correlations of grains spike⁻¹ with plant height, grain weight spike⁻¹, biological yield, grain yield and harvest index. Correlations of 100-grain weight with days to heading and days to maturity were significantly negative while with grain weight spike⁻¹ and grain yield was significantly positive. Biological yield exhibited significantly positive correlations with days to heading, days to maturity, spikes ha⁻¹, grains spike⁻¹, grain weight spike⁻¹ and grain yield. Associations of grain yield with days to maturity, spikes ha⁻¹, grains spike⁻¹, grain weight spike⁻¹, biological yield, harvest index and 100-grain weight were significantly positive. Based on the results of this study, most of the breeding lines performed well for grain yield but this needs to be confirmed over years and locations for conclusive recommendations.

Marker-assisted selection of maize lines against drought tolerance at early growth stages

Malik N. Shuja*, Aqib Iqbal, Ijaz Ali, Muhammad Ali

Institute of Biotechnology and Genetic Engineering (IBGE), NWFP Agricultural University Peshawar, Pakistan. maliknshuja@yahoo.com

Drought causes significant decrease in yield of maize (1, 2 and 3). Molecular markers are indispensable tool to study the regulatory genes involved in drought tolerance and makes the selection of drought tolerance genotypes more feasible. Twenty two recurrent selection lines and three established varieties of maize were evaluated for their drought tolerance in a pot experiment. Withholding water from the pots for 20 days imposed drought stress. The genotypes data of Maize exhibited variation in their drought tolerance potential. Five RAPD primers (GLA11, GLB07, GLB10, GLD10 and GLD20) amplified 2.68, 5.2, 4.12, 2.96 and 3.82 bands per genotype respectively. Three primers, GLB07, GLD10 and GLD20 amplified DNA fragments of 2100, 2150 and 700 bp respectively, that were associated the RWC, and GLD10 amplified a band associated with electrolyte leakage. J175-1 was found to have minimum water loss through transpiration, maximum fresh weight, total chlorophyll and chlorophyll a content and have maintained maximum chlorophyll a/b ratio. J175-2 had attained maximum leaf area and could maintain low transpirational water loss, total chlorophyll and chlorophyll a content and chlorophyll a/b ratio. The genotype J158-2 had the highest RWP, plant height and total chlorophyll a content. It has suffered the least damage to membrane and RBCL. The other lines having

good potential of drought tolerance were P28-2, P28-3 and P43-2. It was further concluded from the data that the genotypes vary in their potential to minimize damage to different indicators.

Expresión de genes *nptII-gus* en plantas de *Paulownia elongata*

Osvaldo A. Castellanos-Hernández^{1*}, Araceli Rodríguez-Sahagún¹, Gustavo J. Acevedo-Hernández².

¹Departamento de Ciencias Básicas, Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad Núm. 1115, Ocotlán, Jalisco. México.
e-mail: ocnoscr@cuci.udg.mx, ocnoscr@gmail.com

²Department of Biology, University of Western Ontario, N6A 5B7 London, Ontario Canada.

Se obtuvieron plantas de *Paulownia elongata* transgénicas mediante el bombardeo con microproyectiles y ADN en explantes de hoja. Se desarrolló un sistema eficiente para la regeneración de plantas *in vitro* basado en la formación de callos organogénicos derivados de explantes de hoja. Los mejores resultados se obtuvieron con el medio de cultivo MS con 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA). Los explantes de hoja se bombardearon con el plásmido pBI121, el cual contienen el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina como gen marcador y el gen *gus* que codifica la β -glucuronidasa, como gen reportero. Las plantas obtenidas que mostraron resistencia en medio suplementado con 50 mg.l⁻¹ de kanamicina fueron establecidas en condiciones de invernadero. La inserción del gen foráneo fue demostrado por análisis de PCR. Este trabajo proporciona un protocolo eficiente de transformación para la especie.

Expression of *nptII-gus* genes in plants of *Paulownia elongata*

Stable transgenic *Paulownia elongata* plants were obtained by microprojectile bombardment of leaf explants. An efficient system for plant regeneration based on shoot morphogenesis derived from leaf segments was developed. The best results were obtained with MS basal medium with 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthalenacetic acid (NAA). Leaf explants were bombarded with plasmid pBI121, that contained *nptII* gene, conferring kanamycin resistance and the *gus* gene expressing the β -glucuronidase as a reporter gene. Plants that showed resistance obtained in medium supplemented with 50 mg.l⁻¹ of kanamycin were established in greenhouse conditions. The insertion of foreign gene was demonstrated by PCR analysis. This paper provides an efficient protocol processing for the species.

METABOLISMO SECUNDARIO

Excreción de proteasas durante el cultivo *in vitro* de *Hohenbergia penduliflora* (L.) Rich. Mez. en biorreactores de inmersión temporal

Mayelin Mora^{*}, Aurora Pérez, Carol Carvajal, Reinaldo Trujillo, Martha Hernández

Laboratorio de Ing. Metabólica. Centro de Bioplantas. UNICA. Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila. Cuba.
e-mail: mayelin@bioplantas.cu

El análisis de secuencias completas de varios genomas ha mostrado que aproximadamente el 2% de la información codificada por los genes son proteasas, lo que indica que es éste uno de los grupos funcionales de enzimas más grande y mejor caracterizado. Las plantas de la familia *Bromeliaceae* son una fuente natural rica en cisteino proteasas. Estas enzimas son frecuentemente utilizadas en la industria alimentaria, biotecnológica y médico-farmacéutica. Estudios recientes informan del efecto antitumoral, antitrombótico y antimetastático. La *Hohenbergia penduliflora* (L.) Rich. Mez., es miembro de esta familia botánica. Se ha demostrado la presencia de actividad proteolítica en extractos enzimáticos de varios órganos de esta planta. De ahí la importancia de esta investigación en la propagación *in vitro* de *Hohenbergia penduliflora* (L.) Rich. Mez. como alternativa para la obtención de enzimas proteolíticas *in vitro*. Se estudió el efecto de diferentes citoquininas en la fase de multiplicación donde los mejores resultados (0.37 brotes/explante) se obtuvieron con 6-benciladenina. La presencia mayoritaria de raíces se logró en el medio de cultivo que contenía 6-furfurilaminopurina (5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de BAP (0, 4.4, 8.8 y 13.2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) y el mejor resultado se obtuvo con 8.8 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Al estudiar el efecto del suplemento de ácido naftalenacético en este medio de cultivo, donde se utilizaron dos tratamientos: 0 y 1.61 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de ácido naftalenacético, el mejor resultado se obtuvo al utilizar este regulador. La ausencia del mismo en el medio de cultivo provocó una marcada disminución de la brotación. Como un último experimento se realizó la evaluación de la excreción de proteasas durante el crecimiento de *Hohenbergia penduliflora* Mez. en biorreactores de inmersión temporal donde se evidenció la excreción de proteasas al medio de cultivo en las condiciones evaluadas.

Proteases excretion during *Hohenbergia penduliflora* (L.) Rich. Mez. *in vitro* culture in temporary immersion bioreactors

The sequence analysis of several complete genomes has shown that about 2% of the information encoded

by genes are proteases, indicating that this is one of the functional groups of enzymes largest and best characterized. Plants of *Bromeliaceae* family are a natural source of cysteine proteases. These enzyme are frequently used in pharmaceutical, biotechnological and food industries. In recent years, their effect as anti-inflammatory, antimetastatic, antithrombotic and anti-tumoral has been reported. The *Hohenbergia penduliflora* (L.) Rich. Mez., a member of this botanical family. It has demonstrated the presence of proteolytic activity in enzymatic extracts of various organs of this plant. Hence the importance of this research in the *in vitro* propagation of *Hohenbergia penduliflora* (L.) Rich. Mez. as an alternative for obtaining proteolytic enzymes *in vitro*. The effect of different cytokinins in the multiplication stage where the best results (0.37 shoots / explant) were obtained for 6-benzyladenine. The preponderance of roots was achieved in medium containing 6-furfurilaminopurina (5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). The effect of different concentrations of BAP (0, 4.4, 8.8 and 13.2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) and the best results were obtained with 8.8 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. In studying the effect of naphthaleneacetic acid supplement in this environment, where both treatments were used: 0 and 1.61 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ naphthaleneacetic acid, the best result was obtained when using this controller. The absence of this in the culture medium caused a marked decrease in sprouting. As a last experiment was the assessment of protease excretion during growth of *Hohenbergia penduliflora* Mez. In temporary immersion bioreactors that evidenced the excretion of proteases into the culture medium in the conditions evaluated.

Separación e identificación de diterpenos obtenidos a partir de exudados foliares de accesiones de *Nicotiana*

Capdesuñer Ruiz Yanelis^{*1}; Tandron Moya Yudelsy²; Matros Andrea²; Hernández de la Torre Martha¹, Mock Hans-Peter²

¹Lab. de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantas, Carr. a Morón km 9 CP 69 450. Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: ycapdesuner@bioplantas.cu

²Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben, Germany.

La superficie foliar de muchas plantas terrestres está cubierta por pelos llamados tricomas. Los tricomas glandulares de las plantas permiten que se acumulen grandes cantidades de metabolitos en el espacio entre la pared de las células glandulares y la cutícula que es virtualmente fuera

del cuerpo de la planta. Todas las especies de plantas que acumulan grandes cantidades de diterpenos en los exudados foliares presentan tricomas. Los tricomas glandulares de *Nicotiana tabacum* están involucrados en la secreción de diterpenos y ésteres de azúcares fundamentalmente, principalmente de dos clases de diterpenos: cembrenoides (CBTdiols y CBTols), y los labdenoides (ej: cis-Abienol). La composición y cantidad de los diterpenos es muy variable en especies de *Nicotiana*. En este trabajo se desarrolla un método analítico de cromatografía líquida para la separación, identificación y determinación cuantitativa de cinco diterpenos en extractos de exudados foliares. El método se estableció con el uso de una columna C18 en fase reversa, metanol como fase móvil y condiciones de gradiente para desarrollar el perfil, la cuantificación y comparación de diterpenos en exudados foliares de diferentes accesiones de *Nicotiana*. Los exudados foliares se colectaron sumergiendo las hojas en diclorometano. Los extractos secos se sometieron a una reacción de hidrólisis para eliminar los ésteres de azúcares. El método establecido permitió evaluar el perfil de diterpenos de un gran número de muestras que mostraron una composición variada de estos metabolitos secundarios.

Isolation and identification of diterpenoids from leaf exudates of *Nicotiana* accession

The leaf surface of most terrestrial plants is covered with plant hairs called trichomes. Secreting glandular plant trichome which accumulates large quantities of metabolic compounds in the space between their gland cell walls and cuticle permit the plant to secrete in a compartment that is virtually outside the plant body. All reported plant species which accumulate large amounts of diterpenes in leaf exudates have trichomes. In the case of *Nicotiana tabacum* its glandular trichomes, produce a secretion over half of which is composed of diterpenoids and sucrose esters mainly, diterpenoids belonging to two classes, cembranes (CBTdiols and CBTols) and labdanes (ex: cis Abienol). Among *Nicotiana* species the diterpenoids composition and quantity is very variable. In this work an analytical LC method for the separation, identification, quantitative determination of 5 diterpenoids in *Nicotiana* leaf exudate extract was developed. The method was established using C18 column on reverse phase and methanol as mobile phase with gradient conditions was used for the profiling, quantification and comparison of diterpenoids in tobacco leaf dried exudates from *Nicotiana* accessions. Leaf exudates were collected by dipping in dichloromethane. Before extraction of

diterpenoids the sample is subjected to a hydrolysis reaction to remove sucrose esters. The established method is found to be suitable for the profiling of a large number of samples showing a different composition of these secondary metabolites.

Phenolic content from leaves-derived calli of *Theobroma cacao* L.

Y. Quirós*, J. Quiñones, R. Trujillo, T. Augustine, Y. Capdesuñer, J. Borroto, M. Hernández

Bioplant Center. University of Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 9 CP 69 450. Ciego de Ávila. Cuba.
e-mail: yemeys@biopplantas.cu

In higher plants, many phenomenon and roles are attributable to the secondary metabolites. The nature of polyphenol compounds in plants is complex. *Theobroma cacao* L. is the starting material from chocolate production and it is known in popular medicine as an antiseptic, diuretic and parasiticide. Chemically, cacao seeds contain fat, theobromine, caffeine, starch, β -carotene and phenolic compounds. Phenols have been associated with plant and tissue maturation processes, defense mechanisms, and sensory characterization of plant-derived food products. *In vitro* culture is an alternative source for the production of secondary metabolites. The aim of this work was to determine the phenolic content from leaves-derived calli of *Theobroma cacao* L. The best time for disinfection of young leaves to form calluses were 10 and 15 min. Moreover, the major formation of calli were related with 3,0 and 1.0 μ M of indolbutiric acid (IBA). Conversely, during formation of calli the major soluble phenolic content was detected when IBA was not used meanwhile the major concentration of total phenolic compounds and phenols linked to the cell wall were determined with the use of higher concentration of IBA.

Contenido de fenoles en callos provenientes de hojas de *Theobroma cacao* L.

En plantas superiores muchos fenómenos y papeles se atribuyen a metabolitos secundarios. La naturaleza de los compuestos polifenólicos en plantas es compleja. *Theobroma cacao* L. es el material de partida para la producción de chocolate y se conoce en la medicina popular como antiséptico, diurético y antiparasitario. Químicamente, las semillas de cacao contienen grasas, theobromina, cafeína, almidón, β -caroteno y compuestos fenólicos. El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de fenoles en callos provenientes de hojas de *Theobroma cacao* L. Los mejores tiempos de desinfección de las hojas jóvenes, para la formación

de callos, con los menores porcentajes de contaminación y mayor formación de callos, fueron los 10 y 15 minutos. Se logró una mayor formación de callos, a partir de hojas jóvenes, al utilizar 3.0 y 1.0 μM de ácido indol butírico. En la formación de callos a partir de hojas jóvenes, el mayor contenido de fenoles solubles se detectó cuando no se utilizó ácido indol butírico, mientras que la mayor concentración de fenoles ligados a la pared y totales se registraron para la mayor concentración de la hormona.

***In vitro* cultures of flax as a bioplatfrom to assess allelopathic activities of plant extracts and other natural products**

Ferreira P¹, Pereira J¹, Paulo J¹, Fernandes-Ferreira M^{1,2}, Ferreira AM³, Aguiar C^{1,4}, Cunha A^{1,2*}

*e-mail: accunha@bio.uminho.pt

¹Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga, Portugal.

²Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas (CITAB); pólo Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga, Portugal.

³Centro de Química, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001-801 Vila Real, Portugal.

⁴Centro de Biología Molecular e Ambiental (CBMA), Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga, Portugal.

In vitro culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) was started 16 years ago in our lab, and several types of cultures (suspensions, callus, adventitious shoots, plantlets, etc) with different characteristics (non-morphogenic and embryogenic calli, with or without chlorophyll, etc) were established. Also, phytochemical analysis of *in vivo* and *in vitro* grown aromatic and medicinal plants (MAP) and identification of bioactivities of MAP extracts and compounds have a long tradition in our groups. With this background a study was initiated with the objective to evaluate the potential of *in vitro* flax cultures as a fast-cheap-versatile bioplatfrom to identify biological activities of plant extracts and other natural products, from sub-cellular to whole plant levels. During the last 4 years several plant extracts obtained with different methods and from different plant organs, plant species and families were tested by addition to the culture media. Biological effects were analysed from DNA (by comet assay) and cell cycle (by flow cytometry), to physiological (using chlorophyll a fluorescence analysis) and plant developmental levels. The overall results allowed to identify: a) inhibitory and stimulatory effects on root, hypocotyl and/or epicotyl growth; b) alterations on plantlets growth habit; c) effects on PSII photochemical activity; d) effects on calli chlorophyll content, water status and differentiation

competence; e) protection against oxidative-induced stress; f) alterations in calli genome duplication pattern and cell-cycle phases partition in plantlet cells; and g) DNA protective and/or genotoxic effects. The observation of a broad range of responses of the different cultures and of strong phenotypes at different cellular, physiological and developmental levels not only confirmed the value of this flax model as a bioplatfrom to assess biological activities of plant extracts, but it also suggested that there is a good basis for the identification of new molecular targets in the context of bioherbicide investigation.

Cultivo *in vitro* de lino como una plataforma biológica para identificar actividades alelopáticas de extractos de plantas y otros productos naturales

El cultivo *in vitro* de lino (*Linum usitatissimum* L.) se inició hace 16 años en nuestro laboratorio, y se establecieron varios tipos de cultivos (suspensiones, callos, brotes adventicios, plántulas, etc.) con diferentes características (no morfogénico y callos embriogénicos, con o sin clorofila, etc). Además, el análisis fitoquímico de plantas aromáticas y medicinales (PAM) crecidas *in vivo* e *in vitro* y la identificación de bioactividades de los extractos y compuestos de PAM tienen una larga tradición en nuestros grupos. Con estos antecedentes se inició un estudio con el objetivo de evaluar el potencial de cultivos *in vitro* de lino como una plataforma biológica versátil, rápida y barata para identificar actividades biológicas de los extractos vegetales y otros productos naturales, de los niveles sub-celulares a los de desarrollo de la planta. Durante los últimos 4 años, varios extractos de plantas, obtenidos con diferentes métodos y de diferentes órganos, especies y familias de plantas, han sido probados añadiéndose a los medios de cultivo. Los efectos biológicos fueron analizados a nivel del ADN (por el ensayo cometa) y ciclo celular (por citometría de flujo) y también al nivel de la fisiología (usando un análisis de fluorescencia de la clorofila) y del desarrollo de la planta. Globalmente, los resultados permitirán identificar: a) efectos inhibitorios y estimulantes sobre el crecimiento de la raíz, hipotíleo y/o epicotíleo, b) alteraciones en el patrón de crecimiento de las plántulas, c) efectos sobre la actividad fotoquímica del PSII; d) alteración en el contenido de clorofila, el estado del agua y la capacidad de diferenciación de los callos, e) protección contra el estrés oxidativo inducido, f) alteraciones en el patrón de duplicación del genoma de callos y en la partición de las fases del ciclo celular en las células de plántulas, y g) efectos protectores del ADN y/o efectos genotóxicos. La observación de una amplia gama de respuestas de los diferentes cultivos y de fenotipos fuertes a

diferentes niveles - celular, fisiológico y de desarrollo - no sólo confirmó el valor de este modelo de lino como plataforma para evaluar actividades biológicas de extractos de plantas como también sugieren la existencia de una base para la identificación de nuevas dianas moleculares en el contexto de la investigación en bioherbicidas.

Evaluación química y anatomía en la formación de callos de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) con 2,4-D

Yilan Fung Boix¹*, Cristina Pimentel Victório², Celso L. Salgueiro Lage², Ricardo Machado Kuster², Anna C. Alfarge Defaveri², Rosanni Olivera Arruda³, Alice Sato³

¹Universidad de Oriente, Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), Departamento de Bioelectromagnetismo, Ave. Las Américas s/n, Santiago de Cuba 4, CP 90 400. Cuba. e-mail: yilan@cnea.uo.edu.cu

²Universidad Federal de Rio de Janeiro. Laboratório de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Av. Carlos Chagas Filho, s/n.RJ. Código postal 21941-902.

³Universidad de Rio de Janeiro (UNIRIO). Departamento de Botánica. Avenida Pasteur, 458 urca, RJ. CP 22240-540.

El *Rosmarinus officinalis* es una planta conocida desde la antigüedad, tiene propiedades estimulantes del sistema nervioso, antiespasmódicas y emenagogas. Pertenece a la familia *Lamiaceae* es una especie que por su gran utilidad se destaca entre las plantas traídas por los primeros colonos. Ha sido ampliamente utilizada en la industria de los alimentos, perfumerías y farmacéutica en función de sus propiedades bactericidas, antifúngicas y antioxidantes de su aceite esencial. El trabajo tuvo como objetivo determinar los componentes presente en el aceite esencial obtenido del cultivo *in vitro* de callos empleando 2,4-D como regulador del crecimiento, así como los cortes anatómicos de los mismos. La obtención de metabolitos secundarios a través del cultivo de tejidos es una de las tecnologías que hacen más fácil la obtención de un componente fitoquímico de gran importancia en la industria farmacéutica, alimentaria y química del mercado internacional. En los extractos obtenidos del cultivo de callos a la concentración de 2.26mM de 2,4-D los componentes analizados por GC/FID y GC/MS fueron el α -pineno (7.06%), α -canfeno (4.76%), alcanfor (8.25%), β -pineno (6.35%) mientras que para el control estuvo presente el ácido palmítico (19.14%) y trans-totarol (28.73%) como único componente volátil. Este trabajo permite obtener por vía biotecnológica concentraciones mayores de terpenos son de gran utilidad en la producción en la industria farmacéutica y de los alimentos estableciendo una sustentabilidad del recurso natural en este caso el romero.

Chemical evaluation and anatomy in the callus formation of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) with 2,4-D

The *Rosmarinus officinalis* is a plant known since antiquity, is nervous system stimulant, antispasmodic and emmenagogue. *Lamiaceae* family belongs to a species that is useful for its stands out among the plants brought by early settlers. It has been widely used in the food industry, perfume and pharmaceutical industry based on their antibacterial properties, antifungal and antioxidant of the essential oil. The study aimed to determine the components present in the essential oil obtained from *in vitro* culture of callus using 2,4-D as growth regulator and the anatomic sections of the same. Obtaining secondary metabolites through tissue culture is one of the technology that make it easier to obtain a phytochemical component of great importance in the pharmaceutical, food and chemical market. In the extracts obtained from callus culture of the concentration of 2.26 mM 2,4-D components analyzed by GC / FID and GC / MS were α -pinene (7.06%), α -camphene (4.76%), camphor (8.25%), β -pinene (6.35%) while control was present for palmitic acid (19.14%) and trans-totarol (28.73%) as the only volatile component. This work can get on via biotech higher concentrations of terpenes are useful in production in the pharmaceutical and food by establishing a natural resource sustainability in this case rosemary.

