



**X SIMPOSIO INTERNACIONAL  
DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**  
17- 19 de abril de 2012

**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**

**17 - 19 de abril de 2012**

**RESÚMENES / ABSTRACTS**

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



**X SIMPOSIO INTERNACIONAL  
DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL  
17 - 19 de abril de 2012**

**COMITÉ ORGANIZADOR**

**Presidente de Honor**

Dr.C. José Ramón Saborido Loidi  
Rector  
Universidad Central Marta Abreu de Las Villas

**Presidente**

Dr. Daniel Agramonte Peñalver  
Director  
Instituto de Biotecnología de las Plantas

**Vicepresidente**

Dr.C. Rafael Gómez Kosky  
Subdirector de Investigaciones  
Instituto de Biotecnología de las Plantas

**Organizador Profesional de Eventos**

Lic. Osmildo Fernández Tejera  
Especialista en Información  
Instituto de Biotecnología de las Plantas

**Secretaria Ejecutiva**

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

**COMITÉ CIENTÍFICO**

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

Dr. Ramón Santos Bermúdez  
Dra. María Cristina Pérez Peñaranda  
Dr. Jorge Sandoval Fernández  
Dr. André Gerth  
Prof. Dr. Sezai ERCİŞLİ  
Dr. Orlando Borrás Hidalgo  
PD Dr. habil. Bettina Eichler-Löbermann  
Ph.D. Claudio Stasolla

## AUSPICIADORES



## PATROCINADORES



*Edición: Yelenys Alvarado-Capó*

*Diagramación: Marta Rodríguez Rodríguez*

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

## Tabla de Contenido

	<b>Pag</b>
Cultivo <i>in vitro</i> de células y tejidos de plantas/ Plant cell tissue and organ culture	1
Propagación masiva de plantas por biotecnología / Plant mass propagation by biotechnology	22
Interacción planta patógeno/ Plant pathogen interaction	39
Metabolitos secundarios de plantas / Plant secondary metabolites	59
Métodos avanzados de mejoramiento genético de plantas / Advanced methods in plant breeding	74
Biotecnología, cambio climático y seguridad alimentaria / Biotechnology, climate change and food security	89

## Sesión I: Cultivo *in vitro* de células y tejidos de plantas / *Plant cell tissue and organ culture*

### T1.1 Phenolization control as alternative for *in vitro* propagation of the endangered forest specie *Magnolia silvioi*

Margarita María Jaramillo Ciro<sup>1\*</sup>; Liliana Rocío Botero Botero<sup>1</sup>; Álvaro Alfonso Cogollo Pacheco<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Biotecnología, Biodiversidad y Bioingeniería (GRINBIO). Universidad de Medellín. Medellín, Colombia. BOX 1983 e-mail: mmjaramillo@udem.edu.co; lbotero@udem.edu.co

<sup>2</sup>Grupo de Investigación en Biodiversidad Tropical (GIBIOT). Botanical Garden Joaquín Antonio Uribe. Medellín, Colombia

\*e-mail: alvaro.cogollo@botanicomedellin.org

*Magnolia silvioi* is endemic forest specie from Colombia that is endangered due to the expansion of the urban frontier, agricultural production and livestock and removal of forests and has therefore been considered a priority for the conservation programs of the Colombian biodiversity. The *in vitro* culture arrives as propagation alternative for the future repopulation of the forest. However the phenolization has been an important problem limiting the tissues *in vitro* establishment and culture causing cell death leads finally to the tissues death. Phenolization control of apical and lateral buds of *M. silvioi* was evaluated for *in vitro* culture establishment. The use of coconut water (CW), activated carbon (AC) and polivinilpirrolidone (PVP) were evaluated as the main strategies to prevent tissue death then display a result of the phenolization. We also evaluated a complementary strategy of immersion of the tissue in a solution of PVP as a last step in the disinfection process. Finally, we evaluated the combined effect of ascorbic acid (ASA), citric acid (CIA) and casein hydrolyzate (CH) with AC. After 30 days of tissues introduction to the *in vitro* culture, AC was the best alternative to the phenolization process control for both lateral and apical buds. The tissues immersion into a PVP solution not improved the response of control. The statistical analysis showed that AC alone or combined with ASA or CH have the better responses of control over the phenolization process. The best response for the was obtained with AC and CH without a PVP immersion.

Keywords: *In vitro* culture, phenolization, *Magnolia silvioi*

## Control de la fenolización de la especie forestal amenazada *Magnolia silvioi* como alternativa para la propagación *in vitro*

*Magnolia silvioi* es una especie endémica de los bosques de Colombia que está en peligro debido a la expansión de la frontera urbana, la producción agrícola y ganadera y la eliminación de los bosques y por ello ha sido considerada una prioridad para los programas de conservación de la biodiversidad colombiana. El cultivo *in vitro* llega como alternativa de propagación para la repoblación futura de los bosques. Sin embargo, el fenolización ha sido un problema importante que ha limitado el establecimiento y cultivo *in vitro* de los tejidos causando la muerte celular que conduce finalmente a la muerte de los tejidos. El control de la fenolización de yemas apical y laterales fue evaluada para el establecimiento de cultivo *in vitro* *M. silvioi*. El uso de agua de coco (CW), carbón activado (CA) y polivinilpirrolidona (PVP) fueron evaluadas como las principales estrategias para limitar la muerte del tejido a consecuencia de la fenolización. Se evaluó también una estrategia complementaria de inmersión de los tejidos en una solución de PVP como último paso en el proceso de desinfección. Finalmente, se evaluó el efecto combinado de ácido ascórbico (ASA), ácido cítrico (CIA) y la caseína hidrolizados (CH) con AC. Después de 30 días de la introducción de los tejidos al cultivo *in vitro*, el AC fue la mejor alternativa para el control del proceso fenolización de yemas laterales y apicales. La inmersión de los tejidos en una solución de PVP no mejoró la respuesta de control. El análisis estadístico mostró que el AC solo o en combinación con ASA o CH produjeron mejor respuesta de control sobre el proceso fenolización. La mejor respuesta se obtuvo para el AC y con CH sin inmersión en PVP.

Keyword: Cultivo *in vitro*, fenolización, *Magnolia silvioi*

### T1.3 Obtención de plantas de crisantemo libres de los virus TSWV Y TAV empleando ácido salicílico y termoterapia *in vitro*

Sánchez-Hernández Ruth Ángeles<sup>1</sup>, Mora-Herrera Martha Elena<sup>\*1</sup>, López-Delgado Humberto<sup>2</sup>, García-Velasco Rómulo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitario Tenancingo Universidad Autónoma del Estado de México. Carr. Tenancingo-Villa Guerrero Km 1.5 Edo. de México CP 52 400

México. \*e-mail: ruth@elrincon.org, marthaelenam@gmail.com

<sup>2</sup>Programa Nacional de Papa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Metepec, Méx. 52 140 México.

El cultivo de crisantemo es de importancia económica en algunas regiones de México. Uno de sus problemas son los virus que son difíciles de controlar e identificar; por ello la conservación, manejo y limpieza de materiales libres de virus son prácticas eficientes en programas de producción de semilla certificada. El cultivo de meristemas, tratamientos de calor (termoterapia) y/o quimioterapia son técnicas útiles para erradicar virus. Esta investigación tuvo como objetivo obtener plantas de crisantemo variedad Polaris libres de los virus TAV y TSWV empleando ácido salicílico (AS) y termoterapia *in vitro*; los experimentos se iniciaron con microesquejes positivos (+) a los virus estudiados los cuales se incubaron por 30 días en medio MS con 0 y  $10^{-5}$  M AS; después 45 microesquejes por tratamiento fueron trasplantados a medio sin AS por 5 días, después se iniciaron los tratamientos de termoterapia: a) 33°C por 30 días y b) 37°C por 30 días. Al concluir los tratamientos de termoterapia las microplantas fueron subcultivadas a medio MS y a las 6 semanas microplantas hijas se analizaron de manera individual por DAS-ELISA a una densidad óptica de 405 nm. Las microplantas preincubadas en AS en el tratamiento de 33°C por 30 días, mostró mayor porcentaje de supervivencia (55.6%) con respecto al control. El 32% de microplantas fueron negativas a ambos virus, el 44% de microplantas solo fue negativa a TAV y el 76% a TSWV. Las microplantas no incubadas en AS presentó 0% negativas para ambos virus, 9.1% negativo al TAV y 0% negativo al TSWV. En el tratamiento de 37°C por 30 días con 0 y  $10^{-5}$  M AS se obtuvieron supervivencias por debajo del 7%, y de estas solo el 50% fue negativa al TSWV. La combinación del uso de AS con termoterapia es útil para la erradicación de virus en plantas de crisantemo. El AS incrementa la tolerancia a la termoterapia. El virus TAV presenta mayor resistencia a la erradicación.

Palabras clave: Das-ELISA, *Dendranthema grandiflora*, plantas libres de virus

**Chrysanthemum TSWV and TAV Virus cleaning plants using salicylic acid and *in vitro* thermotherapy**

Chrysanthemum culture is economically important in some regions of Mexico. One of the problems

are viruses which the identification and control is difficult. Certified seed production programs require virus cleaning, conservation and management of virus free plants. Meristem culture-heat treatments (thermotherapy) and /or chemotherapy are useful techniques for getting virus free plants. The objective of this research was to get chrysanthemum cv. Polaris TAV and TSWV virus free plants using salicylic acid (SA) and *in vitro* thermotherapy. Nodal cuttings (+) to the viruses were cultured for 30 days in MS with 0 and  $10^{-5}$  M, then 45 nodal cuttings per treatment were subcultured into SA free medium and cultured for 5 days. Thermotherapy was applied as follows: a) 33 °C and b) 37°C for 30 days each one. After thermotherapy treatments, microplants were subcultured to MS medium and 6 weeks later microplants obtained were individually checked by DAS-ELISA at 405 nm OD. Microplants previously incubated in SA under 33 C treatment for 30 days, showed higher survival percentage (55.6%) respecting the control. 32% of the plants were negatives to both viruses, 44% were negative only to TAV and 76% to TSWV. Microplants no incubated in SA were 0% negative to both viruses, 9.1% negative to TAV and 0% negative to TRWV. On the treatment of 37°C for 30 days with SA 0 and  $10^{-5}$  Mm, survival below 7% was obtained, and only 50% of them were negative to TSWV. The combination of SA-thermotherapy is useful for virus eradication in chrysanthemum plants. SA enhanced tolerance to thermotherapy. TAV virus was more difficult for eradication.

Keywords: Das-ELISA, *Dendranthema grandiflora*, virus-free plants

#### **T1.4 Methodology for *in vitro* establishment of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek**

Leonardo Ferreira Dutra<sup>1\*</sup>, Josiane Mendonça Vitória<sup>1</sup>, Fernanda Medeiros Zacarias<sup>1</sup>, Márcio Paim Mariot<sup>2</sup>, Lorena Pastorini Donini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Clima Temperado Rodovia BR 392, km 78. Caixa Postal 403. CEP 96010-971, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

\*e-mail: leonardo.dutra@cpact.embrapa.br,

<sup>2</sup>IF Sul/Campus Pelotas-Visconde da Graça, Av. Idelfonso Simões Lopes, 2791. CEP 96060-290 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. e-mail. marciomariot@gmail.com

Keywords: cytokinins, medicinal plant, micropropagation, nodal segments

## Metodología para establecimiento *in vitro* de Congorosa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek)

*Maytenus ilicifolia* es una especie medicinal nativa del Brasil, que ocurre predominantemente en la Región Sur y se encuentra amenazada de extinción. Normalmente es propagada por semilla, lo que induce una gran variabilidad genética. Por otro lado, las técnicas de propagación vegetativa carecen de respuestas más efectivas. La micropropagación puede proporcionar la producción de plántulas con alto padrón de calidad genética y fitosanitaria, además de ser una alternativa para la conservación *in vitro* de la especie. El objetivo del trabajo fué establecer *Maytenus ilicifolia in vitro* para definir el protocolo de micropropagación para la especie. Se utilizaron segmentos nodales con aproximadamente 1 cm de largo, obtenidos de brotos nuevos de plantas matrices, mantenidas en invernadero. Los explantes se desinfectaron por inmersión en alcohol 70% por 1 minuto, solución de hipoclorito de sodio 1% durante 10 minutos y lavado triple con agua destilada y autoclavada. Después de desinfectados, los explantes se inocularon en medio MS con adición de citoquininas BAP, cinetina y 2IP en las concentraciones de 0, 1, 2 y 3 mg l<sup>-1</sup>. Transcurridos 35 días de inoculación se evaluaron los porcentajes de sobrevivencia y de establecimiento. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos para porcentaje de sobrevivencia. Sin embargo, los mayores porcentajes de establecimiento se obtuvieron para los explantes sometidos a concentración de 3 mg l<sup>-1</sup>, independiente del tipo de citoquinina utilizada.

Palabras clave: citoquininas, micropropagación, planta medicinal, segmentos nodales

### T1.5 Optimization of *in vitro* shoot multiplication of different pea genotypes

N. Mendler-Drienyovszki\*, K. Magyar-Tábori, J. Dobránszki

Research Institute of Nyíregyháza, Centre for Agricultural and Applied Economic Sciences, University of Debrecen, H-4400. Nyíregyháza, Hungary. contact: \*e-mail: mendlernedn@gmail.com

Development of *in vitro* technologies is a necessary precondition for the implementation of biotechnological approaches in pea (*Pisum sativum* L.) breeding. In first experiments the effect of different salt contents were tested on

shoot multiplication of our breeding lines ('SzB-0210', '2013' and '2106'). Micro and macro elements of Gamborg and Murashige-Skoog media were used in four combinations. Gamborg vitamins, 0.7% agar-agar, 1.5% sucrose, 0.3 mg l<sup>-1</sup> naphthalene-acetic acid, 0.5 mg l<sup>-1</sup> benzyladenine were also added to media. Nodal segments of shoots were placed on medium and cultured for 4 weeks at 22°C, and 16h photoperiod. Considering the multiplication rate and shoot lengths slight differences could be detected between media, but medium containing MS macro and Gamborg microelements was selected for further experiments because the rate of hyperhydration and callus development was the least on this medium. Subsequently, the effect of cytokinins (benzyladenine, benzyladenine riboside and meta-topolin) in 0.5 mg l<sup>-1</sup> concentration was studied. Because of molar mass equality the benzyladenine riboside was also tested at 0.8 mg l<sup>-1</sup> level. The other conditions were same as in the first experiments. The breeding line '2013' did not show differences in the multiplication rate, while '2103' gave the best results on media containing benzyladenine. Applying benzyladenine riboside in 0.8 mg l<sup>-1</sup> concentration resulted in the most newly developed shoots of 'SzB-0210'. The longest shoots developed on media with benzyladenine riboside (0.8 mg l<sup>-1</sup>) in '2013', while medium containing meta-topolin resulted in the longest shoot in other lines. Low rate of callus development was detected on all media. The rate of hyperhydrated shoots was very low in '2106', there was no hyperhydration in '2013' on medium with benzyladenine riboside (0.8 mg l<sup>-1</sup>).

Keywords: salt content, benzyladenine, benzyladenine riboside, meta-topolin

### T1.6 Effects of aromatic cytokinins on *in vitro* shoot multiplication in apple cv. 'Royal Gala'

Judit Dobránszki\*, Katalin Magyar-Tábori, Ildikó Hudák

Research Institute of Nyíregyháza, Centre for Agricultural Sciences and Engineering, University of Debrecen, H-4400 Nyíregyháza, Westsik V. u. 4-6., Hungary, \*e-mail: dobranszki@freemail.hu

The production of healthy, disease-free plants and the rapid multiplication in apple is based on micropropagation of scions and rootstocks. Successful shoot multiplication using pre-existing meristems of nodal segments is influenced by several internal and external factors but depends mainly on cytokinin content of the medium. In the present experiments *in vitro* shoots of apple scion



cv. Royal Gala were multiplied on Murashige-Skoog basal medium supplemented with 100 mg l<sup>-1</sup> myo-inositol, 0.1 mg l<sup>-1</sup> indole-3-butyric acid (IBA) and 0.2 mg l<sup>-1</sup> gibberellic acid (GA<sub>3</sub>), 3% sucrose and 0.7% agar-agar. We studied the effects of three aromatic cytokinins, such as 6-benzylaminopurine (BA), 6-benzylaminopurine riboside (BAR), 6-(3-hydroxybenzylamino)purine (TOP), at five levels (0, 0.5, 2.0, 3.5, 5.0 mg l<sup>-1</sup>). The cultures were grown at 22 °C with a 16 h photoperiod at a PPF of 105 µmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>. After four-week-long cultures the numbers of newly developed shoots (multiplication rate, MR) and the lengths (SL) of new shoots were observed and counted. The data were analysed statistically applying ANOVA followed by Tukey's test using the SPSS 13.0 for Windows software package. Applying BAR and TOP in 2.0 mg l<sup>-1</sup> concentration resulted in the best multiplication rates (17.5 and 16.5 newly developed shoots per explant, respectively). The rate of hyperhydrated shoots was below 5% on both media. Increasing concentrations of all types of cytokinins decreased the shoot length. The longest shoots were obtained on media containing 0.5 mg l<sup>-1</sup> TOP, but it was satisfactorily high in treatments which resulted in the best multiplication rates.

Keywords: 6-benzylaminopurine, 6-benzylaminopurine riboside, 6-(3-hydroxybenzylamino)purine, micropropagation

### **T1.7 Establecimiento y multiplicación *in vitro* de guayaba (*Psidium guajava* L.) a partir de yemas de plantas adultas**

Catalina Acuña-Gutiérrez, Andrés Hernández-Pridybailo\*, Isabel Mora-Ramírez, María Viñas, Víctor M. Jiménez, Eric Guevara

CIGRAS Universidad de Costa Rica. 2060 San Pedro. Costa Rica e-mail: catalina.acuna@ucr.ac.cr / \*andres.hernandezpridybailo@ucr.ac.cr maria.vinas@ucr.ac.cr / victor.jimenez@ucr.ac.cr

La guayaba es un cultivo frutícola que se consume y se cultiva tanto en el trópico como en el subtrópico de todo el mundo. La propagación por medios asexuales resulta difícil, por lo que el uso de semilla es lo más común, con la desventaja de que los genotipos promisorios no pueden ser clonados. Por lo anterior, en este trabajo se desarrolló un protocolo para el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de guayaba a partir de yemas de plantas adultas. Para ello se tomaron segmentos nodales con dos yemas de plantas en invernadero en época seca los cuales se colocaron en una solución

bactericida/fungicida seguido de 10 minutos en hipoclorito de sodio (NaOCl, 0.75%); en este caso solamente 16% de los explantes presentaron contaminación. Cuando el mismo protocolo se aplicó durante la época lluviosa, las tasas de contaminación fueron muy altas, por lo que el protocolo fue modificado sumergiendo los explantes durante un minuto en etanol (70%) antes de colocarlos en NaOCl (1%), además, se realizó una segunda desinfección, luego de tres días de cultivo *in vitro*, con NaOCl (1%) durante cinco minutos, donde el porcentaje de contaminación fue de 54%. Los explantes se cultivaron en medio Murashige y Skoog, adicionado con 0.5 mg l<sup>-1</sup> de kinetina (KIN) ó 0.5 mg l<sup>-1</sup> de bencilaminopurina (BAP). Los segmentos cultivados en medio con BAP presentaron una mayor brotación (90%) y una mayor longitud del brote que los cultivados en el medio con KIN (45%). El mayor número de brotes/explante, luego de 40 días de cultivo fue de aproximadamente 1.8 con BAP. Luego de cinco semanas, se cultivaron los brotes en crecimiento en medio de cultivo para enraizamiento, utilizando concentraciones crecientes de ácido indolbutírico (AIB) (1, 2.5 y cinco mg l<sup>-1</sup>), con lo cual se obtuvo hasta un 67% de plantas con raíces funcionales.

### ***In vitro* establishment and multiplication of guava (*Psidium guajava* L.) from mature plant buds**

Guava is a fruit crop grown and consumed both in tropical and subtropical areas around the world. Asexual propagation is difficult; hence sexual multiplication is most common, with the disadvantage that promissory genotypes cannot be cloned. Therefore, in this work we developed a protocol for the establishment and *in vitro* propagation of guava from buds of adult plants. Nodal segments were taken from greenhouse plants during the dry season and placed in a bactericide/fungicide solution, followed by 10 minutes in sodium hypochlorite (NaOCl, 0.75%); in this case only 16% of the explants showed contamination. However, when the same protocol was used during the rainy season, the contamination rate was extremely high; therefore, the protocol was modified by immersing the explants for 1 minute in ethanol (70%) prior to disinfecting them with NaOCl (1%); furthermore, a second disinfection step was conducted after 3 days of culture with NaOCl (3%) for 5 minutes, where the contamination was 54%. The nodal segments were cultured on Murashige and Skoog medium with 0.5 mg l<sup>-1</sup> kinetin (KIN) or 0.5 mg l<sup>-1</sup> bencilaminopurine (BAP). Segments cultured on

culture medium with BAP had the highest bud development (90%) and a higher bud length than the ones cultured on KIN-supplemented culture medium (45%). The highest number of buds per explant after 40 days of culture was obtained with BAP (1.8 buds/explant). After 5 weeks of *in vitro* culture, the growing axes were cultured on rooting medium with increasing concentrations of indolbutiric acid (AIB) (1, 2.5 and 5 mg l<sup>-1</sup>), thus obtaining up to 67% of plants with functional roots.

### **T1.8 Aislamiento, purificación y cultivo de protoplastos viables de pitahaya (*Hylocereus* sp. [Weber] Britton & Rose)**

María Viñas, Víctor M. Jiménez

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

Las pitahayas poseen un alto valor comercial, ya sea como fruta para consumo fresco o como fuente de colorante natural para la industria gracias a su alto contenido de betalainas. El uso de protoplastos representa una alternativa interesante como forma de propagación y mejoramiento genético en esta planta. En el presente trabajo se logró el aislamiento de protoplastos de pitahaya a partir de tejidos cultivados *in vitro* (brotes, raíces y callos) y de tejido de plantas en condiciones de invernadero (brotes). Para el aislamiento se evaluaron diferentes concentraciones de las enzimas celulasa y pectinasa, para la purificación distintas concentraciones de sacarosa y para el cultivo factores como las condiciones lumínicas y tipo de cultivo (líquido y sólido). En el caso de los brotes, tanto de invernadero como de tejidos *in vitro*, fue común encontrar dificultades para la purificación de los protoplastos debido a la presencia de gran cantidad de mucílago y de cristales de oxalato de calcio. La mayor densidad de protoplastos se logró utilizando tejido proveniente de invernadero y de callos mantenidos en condiciones *in vitro* (1-3x10<sup>5</sup> protoplastos/g). Los protoplastos obtenidos a partir de callos fueron fáciles de purificar y presentaron una viabilidad superior a los protoplastos obtenidos a partir de los demás tejidos. Se logró la formación de microcallos a partir de estos protoplastos rápidamente a los cuatro días luego del cultivo. Se determinó que es necesario colocar los protoplastos recién purificados 24 horas en oscuridad para lograr un mayor crecimiento. El extracto de malta resultó indispensable para el crecimiento de los protoplastos de pitahaya cultivados. El mayor

crecimiento de los microcallos se observó cuando los protoplastos se cultivaron primero en medio líquido y, luego de un mes, las microcolonias se transfirieron a medio de cultivo sólido.

Palabras clave: callo, celulosa, pectinasa

### **Isolation, purification and culture of viable protoplasts of pitahaya (*Hylocereus* sp. [Weber] Britton & Rose)**

Pitahayas have a high commercial value, either for fresh fruit consumption or as a source of natural pigments for the industry due to their high contents of betalains. The use of protoplasts is an interesting alternative as a method for propagation and breeding in this plant. In this work we report the isolation, purification and culture of pitahaya protoplasts from *in vitro* cultures (shoots, roots and calluses) and from tissues of plants under greenhouse conditions (new shoots). For isolation different concentrations of the enzymes cellulase and pectinase were evaluated, for purification, different concentrations of sucrose, and for culture, light conditions and type of culture (solid and liquid). In the case of shoots from *in vitro* and greenhouse conditions, difficulties were common for the isolation due to the presence of large amounts of mucilage and calcium oxalate crystals. The highest protoplast density was obtained from greenhouse and callus tissues (1-3x10<sup>5</sup> protoplasts/g). Protoplasts obtained from callus were easier to purify and they showed higher viability rates than the protoplasts obtained from the other tissues. Microcalluses from these protoplasts were observed after 4 days in culture. It was necessary to place the purified protoplasts initially for 24 hours in the dark for further growth. Moreover, malt extract was essential for protoplasts growth. When the protoplasts were cultured first in liquid media and then, after 1 month, microcolonies were placed in solid media further growth was observed.