Estudio de la composición fitoquímica y de antioxidantes enzimáticos en variedades e híbridos del género *Morus*

Maykelis Díaz¹*, Yanet Cazaña², Yunel Pérez², Yudit Lugo¹, Hilda Wencomo¹ y Marlene Prieto¹

¹EPPF 'Indio Hatuey', CP 44 280, Perico, Matanzas, Cuba.

²CETENZ, Universidad de Matanzas 'Camilo Cienfuegos', Cuba. e-mail: maykelis.diaz@indio.atenas.inf.cu

Las plantas presentan un sistema antioxidante eficiente y variado, con compuestos de naturaleza proteica y no proteica que interaccionan sinérgicamente en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno (ERO), para mantener el equilibrio redox en el organismo. Entre las más destacadas en este sentido, y de interés forrajero, se encuentran las especies del género *Morus*. En el presente trabajo se realizó un estudio en cinco variedades y en cinco híbridos de este género, cultivadas en la Estación Experimental Indio Hatuey, con el objetivo de: a) identificar la presencia de compuestos como lactonas, alcaloides, esteroides y en especial los de tipo antioxidante como fenoles,

triterpenos, taninos y quinonas, en tres extractos de diferente polaridad y b) determinar las actividades enzimáticas específicas de catalasa y guaiacol peroxidasa en extractos frescos de raíz, tallo y hojas. Además, se realizó una evaluación de toxicidad de los extractos acuosos en ratas, para la determinación preliminar de su inocuidad para ensayos farmacológicos posteriores. El estudio fitoquímico mostró cantidades considerables de triterpenos y esteroides, así como de fenoles y de taninos en los extractos evaluados; mientras que no fueron detectados quinonas ni alcaloides. Se detectaron diferencias significativas entre la actividad específica de ambas enzimas en los diferentes órganos evaluados y entre las variedades e híbridos; reportándose los mayores valores en hojas, tallos y raíces en orden decreciente. En el ensayo de toxicidad no se observaron síntomas clínicos importantes como mortalidad, convulsiones, alteraciones en el ritmo cardíaco o respiratorio. Atendiendo a los resultados se sugiere el empleo de estos extractos en modelos biológicos para la identificación de propiedades medicinales, en particular las asociadas al estrés oxidativo.

Study of the phytochemical and enzymatic antioxidant composition in varieties and hybrids of the *Morus* genus

Plants show an efficient and varied antioxidant system, with protein and non protein compounds, which interact synergically in the elimination of the reactive oxygen species (ROS), to maintain the redox balance in the organism. Among the most outstanding in this sense, and of forage interest, are the species of the *Morus* genus. A study was conducted on five varieties and five hybrids of this genus, cultivated at the Experimental Station 'Indio Hatuey', in order to: a) identify the presence of such compounds as lactones, alkaloids, steroids and especially the antioxidant ones like phenols, triptenes, tannins and quinines, in three extracts of different polarity; and b) determine the enzymatic specific activities of catalase and guaiacol peroxidase in fresh extracts of roots, stem and leaves. In addition, a toxicity evaluation was made of the aqueous extracts in rats, for the preliminary determination of their innocuousness for later pharmacological essays. The phytochemical study showed remarkable quantities of triptenes and steroids, as well as phenols and tannins in the evaluated extracts, while neither quinones nor alkaloids were detected. Significant differences were detected between the specific activity of both enzymes in the different evaluated organs and among the varieties and hybrids; the highest values being

reported in leaves, stems and roots, in decreasing order. In the toxicity essay no important clinical symptoms were observed, such as mortality, convulsions, and alterations in the heart or respiration rate. According to the results, the use of these extracts in biological models for the identification of medicinal properties, particularly those related to oxidative stress, is suggested.

Evaluation of antimicrobial activity of the extracts and anthraquinones obtained from *in vitro* culture of *Morinda royoc* L.

Janetsy Borroto^{1*}, Ricardo Salazar², Martha Hernandez¹, Yemey Quiros¹, Noemí Waksman², Reinaldo Trujillo¹.

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

²Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, U.A.N.L. México. e-mail: salazar121212@yahoo.com.mx

Anthraquinones (AQs) are compounds with a wide range of biological activities. They have been used in textile and food processing industries as well as in medicine. Plant cell cultures are an attractive alternative source to whole plant for the production of high-value secondary metabolites. The aim of the present study were to evaluate the potential antimicrobial activity of dichloromethane extracts and anthraquinones obtained from *in vitro* culture of *Morinda royoc* L., for the treatment of respiratory diseases. Dichloromethane extracts obtained from *in vitro* roots, *in vitro* nodule roots and callus culture of *Morinda royoc* L. as well as eight anthraquinones isolated from these extracts were tested for their antimicrobial activity against seven isolates of *Candida* spp. (*C. albicans* 501, *C. albicans* 53, *C. albicans* 498, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*) and four Gram-positive bacteria (Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 and *Enterococcus faecales*) and three Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*) using broth microdilution test. The crude extracts were active against all *Candida* species whereas morindone was found to be the best active compound. The lowest minimal inhibition concentration (MIC) values obtained by the microdilution test were 1.95 μ g/mL⁻¹ as to the crude extracts as morindone. The dichloromethane extracts of *in vitro* roots, *in vitro* nodule roots and callus culture *Morinda royoc* L., showed strong inhibitory activity against *S. aureus*, *E. faecales*, and *E. coli*. The lowest MIC values obtained by the microdilution test were 31.25 μ g/mL⁻¹ and 15 μ g/mL⁻¹ for crude extracts and morindone respectively. These results suggest

a potential utilization of the *in vitro* cultures of *Morinda royoc* L. to provide extracts which could be useful as natural antimicrobial agents.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos y antraquinonas obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de *Morinda royoc* L.

Las antraquinonas son compuestos con varias actividades biológicas. Se han utilizado en las industrias textiles y de procesamiento de alimentos así como en la medicina. El cultivo de células y tejidos es una alternativa atractiva para la producción de metabolitos secundarios con alto valor. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos diclorometánicos y antraquinonas obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de *Morinda royoc* L. para el tratamiento de enfermedades respiratorias. Los extractos diclorometánicos obtenidos a partir de raíces *in vitro*, nódulos de raíces *in vitro* y cultivo de callos de *Morinda royoc* L. así como ocho antraquinonas aisladas a partir de estos extractos se evaluaron contra siete aislados clínicos de *Candida* spp. (*C. albicans* 501, *C. albicans* 53, *C. albicans* 498, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*), cuatro cepas de bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 y *Enterococcus faecales*), y tres cepas de bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*) utilizando el método de microdilución en placa. Los extractos crudos fueron activos contra todas las especies de *Candida* mientras que la morindona fue el más activo de los compuestos puros evaluados. La concentración mínima inhibitoria (CMI) más baja fue de 1.95 g/ml tanto para extractos crudos como para morindona. Los extractos diclorometánicos de raíces *in vitro*, nódulos de raíces *in vitro* y cultivo de callos de *Morinda royoc* L. mostraron fuerte actividad inhibitoria contra *S. aureus*, *E. faecales*, y *E. coli*. El valor más bajo de CMI obtenido por el método de microdilución fue de 31.25 g/m.l⁻¹ y 15 g/m.l⁻¹ para extractos crudos y morindona, respectivamente. Estos resultados sugieren una utilización potencial del cultivo *in vitro* de *Morinda royoc* L. para proveer extractos y morindona los cuales pudieran ser útiles como agentes antimicrobiales naturales.

Caracterización del contenido de flavonoides de diferentes extractos obtenidos a partir de cinco especies vegetales de la flora cubana

Nadine Vega Pérez, Katia Ojito Ramos*, Yamila Herrera Sánchez
Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a

Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
e-mail: kojito@uclv.edu.cu

Los flavonoides, metabolitos secundarios de las plantas, han recibido en los últimos años mucha atención como potenciales fármacos, debido a su efecto antioxidante y baja toxicidad. Hasta el momento han sido identificados más de 5 000 flavonoides en una gran variedad de plantas, presentando la mayoría actividad antioxidante. Por tal motivo sería de gran utilidad contar con extractos vegetales caracterizados en cuanto a su contenido de flavonoides para su empleo como posibles neuroprotectores. En este trabajo nos propusimos caracterizar el contenido de flavonoides en diferentes extractos obtenidos a partir de cinco especies vegetales de la flora cubana: *Citrus lemon* (L.), *Citrus aurantium* (L.), *Citrus aurantifolia* (Christm.), *Osimum gratissimum* (L.) y *Eucaliptus robusta* (L.). Los extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de hojas de estas plantas se obtuvieron mediante ultrasonificación y filtración al vacío. Posteriormente, los flavonoides fueron identificados empleando métodos colorimétricos, espectrofotométricos y cromatografía en placa delgada, y la concentración total de los mismos se determinó mediante el método $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$, empleando quercetina como patrón. La actividad antioxidante de los extractos se determinó mediante la capacidad atrapadora de radicales libre del 2-2'-azino-bis (3-etilbenztiazolina-6- ácido sulfónico), usando ácido ascórbico y quercetina como patrón. La mayor diversidad de flavonoides se obtuvo en *Citrus aurantium* (naranja agria). Las flavonas, antocianinas y auronas resultaron los flavonoides más comunes en los extractos de las plantas seleccionadas. Para todas las especies de plantas analizadas se informaron clases de flavonoides no descritas en la literatura consultada. La mayor concentración de flavonoides totales se obtuvo en el extracto metanólico de naranja agria (4.8 mg de quercetina por ml de extracto). Todos los extractos mostraron actividad antioxidante, observándose mayor actividad en los extractos metanólicos de las especies de cítricos analizadas.

Characterization of the content of flavonoids in different extracts obtained from five plants species of the Cuban flora

The flavonoids, secondary metabolites of plants, have been recently studied extensively since they are highly effective antioxidant with a low toxic effect. At this time, it has been identified more than 5 000 flavonoids in a large variety of plants, most of them with antioxidant activity. For this reason, it would be very useful to have well-characterized plant extracts in their flavonoids content for their possible use as neuroprotectants. The aim of our work was to

characterize the flavonoids content in different extracts from five plant species of the Cuban flora: *Citrus lemon* (L.), *Citrus aurantium* (L.), *Citrus aurantifolia* (Christm.), *Osimum gratissimum* (L.) and *Eucaliptus robusta* (L.). The ethanolic, methanolic and aqueous leaf extracts were obtained by an ultrasound assisted extraction method. Later, the flavonoids were identified using colorimetric, spectrophotometric and thin layer chromatography methodologies. The flavonoids total content was determined by the $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$ method, using quercetin as standard compound. The antioxidant activity of the extracts was determined by the free radical scavenging of 2-2'-azino- bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), using ascorbic acid and quercetin as standard compound. The biggest flavonoids diversity was found in *Citrus aurantium* (sour orange). Flavones, anthocyanins and aurones were the most common flavonoids uncovered in the extracts of the selected plants. For all analyzed plants appeared flavonoids that are not yet reported in the literature. The highest total flavonoids concentration was scored in the methanolic extract of sour orange (4.8 quercetin $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). All plant extracts showed antioxidant activity, seeing an increased activity in methanolic extracts of citric plants.

Effects of sucrose on phenolic compounds production in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* cv. Gamay

Emine Sema ÇETÝN^{1,*}, Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR²

¹Süleyman Demirel University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, 32260 Isparta-Turkey
e-mail: sema@sdu.edu.tr

²Süleyman Demirel University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, 32 260 Isparta-Turkey
e-mail: nilgun@ziraat.sdu.edu.tr

Phenolic compounds, secondary metabolites, have attracted much interest due to their antioxidant and antimicrobial properties and their potentially beneficial effects for human health. Thus, it is too important to obtain these compounds from plants containing high-level of phenolics. Grape is one of the plants having high levels of phenolics. Plant cell suspension cultures have been studied as a means of producing plant secondary metabolites for use in medicine and food industry. However, one of the difficulties of industrial production by plant cell culture is the low productivity. To enhance the productivity, addition of enhancer such as elicitors has been used. Secondary metabolite production via cell suspension culture in *Vitis vinifera* generally focused on resveratrol and anthocyanidins. But in this study, it was determined

the effects of different sucrose concentrations as an enhancer on contents of 3,4- hydroxy benzoic acid and 4- hydroxy benzoic acid as phenolic acids and (+)-catechin, (-)-epicatechin, eridictiol, kaempherol, luteolin, naringenin and quercetin as flavanoids obtained from *Vitis vinifera* cell suspension cultures. For this aim, cell suspension cultures of *Vitis vinifera* cv. Gamay were initiated from callus belong to petiole tissue. Two different concentrations (0 and 0.20 M) of sucrose were used and cells were harvested at 0, 3, 6, 9, 12 and 15 day after treatments. Phenolic compounds of the cell samples were detected by HPLC. The highest levels of (+)-catechin (5.39 $\mu\text{g/g}$ fw), (-)-epicatechin (25.95 $\mu\text{g/g}$ fw), eridictiol (2.88 $\mu\text{g/g}$ fw), 4- hydroxy benzoic acid (22.26 $\mu\text{g/g}$ fw), quercetin (1.48 $\mu\text{g/g}$ fw), naringenin (4.93 $\mu\text{g/g}$ fw), luteolin (12.67 $\mu\text{g/g}$ fw) and kaempherol (37.50 $\mu\text{g/g}$ fw) were found in cells treated with 0.20 M sucrose. However the content of 3, 4- hydroxy benzoic acid was not affected by the sucrose concentrations. In this study, sucrose was found as a modulator in phenolic accumulations in this grape cultivar.

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Digitalis purpurea* L., and important pharmaceutical plant

Yovanny Izquierdo¹, Naivy Pérez-Alonso¹, Borys Chong-Pérez¹, Alina Capote¹, Anabel Pérez¹, Geert Angenon², Elio Jiménez¹

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

²Laboratory of Plant Genetics, Department of Applied Biological Sciences Vrije Universiteit Brussel (VUB) Campus Etterbeek - Gebouw E Pleinlaan 2 B-1050 Brussel Belgium
e-mail: yovanny@ibp.co.cu

Digitalis purpurea L., contains cardiac glycosides of major interest in pharmaceutical industries. Genetic transformation is a tool of special interest to improve the production of these compounds, exclusively obtained from plants. Besides, it grants the possibility to widen the knowledge on the biosynthesis of these compounds. In this study, an efficient transformation protocol for *D. purpurea* that would permit the stable expression of transgenes was developed. A regeneration protocol via somatic embryogenesis was obtained from *in vitro* plant leaf segments. The minimal inhibitory concentration of geneticin was determined for each step of the protocol. Two *Agrobacterium tumefaciens* strains were used to test the T-DNA transfer ability, EHA101 and C58C1pMP90, harboring the binary vector pTJK136. A six days cocultivation on medium with 1.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2,4-D was used for callus induction. Both leaf explants and callus pieces were sensitive to 70 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ geneticin.

No differences were found between two *A. tumefaciens* strains on transient *Gus* expression. Nevertheless, the strain C58C1pMP90 yielded better results regarding number of transformed plants. GUS histochemical analysis of the putative transgenic tissues further confirmed the transformation event. PCR and Southern blot hybridization confirmed the presence of the transgenes and their stable integration in the regenerated plants. The transformation efficiency reached 82%. To date, only a few papers have been published on studies of genetic transformation of *Digitalis* species. From these results an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation protocol of *D. purpurea* was by the first time developed.

Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de *Digitalis purpurea* L., una especie de importancia farmacéutica

Digitalis purpurea L. contiene glicósidos cardíacos de gran interés para la industria farmacéutica. La transformación genética es una herramienta de especial interés para incrementar la producción de estos compuestos, exclusivamente obtenidos a partir de las plantas. En este estudio se desarrolló un protocolo eficiente de transformación de *D. purpurea* que permitiría la expresión estable de genes de interés para la ingeniería metabólica de estos compuestos. Se desarrolló un protocolo de regeneración vía embriogénesis somática a partir de segmentos de hojas de plantas cultivadas *in vitro*. Se determinó la concentración mínima inhibitoria de geneticina para cada paso del protocolo. Dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens* fueron usadas para probar su capacidad de transferencia de ADN: EHA10 y C58C5pMP90, que contenían ambas el plásmido pTJK136. La inducción de callos se realizó por seis días de cocultivo en medio de cultivo con 2,4-D 1.0 mg.l⁻¹. Tanto los callos como los fragmentos de hojas fueron sensibles a 70 mg.l⁻¹ de geneticina. No se observaron diferencias en la expresión transiente del gen *Gus* entre las dos cepas de *Agrobacterium*. Sin embargo, C58C1pMP90 dio mejores resultados en cuanto a número de plantas regeneradas. La transgénesis fue confirmada por ensayo histoquímico GUS en todas las etapas del proceso, y por PCR y *Southern blot* sobre las plantas regeneradas. La eficiencia de la transformación fue del 82%. Hasta la fecha, sólo unos pocos trabajos han sido publicados sobre transformación de *Digitalis*. A partir de estos resultados se desarrolló por primera vez un protocolo de transformación genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

Efficient synthesis of (3-allyl C-glycosides of D-ribofuranose and 2-deoxy-D-ribofuranose and their use for the preparation of nucleoside analogues

Christian Vogel*, Heike Otero Martínez

Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, University of Rostock, Albert-Einstein Str. 3a, D-18 059 Rostock, Germany. e-mail: christian.vogel@uni-rostock.de

In order to synthesize new spacer-C-nucleoside analogues with potential biological activity a safe route for the synthesis of α -allyl C-glycosides of D-ribo- and 2-deoxy-D-ribofuranose became established [1]. Successful hydroboration-oxidation and stepwise oxidation provided a set of versatile intermediates which allow the synthesis of heterocycles belonging to quite different classes. For example, the tetraisopropylidisiloxan-propanal 1 was treated with 2-cyanoacetamide in the presence of aluminium oxide to yield a pentene acid intermediate. Cyclization with sulphur and triethylamine was performed to provide a thiophene derivative which was then treated with triethyl orthoformate to obtain after deprotection the thienopyrimidine nucleoside 2. Reaction of propanal 1 with ethynylmagnesium bromide or lithium phenylacetylide in THF followed by oxidation, afforded pentinone intermediates. Treatment of these compounds with hydrazine, S-methylthiuronium sulfate and o-phenylenediamine provided the corresponding pyrazole, pyrimidine or benzodiazepine derivatives in good to excellent yields. Deprotection was performed by using tetrabutylammonium fluoride to furnish compounds 3, 4 and 5 suitable for biological and pharmacological investigations.

Phenolic content and antioxidant activity of plant and callus *Theobroma cacao* L. extracts

J. Quiñones*, R. Trujillo, T. Augustine, Y. Capdesuñer, Y. Quirós, J. Borroto, M. Hernández

Bioplant Center. University of Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 9 CP 69 450. Ciego de Ávila. Cuba. e-mail: jquinones@bioplasmas.cu

The *Theobroma cacao* L. (Cocoa) is endemic to the Amazon basin and Central America. Cocoa-derived foods are rich in phenol and are obtained from the fermented, roasted and milled seeds of *Theobroma cacao* L. A growing body of evidence indicates that secondary plant metabolites plays a critical role in human health and may be nutritionally important. Of special interest are plant-based phenolic metabolites due to their potent antioxidant activity and wide range of pharmacologic properties including anticancer, antioxidant, and platelet aggregation inhibition activity. The antioxidant activities of phenolic

compounds are mainly due to their redox properties, which can play an important role in adsorbing and neutralizing free radicals. The aim of this work were to determinate the phenolic content in plant of *Theobroma cacao* L., the antioxidant activity of the extracts leaves, branches, seeds, flowers and roots of field plants, and callus of staminodes, petals and nucelus were analyzed. The nucelus, petals and staminoids were culture on a callogenesis medium and the callus grown were measured. The phenolic content was determinated with Folin-Ciocalteu reagent. The procedure for performing antioxidant activity were based on Harding and Benson and Ait Barka *et al.* for malondialdehyde and aldehyde levels respectably. The staminodes and petals showed a higher grown of callus than nucelus. The highest phenolic content was recorded in seeds showing significant statistical difference with other organs, the callus of nucelus showed more phenolic content than the other callus evaluated. The branches and flowers displayed the highest antioxidant activity with the lowest malondialdehyde and other aldehyde value followed by old leaves, seed, young leaves and root. The callus of staminodes, petals and nucelus showed a similar antioxidant activity.

Contenido de fenoles y actividad antioxidante de extractos de plantas y callos de *Theobroma cacao* L.