Keyword: callus, mcellulose, pectinase

### **T1.9 Determinación de la variación genética en plantas de papaya regeneradas a través de embriogénesis somática**

Li-Wei, L. Tapia-Campos, E. Rodríguez-Garay, B. y A. Gutiérrez-Mora\*.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Normalistas 800. Colinas de la Normal. C.P. 44270. Guadalajara, Jalisco. México. \*e-mail: agutierrez@ciatej.net.mx

La embriogénesis somática es un método eficiente para la micropropagación de plantas, sin embargo, su proceso incluye distintos factores que inducen variación somaclonal, la cual es no deseable para una producción clonal. El objetivo del presente trabajo fue determinar la variación genética en plantas de papaya regeneradas mediante embriogénesis somática indirecta utilizando la técnica de AFLP. Se utilizaron como explantes embriones cigóticos de *Carica papaya* var. Maradol. También, se utilizaron hojas y meristemas de papaya silvestre (*Carica* sp.) adicionando 1.0 mg l<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético, 1.0 mg l<sup>-1</sup> de cinetina y 1.0 mg l<sup>-1</sup> de ácido giberélico para la regeneración de plantas por embriogénesis somática. Se utilizaron tres combinaciones de iniciadores: E-ACG + M-CTG, E-ACT + M-CAT, E-ACT+M-CAG. Las plantas de papaya silvestres regeneradas a partir del mismo explante donador presentaron alta similitud (95%). Por otra parte, cuando se analizaron plantas regeneradas a partir de diferentes explantes donadores en papaya Maradol esta similitud fue menor (87%). Con los resultados se puede concluir que las plantas regeneradas por medio de embriogénesis somática no presentan variación genética

Palabras clave: *Carica* sp., Maradol, propagación masiva

#### **Determination of genetic variation in papaya plants regenerated through somatic embryogenesis**

Somatic embryogenesis is an efficient method for the micropropagation of plants, however, the process involves several factors that induce somaclonal variation, which is undesirable for clonal production. The aim of this work was to determine the genetic variation in papaya plants regenerated through indirect somatic embryogenesis using AFLP techniques. Zygotic embryos of *Carica papaya* var. Maradol were used as explants. Also, Leaves and meristems of wild papaya (*Carica* sp.) were used as explants adding 1.0 mg l<sup>-1</sup> naphthaleneacetic acid, 1.0 mg l<sup>-1</sup> kinetin and 1.0 mg l<sup>-1</sup> gibberellic acid for regeneration of plants by somatic embryogenesis. It was used three combinations of primers: E-ACG + M-CTG, E-ACT + M-CAT, E-ACT + M-CAG. Wild papaya plants regenerated from the same donor explant showed high similarity (95%). Moreover, plants regenerated from explants from different donors in papaya Maradol the similarity was less (87%). With these results we can conclude that the regenerated plants via somatic embryogenesis do not have genetic variation.

Keywords: *Carica* sp., Maradol, mass propagation

#### **T1.11 *Jatropha curcas* micropropagation: a new research at Embrapa Temperate Agriculture**

Leonardo Ferreira Dutra<sup>1\*</sup>, Lorena Pastorini Donini, Sérgio Delmar dos Anjos e Silva, Natália Dias Gomes da Silva, Fernanda Beatriz Thiel

Embrapa Clima Temperado Rodovia BR 392, km 78. Caixa Postal 403. CP 96010-971, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil,

\*e-mail: leonardo.dutra@cpact.embrapa.br

*Jatropha* is a species that has the potential to commercial feedstock for the biofuel production. *Jatropha curcas* superior genotypes have been selected at Embrapa Temperate Agriculture, Pelotas, RS, Brazil. Aiming the genetic characteristics of interest maintenance and production of seedlings free of virus and other pathogens, and considering the scarcity of micropropagation studies, works with *in vitro* cloning of *Jatropha curcas* were started. Stock plants at 6 months old kept in greenhouse and previously submitted to treatment with fungicide and bactericide served as explants source. New shoots were collected and disinfested with alcohol 70% immersion for one minute and in 1% sodium hypochlorite solution for ten minutes, followed by triple wash in sterile distilled water. Later, nodal segments of approximately 1.5 cm long or meristems were isolated, which were inoculated in MS or WPM medium, containing sucrose at 15, 30, 45 or 60 g l<sup>-1</sup>. When using nodal segments, the best results were in WPM medium added of 45 g l<sup>-1</sup> of sucrose. When using meristems, WPM medium also provided the best answers, however, independent of the sucrose concentration used.

Keywords: *Jatropha*, *in vitro* cloning, nodal segments, medium, sucrose

#### **Micropropagación de *Jatropha curcas*: una nueva línea de investigación en la Embrapa Clima Templado**

Se seleccionaron genotipos superiores de *Jatropha curcas* (piñón manso) en la Embrapa Clima Templado, Pelotas, RS, Brasil, iniciando los trabajos de clonación *in vitro*, con la intención de conservar las características genéticas de interés y para la producción de plántulas libres de virus y otros patógenos, dada la escasez de referencias sobre micropropagación en la

literatura del tema. Plantas madre de seis meses de cultivo se mantuvieron en invernadero plástico, después de tratamiento sanitario con fungicida y bactericida como fuente de explantes. Los brotes nuevos se recolectaron y desinfectaron con inmersión en alcohol 70% por un minuto y solución de hipoclorito de sodio por 10 minutos, con post-lavado triple en agua esterilizada. Posteriormente, se aislaron los segmentos nodales con cerca de 1.5 cm de largo, o meristemas, los cuales se inocularon en medio de cultivo MS o WPM, que contenían sacarosa a 15, 30, 45 o 60 g l<sup>-1</sup>. Los mejores resultados con segmentos nodales se obtuvieron con el medio de cultivo WPM al adicionar solución de sacarosa (45 g l<sup>-1</sup>). Para los meristemas, el medio de cultivo WPM también proporcionó los mejores resultados, sin embargo, de manera independiente a la concentración de sacarosa.

Palabras clave: piñon manso, clonación *in vitro*, segmentos nodales, medio de cultivo, sacarosa

#### **T1.14 Multiplicación y enraizamiento *in vitro* de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.)**

Sergio Upegui<sup>1</sup>, Liliana R. Botero<sup>1\*</sup>, Claudia Valencia<sup>2</sup>, Diego Martínez<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Biotecnología, Biodiversidad y Bioingeniería (GRINBIO). Universidad de Medellín. Medellín, Colombia. BOX 1983. supegui@udem.edu.co; \*e-mail: lbotero@udem.edu.co

<sup>2</sup>Parque Tecnológico de Antioquia. Medellín, Colombia. e-mail: calidad@biofabrica.parquepta.org

<sup>3</sup>Universidad CES. Medellín, Colombia. dmartinez@uces.edu.co

La sobreexplotación de poblaciones naturales de cedro rojo (*Cedrela odorata*) en Colombia ha llevado a esta especie a ser incluida en la lista UICN En Peligro (A2cd) a nivel regional. Las técnicas convencionales de propagación de esta especie han resultado poco efectivas debido principalmente a la presencia de problemas fitosanitarios. La propagación mediante cultivo *in vitro* permite obtener material vegetal elite con miras al aprovechamiento sostenible de esta especie. En este trabajo se evaluó el efecto de los reguladores Bencil amino purina (BAP) (0.5-3.0 mg l<sup>-1</sup>), ácido naftalenacético (ANA) (0 - 0.1 mg l<sup>-1</sup>) y Ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) (0 - 1 mg l<sup>-1</sup>) respectivamente en el proceso de multiplicación *in vitro* de plántulas de *Cedrela odorata*; así como ácido indolbutírico (IBA) (0 - 1.0 mg l<sup>-1</sup>) y ANA (0, 0.1, 0.1 mg l<sup>-1</sup>) en el proceso de enraizamiento.

Para realizar los ensayos se utilizaron plántulas germinadas *in vitro* con tres meses de desarrollo tomándose los segmentos caulinares superiores ubicados entre el nudo cotiledonar y la yema apical, los cuales fueron sembrados en medio de cultivo basal WPM. Los explantes fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (21°C) y luz blanca fría las 24 horas del día. Como variables de respuesta se midió el porcentaje de supervivencia, el porcentaje de brotación y el número y altura de los brotes para la multiplicación, y el porcentaje de supervivencia, porcentaje de enraizamiento y el número y longitud promedio de raíces para el enraizamiento. Los ensayos mostraron que el número máximo y la mayor altura de brotes se lograron con la presencia de BAP y ausencia de ANA y AG<sub>3</sub>. Para el proceso de enraizamiento, la mayor cantidad y longitud promedio de raíces se presenta en altas concentraciones de IBA.

Palabras clave: *Cedrela odorata*, *in vitro*, multiplicación, enraizamiento, micropropagación

#### ***In vitro* shoot multiplication and root formation of red cedar (*Cedrela odorata* L.)**

The over-exploitation of natural populations of red cedar (*Cedrela odorata*) in Colombia has drive this species to be listed as Endangered IUCN category (A2cd) at regional level. Conventional techniques for propagation of this cedar specie have been largely ineffective due to plant health problems. Propagation by *in vitro* culture allows obtaining elite plant material for the sustainable commercial use of this specie. Benzylaminopurine (BAP) (0.5 - 3.0 mg l<sup>-1</sup>), naphthaleneacetic acid (NAA) (0 - 0.1 mg l<sup>-1</sup>) and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (0 - 1 mg l<sup>-1</sup>) effects was evaluated on *in vitro* propagation of *Cedrela odorata* seedlings, likewise the effect of indole butyric acid (IBA) (0 - 1.0 mg l<sup>-1</sup>) and NAA (0, 0.1, 0.1 mg l<sup>-1</sup>) was evaluated in the rooting formation process. Assays were carried out using 3 months old *in vitro* germinated seeds, taking upper plant segments located between cotyledonary node and apical bud, which were planted in WPM basal medium. The explants were kept under controlled temperature (21°C) and cool white light 24 hours a day. As response multiplication variables were measured the survival rate, the percentage of shoot formation and the number and height of shoots; in the case of root formation response were measured the survival rate, percentage of rooting and the number and average root length. The results showed that the maximum and the greatest height of shoots were achieved with BAP and absence of both NAA and GA<sub>3</sub>. For rooting

formation process, the greatest number and average root length occur with high concentration of IBA.

Keywords: *Cedrela odorata*, *in vitro*, multiplication, root formation, micropropagation

### T1.15 *In vitro* propagation of native species of Patagonia

Latorre Valeria<sup>1\*</sup>, Olave Rodrigo<sup>2</sup>, Bahamonde Luis<sup>1</sup>, Barria Cristopher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile \*e-mail: valeria.latorre@umag.cl

<sup>2</sup>Agri-Food & Bioscience Institute, Agriculture, Food and Environmental Science Division, Newforge Lane, Belfast, BT9 5PX, United Kingdom

Chile is the main exporter of berries in the southern hemisphere and the second largest producer of raspberries in the world. It could be supposed that, native berries might have the market secured once they enter in production. *Berberis buxifolia*, is a shrub commonly known as Calafate and its fruits are blue-black colour, meaty and juicy with rich flavor of bittersweet. *Rubus geoides*, known as wild strawberry, is a creeping and herbaceous species that has red fruits and a pleasant flavor similar to raspberry. Both species are native of Patagonia and are used as fresh fruit and/or jam. This paper presents preliminary results of the protocols for *in vitro* propagation of *B. buxifolia* and *R. geoides*. It was used the culture medium of Murashige and Skoog (MS) with 0.125 mg l<sup>-1</sup> and 1.10 mM of 6-benzylaminopurine (BA) for *B. buxifolia* and *R. geoides*, respectively. At 40 days after sowing, the percentage of contaminated explants 62% for *B. buxifolia* and 58% *R. geoides*. Additionally the number of shoots per explant for *R. geoides* (1.92) and total leaf numbers of outbreaks were also evaluated. These results are an important contribution for the development of a protocol for *in vitro* culture of *R. geoides* and *B. buxifolia* which plays a crucial role in the introduction of these species as a commercial crop.

Keywords: *Berberis buxifolia*, micropropagations, *Rubus geoides*

### T1.16 Somatic embryogenesis in grasses, a model for studying gene regulation and subcellular transport of homologous enzymes transglutaminase to maize TGZ15

Enrique Villalobos Amador\*, María Asunción Santos Lozano y Josep María Torné.

Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec. Instituto de biotecnología. Circuito Central No. 200, Col. Parque Industrial. CP. 68301. Tuxtepec, Oaxaca. México. CRAG: Centre de Reserca en Agrigenomica de Barcelona, España.

\*e-mail: evillalobos@unpa.edu.mx

Transglutaminases (TGases; EC2.3.2.13) are a family of enzymes present in all living things that cause posttranslational modifications of proteins, catalyzing covalent bonds between amino groups of lysine residues or polyamines and gamma groups' carboxyamides glutamine residue protein substrates to form peptide-polyamine mono and bis-derivatives. The coagulation factor XIIIa of human blood is used as a reference for this enzyme family. The structural characteristic that defines this group of enzymes is the conservation of a catalytic triad consisting of three domains containing a cysteine, histidine and aspartic acid. The formation of protein bis-derivatives gives this enzyme family a very wide use in biotechnology, nanotechnology, the textile and food industries, in new materials and in therapeutic use as a surgical adhesive. Transglutaminase activity in plants was first detected in the work of Ickson and Apelbaum with pea plants in 1987. In grasses, transglutaminases have been studied in maize at different levels; in chloroplast, at the subcellular level using an antibody against TGase from *Helianthus tuberosus* in different tissues, in identifying the presence of mono-and bis-derivatives and co-locating the enzyme and its substrate antenna complexes. However, the most significant advance to date occurred in our study of isolation, cloning and molecular characterization of the first two genes of maize active TGases, patent number WO03102128, and its expression as a purified recombinant protein, whose DNA sequence marks the first reference of TGases in plants and monocots including rice, barley, wheat and sugarcane. We use somatic embryogenesis in grasses as a model of study of chloroplastic transglutaminases in subcellular transport during chloroplast differentiation. The recent sequencing of the genome and the creation of a bank of T-DNA mutants of *Brachypodium distachyon* L., open a new line of research on gene regulation with the identification, isolation and characterization of promoters of transglutaminases and differential subcellular localization using bioinformatic studies.

Keywords: grasses, somatic embryogenesis, plant transglutaminases, subcellular transport, bioinformatic

**Embriogénesis somática en gramíneas, un modelo de estudio de la regulación genética y de transporte subcelular de enzimas transglutaminasas homólogas a la TGZ15 de maíz**

Las transglutaminasas (TGasas; E.C.2.3.2.13) son una familia de enzimas presentes en todos los seres vivos que originan modificaciones post traduccionales de proteínas, catalizando enlaces covalentes entre grupos amino de poliaminas o residuos de lisina y grupos gama carboxiamidas de residuos de glutamina de proteínas sustratos, formando mono y bis-derivados péptido-poliamina. El factor XIIIa de coagulación sanguíneo humano es usado como referente para esta familia enzimática. La característica estructural que define a este grupo de enzimas es la conservación de una triada catalítica formada por tres dominios que contienen una cisteína, una histidina y un ácido aspártico. La formación de bis-derivados proteicos da a esta familia enzimática un uso biotecnológico muy amplio en nanotecnología y bio-procesos industriales; textil, alimentaria, nuevos materiales o de uso terapéutico como adhesivo quirúrgico. En vegetales la actividad transglutaminasa fue detectada por primera vez en los trabajos realizados por Ickson y Apelbaum con plantas de guisante en 1987. En gramíneas, las transglutaminasas han sido estudiadas en maíz a diferentes niveles; en cloroplasto, a nivel subcelular utilizando un anticuerpo contra una TGasas de *Helianthus tuberosus* en diferentes tejidos, identificando la presencia de mono y bis-derivados y co-localizando el enzima y sus sustratos del complejo antena. Sin embargo, el avance más significativo hasta la fecha ocurrió con este trabajo de aislamiento, clonación y caracterización molecular de los primeros dos genes de TGasas activas de maíz, patente número WO03102128, y su expresión y purificación como proteína recombinante, cuya secuencia de DNA marca el primer referente de TGasas en plantas y en particular monocotiledóneas: arroz, cebada, trigo, caña de azúcar. La embriogénesis somática en gramíneas es utilizada como un modelo de estudio de transporte subcelular de transglutaminasas cloroplásticas durante la diferenciación cloroplástica. La reciente secuenciación del genoma y la creación de un banco de mutantes de T-DNA de *Brachypodium distachyon* L., abre una nueva línea de

investigación sobre regulación genética con la identificación, aislamiento, caracterización de promotores de transglutaminasas, y la localización subcelular diferencial mediante estudios bioinformáticos.

Palabras clave: gramíneas, embriogénesis somática, transglutaminasas vegetales, transporte subcelular, bioinformática

**T1.17 Rompimiento de la recalcitrancia en el cultivo *in vitro* de *Aniba perutilis* Hemsley**

Diana Marcela Beltrán Pedroza\*, Neftali Mesa Lopez, Martha Lily Ocampo Guerrero.

Grupo de investigación en Genética y Biotecnología, Universidad del Tolima. GEBIUT. Laboratorio de Protección de Plantas y Cultivo *in vitro*. Barrio Santa Helena Calle 42. Ibagué, Colombia. Apartado Aereo 546. \*e-mail: dianamabelbiology@gmail.com

El comino (*Aniba perutilis* Hemsley), es una especie nativa, pertenece a la familia *Lauraceae*, es un árbol que presenta una excelente alternativa comercial por su finísima madera; con reducida presencia en bosques naturales. Las causas de la reducción de esta especie son, actividades antropogénicas, la calidad y valor comercial de su madera, las dificultades para su regeneración natural, el prolongado ciclo de aprovechamiento y la importancia para el desarrollo de especies animales y plantas propias del bosque tropical. En este proyecto se plantearon diferentes alternativas para el rompimiento de la recalcitrancia de esta especie, entre las cuales, el tipo de explante arrojó diferencias significativas, las yemas fueron las que mostraron los mejores resultados. En campo se realizaron procesos de juvenalización mediante podas, tomando los explantes de los rebrotes obtenidos; además, se comprobó que el proceso de etiolación en campo, por 48 horas, reduce en un 12% los niveles de oxidación del material vegetal *in vitro*. El medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog, adicionado con 3 g l<sup>-1</sup> de carbón activado como antioxidante, 1 mg l<sup>-1</sup> de Bencil amino purina, y un pH 5,8, siendo esta combinación eficiente al reducir en un 85% los procesos de recalcitrancia y aumento de la brotación en un 73,3%, lo cual permitió el establecimiento y desarrollo *in vitro* de *Aniba perutilis* Hemsley hasta la etapa de rizogénesis.

Palabras clave: Bencil amino purina, Comino Crespo, Dicloruro de Mercurio, Oxidación, pH.

## **Breaking of recalcitrance in the culture *in vitro* of *Aniba perutilis* Hemsley**

*Aniba perutilis* Hemsley, Cumin is a native species belongs to the family *Lauraceae*, is a tree that has excellent commercial alternative for their fine wood with a reduced presence in natural forests. The causes of decline of this species are anthropogenic activities; quality and commercial value of its timber, the difficulties in their natural regeneration, the long harvest cycle and the importance for the development of plant and animal species typical of tropical forest. In this project were raised a number of alternatives for the breakup of the recalcitrance of this species, including the type of explant showed significant differences, still buds that showed better result. In the field were made by pruning juvenilization processes taking sprout explants obtained; also found that the etiolation process in the field, for 48 hours reduced by 12% the levels of *in vitro* oxidation of the material, the culture medium used was Murashige & Skoog, supplemented with 3 g l<sup>-1</sup> of activated charcoal as an antioxidant, 1 mg l<sup>-1</sup> of benzylaminopurine, and pH 5.8, with this combination in an efficient in reducing 85% recalcitrance processes and increased by 73.3% sprouting, which allowed the establishment and development *in vitro* of *Aniba perutilis* Hemsley to the stage of rhizogenesis.

Keywords: Benzylaminopurine, Comin, Mercury dichloride, oxidation, pH

### **T1.1C Efecto en los indicadores del crecimiento del cultivo *in vitro* de plátano cv. Enano Guantanamero con el uso del FitoMas-E y ácidos húmicos**

Daniel Cabezas Montero<sup>1</sup>, Marcia Beatriz Moya<sup>1</sup>, Andrés Calderín Garcías<sup>1</sup>, Liane Portuondo Frías<sup>1</sup>, Sandra Pérez Alvarez, Dany Marrero López<sup>2</sup>, Lázaro J. Mendoza Mendizábal<sup>1</sup> y Luís Enrique Salazar Gómez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Agraria de la Habana. San José de las Lajas, Habana Cuba. e-mail: cabezas@isch.edu.cu

<sup>2</sup>Biofábrica de la Habana. San José de las Lajas, 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 elites de plátano macho para su producción en la provincia La Habana a partir de técnicas biotecnológicas del cultivo *in vitro*. El objetivo fue la evaluación de indicadores del crecimiento del cultivo *in vitro* del plátano clon

Enano Guantanamero con el uso del FitoMas E y ácidos húmicos (AH) como estimuladores de los procesos de crecimiento vegetativo, buscando la posible sustitución parcial o completa de reguladores del crecimiento sintéticos. En el presente trabajo se utilizaron cuatro tratamientos con diferentes combinaciones de FitoMas-E y ácidos húmicos (AH), TI Control: (6 BAP (4mg l<sup>-1</sup>) + AIA (0.65 mg l<sup>-1</sup>); TII (4mg l<sup>-1</sup> 6 BAP + AIA 0.65mg l<sup>-1</sup> + 10 mg l<sup>-1</sup> AH); TIII (4mg l<sup>-1</sup> 6 BAP + AIA 0.65mg l<sup>-1</sup> + 20 mg l<sup>-1</sup> AH); T IV (4mg l<sup>-1</sup> 6 BAP + AIA 0.65mg l<sup>-1</sup> + FitoMas-E (0.24ml l<sup>-1</sup>) y T V (4mg l<sup>-1</sup> 6 BAP + AIA 0.65mg l<sup>-1</sup> + FitoMas-E (0.32ml l<sup>-1</sup>). El pH se ajustó a 5.8±0.01 previo a la adición del agente solidificante. Los resultados obtenidos estadísticamente mostraron que los tratamientos con FitoMas-E fueron los que más favorecieron los procesos de Multiplicación y División Celular, comparados con el número de raíces, longitud de las raíces y masa seca para los cuales los Ácidos Húmicos superaron los valores obtenidos.

Palabras clave: micropropagación, ácido húmico (AH) y FitoMas-E

### **T1.2C Efecto de diferentes estimuladores del enraizamiento *in vitro* en el cultivar de caña de azúcar C95-414**

Aydiloid Bernal, Jorge L. Montes de Oca, Mayra Jiménez, Pablo E. Machado Zenaída Occeguera Águila, Carlos F. Reyes Esquirol, Irenaldo Delgado, Ada Teresita Aguiar, Mediala Bermúdez, Nede Quintero

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

El cultivar C95-414, presenta buena brotación, hábito de crecimiento erecto, cierre de campo medio, regular despaje, buen retoñamiento y de escasa floración. Sin embargo, en su micropropagación ha presentado problemas durante la fase de enraizamiento. Para solucionarlo se realizaron diferentes manejos durante la fase de multiplicación, y no hubo respuesta alguna en este sentido. Por ello, se hizo necesaria la utilización de diferentes estimuladores del enraizamiento para dar solución a esta situación, la cual puede provocar atraso en la entrega y cumplimiento del plan de producción y ventas de la biofábrica. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto *in vitro* de diferentes estimuladores del enraizamiento (Ácido Indolacético, Ácido Indolbutírico, Ácido

Naftalenácetico y el Fitomas-E) del cultivar C95-14. Se identificó que el mejor tratamiento durante las fase de enraizamiento fue el Ácido - Indol butílico (IBA).