Theobroma cacao L. (Cacao) es endémico de la región del Amazonas y América Central. Los alimentos derivados del cacao son ricos en compuesto fenólicos. Una gran cantidad de evidencias indican que los metabolitos secundarios de plantas tienen un papel importante en la nutrición y la salud humana. Los compuestos fenólicos que se obtienen a partir del metabolismo secundarios de las plantas son de un interés especial por su potente actividad antioxidante y el amplio rango de propiedades farmacológicas que poseen (actividades anticáncer, antioxidantes y en la inhibición de la agregación de plaquetas, entre otras). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos está relacionada con sus propiedades redox, que pueden jugar un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres. El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de compuestos fenólicos en plantas de *Theobroma cacao* L. y la actividad antioxidante de extractos de hojas, ramas,

semillas, flores, raíces de plantas de campo y callos formados a partir de estaminoides, pétalos y nucelas. Los explantes se cultivaron en medio de cultivo de formación de callos y se evaluó el crecimiento de los callos cada 14 días. El contenido de compuestos fenólicos se determinó con el reactivo Folin-Ciocalteu. El procedimiento para determinar la actividad antioxidante se realizó de acuerdo con Harding y Benson y Ait Barka *et al.* para los niveles de malondialdehídos y aldehídos, respectivamente. Los estaminoides y pétalos mostraron mayor formación de callos que las nucelas. Las semillas y los callos formados a partir de nucelas mostraron mayor contenido de compuestos fenólicos que el resto de las muestras evaluadas. Las ramas y flores mostraron la mayor actividad antioxidante, con los menores valores de malondialdehídos y otros aldehídos seguidos por las hojas adultas, semillas, hojas jóvenes y raíces.

A novel Airlift bioreactor design: an innovative approach to improve shear sensitivity for plant cell culturing

Gyanendu Runnimukherjee* and Abhinav Kaushal

Department of Biotechnology and Bioinformatics, Jaypee University of Information Technology, Waknaghat, Solan, H.P. India. *e-mail: gyanendu146@gmail.com

Presently, there exist many designs for bioreactors and also airlift bioreactor in market but all these have certain limitations of which some significant ones have been improved upon in the proposed design. This innovative approach proposes a good air and liquid circulation, better mixing, better sparger location with its influence and also a fully new system of concurrent draft tubes for greatly improved influence in the mixing which are greatly required by the plant cells. The design has been supported with a mathematical model for calculation of various hydrodynamic parameters. The study of turbulence in the fluid present in different parts of the reactor has been mathematically calculated for the purpose of detecting levels of shear existing in various conditions. The major contribution of this novel design is that it can be directly used to provide better results for the industry application as it is based on mathematical hydrodynamic model, supported by equations and thus, just require scaling up to increasing capacity to meet a high working volume.

INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMOS

Molecular identification of AVR and ECP genes in Cuban *Cladosporium fulvum* (SYN. *Passalora fulva*) strains by PCR

Alexander Bernal Cabrera^{1*}, Orlando Borrás Hidalgo², Osmany Chacón³, Benedicto Martínez⁴ y Belkis Peteira⁴

¹Centro de Investigaciones Agropecuarias. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
e-mail: alexanderbc@uclv.edu.cu

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana. Cuba.

³Instituto de Investigaciones del Tabaco. La Habana. Cuba.

⁴Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La Habana. Cuba.

Leaf mould of tomato, caused by the fungus *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), does hardly occur in outdoor grown tomatoes in Cuba. However, with the recent increase in production of tomatoes in protected environments including greenhouses (also other ways such plastic-covered stands), it has become a major fungal disease. The high incidence of this disease on tomato hybrids used in greenhouses suggested developments of fungal variants able to overcome resistance genes present in these hybrids. Over the last few decades, the pathosystem *P. fulva*-tomato has been intensively studied, and has become a model for the study of gene-for-gene interactions. Previous studies through EcoTILLING technology have shown a high polymorphism in *Avr* y *Ecp* genes from *C. fulvum*. In order to determine the *Avr* and *Ecp* genes of *C. fulvum* in the Cuban population of this fungus as well as possible sequence variation within its genes were studied 36 single conidial isolates obtained from different regions. The characterization of polymorphisms was examined by PCR amplification using gene-specific primer. The sequencing of PCR products were performed at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). In this study, we demonstrated that high variation levels finding within *Avr4* gene were very closely related with an increase of the pathogen virulence on tomato. This is the first report on Cuban strains.

Caracterización funcional mediante AFLP-ADNc de la interacción patogénica *Saccharum* spp.-*Sporisorium scitamineum*

María de los Angeles Zardón Navarro^{*1}, María LaO Hechavarría¹, Ariel Arencibia Rodríguez¹, Miguel Sautié Castellanos², Ivette Camayd Viera³

¹Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Ministerio del Azúcar, Carretera CAI 'Martínez Prieto' km 2.5, Ciudad de La Habana, Cuba.

*e-mail: mzardon@inica.minaz.cu

²Centro de Cibernética Aplicada a la Medicina. Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. Calle 146 Esq. 31 # 3 102. Playa. Ciudad de la Habana, Cuba.
e-mail: cecam@cecam.sld.cu

³Centro Nacional de Genética Médica. Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. Calle 146 Esq. 31 # 3 102. Playa. Ciudad de la Habana, Cuba.
e-mail: direccion@cngen.sld.cu

El análisis de expresión diferencial de AFLP-ADNc en plantas es un procedimiento que permite mostrar algunas características del fondo genético de diversas líneas o poblaciones durante su interacción con el ambiente. Estudios previos de AFLP-ADNc de la interacción *Saccharum* spp.-*Sporisorium scitamineum* (carbón de la caña de azúcar) en la variedad susceptible Ja60-5 y en la resistente M31/45 muestran que en las primeras 72 h post-inoculación con el patógeno *Sporisorium scitamineum* estaban representados mayoritariamente genes relacionados con las rutas del estrés oxidativo, la respuesta de defensa de la planta, biosíntesis de etileno y auxinas, entre otros. En este trabajo se evaluó la similitud de 81 fragmentos transcripcionales expresados diferencialmente durante esta interacción con secuencias nucleotídicas y proteicas referidas en bases de datos del NCBI, a través de los programas BLAST. Todos los genes mostraron homología significativa con al menos una secuencia ya informada, 60 de ellos con secuencias de proteínas, ocho sólo con secuencias de ácidos nucleicos correspondientes a regiones codificadoras, siete con proteínas hipotéticas y EST y seis sólo con EST. De los genes analizados dos codifican para ARN ribosomal. A partir de las bases de datos incluidas en CDD e INTERPRO así como en dos sistemas de identificación funcional basados en ortología, OrthoMCL e Inparanoid, se propuso una clasificación de acuerdo con familia/superfamilia de proteínas y a las categorías del Gene Ontology de los fragmentos transcripcionales. Se profundizó en la determinación funcional de los transcritos mediante la identificación de la presencia parcial o completa de dominios conservados funcionales y estructurales. Este trabajo sentará las bases para un estudio de genómica comparativa a gran escala de los componentes genéticos de las plantas involucrados en la respuesta a determinados patógenos.

Functional characterization mediated by AFLP-cDNA of the *Saccharum* spp.–*Sporisorium scitamineum* pathogenic Interaction

The analysis of the differential expression in cDNA-AFLP of plants is an useful procedure for quickly assessing the characteristic genetic background of selected lines or populations during environment interaction. Previous works that study the *Saccharum* spp.–*Sporisorium scitamineum* pathogenic (smut sugarcane) interaction using cDNA-AFLP in the susceptible Ja60-5 and the resistant M31/45 genotypes showed that infection triggers the expression of the major genes involved in oxidative burst pathway, plant defensive response, ethylene and auxin biosynthesis among others, during the first 72 h post-inoculation. In our work we determined, by means of BLAST searches, the similarity of 81 transcript-derived fragments with differential expression during the interaction to protein and nucleotide sequences found in NCBI databases. All the genes show significant homology with respect to at least one known sequence, 60 of them with protein sequences, eight with well characterized coding nucleotide sequences, seven with putative proteins and EST and six only with EST. Two of these genes code for ribosomal RNA. On the basis of CDD and INTERPRO data bases as well as two orthology systems useful for functional assignment such as, OrthoMCL and Inparanoid, we proposed a classification according to protein families/superfamilies and Gene Ontology for transcript fragments. The functional assignment to the transcripts was evaluated in greater depth using the identification of the partial or complete presence of functional and structural domains. This work will be helpful for a comparative genomic study at a greater scale of the genetic components involved in the plant response to certain pathogens.

Colonización de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) por dos cepas de *Bacillus* aisladas de este cultivo

Marcia M. Rojas^{1*}, Berto Tejera¹, Mayra Heydrich¹, Jacques Mahillon², Pierre Bertin³

¹Dpto de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba. Calle 25 # 455 e/ J e l Vedado, Ciudad de La Habana.

²Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Université catholique de Louvain, Belgium.

³ECAV, Université catholique de Louvain, Belgium.
e-mail : marcia@fbio.uh.cu

El arroz es uno de los principales cereales cultivados en el mundo, que sirve de alimento a más del 50% de la población mundial. Por tanto, el cultivo del arroz

necesita de la utilización de un manejo que permita obtener la mayor cantidad y calidad posible con el menor impacto ambiental. Es por ello que resulta importante estudiar las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), las cuales pueden estimular el crecimiento de su hospedero y representa un camino para mejorar el cultivo. Entre las PGPB el género *Bacillus* tiene amplias potencialidades para ser utilizado en la biotecnología agrícola. En el presente trabajo, se aislaron mediante el modelo microcosmos, dos cepas de *Bacillus* a partir de arroz cultivado en Cuba que fueron identificadas utilizando la secuenciación del ADN que codifica para el ARN ribosómico 16S. Se llevó a cabo la caracterización fisiológica de los aislados en cuanto a la producción de auxinas estimuladoras del crecimiento vegetal y la determinación cualitativa de la fijación de nitrógeno, así como el efecto antagónico *in vitro* contra cuatro hongos fitopatógenos de este cultivo (*Pyricularia grisea*, *Curvularia* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp.). Se determinó la capacidad de mutantes espontáneos de las cepas a los antibióticos rifampicina y ácido nalidíxico para colonizar tres variedades de arroz utilizadas comercialmente en Cuba. Las cepas identificadas como *B. cereus* (RP27) and *B. pumilus* (EAI3) aparecían en concentraciones superiores a 10³ UFC.planta⁻¹ después de una semana, pero la cepa RP27 coloniza mucho mejor la planta de arroz independientemente de la variedad de que se trate. Estos estudios muestran la capacidad del género *Bacillus* para la colonización de la planta y las potencialidades para la promoción del crecimiento y el control biológico de patógenos en el cultivo del arroz.

Rice (*Oryza sativa* L.) plant colonization by two strains of *Bacillus* isolated from this crop

The rice is one of the main cereals crop in the world, feeding more than 50% of the world population. Thus, rice fields demand managerial care to obtain the best quality and quantity of production with less environmental impact. That is why, we study the plant growth promoting bacteria (PGPB), which can stimulate the growth of their host, and represent an important way to improvement the crop. Among them, the genus *Bacillus* and their relatives have a great potential uses in the agriculture. Two strains of *Bacillus* were isolated from rice crop cultivated in Cuba and were identified using 16SrDNA sequencing as *B. cereus* (RP27) and *B. pumilus* (EAI3). These strains are capable to produce indoleacetic acid and fix dinitrogen in semisolid medium without nitrogen. Also they produce antagonistic *in vitro* effect against four pathogenic fungi: *Pyricularia grisea*, *Curvularia* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. The ability to colonize rice plant of three varieties was measured

using spontaneous mutants to Rifampicine and nalidixic acid. The strain RP27 was better colonizer than EAI3 independently of rice varieties analyzed, but both are over 10^3 UFC.plant⁻¹ after one week. This studies show the ability of *Bacillus* strains to colonize the rice plant and their potentialities in the biological control and the plant growth promotion.

Detección de fitoplasma y rickettsia en papaya (*Carica papaya* L.) afectada con Síntomas de Cogollo Arrepollado (BTS) en Cuba

Karel Acosta Pérez^{1*}, Berta Piñol², Loidy Zamora Gutiérrez², Franklyn Arana Labrada¹, Aida Fernández Osorio¹, Yamila Martínez Zubiaur²

¹Universidad 'Vladimir Ilich Lenin', Israel Santos, CP 75 200, Las Tunas, Cuba

² Centro Nacional Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apdo 10, San José de Las Lajas, CP 32700, Habana, Cuba.

*e-mail: karelap@ult.edu.cu

En Cuba la papaya ha sido afectada por una enfermedad similar a cogollo arrepollado nombrada BTS (*Bunchy Top Symptom*) que afecta el rendimiento y la calidad de las producciones. El grupo de fitoplasma 16SrII, "*Candidatus* Fitoplasma aurantifolia" fue previamente consistentemente asociado con BTS. En los análisis muestras con diferentes síntomas fueron colectadas de campos de papaya de las regiones oriental y occidental del país. El ADN total extraído de plantas sintomáticas y asintomáticas fue respectivamente sometido a PCR anidada usando iniciadores región 16S ADNr de fitoplasma y a PCR simple con iniciadores específicos para rickettsia (PBT) designados para el gen *sdhA*. Productos de PCR, aproximadamente 880 bp fueron obtenidos en 90/103 plantas de papaya con síntomas BTS y de 7/20 plantas asintomáticas para fitoplasma del grupo 16SrII determinada su similaridad con otros miembros del grupo usando RFLP con enzima de restricción *Sau3AI*. Productos de PCR, aproximadamente 705 bp fueron obtenidos de 32/103 plantas sintomáticas, las muestras positivas solo mostraban síntomas de acortamiento de entrenudos y clorosis en las hojas interiores de la corona, dando una apariencia de arrepollado, manchas de apariencia aceitosa de donde el látex no fluye; y otras plantas con amarilleamiento, arrugamiento y hojas con quemadura de puntas. No fueron observados productos PCR para rickettsia asociada a PBT de plantas con síntomas de mosaico, amarilleamiento y clorosis internervial de hojas de la corona, así como curvado, deformado y acortamiento de entrenudos del punto de crecimiento apical y clorosis de hojas de la corona; seguido por necrosis basipetal de hojas jóvenes. Esto sugiere que

fitoplasma del grupo 16SrII y rickettsias asociadas a PBT coexisten en plantas de papaya afectadas por BTS, aunque el fitoplasma está más asociado con las diferentes sintomatología, lo cual debe ser considerado para estrategias de diagnóstico futuras, incluyendo investigaciones para evaluar tolerancia de nuevos cultivares obtenidos de programas de mejoramiento genético.

Detection of phytoplasma and rickettsia in papaya (*Carica papaya* L.) affected with 'Bunchy Top Symptom' (BTS) in Cuba

Papaya in Cuba has been affected by a bunchy top-like disease named as BTS (*Bunchy Top Symptom*) that affect the yield and quality of the productions. The phytoplasma group 16SrII, "*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia", was previously consistently associated with BTS. In surveys sample with different symptoms were collected of papaya fields from eastern and western regions. Total DNA extracted from symptomatic and asymptomatic plants was respectively subjected to nested PCR using phytoplasma 16S rDNA primers and to simple PCR with PBT-specific primers designed for the *sdhA* gene of rickettsia. Nested PCR products ~ 880 bp were obtained in 90/103 of BTS-symptomatic papayas and 7/20 asymptomatic plants for phytoplasma 16SrII group determinate their similarity with others members of group using RFLP with *Sau3AI* restriction enzyme. PCR products ~ 705 bp for rickettsia were obtained from 32/103 symptomatic papaya plants, the positive samples only showing shortening of internodes and chlorosis in the inner crown leaves, giving a bunchy appearance, oily appearing spots from where the latex no flow and other plants with yellowing, crinkling and leaf tips with burn symptoms. No PCR products were observed for PBT-rickettsia from symptomatic plants with mosaic, yellowing and chlorosis intervenial of crown leaves symptoms, as well as bending, deformation and shortening of internodes of the apical growing point, and chlorosis of crown leaves, followed by basipetal necrosis of young leaf. These suggest that the phytoplasma 16SrII group and rickettsia associated to PBT coexist in BTS-affected papaya plants, but demonstrated that phytoplasma is more highly associated with different symptoms, which must be considered for further diagnostic strategies, including investigations to evaluate tolerance of new cultivars obtained from improvement programs.

Remoción de hidrocarburos en cultivo *in vitro*: interacción planta-hongo filamentoso

Areli Cruz-Hernández; Francisco Cruz-Sosa, Mariano Gutiérrez-Rojas*

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa 09 340, D.F. e-mail: mgr@xanum.uam.mx

El uso de plantas capaces de degradar y/o remover contaminantes del suelo forma parte de un grupo de tecnologías emergentes para restaurar sitios contaminados. Sin embargo, el éxito de la remediación basado en plantas también depende de la interacción con los microorganismos asociados a la rizosfera, siempre capaces de absorber, retener o degradar compuestos peligrosos. En este estudio se evaluó, bajo condiciones *in vitro*, el efecto de una mezcla conocida de dos diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH): fenantreno (PHE) y pireno (PYR) con un alifático: hexadecano (HXD) (0.5:0.5:1; p/p/p) sobre el crecimiento de cuatro cepas de hongos filamentosos y una gramínea (*Festuca arundinacea*); así mismo se evaluó la capacidad de remoción de la mezcla de hidrocarburos (MHC) a los 14, 40 y 20 días de cultivo de las cuatro cepas de hongos, planta y planta-hongo, respectivamente. Hongos y planta fueron cultivados en un medio de cultivo (Murashige y Skoog) con 1 500 mg de MHC (kg de medio)⁻¹, en condiciones estériles. En la remoción de HXD y PHE no se observaron diferencias significativas para los ensayos con cada una de las cuatro cepas, 73 y 44%, respectivamente; para PYR tres de las cuatro cepas removieron menos del 24% del PYR inicial, mientras que la cepa 4 (*Lewia* sp.) removió hasta un 35%. *F. arundinacea* removió 55, 49.9 y 31.7% de HXD, PHE y PYR, respectivamente. Finalmente, la remoción de hidrocarburos se evaluó para la interacción entre la única cepa no fitopatógena (*Lewia* sp.) y *F. arundinacea*. La interacción planta-hongo filamentosos favoreció significativamente la remoción del PYR, 61.8%. La importancia de este trabajo consistió en lograr una mayor eficiencia de remoción de PYR con la interacción entre una planta y un hongo filamentosos. PYR es un PAH de alto peso molecular, que produce efectos carcinogénicos.

Remove of hydrocarbons *in vitro* culture: plant-filamentous fungi interaction

The use of plants able to degrade and/or remove contaminants from soil takes part of a group of emerging technologies for restoring contaminated sites. However, the success of remediation based in plants also depends on the association of root plant and soil microorganisms able to absorb, retain or degrade hazardous compounds. In this study, we evaluated at *in vitro* conditions, the effect of a known mixture of hydrocarbons (MHC) composed by two different polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH): phenanthrene (PHE) and pyrene (PYR) with an

aliphatic: hexadecane (HXD) (0.5:0.5:1; w/w/w) on the growth of four filamentous fungi strains and grass (*Festuca arundinacea*) and the removal capacity of the MHC at 14, 40 and 20 days of cultivation of four strains of fungi, plants and plant-fungus, respectively. Fungi and plant were grown in culture medium Murashige and Skoog with concentration of 1 500 mg of MHC (medium kg)⁻¹, at sterile conditions. The removal of HXD and PHE wasn't significantly different between trials with each of the four strains, 73 and 44%, respectively. Three strains removed not as much of 24% of initial PYR, while the strain 4 (*Lewia* sp.) removed 35%. *F. arundinacea* removed 55, 49.9 and 31.7% of HXD, PHE and PYR, respectively. Finally, the hydrocarbon removal was evaluated for interaction between *F. arundinacea* and *Lewia* sp. (the only not phytopathogenic strain); this interaction significantly favored the removal of PYR, 61.8%. The importance of our work was the PYR removal efficiency with plant - filamentous fungus interaction. PYR is a high molecular weight PAH, which produces carcinogenic effect.

Identificación de cepas del Virus del Mosaico de la caña de azúcar en Cuba por RT-PCR y secuenciación directa

M. La O^{*1}, E. Fernández², J.C. Girard², R. González¹, J. Mesa¹, E. Filotet¹, Rodríguez¹, J. Montalván¹, Y. Rufin¹, A. Corrales¹, M.A. Zardón¹, M. Quiñones³, Y. Martínez¹, J. C. Girard²

¹Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Ministerio del Azúcar, Carretera CAI 'Martínez Prieto' km 2.5, Ciudad de La Habana, Cuba. e-mail: lao@inica.minaz.cu

²CIRAD. Biologie et Genetique des Interactions Plante-Parasite UMR.385 Montpellier, France.

³Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana.

Los síntomas del mosaico de la caña de azúcar son comúnmente asociados a la presencia de numerosas cepas del Virus del Mosaico de la Caña de Azúcar (SCMV) y del Virus del Mosaico del Sorgo (SrMV). Ambas virosis son miembros del subgrupo SCMV pertenecientes al género *Potyvirus* de la familia *Potyviridae*. Otro virus del mosaico identificado fue el Virus del Mosaico Estriado (SCSMV) el que constituye la principal causa de síntomas de mosaico en los cultivos comerciales en varios países de Asia, este virus pertenece a un nuevo género de la familia *Potyviridae* y puede infectar la caña de azúcar simultáneamente con el SCMV. Los protocolos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Reverso Transcriptasa (RT-PCR) se utilizan para detectar el SCMV y el SrMV en la misma reacción con los cebadores 1n/2n. Además, se pueden identificar el SCSMV por otro protocolo con los cebadores ST2/ST5. En este trabajo se utilizó la RT-PCR con los

cebadores 1n/2n para clasificar las cepas del virus SCMV que infectan las variedades de caña de azúcar localizadas en Matanzas, Camagüey y Holguín. La secuenciación directa de los productos de la reacción RT-PCR demostró que en estos momentos en Cuba están presentes tres cepas diferentes del SCMV, esto sugiere la necesidad de un nuevo programa para evaluar la reacción de resistencia ante la infacción del SCMV de las variedades de caña de azúcar presentes en Cuba.