Palabras clave: cultivar, estimuladores del enraizamiento

#### **Effect of different *in vitro* root-stimulating substances on sugarcane cultivar C95-414**

The sugarcane variety C95-414 is a good-sprouting cultivar, with erect growth habit, middle field closing, regulate trashing, good rooting and of scarce flowering. In our laboratory it has presented problems during the rooting stage. Different management techniques were carried out during the multiplication stage and there was not any answer regarding this sense, so that, it became necessary the use of different root-stimulating substances to overcome this situation, which can cause backwardness in the delivery and execution of the production plans and sales of the Tissue Culture Plant. The objective of the present paper was to prove the effect of different *in vitro* stimulating substances (Indole Acetic Acid (IAA), Indole Butiric Acid (IBA), Naftal Acetic Acid (NAA) and the Fitomas-E) in sugarcane cultivar C95-414. It was identified that the best treatment during the rooting stage was the Indole Butiric Acid (IBA).

Key words: Cultivar, root-stimulating substances

#### **T1.3C Efecto del sulfato de adenina en la regeneración y elongación de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. var. 'CIAP 7247F'**

L. R. García\*, I. Bermúdez-Caraballosa, N. Veitía, R. Collado, D. Torres, C. Romero. \*Autor para correspondencia

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

En *Phaseolus vulgaris* L. la regeneración de brotes, el crecimiento y elongación de las plantas regeneradas *in vitro* son etapas críticas del cultivo de tejidos. En estas etapas los componentes del medio de cultivo juegan un rol fundamental. La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto del sulfato de adenina adicionado a los medios de cultivo sobre la regeneración y elongación de brotes de *Phaseolus vulgaris* var. 'CIAP 7247F'. Se logró demostrar el efecto positivo que ejerce este compuesto en

este cultivar. Los valores de brotes regenerados y la altura de las plantas se incrementaron.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, medio de cultivo, frijol común

#### **Effect of Adenin sulfat on the regeneration and elongation of shoots of *Phaseolus vulgaris* L. var. 'CIAP 7247F'**

In *Phaseolus vulgaris* L. the shoot regeneration, growth and elongation of the regenerated plants are critical steps in tissue culture. In these phases the culture medium components play a fundamental role. This study aimed to determine the effect of adenine sulfate included in the culture media on the regeneration and elongation of shoots in the variety 'CIAP 7247F' The results showed that adenine sulfate affect plant regeneration and its elongation. The values of regenerated shoots and the plant height were increased.

Keywords: *in vitro* culture, culture medium, common bean

#### **T1.4C Nuevo explante para la formación de embriones somáticos de sorgo variedad CIAP 2E-95**

Silvio Martínez<sup>\*1,2</sup>, Kosky RG<sup>1</sup>, L. Posada-Pérez<sup>1</sup>, R. Barbón<sup>1</sup>, M. Acosta-Suárez<sup>1</sup>, Maritza Reyes<sup>1</sup>, Martha Pérez<sup>1</sup>, Damaris Torres<sup>1</sup>, Mileidy Pons<sup>1</sup>, Mariana La O<sup>1</sup>, Anneris Aguilera<sup>3</sup>, M. Tejeda<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Sede Universitaria Municipal Camajuaní. Joaquín Páneca 62. Camajuaní. Villa Clara. Cuba. e-mail: silviod@uclv.edu.cu

<sup>3</sup>Biofábrica. MINAGRI. Carretera a Palmira Km1.5, Cienfuegos. Cuba

El desarrollo de un eficiente y reproducible protocolo de regeneración de plantas es un prerequisite para la transformación genética. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de formar embriones somáticos en sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) variedad comercial CIAP 2-E-95. Como material vegetal se utilizaron plantas regeneradas *in vitro* vía organogénesis directa. Se cortaron segmentos del cilindro central de las vainas de las hojas de 0.5 cm de longitud y 0.3 cm de diámetro, por encima de la base de la planta. Se colocaron en el medio de cultivo



semisólido, compuesto por las sales MS, con vitaminas Heinz, mio-inositol ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ), agar ( $4.2 \text{ g l}^{-1}$ ) y pH 5.7. Se estudiaron tres concentraciones de 2,4-D ( $2, 4$  y  $6 \text{ mg l}^{-1}$ ) para la inducción de callos. Se evaluó el porcentaje de formación de callos y la aparición de compuestos fenólicos. Con el objetivo de reducir o eliminar los compuestos fenólicos durante la formación de callo se empleó como antioxidante el ácido ascórbico en concentraciones de  $20, 50$  y  $80 \text{ mg l}^{-1}$ . Se cuantificó el número de explantes necrosados y la presencia de pigmentos oscuros en el medio de cultivo. La utilización de las sales MS con  $6.0 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D elevó el porcentaje de inducción de callos hasta un 80% con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos estudiados. Con el ácido ascórbico a una concentración de  $50 \text{ mg l}^{-1}$  no se observaron explantes necrosados, ni pigmentos de color oscuro-púrpura en el medio de cultivo. Se observaron dos tipos de callos, unos compactos con superficies lisas y brillantes y otros blandos de coloración oscura. Se formaron embriones somáticos a partir de callos con estructuras embriogénicas obtenidos del segmento uno del cilindro central de la vaina de las hojas.

Palabras clave: compuestos fenólicos, explantes necrosados, *Sorghum bicolor*

#### T1.5C Establecimiento de un sistema *in vitro* de *Orobanche ramosa* L. y *Nicotiana tabacum* L.

Domínguez- Larrinaga, R<sup>1\*</sup>, Morán Y<sup>1</sup>, Rodríguez, L<sup>1</sup>, Pérez, E. M<sup>2</sup>, Echemendía, M<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT) e-mail: rosario@iitabaco.co.cu

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV)

<sup>3</sup>Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez" (UNAH)

*Orobanche ramosa* L. constituye un serio problema para el tabaco cubano debido a los daños que ocasiona al cultivo. El establecimiento del cultivo *in vitro* de esta planta parásita permitiría observar la dinámica de desarrollo de su fase hipogea. Esto sería útil para la evaluación de la acción de algún producto o patógeno que se quiera emplear en su control. El objetivo del trabajo fue desarrollar el cultivo *in vitro* de *O. ramosa* L. en presencia de su hospedero *Nicotiana tabacum* L. Se utilizaron cuatro métodos de esterilización de las semillas de

*Orobanche*, tres informados por la literatura y uno diseñado en este estudio. Para el "acondicionamiento" de las semillas, estas se incubaron a  $23^\circ\text{C}$  en condiciones de oscuridad, humedecidas con agua destilada por siete días. La germinación tuvo lugar bajo las mismas condiciones pero el agua se sustituyó por Piridoxina, Nicotinamida y AG<sub>3</sub>. La siembra *in vitro* de las semillas germinadas se realizó en medio B5 con: vitaminas, sacarosa, hidrolizado de caseína, agua de coco, PDA, ANA, BAP y AG<sub>3</sub>. Estas se mantuvieron cuatro semanas hasta desarrollar los callos. La infección *in vitro* se efectuó en medio de cultivo MS con plantas de *Nicotiana tabacum* L. var. 'Criollo 98' crecidas previamente, exponiendo los callos de *O. ramosa* L. a las raíces del tabaco. El examen anatómico de la infección se realizó dos veces por semana. De los cuatro métodos para esterilización de las semillas, el método cuatro donde las semillas se lavaron cinco veces con agua común y se mantuvieron en una solución de Acrobat (0,2%) en agitación constante durante 12 h, fue el más efectivo. Las semillas mostraron porcentajes de germinación semejantes para los tres tratamientos empleados. La infección por los callos tuvo lugar a partir de las tres semanas de sembrados.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, semillas, callos, *Orobanche ramosa* L., *Nicotiana tabacum* L., infección

#### Establishment of *Orobanche ramosa* L. and *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* system

*Orobanche ramosa* L. is a serious problem for the Cuban tobacco because it causes damage to the crop. The establishment of *in vitro* culture of this parasitic plant would permit to observe the dynamics of development of their hypogean stage. This would be useful for evaluating the action of a product or the agent that wants to use in its control. The objective of this study was to develop *in vitro* culture of *O. ramosa* L. in presence of their host *Nicotiana tabacum* L. Four methods of *Orobanche* seeds sterilization were used, three of them were reported in the literature and the other one was designed for this study. For the "conditioning" of seeds, these were incubated at  $23^\circ\text{C}$  in darkness, moistened with distilled water for seven days. Germination took place under the same conditions but the water was replaced by Pyridoxine, Nicotinamide and GA<sub>3</sub>. Germinated seeds were planted *in vitro* on B5 medium supplemented with vitamins, sucrose, casein hydrolyzate, coconut water, PDA, NAA, BAP and GA<sub>3</sub>. They were about four weeks to develop calluses. Infection *in vitro* was performed on MS

medium with plants of *Nicotiana tabacum* L. var 'Criollo 98' previously developed, exposing the tobacco roots to the *O. ramosa* L. callus. The infection anatomical study was carried out twice a week. The most effective sterilization methods was the fourth where seeds were washed five times with common water and were kept in an Acrobat solution (0.2%) under constant stirring for 12 h. For the three treatments applied, the germination percentages were similar. Callus infection took place three weeks after planting.

Keywords: *in vitro* culture, seeds, callus, *Orobanche ramosa* L., *Nicotiana tabacum* L., infection

### **T1.6C Regeneración de plantas vía organogénesis indirecta de diferentes variedades de frijol común**

N. Veitía<sup>\*1</sup>, R. Collado<sup>1</sup>, I. Bermúdez-Caraballos<sup>1</sup>, L.R. García<sup>1</sup>, D. Torres<sup>1</sup>, C. Romero<sup>1</sup>, G. Angenon<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Instituut Voor Moleculaire Biologie en Biotechnologie. Vrije Universiteit Brussel. Belgium.

El frijol común, es la leguminosa de grano más importante para el consumo humano en el mundo. Para las leguminosas de grano en general y en *Phaseolus vulgaris* L. en particular, la transformación genética es difícil de lograr. La falta de eficiencia en el sistema de regeneración *in vitro* es una limitante para la utilización de la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*. En la literatura científica se han descrito tres protocolos de regeneración vía organogénesis indirecta en *P. vulgaris*, los cuales son altamente dependientes de la variedad utilizada o tienen muy baja eficiencia. El objetivo del presente estudio fue regenerar plantas vía organogénesis indirecta en cuatro variedades de frijol a partir del protocolo desarrollado para la variedad cubana de frijol 'CIAP7247F'. Para ello, se emplearon las variedades de frijol común 'BAT93', 'BAT304', 'BAT482', 'Ica Pijao' y 'CIAP7247F'. Para la formación de callos se emplearon semillas procedentes de plantas que se cultivaron en casa de cultivo. La respuesta de las cinco variedades en la regeneración se evaluó mediante la masa fresca de los callos (g) en medio de cultivo de proliferación y el número de brotes formados por callo que se cultivaron en medio de cultivo de regeneración de brotes.

Una vez regenerados los brotes, los que presentaron más de 2.0cm de longitud y el sistema radicular desarrollado se transfirieron a casa de cultivo. El mayor número de brotes lo presentó la variedad 'Ica Pijao', seguido de las variedades 'BAT482', 'CIAP7247F' y 'BAT304'. La variedad 'BAT93' presentó los menores valores en el número de brotes por callo. En el empleo del protocolo desarrollado para la variedad cubana 'CIAP7247F' se logró regenerar plantas de cuatro variedades comerciales de frijol. Además, se comprobó que la regeneración de plantas en *P. vulgaris* es específico para cada cultivar.

Palabras clave: callos, *Phaseolus vulgaris*, regeneración de brotes

### **Plant regeneration via indirect organogenesis for different common bean cultivars**

The common bean is the most important grain legume for human consumption in the world. For grain legumes in general and in *Phaseolus vulgaris* L. in particular, genetic transformation is difficult to achieve. The lack of efficiency *in vitro* regeneration system is a constraint to the use of genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. In the scientific literature have described three protocols regeneration via indirect organogenesis in *P. vulgaris*, which are highly dependent on varieties used or have very low efficiency. The aim of this study was the regeneration via indirect organogenesis in four varieties of beans from the protocol developed for the Cuban variety 'CIAP7247F' bean. To do this, we used common bean varieties 'BAT93', 'BAT304', 'BAT482', 'Ica Pijao' and 'CIAP7247F'. For the formation of calluses of these varieties were used seeds from plants grown in greenhouse. The response of the five varieties in the regeneration was assessed using the callus fresh weight (g) in culture medium for proliferation and the number of shoots formed per callus was grown in culture medium for shoot regeneration. Once regenerated shoots, which had more than 2.0cm in length and developed root system were transferred to growing house. The largest number of shoot was presented by the variety 'Ica Pijao', followed by the varieties 'BAT482', 'BAT304', 'CIAP7247F'. The variety 'BAT93' showed the lowest values in the number of shoots per callus. By using the protocol developed for the Cuban variety 'CIAP7247F' plants were regenerated four commercial varieties of beans. Furthermore, it was found that regeneration of plants in *P. vulgaris* is specific for each cultivar

Keywords: callus, *Phaseolus vulgaris*, shoots regeneration

### **T1.7C Regeneración *in vitro* del cedro (*Cedrela odorata* L.) a partir de explantes nodales vía organogénesis indirecta**

L. Rodríguez

Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera Tumbadero km 8.5, San Antonio de los Baños, Artemisa. e-mail: leixys@iitabaco.co.cu

El Cedro (*Cedrela odorata* L.) es considerado la especie comercial más importante y ampliamente distribuida de su género. El cedro presenta serios problemas debido a la sobreexplotación de sus poblaciones naturales y a la susceptibilidad al taladrador de las meliáceas *Hypsipyla grandella*, que la han clasificado como una especie de alto riesgo de extinción en su estado natural para un futuro cercano. Una rápida introducción de nuevas variedades mediante la propagación clonal pudiera ser la vía más efectiva para la producción de plantaciones perennes de la especie. El objetivo del siguiente trabajo fue contribuir con un método para la propagación de *C. odorata* L. a partir de explantes nodales de plántulas *in vitro* vía organogénesis indirecta. Callos obtenidos de explantes nodales en presencia de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) fueron utilizados para la inducción de brotes, para ello se evaluó la acción de diferentes concentraciones de benzilaminopurina (BAP) en el medio Murashige y Skoog (MS) enriquecido con sacarosa, ácido cítrico, ácido ascórbico y solidificado con agar. Finalmente se determinaron las condiciones para elongar y enraizar los brotes inducidos, para ello se variaron la composición y concentración de reguladores del crecimiento (esta vez se empleó el ácido naftalenacético (ANA), el ácido indolacético (AIA) y el BAP) así como la acción mecánica de individualizar o no los brotes obtenidos. El método propuesto propicia la formación de callos a partir de tejidos nodales mediante la acción mecánica de disección del meristemo axilar y la acción del 2,4 D, de esta manera se elimina la dominancia de la yema y se promueve una proliferación basal del tejido. La des-diferenciación de los tejidos y la subsecuente síntesis *de novo* de brotes vía organogénesis indirecta pudieran potenciar el empleo de otras técnicas biotecnológicas en el mejoramiento genético del cedro.

Palabras clave: brotes, callo, *Cedrella odorata*, inducción

### ***In vitro* plant regeneration in cedar (*Cedrela odorata* L.) using nodal explants via indirect organogenesis**

Cedar (*Cedrela odorata* L.) is considered the most commercially important and widely distributed species of the genus. Cedar confronts serious problems due to the over-exploitation of its natural populations and its susceptibility to the Meliaceae borer *Hypsipyla grandella*. Due to these factors, cedar is classified as a species in a high danger of extinction in woodland in the medium-term future. The rapid introduction of new varieties through clonal forestry could be the most effective way to improve the production of perennial plantation species. The main goal of this work is to contribute with a method for the propagation of *C. odorata* initiated from nodal explants of plants *in vitro* germinated by indirect organogenesis. Callus obtained of nodal explants in presence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D) were used as started material for shoot induction, for that we evaluate the Murashige y Skoog medium (MS) supplemented with sucrose, citric acid, ascorbic acid, different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) and solidified with agar; finally we determined the conditions for elongation and rooting, for that we varied the composition and concentration of growth regulators (this time we used  $\alpha$ -Naphthaleneacetic acid (NAA), Indole-3-acetic acid (IAA) and BAP) and the mechanic action of individualization. This method favors the callus formation from nodal tissues by the mechanic action of dissection of axilar meristem and the action of 2,4 D. This way, the shoot apical dominance is abolished and the basal proliferation is promoted. Des-differentiation of tissue and the subsequent *de novo* shoots synthesis, could improve the introduction of another biotechnological techniques for the genetic breeding of cedar.

Keywords: shoot, callus, *Cedrella odorata*, induction

### **T1.8C Establecimiento *in vitro* de *Jatropha curcas* L. a partir de diferentes tipos de explantes**

M. Chávez, M. de Feria\*, M. La O

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

El uso de *Jatropha curcas* para la producción de biocombustibles está creciendo rápidamente a nivel mundial. Los métodos tradicionales de propagación no han logrado dar respuesta a dicha demanda. El cultivo *in vitro* podría convertirse en una alternativa para propagar esta especie a escala comercial. A partir de plantas de diferentes procedencias del país, se estableció en casa de cultivo un banco de plantas donantes y se tomaron diferentes tipos de explantes (brotes apicales, yemas axilares y discos de hojas) que fueron sometidos a diferentes tratamientos de desinfección con Hipoclorito de sodio (NaOCl) durante 15 minutos. En el caso de los brotes apicales y las yemas axilares, independientemente de la concentración de NaOCl usada, no se observó contaminación por hongos filamentosos. Sin embargo, la presencia de contaminación por bacterias osciló entre el 16 y 33%. A medida que se incrementó la concentración del desinfectante, se incrementó el número de explantes con necrosis en diferentes zonas del tejido, hasta un 21% de explantes muertos en el tratamiento con 3.0% de NaOCl. El número de explantes brotados fue mayor en el tratamiento con menor concentración (2.0%) del desinfectante, con un 83.3% en el caso de los brotes apicales y un 54% para las yemas axilares. Los tratamientos de desinfección para los discos de hojas, las concentraciones de NaOCl fueron menores (1.0, 1.5, 2.0%). Se observó que con 1.0% del NaOCl se produjo hasta un 75% de contaminación microbiana, mientras que con 2.0% se presentaron daños por necrosis en el 58.3% de los discos de hoja. Los resultados permiten disponer de un procedimiento que garantiza establecer *in vitro* diferentes tipos de explantes, lo cual constituye un punto de partida en el desarrollo de un protocolo para la propagación de esta especie.

Palabras clave: biocombustibles, desinfección, hipoclorito de sodio

#### ***In vitro* establishment of *Jatropha curcas* L. starting from different types of explants**

The use of *Jatropha curcas* for biofuels production is growing rapidly worldwide. Traditional methods of propagation have failed to respond to that demand. *In vitro* culture could become an alternative to propagate this species on a commercial scale. From plants of different origins of the country, a bank of donors plants was established in culture house and different explants types took (apical shoots, axillaries buds and discs of leaves) that were submitted to different treatments of disinfection by sodium

hypochlorite (NaOCl) during 15 minutes. In the case of the apical shoots and axillaries buds, independently of the concentration of NaOCl used, contamination by funguses microorganisms was not observed. Nevertheless, the presence of contamination by bacteria oscillated between 16 and 33%. As the concentration of the disinfectant was increased, the number of explants with necrosis in different zones of the tissue was greater, until a 21% of explants died in the treatment with 3.0% of NaOCl. The number of explants brought forth was greater in the treatment with smaller concentration (2.0%) of the disinfectant, with 83.3% in the case of the apical shoots and a 54% for the axillaries buds. In the disinfection treatments for leaf discs, NaOCl concentrations were lower (1.0, 1.5, 2.0%). It was observed with 1.0% NaOCl a 75% of microbial contamination, while 2.0% showed damage from necrosis in 58.3% of the leaf discs. The results allow for a method that guarantees the *in vitro* establishment different types of explants, which is a starting point in developing a protocol for the propagation of this species.

Keywords: biofuels, disinfection, sodium hypochlorite

#### **T1.9C Establecimiento para la propagación *in vitro* de *Paulownia elongata***

Mariela Cid Ruiz<sup>1</sup>, Lelurllys Nápoles Borrero<sup>1</sup>, José Luis Domínguez Álvarez<sup>2</sup>, Oscar Concepción Laffitte<sup>1</sup>, Luis Antonio Domínguez Perales<sup>2</sup> y Blanca Berenice Flores Espinosa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Biotecnología, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba

<sup>2</sup>Dirección de Centros Regionales, Universidad Autónoma Chapingo, México

La *Paulownia* es el único género maderable de la familia de las *Scrophulariaceae*. Su principal importancia radica en ser un forestal de crecimiento extraordinariamente rápido, regenerador de suelos, que se adapta a cualquier clima y productor de una madera de alta calidad. El objetivo del presente trabajo fue la micropropagación de *Paulownia elongata*. Como fuentes de explantes se emplearon yemas apicales y secciones nodales las cuales se desinfectaron con hipoclorito de calcio al 1.5% y se evaluaron tres tiempos 10, 15 y 20 minutos, donde el mejor resultado se obtuvo con 15 minutos. El medio de cultivo empleado para el establecimiento y la multiplicación fue el medio Murashige y Skoog, con 6-bencilaminopurina

(BA) a  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  y ácido naftalenacético a  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  y  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  respectivamente. Se estudiaron cuatro concentraciones de ácido indolbutírico (AIB) para el enraizamiento. Se logró la más alta inducción de raíces con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido indolbutírico (AIB).

Palabras clave: propagación, *Paulownia elongata*, explante, reguladores de crecimiento

#### **T1.10C Two years of continuous rice callus subculture: development and loss of regeneration potential**

Maylin Pérez-Bernal\*, Magalis Delgado, Yeosvany Cabrera, Daymí Abreu, Onel Valdivia, Raúl Armas

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

Successful plastid transformation in rice is possible when efficient and reproducible plant regeneration protocols are available, for the strict selection of transformed material, in order to assure the homoplasmy before the obtaining of the plants. Here, we describe a subculture system to obtain indica rice calli (cultivar 'J-104') with long-term morphogenic potential for plant regeneration. We examined the effects of 2,4-D ( $1.0$ ,  $2.0$ ,  $3.0$ ,  $4.0$  and  $5.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) and culture duration on the morphogenesis and regeneration potential, respectively. Calli were subcultured two years on callus induction semisolid medium, in dark conditions. During this time, callus masses with similar weight were monthly transferred to the regeneration medium, containing a mixture of cytokinins and auxins, under photoperiod regime. In first months, plant regeneration took place through two morphogenic pathways: indirect somatic embryogenesis and indirect organogenesis. The concentration of 2,4-D used in the callogenesis determined the prevalence of the morphogenic response. In the first year of subculture, embryogenesis prevailed over organogenesis. Throughout the second year, all shoots had single-pole morphology and embryogenesis was not happening in calli induced with  $3.0$ ,  $4.0$  and  $5.0 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D. Most callus lines retained their regeneration potential by organogenesis until the end of second year. The percentage of abnormal plants was negligible throughout the subcultures. The result of this study would be a promising step towards stable plastid transformation in rice, because it could be possible to maintain a large period of selection

pressure of calli, for reaching of homoplasmy before the regeneration of the plants.

Key words: embryogenesis, organogenesis, plastid transformation, subculture

#### **Dos años de subcultivo continuo de callos de arroz: desarrollo y pérdida del potencial de regeneración**

El éxito de la transformación plastidial del arroz depende de un protocolo de regeneración eficiente y reproducible, que permita la estricta selección del material transformado y asegure la homoplasma antes de la regeneración de las plantas. Este trabajo describe un sistema de subcultivo de callos de arroz indica (variedad 'J-104') con un potencial morfogénico a largo plazo para la regeneración de plantas. Se estudió el efecto del 2,4-D ( $1.0$ ,  $2.0$ ,  $3.0$ ,  $4.0$  y  $5.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) y de la duración del subcultivo sobre la morfogénesis y el potencial de regeneración, respectivamente. Los callos fueron subcultivados dos años en medio de cultivo semisólido, en la oscuridad. Durante este tiempo, masas de callos con peso similar fueron mensualmente transferidas a medio de regeneración, con una combinación de auxinas y citoquininas, bajo régimen de fotoperíodo. En los primeros meses, la regeneración ocurrió mediante dos rutas morfogénicas: embriogénesis somática y organogénesis indirectas. La concentración de 2,4-D usada en la callogenesis determinó la prevalencia de una vía morfogénica u otra. En el primer año de subcultivo, la embriogénesis prevaleció sobre la organogénesis. Durante el segundo año, los brotes regeneraron con estructura unipolar, típica de la organogénesis; la embriogénesis somática no ocurrió en los callos inducidos con  $3.0$ ,  $4.0$  y  $5.0 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D. Los callos mantuvieron su potencial de regeneración hasta el final del segundo año. El porcentaje de plantas anormales fue insignificante. Este trabajo es importante para la transformación plastidial del arroz, al demostrar que el potencial de regeneración de los callos puede extenderse hasta dos años, tiempo suficiente para seleccionar con rigor el material transformado y garantizar la homoplasma, antes de la regeneración de las plantas.