Strain differentiation of *Sugarcane Mosaic Virus* in Cuba by RT-PCR and direct sequencing

Mosaic symptoms of sugarcane are commonly associated with the presence of numerous strains of *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) and *Sorghum Mosaic Virus* (SrMV). Both viruses are members of the SCMV subgroup which belongs to the genus *Potyvirus* of the family *Potyviridae*. Another mosaic virus, *Sugarcane Streak Mosaic Virus* (SCSMV) was also identified and is the major cause of mosaic symptoms in commercial sugarcane cultivars in several Asian countries; this virus belongs to a new genus in the family *Potyviridae* and can infect sugarcane simultaneously with SCMV. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) protocols are currently available to identify SCMV and SrMV in the same reaction with the primers 1n/2n. On the other hand, SCSMV can be identified by another protocol with primers ST2/ST5. In this work we used RT-PCR with the primers 1n/2n, in order to identify the strains of SCMV that infect the varieties of sugarcane located in Matanzas, Camaguey and Holguín. Direct sequencing of RT-PCR products showed that in this moment are present in Cuban three different strains of the SCMV, suggesting the necessity of a new Program to evaluate resistance reaction to SCMV infection of the sugarcane varieties present in Cuba

Efecto de *Azotobacter chroococcum* sobre plantas *in vitro* de piña durante la fase de aclimatización

Rayza González^{*1}, Taletha Laudat², Mayda Arzola¹, Roberto Méndez², Pedro Marrero², Lázaro E. Pulido², Bernardo Dibut³, José Carlos Lorenzo¹

^{*}Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, carretera Morón km 9.5, Ciego de Ávila, CP 69 450, Cuba. e-mail: rgonzalez@bioplasmas.cu

¹Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila. Laboratorio de Interacción planta-patógeno, Lab. de Mejoramiento genético.

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.

³Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical (INIFAT), Ciudad de La Habana, Cuba.

La piña es una de las frutas tropicales más importantes a nivel mundial. Sin embargo, la carencia de material vegetal de plantación figura entre los factores que han provocado un aumento de la demanda de esta fruta. El desarrollo de varios protocolos de micropropagación ha abierto una alternativa para satisfacer la demanda de plantación en el cultivo de la piña. Sin embargo, el éxito de estos procedimientos se ha visto limitado por la lentitud del crecimiento de las plantas durante la aclimatización. El empleo de biofertilizantes ha constituido una alternativa para incrementar el desarrollo de diversos cultivos. En el trabajo se muestra el efecto del biofertilizante a base de *Azotobacter chroococcum* (cepa INIFAT5) en la aclimatización de vitroplantas de piña. La bacteria fue asperjada en el momento de la siembra a condiciones *ex vitro* con una frecuencia de aplicación cada 4 semanas durante 5 meses. Fueron evaluados los parámetros de masa fresca y seca, altura de la planta y longitud de la raíz. Además, se realizó una caracterización anatómica de las hojas y raíces de las plantas biofertilizadas y al tratamiento control, y se determinaron los siguientes parámetros: grosor de: la cutícula, epidermis, hipodermis, parénquima acuífero y clorofílico. En las raíces se evaluaron: grosor de la exodermis, mesodermis externa e interna y la médula. De forma general la aplicación de la cepa INIFAT 5 incrementó el desarrollo de las vitroplantas. Los mayores efectos positivos se mostraron en los siguientes indicadores: masa fresca, grosor de la cutícula superior e inferior, y en la exodermis de la raíz. No se observaron efectos en el grosor del parénquima clorofílicos.

Effect of *Azotobacter chroococcum* on pineapple *in vitro*-plantlets growth during acclimatization

Pineapple is one of the most important tropical fruits but availability of planting material is not enough to meet the agricultural demands. Therefore, several pineapple micropropagation protocols have been developed however acclimatization of *in vitro*-plantlets is still a very prolonged period. Bio-fertilizers have been found as safe alternatives to improve the agricultural performances of many crops. We report here some of the effects of *Azotobacter chroococcum* (strain INIFAT5) application over pineapple *in vitro*-plantlets during hardening. The bacteria were sprayed immediately after transplanting to *ex vitro* environment, and every 4 weeks. A control group of plantlets was established. The experiment was evaluated after 5 months. Plant fresh mass, plant dry mass, plant height and root length were recorded. Anatomy of middle-aged leaves and roots were also studied. The following leaf measurements were

performed: transversal thickness; and width of cuticle, epidermis, hypodermis, water-storage parenchyma, and chlorophyll-storage parenchyma. Thickness of root exoderm, external mesoderm, internal mesoderm and marrow were also evaluated. In general, strain INIFAT5 increased the plantlet development. The most remarkable and positive effects were recorded in the plant fresh mass, in the thickness of the leaf upper and lower cuticles, and in the root exoderm width. Contrastingly, *A. chroococcum* did not affect the thickness of the leaf –storage chlorophyll parenchyma.

Aislamiento de pseudomonas fluorescentes de la rizosfera del cacao (*Theobroma cacao*) con actividad antagonista ante *Phytophthora palmivora*

Yanelis Acebo-Guerrero^{1*}, M. El Jaziri², O. M. Vandeputte², Aleida Romero-Sacerio¹, Mayra Heydrich-Pérez¹, Annia Hernández-Rodríguez¹

¹Facultad de Biología. Universidad de la Habana. Calle 25 #455 e/J e I. Vedado, Ciudad de la Habana, Cuba.
e-mail: acebo@fbio.uh.cu

²Laboratoire de Biotechnologie Végétale, Université Libre de Bruxelles (ULB), 8 rue Adrienne Bolland, 6041 Gosselies, Belgium

En Cuba, casi todo el cacao que se produce se hace por pequeños campesinos y productores, siendo la pudrición negra una de las enfermedades que más ataca el cultivo del cacao. La enfermedad está causada por un complejo de especies del género *Phytophthora* (*P. palmivora*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. heveae*, and *P. megakarya*). Dentro de la estrategia de Agricultura sostenible, se considera cada vez más la utilización de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal como una alternativa al uso excesivo de químicos en la Agricultura. Muchas rizobacterias han sido empleadas como agentes de control biológico para erradicar diferentes fitopatógenos. Dentro de las rizobacterias más prometedoras están las pseudomonas fluorescentes, un grupo microbiano que tiene la capacidad tanto de fitoestimular como de controlar enfermedades vegetales. Sin embargo, se conoce poco de las interacciones cacao-pseudomonas fluorescentes, por lo que la utilización de estos microorganismos para el control de la pudrición negra resulta de gran interés para nuestro país. En este trabajo, se llevaron a cabo aislamientos de pseudomonas fluorescentes asociadas a la rizosfera del cacao. A los aislados obtenidos se le realizaron diferentes estudios, tales como la producción de sideróforos, quitinasas, lipasas, AHLs, así como la determinación de su actividad antagonista *in vitro* ante *Phytophthora palmivora*. Los resultados

muestran que las cepas de rizobacterias tienen actividad antagonista ante *P. palmivora*, tienen la capacidad de producir sideróforos, no producen quitinasas, lipasas ni AHLs, por lo que su actividad antagonista debe estar relacionada con otro mecanismo de acción además de la producción de sideróforos. En este estudio se demuestran las potencialidades de la utilización de estas rizobacterias como antagonistas frente a *P. palmivora*.

Isolation of fluorescent pseudomonads from the cacao (*Theobroma cacao*) rhizosphere with antagonistic activity against *Phytophthora palmivora*

In Cuba, most of the cacao is produced by smallholders and farmers, being black pod one of the most important cacao diseases. Black pod is caused by a species complex of *Phytophthora* (*P. palmivora*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. heveae*, and *P. megakarya*). In the Sustainable Agriculture strategy, the utilization of Plant Growth Promoting Bacteria is more often considered as an alternative for the excessive use of chemical compounds in the agriculture. Many rhizobacteria have been used as biocontrol agents to eradicate several phytopathogens. Among the most promising rhizobacteria, fluorescent pseudomonads stand out, since it is a microbial group able to both phytostimulate and biocontrol plant diseases. However, little is known of cacao-fluorescent pseudomonads interactions, thus being of great interest the use of these microorganisms to biocontrol black pod in our country. In this work, fluorescent pseudomonads were isolated from cacao rhizosphere. The obtained isolates were characterized regarding siderophore production, chitinases, lipases, AHLs and the determination of antagonistic activity *in vitro* against *Phytophthora palmivora*. The results showed that the rhizobacterial strains have antagonistic activity against *P. palmivora*, are able to produce siderophores, although they are not able to produce neither chitinases nor lipases or AHLs. Therefore, their antagonistic activity is suggested to be related to siderophore production and other mechanisms. In this study the potentialities of these rhizobacteria as antagonists against *P. palmivora* were proven.

First report of Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus 3 infecting pineapple in Cuba

L. Hernández*, P. L. Ramos, I. Peña, M. Rubial, J. M. Pérez.

Research Institute on Tropical Fruit Crops, P.O. Box 11 300, 7th Ave., 3005, Playa, Havana City, Cuba.

*e-mail: lesterhernandez@iift.cu

Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) is a widespread crop in tropical and subtropical areas of the world. Crop yields are affected by mealybug wilt of pineapple (MWP), a disease related to a viral infection and vectored by mealybugs (*Dysmicoccus* spp.). Five species of ampeloviruses (*Ampelovirus* genus, *Closteroviridae* family) associated to PMW have been described. These viruses have been denominated *Pineapple Mealybug Wilt-associated virus 1* (PMWaV-1), PMWaV-2, PMWaV-3, PMWaV-4 and PMWaV-5, according to the order in which they have been characterized. However, contribution of each virus to pineapple crop yield losses, but PMWaV-2, is not well known yet. At present, there are 6 736 ha of pineapple orchards in Cuba, and fruit annual production in 2 009 was about 24 502 ton at the end of the last year. The presence of ampeloviruses associated to MWP in Ciego de Avila, a locality from the central region of the Island, was firstly reported in 1 998 and lately it was demonstrated by molecular analyses the presence of the specie PMWaV-2. During a survey to search for the presence of PMWaVs along the Cuban island, two plants showing typical symptoms of MWP (foliar reddening, leaves with tips curved down and die back) were collected at the occidental region of Cuba. Total RNA was extracted using the *TRIzol LS Reagent* according to the manufacturer's manual (GIBCO BLR). RT-PCR assays for PMWaV-3 detection was performed using the 263/264 primer pair which amplify a 490 pb fragment from the *HSP 70h* protein ORF (Sether *et al.*, 2005). Amplicons with expected size obtained were ligated to pGEM®-Teasy vector (PROMEGA, Madison) and two individual clones derived from each infected plant were sequenced (GenBank #GU563497). Sequence comparisons using CLUSTAL W program revealed the closest nucleotide identities (98%) to PMWaV-3 from Hawaii (GB #DQ399259.2). Furthermore, the two pineapple plants infected with PMWaV-3 were also infected with PMWaV-2. Gathering all of these evidences, this is the first report of the presence of the PMWaV-3 in the Caribbean basin pineapple fields.

Primer informe de la presencia de *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus 3* en plantas de piña en Cuba

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) es un cultivo distribuido por las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Los rendimientos del cultivo son afectados por la marchitez de la piña causada por cochinillas (MPC), una enfermedad asociada a virosis y que se trasmite por cochinillas (*Dysmicoccus* spp.). Hasta el momento se han descrito cinco especies de ampelovirus (Género *Ampelovirus*, Familia *Closteroviridae*) asociadas a MPC. Estos virus se

han nombrado como *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus 1* (PMWaV-1), PMWaV-2, PMWaV-3, PMWaV-4 y PMWaV-5, de acuerdo con el orden en el cual se caracterizaron. Sin embargo, la afectación de cada uno de los virus a los rendimientos del cultivo, excepto para PMWaV-2, no está bien descrita aún. En la actualidad en Cuba existen más de 6 736 ha de tierra cultivadas con piña y la producción en el 2 009 fue de 24 502 ton. El primer informe de la presencia de ampelovirus asociados a plantas con MPC en Cuba data del 1 998. Los análisis moleculares demostraron la infección por PMWaV-2 en las de muestras de Ciego de Ávila, en la región central de la isla. Durante una prospección para investigar la presencia de los PMWaVs en Cuba, se colectaron dos plantas en la región occidental de la Isla, las cuales mostraban los síntomas típicos de MPC (enrojecimiento foliar y hojas con las puntas curvadas y con necrosis). Los ARN totales se aislaron y el ensayo para la detección del PMWaV-3 por RT-PCR se efectuó con el par de cebadores específicos 263/264. Estos cebadores amplifican un fragmento de 490 pb del marco de lectura abierto de la proteína de shock térmico *HSP 70h*. Los amplicones con la talla esperada se purificaron y se clonaron en el plásmido pGEM®-Teasy vector (PROMEGA, Madison). Las secuencias obtenidas (GenBank #GU563497) demostraron una identidad nucleotídica del 98% con PMWaV-3 aislado de Hawái (GB #DQ399259.2). En las plantas infectadas también se detectó la presencia de PMWaV-2. El presente trabajo constituye el primer informe de la presencia del PMWaV-3 en plantaciones de piña del Caribe.

El medio de cultivo libre de células de *Burkholderia cepacia* aumenta la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*)

Annia Hernández-Rodríguez^{1*}, Yanelis Acebo-Guerrero¹, Mayra Heydrich-Pérez¹, M. El Jaziri², O. M. Vandeputte²

¹Facultad de Biología. Universidad de la Habana. Calle 25 #455 e/J e I. Vedado, Ciudad de la Habana, Cuba.
e-mail: annia@fbio.uh.cu

²Laboratoire de Biotechnologie Végétale, Université Libre de Bruxelles (ULB), 8 rue Adrienne Bolland, 6041 Gosselies, Belgium

La bacteria saprofítica *Burkholderia cepacia* juega un papel activo como Bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPB). En este estudio, se evaluó la capacidad del medio de cultivo libre de células (CFCM) de promover el crecimiento vegetal en estadios tempranos del desarrollo en dos cultivos de importancia agronómica: el maíz (*Zea mays*) y el arroz (*Oryza sativa*). El tratamiento de semillas de

maíz y arroz por 45 minutos con el CFCM aumentó la germinación y consecuentemente, el crecimiento de las plántulas. El efecto del CFCM se confirmó por un aumento en la biomasa del tallo y principalmente en los sistemas radicales de las plántulas tratadas. La caracterización cromatográfica reveló que el CFCM de *B. cepacia* es una mezcla compleja de diferentes tipos de metabolitos incluyendo entre otros, ácido salicílico, ácido indolacético (AIA) y varias compuestos fenólicos no identificados. El fraccionamiento de los componentes del CFCM reveló que el desarrollo acelerado del sistema radical de las plántulas tratadas con este, se debe a la acción sinérgica de varios grupos de componentes, más que a la acción individual del AIA. Los datos presentados sugieren que el CFCM de *B. cepacia* puede ser utilizado para aumentar la germinación vegetal.

Cell-free culture medium of *Burkholderia cepacia* improves seed germination and seedling growth in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*)

The saprophytic bacterium *Burkholderia cepacia* has been shown to play an active role as plant growth promoting bacteria (PGPB). In this study, the ability of cell-free culture medium (CFCM) of *B. cepacia* to improve early developmental stages of plants has been assessed on two agronomically important crops: maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). Treating maize and rice seeds for 45 min before germination significantly improved seed germination and consequent seedling growth. The effect of CFCM was confirmed by the increased biomass of the shoot and, mainly, the root systems of treated seedlings. Chromatographic characterization of the CFCM revealed that the spent culture medium of *B. cepacia* is a complex mix of different classes of metabolites including, among others, salicylic acid, indole-3-acetic acid (IAA) and several unidentified phenolic compounds. Fractionation of the CFCM components revealed that the impressive development of the root system of CFCM-treated seedlings is due to the synergistic action of several groups of components rather than IAA alone. The data presented here suggest that a CFCM of *B. cepacia* can be used to improve crop germination.

Identificación de aislados nativos de pseudomonas fluorescentes con actividad antagonista ante *Curvularia* spp.

Dennys León-Plasencia¹, Annia Hernández-Rodríguez¹, Narovis Rives-Rodríguez², Acela Díaz-de la Osa¹, Aleida Romero-Sacerio¹, Michel Almaguer-Chávez¹, Yanelis Acebo-Guerrero¹.

¹Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Calle 25 #455 e/J e I. Vedado, Ciudad de la Habana, Cuba.

²Instituto de Investigaciones de Granos. km 16.5, Autopista Novia del Mediodía, Bauta, La Habana, Cuba.
e-mail: annia@fbio.uh.cu, acebo@fbio.uh.cu

La identificación de rizobacterias con potencialidades para el control biológico y estimulación del crecimiento vegetal resulta de especial interés para el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) en Cuba. Este trabajo tuvo como objetivos: identificar aislados autóctonos de pseudomonas fluorescentes con actividad antagonista ante *Curvularia pallescens* (Kauffman) Boedijn y *Curvularia trifolii* Boedijn. Los resultados demostraron que todos los aislados tuvieron efecto antagonista ante los aislamientos fúngicos probados, mostrando porcentajes de inhibición desde 49% hasta un 83%. Las cepas bacterianas fueron incluidas dentro de las especies *Pseudomonas putida* (14 de ellas) y *Pseudomonas fluorescens* (tres). De modo general, se demuestra que los aislados de pseudomonas fluorescentes presentan actividad antagonista ante los aislados de *Curvularia* estudiados, lo que indica las potencialidades de estas rizobacterias como agentes de control biológico de patógenos fúngicos en el cultivo del arroz.

Identification of native isolates of fluorescent pseudomonas with antagonistic activity against *Curvularia* spp.

The identification of rhizobacteria with potentialities for biocontrol and plant growth promotion is of great interest for the improvement of rice crop (*Oryza sativa* L.) in Cuba. This work is aimed to identify native fluorescent pseudomonas isolates with antagonistic activity against *Curvularia pallescens* and *Curvularia trifolii*. The results showed that all the isolates have antagonistic effect against the tested fungal isolates, showing inhibition percentages ranging from 49% to 83%. The bacterial isolates were classified as *Pseudomonas putida* (14 of them) and *Pseudomonas fluorescens* (three). In general, it is shown that the fluorescent pseudomonas isolates showed antagonistic activity against these *Curvularia* species, which suggest the potentialities of these rhizobacteria as biocontrol agents against fungal pathogens in rice crop.

Plant sulphur metabolism and plant diseases

Silvia Haneklaus, Elke Bloem, Ewald Schnug

Institute for Crop and Soil Science, Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI), Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany, silvia.haneklaus@jki.bund.de

Environmentally sound methods for disease control imply for instance soil tillage measures, crop rotation, mixed cropping systems and cultivation of resistant

varieties. The targeted use of minerals offers yet another possibility to enhance resistance against pathogens. Here, the direct toxicity of nutrients and indirect impairment by minerals needs to be distinguished from nutrient-mediated, resistance mechanisms. Sulphur (S) is unique in having changed its reputation within just a few years from undesired pollutant to a major nutrient limiting plant production in Western Europe. Hence, macroscopic symptoms of S deficiency can be observed regularly on production fields. S deficiency impairs crop productivity and quality, but also interferes with environmental demands. The mineral nutrient supply is supposedly the primary and pivotal barrier against infection, which also influences the course of pathogenesis. In general, the greatest benefit to the plant in terms of health can be expected when full nutrient sufficiency is provided; however, the response to a particular nutrient may be different when going from deficiency to sufficiency than from sufficiency to excess. The plant S metabolism is closely related to the natural resistance of crops against fungal diseases. Soil-applied sulphate fertilisation proved to significantly reduce infection rate and severity of crops by fungal diseases. The potential efficacy of SIR expressed as a reduction of the disease index ranged from 5 - 50% and 17 - 35% in greenhouse and field experiments, respectively. The term Sulphur Induced Resistance (SIR) denotes the reinforcement of the natural resistance of plants against fungal pathogens through triggering the stimulation of metabolic processes involving sulphur by targeted sulphate-based and soil-applied fertilizer strategies. The present contribution summarises up-to-date research in the field of SIR from molecular to field level in relation to different host/pathogen systems.

Respuesta histoquímica defensiva en plantas de dos genotipos de *Musa* spp. inoculados artificialmente con *M. fijiensis*

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

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: cynthia@ibp.co.cu

La Sigatoka negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis* es clasificada como la enfermedad foliar de plátanos y bananos más devastadora en todo el mundo. Para su control no han sido establecidas opciones viables desde el punto de vista económico y ambiental y el desarrollo de genotipos resistentes es insuficiente. Unido a esto, aún es muy limitado el conocimiento de los eventos bioquímicos involucrados en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*.

El estudio de este patosistema puede brindar nuevas herramientas para los programas de mejoramiento genético de plantas de *Musa* spp. ante la enfermedad. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar la respuesta histoquímica defensiva en plantas de dos genotipos de *Musa* spp. inoculados artificialmente con *M. fijiensis*. Se detectó la presencia de lignina, peróxido de hidrógeno y compuestos fenólicos mediante técnicas histoquímicas, en los diferentes estados de síntoma en los genotipos de *Musa* 'Grande naine' (susceptible) y 'Calcutta 4' (resistente). Como resultado, se observó la presencia de deposiciones de lignina, así como la acumulación de peróxido de hidrógeno y fenoles en el tejido vegetal correspondiente a los diferentes síntomas de la enfermedad, tanto en las plantas del genotipo susceptible como del resistente. La presencia de estos compuestos aumentó a medida que evolucionaron los síntomas en ambos, y en el caso de la acumulación de peróxido de hidrógeno fue mayor en plantas de 'Calcutta 4' respecto a las de 'Grande naine'. Se demostró que la acumulación de estos compuestos bioquímicos está relacionada con la respuesta defensiva de la planta ante la inoculación del patógeno, en ambos genotipos. Estos resultados ofrecen además, nuevas evidencias de los mecanismos de defensa de la planta en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*.