Palabras clave: embriogénesis, organogénesis, subcultivo, transformación plastidial

#### **T1.11C Regulación de destinos celulares durante la embriogénesis somática de alcornoque (*Quercus suber* L.)**

Maritza Escalona<sup>1</sup>, Marta Pérez<sup>2</sup>, Mónica Escandón<sup>2</sup>,  
María E. Martínez<sup>2</sup>, Roberto Rodríguez<sup>2</sup>, María Jesús  
Cañal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Bioplasmas, Carretera a Morón km 9, Ciego  
de Ávila e-mail: mescalona@bioplasmas.cu

<sup>2</sup>Departamento Biología Organismos y Sistemas.  
Facultad de Biología, Universidad de Oviedo, España

La multiplicación de embriones somáticos en alcornoque (*Quercus suber* L.) tiene lugar mediante embriogénesis secundaria en medio sin reguladores del crecimiento, lo que genera un proceso recurrente prácticamente ilimitado en el tiempo. El establecimiento de cultivos embriogénicos sincrónicos en los que se pueda lograr de forma efectiva el proceso de maduración-germinación sigue constituyendo el principal 'cuello de botella' para la propagación *in vitro* de esta especie. El cultivo en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) resulta un método muy atractivo para controlar el destino celular del cultivo embriogénico. Con este objetivo se evaluaron, el número de ciclos en BIT; el número de subcultivos a partir de 1.5 g de biomasa, la frecuencia de inmersión, el volumen de medio de cultivo y el tiempo de cultivo del inóculo procedente del medio semi-sólido. El volumen de medio de cultivo (300 ml) fue el factor más influyente en la formación de estructuras pre-embriogénicas en diferenciación avanzada (EP<sub>2</sub>) y en el número de embriones cotiledonares aislados sin recurrencia (ECASR) durante la proliferación. Al comparar la misma cantidad de nutrientes en diferentes volúmenes de medio de cultivo (150 y 300 ml) se lograron hasta 4,3 ECASR/g EP<sub>2</sub> con el volumen de 300 ml, lo cual resultó indicativo de presencia de sustancias inhibitorias de la diferenciación celular a menor volumen. La toma del inóculo a los 15 días del subcultivo en medio semi-sólido con 300 ml de medio de cultivo produjo esa misma cantidad de ECASR/g EP<sub>2</sub>. Sin embargo, después de la maduración el tratamiento 30 días del inóculo con 300 ml de medio de cultivo logró un mayor incremento de EP<sub>2</sub> (26 g) y de ECASR/g EP<sub>2</sub> con tamaños entre 0.8-1.0 cm y una apariencia blanca-opaca. En la pre-germinación no se encontraron diferencias en el número de ECASR entre los tratamientos con Fluridone (5 µmol/l) y Carbón Activo (1 g l<sup>-1</sup>) pero previo a la germinación, el Fluridone logró 8,73 ECASR/ g EP<sub>2</sub> en comparación con el Carbón activo (4,1 ECASR/g EP<sub>2</sub>).

Palabras clave: alcornoque, embriogénesis somática, factores de cultivo, inmersión temporal

## Regulation of cellular destinations during somatic embryogenesis of cork oak (*Quercus suber* L.)

The multiplication of somatic embryos in Cork oak (*Quercus suber* L.) takes place through secondary embryogenesis in the medium without plant growth regulators, which generates a recurrent process practically unlimited in time. Establishing synchronous embryogenic cultures in which the maturation-germination process can be effectively continued to be the main 'bottle neck' for *in vitro* propagation of this species. Temporary Immersion Bioreactor (TIB) is a very attractive method to control cellular pathways of embryogenic culture. With this objective were assessed: the number of cycles in the BIT; the number of subcultures from 1.5 g of biomass, the frequency of immersion, the volume of culture medium and duration time subculture from semi-solid culture. The volume of culture medium (300 ml) was the most influential factor in the formation of pre-embryogenic structures (EP<sub>2</sub>) and the number of cotyledonary isolated somatic embryos without recurrent process (ECASR) during proliferation stage. When the same amount of nutrients in different volumes of culture medium (150 and 300 ml) were compared, 4.3 ECASR/g EP<sub>2</sub> were achieved with the volume of 300 ml, which could be indicative of the presence of inhibitory substances of cellular differentiation to lower volume. The taking of the inoculum to the 15 days of the subculture in the semi-solid with 300 ml of culture medium produced the same amount of ECASR/g EP<sub>2</sub>. However, after maturation treatment, 30 days of inoculum with 300 ml of culture medium increased EP<sub>2</sub> (26 g) and ECASR/g EP<sub>2</sub> with sizes between 0.8-1.0 cm and a white-opaque appearance. The pre-germination found no differences in the number of ECASR between the treatments with Fluridone (5 µmol/l) and active charcoal (1 g l<sup>-1</sup>), but prior to germination, the Fluridone achieved 8.73 ECASR/ g EP<sub>2</sub> compared with active charcoal (4.1 ECASR/g EP<sub>2</sub>).

Keywords: cork, culture factors, somatic embryogenesis, temporary immersion

## T1.12C Perfil proteómico de estados morfo-fisiológicos alterados en *Tectona grandis* L.

Elisa Quiala<sup>1</sup>, María Jesús Cañal<sup>2</sup>, Roberto Rodríguez<sup>2</sup>, Norma Yagüe<sup>2</sup>, Maité Chávez<sup>1</sup>, Raúl Barbón<sup>1</sup>, Luis Valledor<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a

Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, CP 54 830, Cuba. e-mail: elisa@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Area de Fisiología Vegetal, Dpto. Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo, C/Catedrático Rodrigo Uría s/n, E-33 071, Oviedo, Asturias, Spain

<sup>3</sup>Molecular Systems Biology (MOSYS). University of Vienna. Althanstrasse 14, A-1090 Wien, Austria.

La especie *Tectona grandis* L. (Teca) es una de las principales maderas preciosas y la quinta especie forestal de mayor área de plantación en el mundo. La caracterización de las proteínas presentes en la hoja de teca puede sentar las bases para el desarrollo de nuevas herramientas que ayudarían durante la selección de árboles, el monitoreo de la propagación de plantas, la certificación clonal y la identificación fenotípica de los mismos. En el presente trabajo se refiere la extracción, separación e identificación de las proteínas de la hoja de *T. grandis* mediante un protocolo de TCA/acetona, 2-DE y MALDI-TOF-TOF. Como resultado de la extracción de las proteínas de la hoja en TCA/acetona, se detectaron 998 manchas resolutivas en geles teñidos con azul de Coomassie, dentro de un pH lineal de 3-11 pH y un rango de peso molecular de 10-114 kDa. Un total de 120 manchas fueron digeridas y sometidas a espectrometría de masas. Dentro de estos, 100 especies de proteínas no redundantes fueron identificadas satisfactoriamente. La clasificación funcional de las proteínas identificadas reveló que las proteínas más abundantes fueron aquellas involucradas en la fotosíntesis, la traducción de proteínas y producción de energía. Esta investigación provee por primera vez información sobre el proteoma de la hoja de teca y representa un primer paso para futuros estudios de expresión diferencial de proteínas relacionados con el crecimiento de la biomasa y el desarrollo de los cultivos asociados a las respuestas fisiológicas.

Palabras clave: teca, proteoma, 2-DE, hoja, especie forestal

### **Proteomics profiling of altered morpho-physiological state in *Tectona grandis* L.**

*Tectona grandis* L. (Teak) is one of the premier hardwood timbers in the world, ranking at present on the top five tropical hardwood species in terms of worldwide plantation area. The characterization of the proteins present in teak leaves will provide a basis for the development of new tools aimed to help in the tree selections, the monitoring of plant

propagation and the certification of clonal and phenotypical identities. In this paper, we refer the extraction, separation and identification of leaf proteins from *T. grandis* using a TCA/acetone protocol, 2-DE and MALDI-TOF-TOF. After TCA/acetone protein extraction of leaves, 998 well-resolved spots were detected in Coomassie-stained gels within the 3-11 pH and 10-114 kDa *Mr* ranges. A total of 120 spots were digested and subjected to MS. Out of these, 100 non redundant protein species were successfully identified. Functional classification of identified proteins revealed that proteins involved in photosynthesis, protein translation and energy production were the most abundant. This research provides a first high-throughput attempt to study *T. grandis* leaf proteome and represents a launching step for further differential expression proteomic studies related to growth, development, biomass production and culture associated physiological responses.

Keywords: Teak, proteome, 2-DE, leaf, forest specie

### **T1.13C Cambios en el proteoma y el transcriptoma de plantas de piña (MD-2) aclimatizadas bajo diferentes condiciones ambientales, favorables a un metabolismo C3 o CAM**

Aragón, C.\*, Carvalho, L., Escalona, M., González, J., Capote, I., Pina, D., Amâncio, S.

Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. \*e-mail: eduardo@bioplantas.cu

El metabolismo CAM se caracteriza por ser una forma de adaptación fisiológica en las plantas condicionada por las características de ambientes estresantes con poca disponibilidad de agua. En el caso de la piña el metabolismo es CAM facultativo, donde en dependencia de las características de los ambientes la fisiología puede ser CAM o C3, lo cual convierte a este cultivo como un modelo para estudiar las bases fisiológicas de ambas fisiologías condicionadas por el estrés ambiental. En el presente estudio se observó la variación del proteoma de las plantas de piña focalizado en las enzimas del metabolismo del carbono PEPCK, PEPC y la RubisCO y la SOD, CAT, APX y GR del metabolismo de respuesta al estrés oxidativo. Además, se estudió la expresión en tiempo real (qRT-PCR) de algunos de los genes correspondientes a algunas de estas enzimas. La relación de los cambios proteómicos y transcriptómicos brindaron datos fundamentales para describir los cambios en las plantas de piña

inducidos por el ambiente y que llevaron el metabolismo C3 a convertirse en CAM. En la actualidad existen varios grupos enfrascados en lograr la conversión de especies C3 en C4 (arroz C4, Inglaterra). Estos investigadores enfocan sus estudios en las plantas que son C3/CAM facultativas, pues la conversión de C3 para C4 puede resultar mucho más efectiva si se tienen en cuenta los aspectos básicos de la fisiología CAM, el ciclo circadiano, el alto aprovechamiento del agua y la eficiencia en el metabolismo del almidón.

#### **T1.14 Regeneración *in vitro* de callos y brotes de *N. tabacum* L. mediante la inoculación con *Nocardia* sp.**

Yunior M. Morán Gómez<sup>1\*</sup>, Rosario Domínguez-Larrinaga<sup>1</sup>, Felipe Lidcay Herrera Isla<sup>2</sup>, Orlando Borrás Hidalgo<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera a Tumbadero, km 8 ½, San Antonio de los Baños, Artemisa, Cuba. CP: 32 500 \*e-mail: yunior.moran@iitabaco.co.cu

<sup>2</sup>Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara, Cuba

<sup>3</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Ave 31 s/n, e/ 158 y 190. Cubanacán. Playa, La Habana, Cuba

El falso Orobanche es una enfermedad que afecta el cultivo del tabaco en Cuba, llegando a producir importantes pérdidas económicas en la región central y oriental del país. Las plantas afectadas presentan tumores en las raíces y muestran proliferación exhaustiva de brotes abortados en el cuello del tallo, que al desarrollarse con posterioridad llegan a diferenciarse en plantas independientes. Su agente causal, *Nocardia* sp., es un actinomiceto recientemente identificado. Con el objetivo de evaluar las posibilidades de empleo de este agente fitopatógeno para la propagación *in vitro* de plantas de tabaco se llevó a cabo esta investigación. La inoculación de plantas *in vitro* de tabaco de 15 días de desarrollo con un cultivo puro de este agente bacteriano provocó de producción exhaustiva de callos y brotes en cualquier parte de la planta que estuvo en contacto con el inóculo. A los 20 días de la inoculación, los brotes se individualizaron y se sometieron a un proceso de eliminación del agente fitopatógeno. Al sembrar estos brotes en medio de cultivo Murashige Skoog semisólido, se desarrollaron plantas normales de tabaco. El empleo de este procedimiento pudiera constituir

una alternativa económicamente viable para la micropropagación de plantas de tabaco.