Histochemical defense response in two *Musa* spp. genotypes artificially inoculated with *M. fijiensis*

Black leaf streak, caused by *Mycosphaerella fijiensis* is considered the most destructive foliar disease of bananas and plantains worldwide. Economic and environmental viable options to control the disease have not been established and the development of resistant genotypes is still insufficient. Besides, the knowledge of the biochemical events involved in *Musa* spp.-*M. fijiensis* interaction is still very limited, so studying this pathosystem provides new tools for genetic improvement programs of *Musa* spp. plants for to control the disease. That is why the aim of this study was to determine histochemical defense response in two *Musa* spp. genotypes artificially inoculated with *M. fijiensis*. The presence of lignin, hydrogen peroxide and phenolic compounds in different stages of symptoms were detected in leaves of 'Grande naine' (susceptible) and 'Calcutta 4' (resistant) *Musa* genotypes. As a result, the presence of lignin deposition and the accumulation of hydrogen peroxide and phenolics in plant tissue were observed for all the symptoms stages in both susceptible and resistant genotypes. The presence of these compounds increased as the symptoms developed in both 'Grande naine' and 'Calcutta 4' plants. The

hydrogen peroxide accumulation was greater in 'Calcutta 4' than in 'Grande naine' plants. The increase of these biochemical compounds in *Musa* spp. plant leaves is related to the plant defence response to *M. fijiensis* inoculation, in both genotypes. These results provide further new evidences of the mechanisms of plant defence in *Musa* spp.-*M. fijiensis* interaction.

Nuevo método para evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de bacterias frente a *Mycosphaerella fijiensis*

Mileidy Cruz-Martín¹, Ivian Poveda, C. Sánchez-García, M. Acosta-Suárez, M. Leiva-Mora, B. Roque-Morales, Y. Alvarado-Capó

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

Una de las características distintivas de *Mycosphaerella fijiensis* es su crecimiento lento, compacto y duro en medios de cultivo sintético y semi-sintético. Esto implica una desventaja a la hora de realizar ensayos relacionados con la actividad antifúngica ya sea de controles biológicos o nuevos productos químicos frente a este patógeno. Se han desarrollado métodos basados en la inhibición del crecimiento del tubo germinativo de ascosporas, así como la medición del diámetro de colonias. Sin embargo, estos son muy laboriosos y requieren de entre 15 y 20 días para su evaluación. La presente investigación se realizó con el objetivo de estandarizar un nuevo método para evaluar actividad antifúngica *in vitro* de bacterias frente a *M. fijiensis*. Se emplearon siete cepas bacterianas aisladas de la filosfera de plantas de *Musa* spp. y el aislado CCIBP-Pf83 de *M. fijiensis* pertenecientes a la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Microbiología aplicada del IBP. El método consistió en emplear suspensiones miceliales de *M. fijiensis* en Agar Papa Dextrosa (PDA) a 40°C. El agar fue distribuido en placas de Petri de 90 mm y a las 24 horas se inocularon las suspensiones bacterianas. Diariamente se midió el diámetro del halo de inhibición. Con el método propuesto se logró determinar, a partir de las 48 h, actividad antifúngica de bacterias frente a *M. fijiensis* así como se encontraron diferencias entre las cepas bacterianas en relación con su efecto antifúngico. El método ensayado dado sus características, permite no solo evaluar cepas bacterianas con actividad antifúngica sino fungicidas químicos. Disponer de bioensayos para determinar actividad antifúngica es una herramienta importante en los estudios de interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis* y *M. fijiensis*- microorganismo dentro de los programas de mejoramiento genético de *Musa* spp.

Analysis of differential gene expression of some flavonoids pathway derived genes in *Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis* Morelet pathosystem

Milady Mendoza-Rodríguez¹, Orelvis Portal¹, Aminael Sánchez-Rodríguez¹, Bárbara Ocaña¹, Mayra Acosta-Suárez¹, Berkis Roque¹, Elio Jiménez¹, Monica Höfte²

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

²Laboratory of Phytopathology, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Coupure Links 653, B-9000 Gent, Belgium

Phenylpropanoid pathway is the best-studied, most engineered and frequently induced by pathogens or pathogen elicitors and specifically flavonoid branch (including isoflavonoid), have been subject for the study of different host-pathogen interaction. Differential expression of genes such as chalcone synthase (CHS), flavonoid 3'5' hydroxylase-like (F3'5'H) and isoavone reductase-like (IRL), involved in flavonoid pathway were investigated in banana plants 'Calcutta 4' and 'Grande naine' at 0, 6 and 12 days after artificial inoculation with *M. fijiensis* and after plant elicitation with ethephon 500 µM, throughout reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) by using specific primers. Gene activation patterns were obtained for three genes under study with a faster and slightly increased in the resistant genotype compared with the susceptible one in the face of fungal challenge. After plant elicitation treatment no significance differences were observed between F3'5'H and IRL mRNA transcripts levels in the susceptible plants however, in the resistant genotype there were observed maximum peaks of expression for each gene under study. The preliminary results in *Musa*-*M. fijiensis* pathosystem study constitute the first approach to unravel flavonoids role in plant defense response.

Análisis de la expresión diferencial de genes en la interacción *Musa*-*Mycosphaerella fijiensis* Morelet

La ruta de los fenilpropanoides es la más estudiada, manipulada y frecuentemente inducida por patógenos o elicitores de patógenos y específicamente la rama de los flavonoides (que incluye los isoflavonoides), han sido tema de estudio en diferentes interacciones hospedante-patógeno. La expresión diferencial de genes involucrados en la ruta de los flavonoides tales como chalcona sintasa (CHS), similar a flavonoide 3'5' hidroxilasa (F3'5'H) y similar a la isoflavona reductasa (IRL), fue investigada a través de la reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con cebadores específicos, en plantas de 'Calcutta 4' y 'Grande naine' a los 0, 6 y 12 días

posteriores a la inoculación con *M. fijiensis* y después de la elicitación de las plantas con etephon 500µM. Perfiles de activación de genes fueron obtenidos para los tres genes en estudio con un mayor y ligero incremento en el genotipo resistente comparado con el susceptible ante el desafío del hongo. Después del tratamiento de las plantas con elicitor no se observaron diferencias significativas entre los niveles de transcritos de F3'5'H e IRL en las plantas susceptibles sin embargo, en el genotipo resistente se observaron picos máximos de expresión para cada gen estudiado. Los resultados preliminares obtenidos en el estudio del patosistema *Musa-M. fijiensis* constituyen el primer acercamiento para desentrañar el papel de los flavonoides en la respuesta de defensa en la planta.

Characterization of three metallothionein-like genes obtained from a subtractive library in 'Calcutta 4'-*Mycosphaerella fijiensis* Morelet interaction

Milady F. Mendoza-Rodríguez¹, Aminaél Sánchez-Rodríguez¹, Orelvis Portal¹, Mayra Acosta-Suárez¹, Berkis Roque¹, Yovanni Izquierdo¹, Monica Höfte² and Elio Jiménez¹. *Autor para correspondencia.

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

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

Metallothioneins (MTs) are small, Cys-rich proteins which are involved in reactive oxygen species (ROS) scavenging and metal homeostasis. In contrast to the vertebrate forms, knowledge about members of the plant metallothionein is still scarcely. In this study, three complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) encoding type-3 MT-like genes were characterized, from an expressed sequence tag collection, obtained from a polymerase chain reaction based suppression subtractive hybridization approach from 'Calcutta 4' leaves inoculated with *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Sequence alignment, domains findings and phylogenetic relationships was established among 24 metallothioneins sequences with the bioinformatics ClustalW, MEME and MEGA4. Finally, it was obtained a common domain for all sequences and close relationship among them, which allowed us to probe that the three sequences under study shared the characteristics of type-3 plant metallothionein.

Caracterización de tres genes de metalotioninas obtenidos de una biblioteca sustractiva en la interacción 'Calcutta 4'-*Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Las metalotioninas son proteínas pequeñas, ricas en cisteína las cuales están involucradas en la eliminación de especies reactivas de oxígeno y la homeostasis de metales. El conocimiento acerca de miembros de las metalotioninas de plantas es aún escaso en contraste a lo que se sabe de estas en las formas vertebradas. En este estudio, fueron caracterizados tres ácido desoxirribonucleicos complementarios que codificaban para genes similares a las metalotioninas tipo 3, de una colección de secuencias blanco expresadas, obtenida de una biblioteca sustractiva basada en la reacción en cadena de la polimerasa en hojas de 'Calcutta 4' inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. El alineamiento de secuencias, búsqueda de dominios y la relación filogenética fue establecida a través de 24 secuencias de metalotionina con las herramientas bioinformáticas ClustalW, MEME y MEGA4. Finalmente, fue obtenido un dominio común para todas las secuencias y una estrecha relación entre ellas lo cual nos permitió demostrar que las tres secuencias estudiadas compartían las características de las metalotioninas tipo 3.

Identificación de hongos del suelo asociados a plantaciones de *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland

M. Acosta-Suárez*, Y. Alvarado-Capó, M. Leiva-Mora, Berkis Roque, M. Cruz-Martín, C. Sánchez-García, M. Freire-Feijo

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

Los microorganismos juegan un rol esencial en el funcionamiento y sustentabilidad del ecosistema del suelo incluyendo los ciclos biogeoquímicos. Los hongos pueden ser hallados en suelos que difieren ampliamente en su textura, composición química, humedad y pH, en diversas áreas geográficas. El estudio de la diversidad fúngica en suelos plantados con bambúes ayudará al conocimiento de la importancia de estos microorganismos en la conservación de los suelos y en la fertilidad de esta especie y por ende al cuidado del medio ambiente. Este trabajo tuvo como objetivo: cuantificar e identificar los hongos del suelo presentes en dos plantaciones de *Bambusa vulgaris* var. vulgaris Schrader ex Wendland. Se realizaron dos muestreos en dos tipos de suelos, uno en Villa Clara (Loma el Sijú) y otro en Cienfuegos (Jardín Botánico de Cienfuegos) en dos épocas del año. Para el conteo de las colonias se utilizó el método indirecto de cuenta en placa mediante diluciones decimales seriadas y siembra en medio de cultivo Agar Rosa bengala. Para la caracterización e identificación se tuvieron en cuenta sus características culturales y morfológicas. Se comprobó que el número de hongos

filamentosos cultivables en el suelo de plantaciones de *B. vulgaris* var. *vulgaris* se encontraba entre 10^4 - 10^5 ufc/g de suelo tanto en plantaciones jóvenes (4 años) como en la de más de 60 años. Se encontró diversidad en la microbiota presente y se identificó como más frecuente al género *Trichoderma*.

Identificación molecular de aislados de *Mycosphaerella fijiensis* para su uso en programas de mejoramiento genético utilizando la biotecnología vegetal

M. Leiva-Mora*, Y. Alvarado-Capó, Orelvis Portal, M. Acosta-Suárez, M. Cruz-Martín, C. Sánchez, B. Roque

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

La presencia de tres especies de *Mycosphaerella* morfológicamente similares dentro del complejo Sigatoka, requiere el uso de herramientas moleculares para realizar un diagnóstico más preciso. El presente trabajo se realizó con el objetivo de identificar molecularmente aislados monoascospóricos de *Mycosphaerella* obtenidos a partir de hojas enfermas de 'Grande naine' (*Musa* AAA). El ADN genómico de cada aislado se extrajo, a partir de 50 mg de micelio liofilizado. Para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se utilizaron oligonucleótidos específicos para *M. fijiensis* (MF137 5' situado entre la región de los ARN estructurales 18S y 5.8S y R635 5' -GGTCCGTGTTTCAAGACGG- 3' situado en la región ribosomal 25 S del ADN genómico). En cada uno de los nueve aislados, se obtuvo una banda de aproximadamente 1 000 pares de bases que se correspondió con la talla esperada para la amplificación del ADNr (ITS1) de *M. fijiensis*. Se confirmó que todos los aislados pertenecían a dicha especie y además se comprobó que fueron patógenos y reprodujeron la sintomatología de la Sigatoka negra en el genotipo susceptible 'Grande naine' en casa de cultivo. Con el aislado más agresivo (CCIBP-Pf80) y el uso de variables epifitológicas y componentes de la resistencia se evaluaron tempranamente la respuesta de genotipos susceptibles ('Grande naine', 'Pisang Awak') y resistentes ('Calcutta 4', 'Yangambi km 5', 'FHIA-18' y 'FHIA-25') de *Musa* frente a *M. fijiensis*. Este resultado es el primer informe de identificación molecular de aislados cubanos de *M. fijiensis* para la evaluación temprana de genotipos de *Musa*.

Molecular identification of *Mycosphaerella fijiensis* isolates to support breeding programs using plant biotechnology

The presence of three species of *Mycosphaerella* morphologically related are involved in the Sigatoka disease complex, it is required the use of molecular tools for a more precise diagnostic. The aim of the present study was to identify molecularly monoascosporic isolates of *Mycosphaerella* obtained from 'Grande naine' infected leaves. Genomic DNA from each isolate was extracted, from 50 mg of lyophilized mycelia. For the amplification of Polymerase chain reaction (PCR), it were used specific oligonucleotides of *M. fijiensis* (MF137 5' placed between structural RNA region 18S/5.8S and R635 placed between ribosomal region 25 S of genomic DNA). In each of the nine isolates, it was obtained a band of approximately 1000 bases pairs that correspond with the size of DNAr (ITS1) of *M. fijiensis*. It was confirmed that all isolates belonged to *M. fijiensis* and were also pathogenic because they reproduced in 'Grande naine' the sintomatology of Black Sigatoka in greenhouse. Using the more aggressive isolate (CCIBP-Pf80) together with epidemiological variables and components of resistance, it was done an early screening susceptible ('Grande naine', 'Pisang Awak') and resistant *Musa* genotypes ('Calcutta 4', 'Yangambi km 5', 'FHIA-18' y 'FHIA-25') to *M. fijiensis*. This is the first report of molecular identification of cubans *M. fijiensis* isolates for early evaluation of *Musa* genotypes.

Aislamiento e identificación de bacterias con propiedades antifúngicas en lesiones de Sigatoka negra

Ivian Poveda Martínez*, Mileidy Cruz-Martín, C. Sánchez-García, M Acosta-Suárez, M. Leiva-Mora, B. Roque-Morales, Y. Alvarado-Capó

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

*e-mail: ivian@ibp.co.cu

El estudio de las interacciones *Musa* – *Mycosphaerella fijiensis* así como su interrelación entre estos y demás microorganismos asociados puede contribuir al desarrollo de fungicidas altamente selectivos, así como, a la elaboración de estrategias de resistencia más duraderas. Sin embargo poco se conoce sobre lo relacionado a la microbiota presente en la filosfera de estas plantas. Teniendo en cuenta este criterio el trabajo tuvo como objetivo aislar y caracterizar bacterias de la filosfera de bananos y plátanos. Para ello se desarrollaron tres métodos de aislamiento: lavado de las hojas, maceración e impresión. El material vegetal empleado consistió en fragmentos de tejido de la tercera y cuarta hojas, con lesiones y sin lesiones de Sigatoka negra. Las muestras se recolectaron de parcelas

particulares de diferentes regiones de la provincial Villa Clara. Se le determinó la actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*. Los aislados que presentaron actividad antifúngica fueron caracterizados morfológica y bioquímicamente. Se obtuvieron un total de 217 aislados bacterianos con características morfológicas y culturales diferentes y los tres métodos empleados permitieron aislar bacterias. Del total de aislados el 10.6% manifestaron actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*. De este grupo se pudo apreciar que prevalecieron los aislados con células en forma bacilar, solo uno se observó en forma de cocos. Este trabajo permitió corroborar la presencia de bacterias con actividad antifúngica en la filosfera de *Musa* spp. tanto en hojas sin síntomas como en enfermas con Sigatoka negra. Estos resultados son alentadores en lo concerniente al estudio de la interacción entre estos microorganismos y *M. fijiensis* ya sea para el conocimiento de la biología del patógeno como en la búsqueda de nuevos métodos de control, representando, los microorganismos residentes, una alternativa potencial.

Efecto de la infección temprana con el Virus de la mancha anular de la papaya en el crecimiento de *Carica papaya* L. var. Maradol roja

Daniel Cabrera^{1,2} y Orelvis Portal^{2*}

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

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. e-mail: orelvis@ibp.co.cu

El Virus de la mancha anular de la papaya (PRSV) está considerado en muchos países tropicales y subtropicales como el mayor obstáculo en la producción de papaya. La enfermedad producida por este virus limita el crecimiento de las plantas. Cuando la enfermedad aparece en fases tempranas de las plantaciones de papaya, la infección es más severa y las plantas generalmente no producen frutos. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del PRSV en el crecimiento de plantas de papaya var. Maradol roja con 60 días de germinadas las semillas. Para la inoculación del PRSV, se empleó Carborundum (600 mesh) como abrasivo y posteriormente se evaluó el grado de infección mediante una escala de gradación (de 0 a 6) según la sintomatología desarrollada y el tamaño de las plantas a las siete semanas de inoculadas. Los resultados se procesaron mediante el uso del paquete estadístico STATGRAPHIC plus 5.0 sobre Windows. A las siete semanas las plantas de papaya infectadas manifestaron una longitud promedio de 17.5 cm, lo que representó una reducción del crecimiento en 5.1 cm en comparación con las plantas sanas.

Todas las plantas inoculadas alcanzaron el máximo grado de la escala (6), observándose un mosaico severo y deformación en las hojas. La disminución del crecimiento se debió al efecto del virus sobre las plantas jóvenes. Estos resultados confirman que las plantas con aproximadamente 60 días de germinadas las semillas son susceptibles a la infección por el PRSV y pueden constituir fuente de inóculo para la diseminación del virus en el campo.

Regulation of the Isocitrate lyase promoter of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Orelvis Portal^{1*}, Dorien Colman², Amina Sánchez-Rodríguez^{1,3}, Barbará Ocaña¹, Mayra Acosta-Suarez¹, Monica Hofte² and Elio Jiménez¹.

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

²Faculty of Bioscience Engineering. Ghent University. Coupure Links 653, Gent, Belgium

³CMPG, Department of Microbial and Molecular Systems. Katholieke Universiteit Leuven. Kasteelpark Arenberg 20, Leuven, Belgium

Mycosphaerella fijiensis is a typical hemibiotrophic ascomycete and the causal agent of black leaf streak disease in bananas and plantains. In fungi, there are evidences indicating an important role of the fatty acid metabolism during plant penetration. Lipolysis and α -oxidation are the mechanisms responsible to convert the lipid stores into acetyl-CoA, which is further consumed in the tricarboxylic acid cycle via the glyoxylate cycle. Although much progress has been achieved recently on the biochemical characterization and the possible role of the key glyoxylate cycle enzyme Isocitrate lyase (ICL) as pathogenicity factor in different filamentous fungi, there is very little information concerning its regulation. In this work, transcription, expression and bioinformatic approach analysis were conducted to investigate the regulation of the native *icl* promoter in the context of a *M. fijiensis* green fluorescent protein (GFP) transformant strain, which resembles the wild type strain that gave rise. In this *M. fijiensis* transformant strain, the *gfp* transcription is under the control of the *Neurospora crassa icl* promoter. First, it was shown that *M. fijiensis* could grow in minimal medium supplemented with glucose, glycerol and ethanol as sole carbon sources. After RT-PCR analysis in repressing and non-repressing conditions it was demonstrated that both *icl* promoters from *N. crassa* and *M. fijiensis* in the GFP transformant context are two-carbon induced and not repressed by glucose. Similar result was obtained for the *N. crassa icl* promoter by GFP measurements. A motif detection

approach was useful to give new insight about the *icl* promoter regulation and carbon catabolite repression in fungi; the latter is not always correlated with a transcription of the carbon repression protein CreA. Possible implications of the ICL constitutive expression in *M. fijiensis* are discussed.

Regulación del promotor de la *Isocitrato liasa* de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Mycosphaerella fijiensis es un típico ascomiceto y el agente causal del rayado negro de la hoja de plátanos y bananos. En hongos, existen evidencias que indican un papel importante del metabolismo de los ácidos grasos durante el proceso de penetración. La lipólisis y la α -oxidación son los mecanismos responsables de convertir las fuentes de lípidos en acetil CoA, la cual es posteriormente consumida en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos a través del ciclo del glioxilato. Aunque últimamente se han alcanzado progresos en la caracterización y determinación del posible papel de la isocitrato liasa (ICL) como factor de patogenicidad en diferentes hongos filamentosos, aun existen muy poca información acerca de su regulación. En este trabajo, análisis de transcripción, expresión y bioinformáticos se llevaron a cabo para investigar la regulación del promotor nativo de la *icl* en el contexto de una cepa de *M. fijiensis* transformada con la proteína verde fluorescente (GFP), la cual está bajo el control del promotor de la *icl* de *Neurospora crassa*. Primero se mostró que *M. fijiensis* puede crecer en medio de cultivo mínimo suplementado con glucosa, glicerol y etanol como fuentes de carbono. Después de análisis por PCR en condiciones de represión y no represión se demostró que los promotores estudiados se inducen cuando hay fuentes de dos carbonos en el medio de cultivo y no se reprimen con la glucosa. Similar resultado fue observado para el promotor de la *icl* de *N. crassa* mediante mediciones de la GFP. Un análisis mediante detección de motivos reguladores en estos promotores fue útil a la hora de esclarecer su regulación y la represión por glucosa, la cual no siempre está relacionada con la expresión de la proteína CreA. Posibles implicaciones de la expresión constitutiva de la ICL en *M. fijiensis* es discutida en el trabajo.

Identificación morfológica y genética de aislados de Rizobacterias en suelos agrícolas

Ariany Colas Sánchez¹, Klever Iván Granda Mora², René Cupull Santana³, Yenisey Gutiérrez Sánchez¹, Bettina Eichler⁶, Anne Willems⁵, Jos Vanderleyden⁴ y *Roldán Torres Gutiérrez¹

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara. 54 830. Cuba. *e-mail: roldantg@uclv.edu.cu

²Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables. Universidad Nacional de Loja, Ecuador.

³Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Cuba.

⁴Centro de Genética Microbiana y de Plantas. Universidad Católica de Leuven. Bélgica.

⁵Laboratorio de Microbiología. Universidad de Gent. Bélgica.

⁶Facultad de Ciencias Agrícolas y Ambientales. Universidad de Rostock. Alemania.

La ecología y la diversidad de microorganismos son la base para el descubrimiento de diferentes procesos que se llevan a cabo en los ecosistemas. Este trabajo tiene como objetivo el aislamiento e identificación morfológica y genética de microorganismos en sistemas agrícolas en la provincia de Villa Clara, Cuba. Se tomaron muestras de nódulos obtenidos en el cultivo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), suelo Luvisol y raíces de del cultivo de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), las cuales se analizaron para determinar la biodiversidad de bacterias diazotróficas y rizosféricas. El análisis morfológico demostró varios grupos de aislados con diferencias en el tipo de crecimiento, color de las colonias, producción de polisacáridos, bordes y altura de las colonias. La identificación genética se realizó usándose la técnica de 16 s rARN, revelando ocho grupos de bacterias pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Ochrobactrum*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus*. De todas las secuencias obtenidas el 47% correspondieron con 100% de homología con la base de datos EMBL, mientras que el 57% correspondió con 99% de identidad. Los aislados correspondientes a *Agrobacterium tumefaciens* o especies de *Rhizobium* obtuvieron 37.5% de similitud con EMBL, destacándose cinco especies de *Rhizobium*. Estos resultados demuestran la abundancia de especies de *Rhizobium* en suelos de la región central de Cuba, lo que demuestra la necesidad de evaluar fenotípicamente la interacción de estas especies con líneas de frijol común para lograr la eficiencia del proceso simbiótico y elevar las tasas de fijación de nitrógeno.

Expression studies of NAC transcription factors in sugarcane in response to the infection with *Puccinia melanocephala*, the causal agent of rust disease

María I. Oloriz¹, Luis Rojas¹, Víctor Gil², Amina Sánchez-Rodríguez¹, Orelvis Portal¹, Monica Höfte³, Elío Jiménez¹

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Santa Clara, Cuba.
e-mail: maria@ibp.co.cu

²Centro de Investigaciones Agropecuarias Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Santa Clara, Cuba

³Faculty of Bioscience Engineering. Ghent University, Gent, Belgium

Genes containing a NAC domain are plant-specific transcription factors expressed in various developmental stages and in plant response to biotic and abiotic stresses. Previously, a suppressed subtractive library (SSH) was constructed which contain differentially express sequences in a rust resistant sugarcane mutant (IBP8518) during the first seven days after inoculation with *P. melanocephala* uredinospores. The expression of two NAC transcription factors (NAC-TFs) isolated in the SSH, was studied by RT-PCR and QRT-PCR analysis in infected leaves from a rust resistant mutant (IBP8518) and the susceptible genotype B4362. Besides, the variations in transcript accumulation of both NAC-TF in plants sprayed with methyl jasmonate (MeJa) and benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) was studied. At early time point of *P. melanocephala*-sugarcane incompatible interaction one of the NAC-TF is down-regulated and the other is up-regulated. In contrast, the expression of both NAC-TF is different in the compatible interaction at the same time point. Transient changes of NAC-TFs transcript accumulation were observed in BTH and MeJa sprayed plants, which putatively associate each NAC-TF to a specific pathway. This result is an evidence of the role of NAC transcription factor family in the complex regulatory network of sugarcane defense against this pathogen.

Estudios de expresión de factores de transcripción NAC en caña de azúcar en respuesta a la infección con *Puccinia melanocephala*, el agente causal de la roya

Los genes que contienen el dominio NAC son factores de transcripción específicos de plantas que se expresan en varios estados de desarrollo y en respuesta a estrés biótico y abiótico. Previamente se obtuvo una biblioteca subtractiva (SSH) que contiene secuencias diferencialmente expresada, en un mutante de caña de azúcar resistente a la roya (IBP8518), durante los primeros siete días post-inoculación con uredosporas de *P. melanocephala*. Fue estudiada la expresión de dos factores de transcripción tipo NAC (NAC-TFs) aislados en la biblioteca subtractiva RT-PCR y QRT-PCR en hojas infestadas del mutante resistente IBP8518 y el genotipo susceptible B4362. También fueron estudiadas las variaciones en la acumulación de los transcriptos de ambos NAC-TFs en plantas tratadas

con metil jasmonato (MeJa) y ácido 1,2,3-benzotiadiazol-7-carbotioico, S-metil éster (BTH). En el inicio de la interacción incompatible uno de los NAC-TF es sobre expresado y el otro es reprimido. En contraste, la expresión de ambos NAC-TF es diferente en la interacción compatible en el mismo tiempo de la interacción. También se observaron cambios temporales en la acumulación de NAC-TFs en plantas tratadas con BTH y MeJa, posiblemente asociada a una ruta específica. Estos resultados constituyen una evidencia del papel de los factores de transcripción tipo NAC en la compleja red que regula la defensa en caña de azúcar al patógeno.

Fitotoxicidad diferencial y Cromatografía en Placa Delgada de las fracciones de diferente polaridad de Filtrados de Cultivo Concentrados obtenidos durante el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (raza 1 y raza 2)

Nayanci Portal González^{1*}, Mayda Arzola², Indira Persaud¹, Mayra Acosta-Suárez³, Cynthia Sánchez-García³, Michel Leiva-Mora³, Belkis Roque³, Yelenys Alvarado-Capó³, Ermis Yanes², Barbarita Companioni², Ramón Santos Bermúdez²

¹Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 9.5. Ciego de Ávila.
e-mail: nayanci@agronomia.unica.cu

²Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 9.5. Ciego de Ávila.

³Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830

La enfermedad de Mal de Panamá o Fusariosis, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, representa la segunda enfermedad en importancia para el cultivo de bananos y plátanos. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar la fitotoxicidad diferencial de las fracciones parcialmente purificadas de los Filtrados de Cultivo Concentrados (FCC) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* razas 1 y 2, así como, evaluar la complejidad de las fracciones semipurificadas por cromatografía en placa delgada. Se emplearon filtrados de cultivo concentrado de los días 15 y 22 de la raza 1 y de los días 16, 20 y 29 de la raza 2. Se desarrolló la separación parcial de las fracciones FCC de los hongos basado en particiones con solventes orgánicos, se determinó la fitotoxicidad de las fracciones parcialmente purificadas frente a cultivares susceptibles y resistentes. Se realizó una cromatografía en placa delgada de las fracciones semipurificadas. La actividad fitotóxica total se recuperó en las fracciones de media y alta polaridad para la raza 1 y en todas las fracciones para la raza 2, aunque los mayores niveles se concentran en la

fracción de polaridad media (Foc - 1C). Las fracciones se mostraron inespecíficas en relación al daño causado sobre cultivares susceptibles y resistentes, con excepción de las fracciones de baja (Foc- 1B) y mediana polaridad (Foc- 1C) del día 16 de la raza 2 la que muestra un efecto selectivo sobre los cultivares. El análisis del cromatograma para las muestras de baja polaridad del día 15 para la raza 1 y del día 16 para la raza 2 se muestra ausencia de compuestos orgánicos. Se detectó una sola fracción Foc- 1B del día 29 de la raza 2 con presencia de una mancha con color y Rf similares al control ácido fusárico.

Differential phytotoxicity and Thin Layer Chromatography of different polarity fractions from concentrated culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (race 1 and race 2)

Panama disease or *Fusarium* wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, is the second most important disease affecting the cultivation of bananas and plantains. This work was developed with the objective of determining the differential phytotoxicity of partially purified fractions of concentrated culture filtrate (CCF) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* races 1 and 2 and assess the complexity of semipurified fractions by thin layer chromatography. Concentrated culture filtrates from days 15 and 22 for race 1 and days 16, 20 and 29 for race 2 were used. By using organic solvents, the different fractions of the CCF were partially separated, and the phytotoxicity of these fractions was determined in both resistant and susceptible cultivars. Semipurified fractions were analyzed by thin layer chromatography. The total phytotoxic activity was recovered in fractions of medium and high polarity for race 1 and in all fractions for the race 2, although the highest levels were concentrated in the fraction of medium polarity (Foc - 1C). The fractions were nonspecific in relation to damage on resistant and susceptible cultivars, with the exception of fractions of low (Foc-1B) and medium polarity (Foc-1C) of the 16th day of the race 2 which shows the selective effect on cultivars. The analysis of the chromatogram for the samples of low polarity from day 15 for race 1 and day 16 for race 2 shows the absence of organic compounds. There was a single fraction (Foc-1B) from day 29 of race 2 which showed a spot with a color and Rf similar to fusaric acid.

Transcriptome analysis on *Verticillium*-infected tomato to identify genes involved in host defense

Ermis Yanes-Paz^{1,3*}, Sajid Rehman¹, Yuling Bai², Ramón Santos Bermúdez³, Orlando Borrás-Hidalgo⁴, Bart P.H.J. Thomma¹

¹Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, The Netherlands.

²Laboratory of Plant Breeding, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, The Netherlands.

³Bioplants Center, Ciego de Avila, Cuba.

*e-mail: eyanes@bioplantas.cu

⁴Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba

Despite the economical importance of *Verticillium* spp., relatively little is known about the molecular basis of *Verticillium* pathogenicity and host resistance against this fungus. To identify key components involved in the interaction between *Verticillium* and tomato, comparative transcriptomics was performed on susceptible and resistant tomato lines of the cultivar MoneyMaker inoculated with a race 1 isolate of *Verticillium* using cDNA-AFLP. As a resistant line, Ve1 transgenic MoneyMaker was used. A total number of 176 selective primer combinations were tested and 1 434 differentially expressed transcript-derived fragments (DE-TDFs) were identified. As the DE-TDFs that are up-regulated specifically in resistant tomato upon *Verticillium* inoculation (302 DE-TDFs) may be involved in host resistance, these are functionally analyzed using virus-induced gene silencing (VIGS). The initial results of this analysis will be presented.

Análisis transcriptómico de plantas de tomate infectadas con *Verticillium* para identificar genes involucrados en la defensa del hospedero

A pesar de la importancia económica de *Verticillium* spp., se sabe relativamente poco acerca de las bases moleculares de la patogenicidad de *Verticillium* y la resistencia de el hospedero contra este hongo. Con el fin de identificar componentes claves involucrados en la interacción entre *Verticillium* y tomate, se realizó un análisis transcriptómico en líneas resistentes y susceptibles del cultivar MoneyMaker inoculadas con la raza 1 de *Verticillium* con el empleo de cDNA-AFLP. Como línea resistente se empleó el MoneyMaker Ve1 transgénico. Se probaron un total de 176 combinaciones de cebadores selectivos y se identificaron 1 434 fragmentos con expresión diferencial. (DE-TDFs). Como los DE-TDFs que se sobreexpresan de manera específica en tomate resistente inoculado con *Verticillium* (302 DE-TDFs) pueden estar involucrados en la resistencia del hospedero, éstos se analizaron de manera funcional con el empleo de Silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS). Se presentan los resultados iniciales de este análisis.

Detección de fitoplasmas tipo Amarillamiento Letal del Cocotero lejos de las costas en México

Páez-Rodríguez, L.A.¹, Aviña-Padilla, K.², Castrejón-Nava, A.I.¹, Ochoa-Sánchez, J.C.², Rivera-Bustamante, R.² y Martínez-Soriano, J.P.^{2*}

¹Instituto Tecnológico Cd. Altamirano Av. Pungarabato Pte S/N Col. Morelos Cd. Altamirano, Gro., México CP 40 660

²CINVESTAV, Campus Guanajuato, km. 9.6 lib. nte. carr. Irapuato-León, Irapuato, Gto, México CP 36 821.

e-mail: jpms@ira.cinvestav.mx

Los fitoplasmas son procariotes pleomórficos que ocasionan enfermedades ocasionando proliferación de brotes, amarillamiento y coloraciones inusuales. Estos parásitos alteran el balance hormonal de los hospedantes sin generalmente sin causar muerte prematura de las plantas. Existen excepciones, tal como el amarillamiento letal del cocotero (CLY), causante de altas pérdidas económicas en el mundo. En México apareció en 1971, avanzando de la Península de Yucatán a los estados de Chiapas, Campeche y recientemente a Oaxaca y Guerrero. La población de cocoteros ha sido afectada en un 68% con secuelas económicas al turismo y producción de copra. Recientemente, en el Estado de Guanajuato se detectaron síntomas característicos de CLY en palmas datileras (*Phoenix dactylifera*): amarillamiento, declinamiento y muerte prematura, observándose un avance epidémico de la enfermedad. Se muestrearon palmas en las localidades de Abasolo, Salamanca e Irapuato, Guanajuato y el DNA obtenido fue usado el como molde para análisis por PCR con oligonucleótidos universales que anillan en la región genómica 16S RNAr; en la PCR inicial se emplearon los iniciadores R16mF2 y R16mR1 y en un PCR anidado se utilizó los iniciadores R16F2N y R16R2. Las secuencias obtenidas fueron analizadas usando Blastn (NCBI) y depositadas al GenBank. El análisis indicó que el agente causal es el *Coconut lethal yellowing phytoplasma*, específicamente variantes informadas de Guerrero y de Florida (USA). Este es el primer informe mundial de la presencia del fitoplasma afectando palmas en una zona alejada de las costas. El único vector conocido (*Myndus crudus*) se encuentra distribuido mundialmente sólo en las

costas dado su sensibilidad a bajas temperaturas. Estos hallazgos pudieran indicar la presencia de un vector no conocido o que algún nuevo biotipo *Myndus crudus* se haya establecido en el Centro de México.

Presence of Coconut Lethal Yellowing phytoplasmas far from the coasts of Mexico

Phytoplasmas are pleomorphic prokaryotes associated to plant diseases worldwide. Infected plants show abnormal growth with excessive bud proliferation, yellow stems, yellow mosaics and unusual colorations. These parasites induce hormonal disorders on their hosts but they normally do not cause premature death of affected plants. There are few exceptions, and one is the Lethal Yellowing (LY) of the coconut palms. LY appeared in Mexico in 1971 devastating palm plantations on the states of Yucatan, Chiapas and Campeche and recently the Pacific coasts of Oaxaca and Guerrero. The palm population has been affected up to 68% with obvious impact to the economy. Recently, *Phoenix dactylifera* palms showed symptoms of lethal decline in Central México far from the coasts. Our group analyzed and characterized the putative causal agent of the disease. Plant samples were taken at the municipalities of Abasolo, Salamanca and Irapuato, State of Guanajuato. Total DNA was extracted and used in PCR assays with universal primers targeting the 16S RNA gene; in the initial reaction primers R16mF2 and R16mR1 were used. Sequential nested PCRs with the primers R16F2N and R16R2 was performed. DNA sequences were analyzed using the program Blastn (NCBI) and later submitted to the GenBank. DNA comparison indicated that the causal agent is the *Coconut lethal yellowing phytoplasma*, specifically the strains reported for the States of Guerrero (México) and Florida (USA). This is the first report worldwide reporting the presence of the LY phytoplasmas far from any coasts. The vector *Myndus crudus* is only present in warm areas due to its high susceptibility to low temperatures. Our findings could indicate the presence of a new unknown vector or that a new biotype of *Myndus crudus* is spreading in Central México.

ESTRÉS ABIÓTICO Y NUTRICIÓN

Effect of nitrogen levels on source restriction and the pattern of assimilate redistribution to grains in wheat genotypes under optimum and post-anthesis heat stress conditions

Adel Modhej

Assistant professor, Islamic Azad University, Shoushtar Branch, Iran. e-mail: Adelmodhej2006@yahoo.com

Two separate field experiments were conducted at delayed and optimum sowing dates in Ahvaz, Iran in 2007 and 2008. The experimental site had a moderate winter and dry, hot summer. Plants with delayed sowing date experienced heat stress post-anthesis. Each split-plot experiment had a randomized complete block design with three replicates. The N application rates were assigned in the main-plots. Sub-plots consisted of six bread and durum wheat genotypes. Compared with optimum conditions, heat stress after anthesis reduced grain yield and grain weight 24% and 31%, respectively. GY reduction under post-anthesis heat stress conditions was due to significant grain weight reduction. In all genotypes, the source restriction (SR) reduction under post-anthesis heat stress conditions was 45% compared with the non-stressed treatments. The highest and the lowest SR increment under post-anthesis heat stress conditions was belonged to D-84-5 and D-83-8 lines, respectively. The SR increment in long, middle and short season genotypes under stressed conditions was 56%, 43.5% and 30.5%, respectively. The average of N grain protein concentration (GPC) in wheat genotypes was between 11-12.6% under optimum and between 12.6-13.8% under post-anthesis heat stress conditions. Although, the assimilate redistribution increased under heat stress condition and this increment was higher in long season genotypes, but significant reduction of the current photosynthesis and the rate of redistributed dry matter to grains and also increment of the SR, led to 1 000-grain weight and GY reduction.

Effect of Water Deficit on Yield and Yield Components Of Spring Canola Varieties

Seyedmohammadi, N.1*, Alahdadi, I2, Shirani rad, A. H.3, Seyedmohammadi, A.4, Sarafraz, E.5

1, 2, 5University of Tehran, Iran.
e-mail: nasrinseyedmohammadi@yahoo.com

3Breeding and Seed Institute, Iran

4Islamic Azad University of Boroujerd, Iran

For evaluating the effect of water insufficiency on the yield and yield components of two digit of spring

canola plant, it was tested as a split plot in a 4 repetitious experiments on the basis of quite random blocks in the agricultural year of 2009-2008 in Aburaihan compus research farm located in Tehran University. The test factors include 3 irrigation gaps, (to be carried out once for every 6, 8 and 10 days) and two digit canola (RGS003, option). The tension due to water insufficiency caused reduction of oil content in the seed, in addition functionality of the oil, the functionality of the seed and its components were reduced as well. The number of cantina in the plant, the number of seeds in the cantina, the weight of the seeds, the yield of the seeds, the yield of the oil, oil percentage in the care with the irrigation gap of 6 days was measured respectively 144.88, 21.796 numbers, 2.909 g as 1150.3 and 271.46 kg/ha and 34.705 percent and in the care with irrigation gap of 8 days as 86.45 18.193 numbers and 2.347 g, 629.1 and 181.88 kg/ha and 29.646 percent and in the care with an irrigation gap of 10 days respectively as 70.68 16.789 numbers, 593 and 182.93 kg/ha and 29.256 percent. The results show that canola is still capable to preserve an acceptable functionality even with the least water but in case that sufficient water will be provided, it can have high production.

Significance of sulphur nutrition for the quality of agricultural and medicinal crop plants

Ewald Schnug, Silvia Haneklaus, Elke Bloem

Institute for Crop and Soil Science, Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI), Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany, e-mail: ewald.schnug@jki.bund.de

Clean air acts resulted in a drastic decline in sulphur (S) loads and consequently atmospheric depositions declined to zero in rural remote areas of northern Europe. Without S fertilisation, macroscopic symptoms of severe S deficiency are observed routinely on farmlands irrespective of the crop grown. Severe S deficiency will not only reduce crop productivity and diminish crop quality, but it also affects plant health and environmental quality. A sufficient S supply is required for a high quality of bread-making wheat. Its deficiency yields distinctly firmer and less extensible doughs as the elasticity and resistance against extensibility of the dough are related to the concentration of S-containing amino acids and glutathione. It is the asparagine content of a crop that determines the formation of potentially carcinogenic acrylamide during processing at high temperatures. S

deficiency causes a substantial accumulation of free asparagine in wheat grains and may constitute up to 50 % of the total free amino acid pool. Consequently, there exists a close correlation between free asparagine in the grain and acrylamide formation in heated wheat flour. The S supply is a key factor influencing the pharmaceutical quality of medicinal plants where S-containing secondary compounds account for the bioactive principal. Prominent examples are the significant increase of the glucosinolate content in vegetative and generative tissue of *Tropaeolaceae* (e.g. *Tropaeolum majus*) and the alliin content in *Liliaceae* (e.g. *Allium cepa*) by S fertilization. This contribution addresses the following aspects of S nutrition: diagnosis of the S nutritional status, quantification of relationships between S supply and selected quality parameters of agricultural crops and medicinal plants and crop and site-specific fertiliser recommendations.

Callogénesis de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184 en presencia de NaCl

Leticia Fuentes Alfonso^{*1}, María Luisa Ruiz Sánchez², Rafael Álvarez de la Noval², Yunel Pérez Hernández¹, Silvia Alemán García¹, Anesio Mesa Sardinas³, Sergio González Suárez⁴

¹Centro de Estudios Biotecnológicos, Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas 'Camilo Cienfuegos', Cuba.
e-mail: leticia.fuentes@umcc.cu

²Facultad de CC. Biológicas y Ambientales, Universidad de León, España.

³Estación Experimental de Pastos y Forrajes 'Indio Hatuey', Matanzas, Cuba.

⁴Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

La selección *in vitro* de líneas celulares y plantas regeneradas ha sido aplicada en varias especies, y un elemento importante en esta metodología depende del desarrollo de un sistema eficiente y viable de inducción de callos y regeneración de plantas. *Stylosanthes* es considerado dentro de las leguminosas como un modelo de regeneración vía callo. *Stylosanthes guianensis* es una leguminosa forrajera importante con alta productividad y calidad, capaz de adaptarse a suelos poco fértiles de los trópicos y subtropicos, reconocido como moderadamente tolerante a salinidad. En este trabajo fue evaluada la influencia del NaCl en la formación de callos a partir de tres explantes del cultivar CIAT-184. Fragmentos de hipocótilos, hojas y hojas cotiledonales fueron cultivados en medio de cultivo MS con 1 mg.l⁻¹ de 2,4-D, 2 mg.l⁻¹ de 6-BAP y diferentes concentraciones de NaCl (0-300 mM). Callos de 10, 20 y 30 días fueron fijados en parafina para

realizar el estudio histológico de los mismos. Aunque el proceso de dediferenciación fue observado en los extremos cortados de los explantes cultivados hasta 250 mM, la formación de callos completos fue posible hasta 200 mM en los tres explantes, con una respuesta más rápida en los hipocótilos. El porcentaje de transformación y las masas frescas y secas disminuyeron de forma significativa, a partir de 150 mM. La respuesta organogénica en callos de 20 días formados a partir de hipocótilos en 100mM de la sal fue similar a la observada en el control. Los mayores valores de actividad de las enzimas catalasas y peroxidasas fueron medidos en las muestras a 250 mM, mientras que se detectaron los menores valores en cuanto a contenido de proteínas totales.

Callus cultured of *Stylosanthes guianensis* CIAT-184 with NaCl

In vitro selection of salt tolerant cell lines and regenerated plants has been reported in several species, and one important element on this methodology dependent on the development of efficient and reliable callus induction and plant regeneration systems. *Stylosanthes* is considered one of the least recalcitrant legumes in respect to regeneration via callus, and *Stylosanthes guianensis* is an important pasture legume with high yield and quality, adaptation to low fertility soil in tropical and subtropical countries, point out as moderately tolerant to salinity. In this work, the influences of NaCl on callus formation from three explants of *S. guianensis* CIAT-184, was evaluated. Small pieces of hypocotyls, leaves and cotyledons leaves were cultured on MS medium supplied with 1 mg.l⁻¹ of 2,4-D, 2 mg.l⁻¹ de 6-BAP and different concentrations of NaCl (0-300 mM). In order to do the anatomical studies 10, 20, 30-days old callus sections from 0, 100 and 200 mM, were taken and permanent histological preparations were obtained. Although some explants began to dedifferentiate from cut ends in 250mM, the completely callus formation occurred up to 200 mM in the three explants, and the hypocotyls responded more quickly than the rest. The transformation percentages and fresh and dry weight diminished from 150 mM. The histological evaluation 20 days-old hypocotyls callus that grew up in 50 and 100 mM showed an organogenic response similar that callus grew up in control media. The highest values of catalases and peroxidases enzymatic happened in explants cultured in 250 mM, while the lowest levels of protein content were measured in the same condition.

Responses of *Jatropha curcas* seedlings to drought stress

Leyanes Díaz^{1*}, Vicente Gimeno², Francisco García-Sánchez², Maria Luisa Nicolás², Mario Sánchez, José C. Lorenzo¹.

¹Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Avila, Carretera a Morón km 9.5. Ciego de Avila. Cuba.

²Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CSIC, Campus Universitario de Espinardo, Espinardo, 30 100 Murcia, Spain

Jatropha curcas L. is an oil bearing species with multiple uses and considerable economic potential as a biofuel crop. We investigated the influence of drought stress (DS) on leaf water relations, net gas exchange, growth and mineral nutrient concentrations on 1-month-old seedlings of *Jatropha curcas*. For that the plants were irrigated daily with half-strength Hoagland's solution according to following treatments: control (watering daily to eld capacity), 75% (75% of eld capacity), 50% (50% of eld capacity), 25% (25% of eld capacity) and severe stress (plants were non watering during the experiment). Drought stress, had no effect on relative water content (RWC) neither leaf osmotic potential (ψ_o), but decreased the Pre-dawn leaf water potential (ψ_w) and Turgor potential (ψ_p). Leaf osmotic potential at full turgor (ψ_o^{100}) and osmotic adjustment (AO) of stressed seedlings not showed statistics differences with the control treatment. The decreased of Net CO₂ assimilation rate (ACO₂) in leaves was directly proportional to the irrigation regimen in every time analyzed. Leaf water-use efficiency (WUE=ACO₂/transpiration) was similar for all treatment at the begin of the experiment, but up to 4 day of stress, non-irrigated seedlings show marked decrease respect to control, reached the maximum difference up to 24 days. The chlorophyll degradation and chlorophyll fluorescence [maximum quantum efficiency of PSII (Fv/Fm, where Fm is the maximum fluorescence and F_o, minimum fluorescence in dark-adapted leaves)] were important limitations on ACO₂. At the end of the experiment, the control treatment had higher leaf dry weight, stem dry weight, root dry weight, and foliar area in contrast to non-irrigation treatment. Mineral solutes accumulation was at a maximum in leaves, followed by stem and roots. Cations K⁺, Mg²⁺Ca²⁺ and P concentrations in both stem and leave increased with the drought stress, while in the root was not affected by stress.

Respuesta de plántulas de *Jatropha curcas* al estrés hídrico

Jatropha curcas L. es una especie con múltiples usos y un potencial económico considerable como productora de biodiesel. Se investigó la influencia

del estrés hídrico (DS) en las relaciones hídricas de la hoja, intercambio gaseoso, crecimiento y concentraciones de nutrientes minerales en plántulas de *Jatropha curcas* de un mes de cultivo. Para esto las plantas fueron irrigadas diariamente con solución 1/2 Hoagland de acuerdo con los siguientes tratamientos: control (capacidad de campo), 75% (75% de la capacidad de campo), 50% (50% de la capacidad de campo), 25% (25% de la capacidad de campo) y estrés severo (no se regaron durante el experimento). El estrés hídrico no tuvo efecto en el contenido de agua relativa (RWC) ni en el potencial osmótico (ψ_o), pero disminuyó el potencial hídrico de la hoja antes del alba (ψ_w) y el potencial de turgor (ψ_p). El potencial osmótico a máxima turgencia (ψ_o^{100}) ajuste osmótico (AO) de las plantas estresadas no mostraron diferencias significativas con el tratamiento control. El decremento de la asimilación neta de CO₂ (ACO₂) en hojas fue directamente proporcional al régimen de irrigación en cada tiempo analizado. La eficiencia del uso de agua de la hoja (WUE=ACO₂/transpiración) fue similar para todos los tratamientos al principio del experimento, pero a partir de 4 días de estrés las plántulas no irrigadas mostraron un marcado decremento respecto al control, alcanzando la máxima diferencia entre ellos a los 24 días. La degradación de la clorofila y la fluorescencia de la clorofila [eficiencia máxima del fotosistema PSII (Fv/Fm, donde Fm es la fluorescencia máxima y F_o, fluorescencia mínima de las hojas en la oscuridad)] fueron importantes limitantes de la asimilación de CO₂. Al final del experimento, el tratamiento control presentó los más altos valores de masa seca de la hoja, tallo y raíz, así como área foliar contrastando con el tratamiento no irrigado. La acumulación de solutos minerales alcanzó el máximo nivel en hojas, seguido por tallos y raíces. La concentración de cationes K⁺, Mg²⁺Ca²⁺ y P incrementó con el estrés hídrico tanto en hoja como en tallo, mientras en la raíz no fue afectada por el estrés.

Effects of biogas residues on plant P nutrition and soil P cycle

Silvia Bachmann^{1*}, Carlos Avila Amador², Bettina Eichler-Löbermann¹

¹Department for Crop Production, Institute for Land Use, Faculty for Agricultural and Environmental Sciences, University of Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 6, 18 059 Rostock
e-mail: silvia.bachmann@uni-rostock.de

²Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, University of Bayamo

Anaerobic fermentation is a widely used process to generate renewable energy. It allows to use slurries,

fodder- and plant residues or other organic wastes for energy generation and is therefore especially an option for rural areas to ensure local energy supply. Besides, anaerobic fermentation leaves considerable amounts of nutrient rich residues, which could be used as fertilizer in crop production. Various studies exist, investigating the value of biogas residues as N fertilizer in crop production. But the effects of the application of fermentation residues on plant phosphorus (P) nutrition and on the soil P cycle was much less investigated yet. The aim of this work was to (I) analyse the composition of biogas substrates before and after anaerobic fermentation and to (II) study their effect on plant P uptake, P availability in the soil and soil microbial activity. Therefore, an eight week pot experiment with maize as a test crop was carried out. Biogas substrates before and after fermentation were applied to the soil before planting in an amount to reach 0.2 g P per pot. As a control, a treatment without P (NK), a mineral fertilization (NPK) with Triple-Superphosphate (TSP) were applied. Dry matter yield, P uptake and plant available P (water soluble P) increased when biogas residues were applied compared to the control without P supply. On the contrary soil respiration as well as dehydrogenase activity decreased after the application of the fermented residue compared to unfermented slurry. The results indicate, that the fermentation process improves the nutrient availability in the input substrate, but reduces its suitability as energy and nutrient source for soil microorganisms.

***In vitro* response of two citrus rootstocks to salt stress**

Wagdi Ghaleb*, Ebrahim Alflah, Mustafa Salama, Kaled Alhaje, Noaman Ennfishi and Ahmed shaaban

Biotechnology research center, Twisha, Tripoli, Libya.
Researches group of crop improvement
e-mail: elnfishinoaman@yahoo.com

This study was conducted in the Plant Tissue Culture Laboratory, Biotechnology research center/ Twisha, Tripoli, Libya. Where fruits of two rootstocks (sour orange "*Citrus aurantium*, L." and volkamer lemon "*Citrus volkameriana*, Ten. & Pasq.") were collected. To study growth and nutrient acquisition under salt stress *in vitro*, microshoots from both rootstocks were transferred to solid Murashige and Skoog (MS) media. Salinity was induced by incorporating two types of salts in different concentrations (0, 50, 100, 150, 200, or 300 mM) of NaCl, CaCl₂ and combinations of both Ca and Na were added in ratio of 1:1 (Na:Ca) in concentration (0, 25, 50, 75, 100 and 150 mM). Results showed that increasing NaCl level in the growth medium led to increased Na and Cl accumulation and decreased Ca content in plant tissue. Increasing CaCl₂ level in the growth medium led to increased Ca accumulation and decreased Na content in plant tissue. Plant K contents decreased with increased salinity level in the media. In general, increased salinity level in growth medium, using NaCl, CaCl₂, or their combination, led to reduced plant growth (leaf number, plant length, fresh weight, dry weight and plant leaf damage) in volkamer lemon and sour orange after two month in culture.

BIOTECNOLOGÍA Y BIOCOMBUSTIBLES

Colecta, introducción y caracterización de oleaginosas para la producción de biocombustibles

R. Machado*, E. Rodríguez, Sofía Montes de Oca y María del Carmen Vigil

Estación Experimental de Pastos y Forrajes 'Indio Hatuey'.
Central España Republicana CP 44 280. Matanzas
e-mail: rmachado@indio.atenas.inf.cu

Jatropha curcas y *Ricinus communis* son fuentes reconocidas para la producción de biocombustibles. Al nivel internacional, países como La India, África, Nicaragua, Honduras, Brasil y Guatemala, entre otros, han realizado ingentes esfuerzos en su colecta y caracterización, incluyendo marcadores moleculares. Estas especies se encuentran naturalizadas en Cuba; sin embargo, se desconocen sus potencialidades para estos fines. Por ello se comenzó a coleccionar, introducir y crear bancos de germoplasma que permitan caracterizar sus procedencias, con el fin de identificar los biotipos sobresalientes. En este trabajo se exponen los resultados de la caracterización inicial del germoplasma existente en el banco de la EEPF Indio Hatuey. Las colectas se desarrollaron en Sancti Spiritus, Guantánamo, Santiago de Cuba y Las Tunas. Durante el muestreo se colectaron propágulos o semillas de individuos bien ramificados, vigorosos, no sometidos a podas, preferentemente aislados y con pocos o nulos efectos causados por plagas y enfermedades. Los resultados, en vivero, permitieron detectar diferencias en términos de individuos enraizados (73 a 83% en *J. curcas*); emergencia de plántulas (5 a 20 para *J. curcas* y 13 a 25 para *R. communis*) y mayor porcentaje de brotes cuando el diámetro de los propágulos excedió los dos centímetros (52.7-61.8%). En condiciones de campo las procedencias de *J. curcas* mostraron variabilidad en términos de altura, número de ramas primarias, grosor de las ramas y número de frutos: 55-170 cm; 1-8; 1.0-2.6 cm y 0-153, respectivamente; mientras que en *R. communis* estos indicadores fluctuaron entre 80 y 430 cm; 0 a 15; 1.2 a 16.0 cm y 10 a 258 frutos/racimo. Aunque la base genética aún es estrecha, se prevé posibilidades de identificar germoplasma potencialmente útil para la producción de biocombustibles y otros coproductos. Se recomienda la continuidad de la colecta e introducción de nuevas procedencias con el fin de ampliar el germoplasma actual.

Collection, introduction and characterization of oil crops for biofuel production

Jatropha curcas and *Ricinus communis* are known sources for biofuel production. Worldwide, countries such as India, Africa, Nicaragua, Honduras, Brazil and Guatemala, among others, have been making great efforts in their collection and characterization, including molecular markers. These species are naturalized in Cuba; however, their potential for this purpose is unknown. For such reason, their collection, introduction and the creation of germplasm banks that allow to characterize their provenances began, aiming at the identification of outstanding biotypes. This work presents the results of the initial characterization of the existing germplasm in the bank of the EEPF Indio Hatuey. The collections were carried out in Sancti Spiritus, Guantánamo, Santiago de Cuba and Las Tunas. During the sampling propagules or seeds were collected from well-branched, vigorous individuals, which had not been subject to pruning, were preferably isolated and with little or no effects caused by pests and diseases. The results under nursery conditions allowed to detect differences in terms of rooted individuals (73 to 83% in *J. curcas*); seedling emergence (5 to 20 for *J. curcas* and 13 to 25 for *R. communis*) and higher shoot percentage when the diameter of the propagules exceeded two centimeters (52.7-61.8%). Under field conditions the provenances of *J. curcas* showed variability regarding height, number of primary branches, branch diameter and number of fruits: 55-170 cm; 1-8; 1.0-2.6 cm and 0-153, respectively; while in *R. communis* these indicators fluctuated between 80 and 430 cm; 0 and 15; 1.2 and 16 cm and 10 and 258 fruits/raceme. Although the genetic basis is still narrow, possibilities of identifying potentially useful germplasm for the production of biofuels and other co-products are foreseen. To continue the collection and introduction of new provenances is recommended in order to increase the current germplasm.

Aislamiento de Limonoides y transesterificación para la producción de biodiesel a partir del aceite de neem

Juan M. Vargas-López^{1*}, Dennis P. Wiesenborn², Rafael Canett-Romero¹, Alma N. Chaira-Alcaraz¹

¹Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Hermosillo, México, 83000. e-mail: vargaslopez.juan@gmail.com

²Department of Agricultural and Biosystems Engineering, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA.

En los últimos años, el árbol de neem (*Azadirachta indica* A.Juss) ha ganado la atención a nivel mundial de la industria oleoquímica. El principal enfoque de comercialización han sido los limonoides, los cuales son utilizados como pesticidas. Sin embargo, las semillas contienen hasta 50% de aceite el cual es rico en ácido oleico (68%); este aceite tiene una potencial aplicación industrial en la preparación de biodiesel. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un procedimiento para el aislamiento de limonoides y evaluar algunas propiedades del biodiesel obtenido del aceite de neem después de la extracción de limonoides. El aceite fue obtenido utilizando una prensa de tornillo Komet S87; las pruebas preliminares que se realizaron utilizando una combinación del contenido de humedad de la semilla (6, 8, y 10%) y semillas con cáscara y sin cáscara (50%) mostraron un aceptable rendimiento de aceite con 6% de humedad de la semilla y 50% de semilla sin cáscara. Los porcentajes de limonoides, especialmente azadiractina (AZA) en los extractos de neem fueron determinados por HPLC, y los contenidos (18.5-23.9%) de las diferentes muestras estuvieron en el rango reportado en la literatura. Las propiedades del biodiesel de neem tales como viscosidad cinemática, punto de turbidez y contenido de glicerol fueron comparadas con los estándares ASTM D6751. El biodiesel de aceite de neem exhibió una alta viscosidad cinemática (7.0 cS) y un alto punto de turbidez (14 °C), el cual indicó niveles excesivos de glicéridos. No obstante, en este estudio se ilustra el potencial para producir biodiesel de aceite de neem, lo cual puede simultáneamente reducir la dependencia de cultivos oleaginosos de uso alimentario. Las investigaciones futuras serán dirigidas hacia la identificación y eliminación de constituyentes del aceite de neem los cuales interfieren con la transesterificación de los triglicéridos.

Isolation of Limonoids and transesterification for biodiesel production from neem oil

In recent years, the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) has gained the attention of the oleochemical industry throughout the world. The main focus of commercialization has been the limonoids, which are used as pesticides. However, the seed kernels contain up to 50% oil which is rich in oleic acid (68 wt%); this oil has potential industrial application in the preparation of biodiesel. The aim of this work was to develop a procedure for limonoids isolation and evaluate some properties of biodiesel obtained from neem oil after limonoids extraction. Oil was extracted using a Komet S87 screw press; preliminary tests using a combination of seed moisture content (6,8, and 10%) and whole or dehulled (50%) seeds showed particularly good oil yield with 6% seed moisture and 50% dehulled seed. The percentage of limonoids, especially azadirachtin (AZA) in the neem seed extracts were determined by HPLC, and the contents (18.5-23.9%) of different samples fell within the range reported in the literature. Neem biodiesel properties such as kinematic viscosity, cloud point and glycerol content were compared with ASTM D6751 specifications. Biodiesel from neem oil exhibited high kinematic viscosity (7.0 cS) and high cloud point (14°C), which indicated excessive levels of glycerides. Nevertheless, this study illustrates the potential to produce biodiesel from neem oil, which may simultaneously reduce dependence on food-use oilseed crops. Future research will be directed towards identifying and eliminating neem oil constituents which may interfere with transesterification.

BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN DE RECURSOS FITOGENÉTICOS

Diversidad molecular entre accesiones de papaya (*Carica papaya* L.) introducidas en Cuba

Maruchi Alonso Esquivel*, Martín Bautista Alor, Matilde Ortiz García, Adriana Quiroz Moreno, Wolfgang Rohde, Lorenzo Felipe Sánchez Teyser

Research Institute on Tropical Fruit Crops, P.O. Box 11 300, 7th Ave., 3005, Playa, Havana City, Cuba.

*e-mail:mejoramiento@iift.cu

Los marcadores moleculares son herramientas valiosas para los estudios genéticos en plantas y en algunos casos están siendo empleados exitosamente en la elección de progenitores y en la selección. El polimorfismo generado mediante la técnica molecular AFLP ha sido de utilidad para estudios de diversidad genética en frutales. En el presente trabajo se realizó la caracterización molecular de 12 accesiones de papaya (*Carica papaya* L.) del banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, empleando la técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Como resultado de los 6 pares de iniciadores empleados, se lograron identificar un total de 431 bandas que mostraron un 73.3% de polimorfismo. El número total de patrones de bandas identificados fueron iguales en todas las combinaciones utilizadas, con un porcentaje de identificación alto. Esto sugiere que dichas combinaciones pudieran ser empleadas para estudios de variabilidad genética en papaya. De forma general, los resultados presentados demuestran que entre las accesiones evaluadas existe diversidad genética, lo cual constituye un reflejo del origen que presentan los genotipos analizados a partir de la introducción de materiales foráneos y la polinización abierta de un grupo de materiales selectos. Por tanto, se recomienda retomar la prospección y selección de accesiones locales, así como la introducción de nuevos genotipos foráneos, como dos vías fundamentales para aumentar la diversidad genética presente en el banco de germoplasma de papaya de Cuba.

Molecular diversity among of papaya accessions (*Carica papaya* L.) introduced in Cuba

Molecular markers are valuable tools to genetic studies in plants and in many cases they are employed successfully for parental choice and selection. The polymorphism generated through molecular technique AFLP has been useful to genetic diversity study in fruits. In this work molecular characterization of 12 papaya accessions belonging to germplasm bank from Research Institute on

Tropical Fruit Crops was carried out through AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Using 6 primers combinations we obtained 431 bands with a 73.3% of polymorphism. The number of total bands patterns identified was the same in all the combinations assayed, with a percentage of identification suggesting that primer combinations employed could be used to access genetic variability in papaya studies. The results obtained demonstrate the existence of genetic diversity among papaya accessions which indicates the origin of the analysed genotypes from exogenous material and open pollination of a selected group of material. That is why it is recommended monitoring and selection of local accessions as well as the introduction of new foreign genotypes as two ways to increase genetic diversity of the germplasm bank of papaya in Cuba.

Análisis de la diversidad genética en chayote (*Sechium edule*) usando marcadores RAPD

Rodríguez-Sahagún A.*¹, Acevedo-Hernández G.J.², Castellanos-Hernández O.¹

¹Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115, Col. Lindavista, CP 47 810, Ocotlán Jalisco, México. e-mail: aracelics@gmail.com, aracelics@cuci.udg.mx

²Department of Biology, University of Western Ontario, N6A 5B7 London, Ontario, Canada

El chayote, *Sechium edule* (Jacq.) SW., es una planta originaria del Continente Americano, cuyo centro de origen posiblemente sea México y países de América Central, su fruto, así como sus raíces, son usados principalmente para el consumo humano en América y en otras partes del mundo, en su fruto, semilla, raíz y troncos jóvenes se han identificado en diferentes concentraciones; almidón y otros carbohidratos, fibra, proteínas, calcio, fósforo, hierro, vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico. El chayote actualmente se encuentra en situación desfavorable debido a la gran incidencia de enfermedades, por lo que se propone conocer la similitud entre los individuos y las poblaciones ya que es de gran utilidad en los programas de mejoramiento genético, pues permite, además de la organización del material la selección adecuada de los genotipos superiores y la complementación con datos fenotípicos y agronómicos para el desarrollo de una población mejorada. Para detectar la huella y estimar la variabilidad genética presente en las colecciones de estudio, se utilizó la técnica RAPD, fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar

(Random Amplified Polymorphism DNA). Encontrando una cercanía genética entre poblaciones de diferentes estados. Con la realización de este proyecto se implementará el inicio de las alternativas que se ofrecerán a los productores de chayote para iniciar con la mejora de la especie, ya que actualmente este sector se encuentra en dificultades.

Genetic diversity analysis of chayote (*Sechium edule*) using RAPD markers

Chayote, *Sechium edule* (Jacq.) SW., is a plant native to the Americas, whose place of origin may be México and Central American countries, their fruit and roots, are used primarily for human consumption in America and other parts of the world. Fruit, seed, root and young trees have been identified in different concentrations of starch and other carbohydrates, fiber, protein, calcium, phosphorus, iron, vitamin A, thiamin, riboflavin, niacin and ascorbic acid. The chayote is currently at a disadvantage due to the high incidence of diseases, therefore intends to know the similarity between individuals and populations because it is very useful in breeding programs, it also allows the organization material the appropriate selection of superior genotypes and supplementation with phenotypic and agronomic data for the development of an improved population. To detect the trace and estimate the genetic variability present in the collections of study, RAPD technique was used, Random Amplified Polymorphism DNA. Finding a genetic closeness between plants of different states. With the completion of this project will be implemented beginning of the alternatives being offered to producers of chayote and start with the improvement of the species, since the sector now finds itself in difficulties.

Efecto del manitol y el nitrato de plata en la conservación *in vitro* de malanga (*Xanthosoma* spp.)

Aymé Rayas, Manuel Cabrera, Jorge López, Víctor Medero, Yoel Beovides, Germán Rodríguez

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

Entre las técnicas más utilizadas para la conservación de recursos genéticos, figuran los bancos de genes conservados en el campo, los de genes en semillas, los de genes *in vitro* y la criopreservación. El mantenimiento en campo de los Bancos de Germoplasma resulta muy costoso, además de los riesgos a que se exponen, a tal efecto el cultivo de tejidos constituye una solución a estos problemas. En el caso de los cultivos de propagación vegetativa

es conveniente utilizar una combinación de técnicas de almacenamiento en lugar de depender de una sola. El cultivo *in vitro* ofrece nuevas alternativas para el mejoramiento de la productividad y la producción de material de siembra sano en esta especie. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las condiciones óptimas para la conservación en crecimiento mínimo *in vitro* de germoplasma de malanga (*Xanthosoma* spp.). La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. Como material vegetal se utilizó el clon de Malanga *Xanthosoma* 'INIVIT MX-2008'. Para la conservación en medio de cultivo de crecimiento mínimo se utilizó el medio de cultivo basal MS y se estudiaron 15 tratamientos que combinaron concentraciones de Manitol (regulador osmótico) (1.5; 3 y 4%) y Nitrato de plata (inhibidor de etileno) (0, 2, 4, 8, 10 mg.l⁻¹). Se concluye que es posible conservar *in vitro* los recursos genéticos de malanga *Xanthosoma*, durante más de 10 meses, en un medio de cultivo compuesto por sales y vitaminas MS, 4% de manitol y 4 mg.l⁻¹ de Nitrato de plata. Al aumentar la concentración de manitol disminuye la altura, aumenta el número de brotes, disminuye el número de raíces, aumenta el número de hojas activas y disminuye la muerte de las hojas. Las plantas propagadas a partir de este medio de cultivo se recuperaron exitosamente. La presencia de la mayor concentración de manitol en el medio de cultivo pudo haber influido en estos resultados ya que otros autores han referido que incrementa la supervivencia del material vegetal conservado, durante el proceso de la recuperación.

Mannitol and silver nitrate effect of taro (*Xanthosoma* spp.) *in vitro* conservation

Among the most widely used techniques for the conservation of genetic resources, gene banks are preserved in the field, the seed gene, the gene *in vitro* and cryopreservation. Maintenance field genebanks are costly, in addition to the risks they face; to that effect on tissue culture is a solution to these problems. In the case of vegetative propagated crops is desirable to use a combination of storage technology rather than relying on just one. *In vitro* culture provides new alternatives for improving productivity and production of healthy planting material in this species. Our objectives was to study the optimum conditions for minimal growth conservation *in vitro* germplasm of taro (*Xanthosoma* spp.). This research was conducted in the Tissue Culture Laboratory of the Research Institute of Tropical Crops. As plant material was used clone of Taro *Xanthosoma* 'INIVIT MX-2008'. For the maintenance in culture of minimal growth basal medium MS was used and studied 15 treatments combined concentrations of mannitol (osmotic

regulator) (1.5, 3 and 4%) and silver nitrate (Ethylene inhibitor) (0, 2, 4, 8, 10 mg.l⁻¹). It concludes that it is possible to conserve taro *Xanthosoma* genetic resources *in vitro*, for over 10 months in a culture medium composed of MS salts and vitamins and supplemented with 4% mannitol and 4 mg.l⁻¹ of silver nitrate. With increasing concentration of mannitol decreases the height, the number of outbreaks, decreasing the number of roots, leaves increases the number of active and decreases the death of leaves. Plants propagated from these culture medium were recovered successfully. The presence of higher concentrations of mannitol, may have influenced these results since other authors have reported that increases survival of preserved material during the recovery process.

Estudio de algunos caracteres de germoplasma de piña (*Ananas comosus*. L. Merr) y establecimiento de un banco de germoplasma

Pedro Enrique Villar Martínez, Miriam Isidró, Daymara Rodríguez

Universidad Agraria de la Habana (UNAH), Cuba. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, UNAH, Autopista nacional km 23.5, carretera Tapaste, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. e-mail: Pedro_Villar@isich.edu.cu

En la actualidad es limitado el conocimiento sobre el germoplasma de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) en la región, por lo que es necesario profundizar en las características de este germoplasma, con lo cual se puede contribuir a su conservación en un Banco de Germoplasma *ex situ*. En el presente trabajo se estudiaron los caracteres morfológicos y agronómicos en accesiones de germoplasma de piña de la región, mediante dos excursiones colectas realizadas en las provincias La Habana (Municipios, Jaruco y Madruga (Bainoa) y Matanzas (Unión de Reyes (Bolondrón) entre los meses marzo/08 y noviembre/09, en los cuales se colectaron cuatro tipos de germoplasma de esta especie, haciéndole a los mismos distintos tipos de evaluaciones, tales como: altura y diámetro de la planta, longitud y ancho de la hoja D, color, tipo de espinas de las mismas, peso de los hijos, así como en los frutos: forma, longitud, diámetro, color, peso, números de espirales, número de ojos en la espiral más larga de éstos, entre otros. Se comenzó a fomentar un Banco de Germoplasma de piña que se encuentra ubicado en las cercanías de la UNAH, donde se plantó el material colectado para la evaluación en cuanto a total de hojas por planta, diámetro y altura de las mismas, así como también longitud y ancho de la hoja D, de las plantas sembradas en este. En la caracterización morfoagronómica del material colectado, se destacan las diferencias que existen entre las accesiones, tanto en las plantas, las hojas y frutos de cada cultivar, así como en los diferentes materiales de plantación.

A study of some features of pineapple germplasm (*Ananas comosus*. L. Merr), and establishing a germoplasm bank

It is currently limited knowledge of the germplasm of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) In the region, so it is necessary to deepen the features of this germplasm, which can contribute to the preservation of it in a *ex situ* germplasm collection. In this paper we studied the morphological and agronomic characters in germplasm accessions of pineapple in the region, through collections made two excursions into the provinces of Havana (Municipalities, Jaruco and Madruga (Bainoa) and Matanzas (Unión de Reyes (Bolondrón) between March/08 and noviembre/09 the months in which four types were collected germplasm of this species, making the same types of assessments, such as height and diameter of the plant, length and width of the blade D, color, type of spines of the same, weight of vastags, as well as fruit shape, length, diameter, color, weight, number of coils, number of eyes in the spiral longest of these, among others. It began to promote Pineapple Germplasm Bank which is located near the University of Honduras, where he planted the material collected for the assessment in terms of total leaves per plant, diameter and height of them, as well as length and width of the leaf D, plants sown in this. In three morphoagronomic characterization of the material collected, highlighting the differences among accessions in both plants, leaves and fruits of each cultivar, as well as the different materials of plantation.

Cryogenic strategy for the establishment of pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) germoplasm bank

Martínez-Montero ME*, Méndez-Pelegín R, Martínez J

Bioplasmas Centre, Carretera a Morón km 9 CP 69 450. University of Ciego de Ávila, Ciego de Ávila. Cuba. *e-mail: marcosem@bioplasmas.cu

In pineapple has been used protocols based on vitrification procedure. However, it is necessary yet the knowledge of different technical factors to obtain appropriate cryogenic strategy for routine application to a wide number of genotypes. Moreover, the visualization of structural changes during the development of a cryopreservation procedure for pineapple has not been accomplished until now. For the above reasons in the present research different technical key issues were determined during the establishment of cryogenic strategy to induce dehydration tolerance to a highly concentrated vitrification solution to improve the survival rates for *in vitro* grown shoot tips of pineapple after immersion in liquid nitrogen (LN). The best established conditions were: type of shoot tip (consisted in meristematic

dome area and 3-4 primordial leaves with 2.5 – 3 mm in size); 0.3 mol.l⁻¹ sucrose preculture during 2 days; application of the loading solution (0.4 mol.l⁻¹ sucrose + 2 mol.l⁻¹ glycerol) during 25 min at 25°C; dehydration with plant vitrification solution number three (PVS3: 50% w/v glycerol + 50% w/v sucrose) during 7 hours at 0°C. The histological analysis of the visualization of structural changes of cryopreserved pineapple shoot tips revealed that only group of cells localized in meristematic area and in young leaf primordial showed a few cellular alterations and remained almost intact their morpho-physiological characteristics during the best established conditions. Moreover, the successful application of the vitrification procedure for nine accessions of the *in vitro* collection at Bioplasmas Centre was accomplished too. The mentioned results constituted a very important step for validation of cryopreservation protocols for pineapple germplasm conservation and the real establishment of its cryobank.

Estudios moleculares relacionados con la acumulación de sacarosa en caña de azúcar

Maribel Quintana*, T. Terauchi, M. Matsuoka

Estación Experimental de Sancti Spiritus, Inst. de Inv. Pastos y Forrajes, Cuba. Apdo. 2228, Zona Postal 1, Sancti Spiritus, Cuba. e-mail: maribel@pastos.yayabo.inf.cu

Los recursos genéticos son de gran importancia para los mejoradores vegetales en la búsqueda de caracteres deseados para los cultivos, por ello la caracterización de germoplasma y su evaluación es fundamental. La enzima sacarosa fosfato sintetasa (UDP-glucosa: D-fructosa-6-P-2-glucosil transferasa) es de gran importancia en la acumulación de sacarosa, siendo observada una alta actividad de esta enzima en variedades de altos rendimientos. El análisis del gen sacarosa fosfato sintetasa (SPS) podría permitir un incremento de la actividad enzimática, lográndose nuevas variedades con potencial más elevado de contenido de sacarosa. Para este trabajo se utilizó SPS cDNA de maíz clonado en el Instituto Nacional de Recursos Agrobiológicos (NIAR, Japan); el cual fue separado por tres sitios de corte de *Hind* III en cuatro fragmentos, los que fueron empleados como sondas. Se utilizó inicialmente la variedad de caña de azúcar NiF8, de alto contenido de sacarosa. Para la extracción de DNA se usó el método CTAB. El Southern se realizó con el sistema DIG-labeling (Boehringer Mannheim). El DNA fue digerido con *Hind* III, *Sac* I y *Xba* I. La mayor diversidad de bandas fue detectada por la sonda de 1.54 kbp del extremo 3' en el DNA digerido con *Sac* I. La variabilidad del gen SPS se evaluó en germoplasma de *Saccharum*

officinatum, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* y *S. spontaneum* e híbridos comerciales, empleando como sonda el fragmento de 1.54 kbp. De cada clon se midieron caracteres morfoagronómicos, y el contenido de azúcares por HPLC. Diferentes patrones polimórficos verificaron una gran diversidad genética en las variedades analizadas. Se obtuvo una correlación positiva entre el número de copias del gen y el contenido de azúcar de los clones evaluados.

Biodiversity and conservation tea germplasm in Turkey

Sezai Ercisli¹, Ayhan Haznedar², Yasar Erturk³

¹Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ataturk University Erzurum, Turkey

²Ministry of Agriculture, Ataturk Tea and Horticulture Research Institute Rize, Turkey

³Ispir Hamza Polat Vocational School, Department of Horticulture Ispir, Erzurum, Turkey

Although tea plants were first introduced to Turkey in the 1920s, the first plantations were established in the Black Sea region during the 1940s. The tea industry in Turkey has developed very quickly and now Turkey is an important tea-producing country, ranking 6th in the world with annual production of 202 000 t. Tea is an economically valuable plant for the eastern Black Sea region of Turkey and a means of subsistence for more than 200 000 farmers and 1 million people. In Turkey, most of the tea plantations were established by using seeds; continuous seed propagation has produced populations with different yield and quality properties reflecting wide genetic variation. In the study we used a total 60 tea plants from these plantations and were compared with molecular (RAPD) and morphological markers. The results showed that there was high genetic diversity. The RAPD analysis showed that there were high genetic diversity among seed propagated tea sample generated corresponding to 73.33% polymorphism. Genetic similarity values ranged from 0.57 to 0.81 with an average of 0.63. These samples are also showed high morphological diversity (leaf color, shape, plant habits etc.). These 60 samples were conserved at Ataturk Tea and Horticulture Research Institute.

An assessment of genetic variability and relationships among wild-grown persimmon (*Diospyros lotus* L.) genotypes based on RAPD markers

Yasar Erturk¹, Sezai Ercisli²

¹Ispir Hamza Polat Vocational School, Ataturk University, 25 800 Ispir-Erzurum, Turkey

²Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ataturk University 25 240 Erzurum, Turkey
e-mail:sercisli@hotmail.com ; yasar_erturk@hotmail.com

Diospyros lotus, wild grown persimmon, exists as wild populations that inhabit uncultivated uplands of Coruh Valley in the northeastern part of Turkey. In order to explore the genetic diversity among wild-grown persimmon *Diospyros lotus* genotypes, a total of 20 individual plants among the wild populations were sampled from Coruh Valley and were subjected

to RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis. RAPD analysis was conducted on 43 random decamer primers and among them 14 primers showed reproducible polymorphic patterns. These 14 primers produced a total of 205 bands, of which 153 were polymorphic with a polymorphism percentage of 74%. A UPGMA dendrogram clearly divided genotypes into three groups, indicating RAPD analysis could be useful in determining genetic relatedness for wild grown persimmon genotypes.

BIOTECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Biological Risk Management of LMOs at the Institute of Plant Biotechnology of Villa Clara. An overview of regulatory activityYamila Suárez Aguiar¹, José M. Machado-Rodríguez^{2*}¹Unidad de Supervisión del CITMA. Delegación Territorial Villa Clara. Candelaria # 6, entre Cuba y Colón. Santa Clara. Villa Clara. e-mail: bioseguridad@dcitma.vcl.cu²Instituto de Biotecnología de las Plantas, Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. C.P. 54 830
*e-mail: machado@ibp.co.cu

The process of analysis and risk assessment of any activity involving biological risk is a control mechanism established by the law in our country, that not only allows the evaluation of proposed process itself, but through two mechanisms complementary (the licensing and inspection) provides a permanent relationship between the regulatory body and the entities that are subject to these mechanisms. In the case of investigations that have been made in the IBP, related to the production of transgenic organisms. The entity-relationship regulatory apparatus has allowed the establishment of risk management as a permanent premise in each of the activities, enabling the control and mitigation of biological hazards to acceptable levels. It has been maintained over time, interactions between the Center and the entities in the country and province oversee the activity, resulting in adequate performance from the point of biosafety.

Gestión de Riesgos biológicos de los OVM en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de Villa Clara. Una perspectiva desde la actividad regulatoria

El proceso de análisis y evaluación de riesgo de cualquier actividad que implique riesgo biológico es un mecanismo de control establecido por la legislación vigente en Cuba, que garantiza no sólo la evaluación del proceso que se propone en sí, sino que a través de dos mecanismos complementarios, (la autorización y la inspección) permite una relación permanente entre el cuerpo regulatorio y las entidades que están sujetas a dichos mecanismos. Para el caso de las investigaciones que se han realizado en el IBP, relacionadas con la producción de organismos transgénicos. La relación entidad-aparato regulador ha permitido el establecimiento de la gestión de riesgo como premisa permanente en cada una de las actividades, permitiendo el control y reducción del riesgo biológico a niveles aceptables. Se ha mantenido en el tiempo las interacciones entre

este Centro y las entidades que en el país y provincia fiscalizan la actividad, lo que se traduce en un desempeño adecuado desde el punto de la bioseguridad.

Risk communication regarding living modified organisms. Is it at adequate level?José M. Machado-Rodríguez¹, Daineris Pérez Duarte², Yamila Suárez Aguiar³, Manuel Martínez Casanova²¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830
e-mail: machado@ibp.co.cu²Facultad de Ciencias Sociales. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830³Delegación provincial del CITMA, Santa Clara, Villa Clara.

Living modified organisms (LMO) are subjected to risk analysis according to Cartagena Protocol. The fact that each transformed organism to be released to the environment has to accomplish several rules before it is accepted by regulatory policies makes the procedures for analysis complicated and time wasting. For that reason most researchers emphasise in risk management and risk evaluation rather than informing people about this new technology to introduce LMO. In Cuba there are several researches on LMO in various institutions in all over the country, and there have been some releases in field containment trials. Only one of them is about to be put in food chain in near time. Knowing that public perception is one of more important items in a technology or novelty to be accepted, it was studied the ways to inform people involved or not in this kind of research. It was chosen the frame of releasing in confined field trial transgenic banana and plantain. A survey was made among population in different regions of our province, to know what the people knows about this technology and its implication. As a result, it was presented information material, four radio programs and public debate in Social Sciences faculty of Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, which was reviewed in web medias of the province and also in Havana's University Journal 'Alma Mater'. It was concluded the importance to communicate the risk even in early stages of research before the transgenic are released to avoid misunderstanding or extremist opinions about this biotechnology. People, as much as possible, must be involved in risk communication to make sure the transparency of communicating process.

La comunicación del riesgo en los organismos vivos modificados. ¿Está a un nivel adecuado?

Los organismos vivos modificados (OVM) están sujetos al análisis de riesgo, según los lineamientos del Protocolo de Cartagena. Todo organismo que sea modificado genéticamente y liberado al medio ambiente, debe cumplir ciertos requisitos antes de ser aceptados por las leyes regulatorias. La mayoría de los investigadores hacen énfasis en el análisis de riesgo, en su evaluación y la gestión, en vez de su comunicación para la introducción de los OVM. En Cuba se llevan a cabo varias investigaciones sobre los OVM en diferentes instituciones de todo el país, teniendo en cuenta que la percepción pública es una de las cuestiones principales en la aceptación de una tecnología o novedad, se estudiaron las vías para informar a las personas que están o no involucradas en este tipo de investigación. Se tomó como marco de estudio la liberación confinada en campo del

banano y plátano transgénico y se llevó a cabo una encuesta en la población de diferentes regiones de la provincia Villa Clara para conocer lo que sabe la gente sobre esta tecnología y sus implicaciones. Como resultado fue presentado un material informativo para la capacitación, cuatro programas radiales en la estación provincial de radio y un debate público en la facultad de Ciencias Sociales de la Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, el cual fue reseñado en los medios de la red radial de la provincia de Villa Clara y también en la revista de la Universidad de La Habana 'Alma Mater'. Se concluye la importancia de comunicar el riesgo, incluso en estadios tempranos de la investigación, antes de que los transgénicos sean liberados, para evitar las interpretaciones erróneas u opiniones extremistas referentes a esta biotecnología. La gran mayoría de las personas deben estar involucradas en la comunicación del riesgo para estar seguros de la transparencia del proceso comunicativo.