Palabras clave: *in vitro*, falso Orobanche, micropropagación, *Nocardia* sp., tabaco

#### ***In vitro* regeneration of callus and shoots of *N. tabacum* L. by inoculation with *Nocardia* sp.**

False broomrape disease affects tobacco crop in Cuba, resulting in significant economic losses in central and eastern regions. Affected plants have roots tumors and shows extensive aborted shoots proliferation in the neck of the stem. Later develop of these shoots become into independent plants. *Nocardia* sp. is a actinomycete recently identified as the causal agent. The aim of this work is assess the potential use of this phytopathogen agent for *in vitro* micropropagation of tobacco plants. Inoculation of 15 days old tobacco vitro-plants with a pure culture of bacterial agent caused extensive production of callus and shoots anywhere in the plant that was in contact with the inoculum. At 20 days after inoculation, the shoots were individualized and were subjected to a process of elimination of the plant pathogen agent. Planting these shoots on Murashige Skoog semisolid media, results in the further development of the normal tobacco plants. The use of this procedure could provide a viable alternative for micropropagation of tobacco plants.

Keywords: tobacco, *Nocardia* sp., *in vitro*, false Broomrape, micropropagation

#### **T1.15C Identificación mediante PCR del sexo de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) variedad Maradol roja obtenidas vía embriogénesis somática**

Laisyn Posada-Pérez\*, Rafael G. Kosky, Milady León, Luis Rojas, Maritza Reyes

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

Para la determinación del sexo de plantas de papaya se han empleado plantas en condiciones de campo sin embargo no se ha determinado en plantas cultivadas *in vitro*. A partir de un protocolo de embriogénesis somática desarrollado usando como material vegetal de partida embriones cigóticos inmaduros se obtuvieron plantas de las cuales se requirió



conocer el sexo. El objetivo de la presente investigación fue identificar plantas hermafroditas de la variedad de papaya Maradol roja obtenidas vía embriogénesis somática. Para ello se empleó un PCR múltiple que permite la amplificación simultánea de dos fragmentos (1.300 y 800 pb respectivamente) para plantas hermafroditas y de un solo fragmento (1.300 pb) para plantas femeninas. El ADN se extrajo a partir de hojas de plantas *in vitro* mediante una lisis alcalina con NaOH. La amplificación por PCR del ADN extraído de muestras foliares de papaya var. Maradol roja, con este método de extracción, produjo los fragmentos del tamaño esperado. La determinación del sexo de 20 líneas de plantas de papaya regeneradas por embriogénesis somática utilizando como explante inicial embriones cigóticos inmaduros mostró un 100% de plantas hermafroditas. Este es el primer informe sobre la determinación del sexo en plantas obtenidas por embriogénesis somática en la variedad Maradol roja.

#### **Sex determination by PCR in papaya (*Carica papaya* L.) plants obtained via somatic embryogenesis**

To determine the sex of papaya plants have been used in field plants but has not been determined in plants grown *in vitro*. From a somatic embryogenesis protocol developed using as starting material immature zygotic embryos plants were obtained which were analyzed by PCR to determine the sex of them. The objective of this research was to identify hermaphrodite plants of the variety of papaya Maradol roja obtained via somatic embryogenesis. Sex identification of plants *in vitro* cultivated, was performed using a multiplex PCR that allows simultaneous amplification of two fragments (1,300 and 800 bp respectively) for hermaphrodite plants and a single fragment (1,300 bp) for female plants. DNA was extracted from leaves of plants *in vitro* by an alkaline lysis with NaOH. PCR amplification of DNA extracted from leaf samples of papaya var. Maradol roja, with this method of extraction, produced fragments of the expected size. Sex determination of 20 lines of papaya plants regenerated by somatic embryogenesis using as initial explant immature zygotic embryos showed 100% of hermaphrodite plants. This is the first report on sex determination in plants obtained by somatic embryogenesis in the Maradol roja variety.

#### **T1.16C Análisis del contenido de nutrientes minerales durante la formación y**

#### **maduración de embriones somáticos de 'FHIA-21' (*Musa* AAAB)**

L. García-Águila<sup>1</sup>, Y. Zoe Sarria<sup>1\*</sup>, Alvarado-Capó<sup>1</sup>, Rafael G. Kosky<sup>1</sup>, Borys Chong-Pérez, Maritza Reyes<sup>1</sup>, Blanca Pérez<sup>1</sup>, Alexis Concepción<sup>1</sup>, A Mollineda<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara, Villa Clara. Cuba, CP 54 830.

A pesar de los avances que ha tenido la embriogénesis somática en *Musa* spp. no existen estudios que reflejen los requerimientos de nutrientes minerales durante su desarrollo. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo al inicio y final de las fases de formación y maduración de embriones somáticos de 'FHIA-21' cultivados con dos densidades de inoculación. Para la formación de embriones somáticos en medio de cultivo líquido se utilizó 0.5 y 1.5 gMF de agregados celulares embriogénicos. A los 30 días de cultivo se cuantificó el número de embriones somáticos formados. Posteriormente, estos se colocaron en medio de cultivo líquido de maduración y se utilizaron 0.2 y 0.6 gMF de densidad de inoculación. A los 30 días de cultivo se observaron las características morfológicas de los embriones somáticos y se transfirieron a medio de cultivo semisólido de germinación. El número de embriones somáticos germinados se cuantificó a los 30 días de cultivo. En ambas fases se determinó el contenido de Calcio, Magnesio, Potasio, Hierro, Cobre, Manganeseo y Zinc en el medio de cultivo por espectroscopia de absorción atómica. Los resultados mostraron el efecto regulatorio de la densidad de inoculación sobre la formación y desarrollo ontogénico de embriones somáticos en 'FHIA-21'. No se comprobó una relación entre el factor densidad de inoculación y el contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo. La formación de un mayor número de embriones somáticos se correspondió con una reducción en el contenido de Calcio, Magnesio, Potasio y Zinc. Se evidenció la importancia del hierro en la fase de maduración.

Palabras clave: embriogénesis somática, hierro, regeneración de plantas

### **Content analysis of mineral nutrients during formation and maturation of somatic embryos of 'FHIA-21' (*Musa* AAAB)**

Despite the advances reached using somatic embryogenesis in *Musa* spp., there are not studies that state the requirements of mineral nutrient during its development. This investigation aimed to determine the mineral nutrient content in the culture medium at the beginning and end of the 'FHIA-21' somatic embryos formation and maturation phases. Two inoculation densities (0.5 and 1.5 gMF) of embryogenic cell aggregates were used for the somatic embryos formation in liquid culture medium. The number of somatic embryos formed was quantified after 30 days of culture. The content of Calcium, Magnesium, Potassium, Iron, Copper, Manganese and Zinc in the culture medium was determined by automatic absorption spectroscopy in both phases. Results showed the regulatory effect of inoculation density on the ontogenic formation and development of somatic embryos of 'FHIA-21'. No relation between the inoculation density factor and mineral nutrients content was observed. The formation of a higher number of somatic embryos corresponded to a reduction in the content of Calcium, Magnesium, Potassium and Zinc. The importance of Iron in the maturation phase was evident.

Keywords: somatic embryogenesis, iron, plant regeneration

### **T1.17C Multiplicación secundaria de embriones somáticos de banano cultivar 'Grande naine' (*Musa* AAA) en medio de cultivo semisólido**

Maritza Reyes, Rafael G. Kosky, Leonardo Moreno-Bermúdez

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

El protocolo para el escalado en las biofábricas cubanas de la tecnología de la embriogénesis somática en los bananos y plátanos (*Musa* spp.) se inicia con la formación de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido, a partir de los agregados celulares embriogénicos cultivados en agitación constante en agitadores orbitales y posteriormente su maduración, germinación, crecimiento para obtener plantas completas. Sin embargo, no se ha desarrollado hasta el presente, la verdadera etapa de

multiplicación de la embriogénesis somática, que es la fase de multiplicación secundaria. Este trabajo tuvo como objetivo determinar la influencia del tipo de frasco, método de esterilización y densidad de inóculo en la multiplicación secundaria de embriones somáticos de bananos cultivar 'Grande naine' (AAA). A partir de 200 µl de agregados celulares embriogénicos se formaron embriones somáticos en etapa globular, en medio de cultivo semisólido los cuales fueron utilizados en los experimentos donde se compararon dos tipos de frascos de cultivo (vidrio y plástico), dos formas de esterilización, calor húmedo (autoclave) y química (Vitrofur). Las evaluaciones del coeficiente de multiplicación se realizaron a los 10, 15 y 20 días de cultivo. Los resultados respecto a la fase de multiplicación fueron promisorios ( $70 \pm 5.0$  embriones somáticos a los 15 días de cultivo) que se presentan en el trabajo, lo cual abre las puertas para la empleo de esta fase en el protocolo de propagación masiva de este cultivo vía embriogénesis somática.

Palabras clave: embriogénesis somática, *Musa*, embriogénesis repetitiva, tipo de frasco

### **Secondary multiplication of somatic embryos of banana cultivar 'Grande Naine' (*Musa* AAA) in semisolid medium**

The protocol for the scaling on the Cuban biofactories technology of somatic embryogenesis in banana and plantain (*Musa* spp.) begins with the somatic embryos formation on semisolid medium, from the embryogenic cell aggregates grown in constant agitation and shakers later maturation, germination, growth for whole plants. However, it has developed to the present, the true multiplication stage of somatic embryogenesis, which is the secondary multiplication phase. This work aimed to evaluate the influence of type of container, method of sterilization and inoculum density on the secondary multiplication of somatic embryos of banana cultivar 'Grande naine' (AAA). From 200 µl of embryogenic cell aggregates were formed globular stage somatic embryos on semisolid medium, which were used in experiments where we compared two types of culture bottles (glass and plastic), two forms of sterilization, moist heat (autoclaving) and chemical (Vitrofur). The multiplication coefficient assessments were performed at 10, 15 and 20 days of culture. The results with respect to the multiplication phase were highly promising ( $70 \pm 5.0$  somatic embryos at 15 days of culture) that present at work, which

opens the door for the use of this phase in the mass propagation protocol this culture via somatic embryogenesis.

Keywords: somatic embryogenesis, *Musa*, repetitive embryogenesis, type of bottle

#### **T1.18C Formación de callos en las variedades cubanas 'CIAP 2E-95' y 'CIAP 132R' de *Sorghum bicolor* L. Moench**

Mayelin Rodríguez \*, Rafael G. Kosky, Mariana La O, Silvio Martínez, Mileidy Pons, Marta Pérez

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: mayelin@ibp.co.cu

El mejoramiento genético mediante la transformación genética de plantas requiere de protocolos eficientes de regeneración de plantas vía embriogénesis somática. Las poáceas y en especial las forrajeras son genotipo dependiente para el cultivo *in vitro*. En el presente trabajo se determinó la capacidad formación de callos en dos variedades cubanas de *Sorghum bicolor* ('CIAP 2E-95' y 'CIAP 132-R') con el objetivo de obtener posteriormente embriones somáticos para su uso en el mejoramiento genético de esta especie forrajera. Como explantes iniciales se emplearon embriones cigóticos inmaduros y se probaron tres concentraciones de 2,4-D (1.0, 3.0, 6.0 mg l<sup>-1</sup>) en la formación de callos. En la octava semana de cultivo, un alto número de explantes formaron callos a partir del embrión cigótico inmaduro con las tres concentraciones de 2,4-D estudiados con diferencias entre ellos. Los mayores valores del número de explantes con callo se presentaron en los tratamientos con 3.0 y 6.0 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D. Los resultados demostraron que a medida que aumentó la concentración de 2,4-D en el medio de cultivo se incrementó la formación de callos a partir de los embriones cigóticos inmaduros en las variedades 'CIAP 2E-95' y 'CIAP 132-R' de *Sorghum bicolor* L. Moench.

Palabras clave: embriones cigóticos inmaduros, formación de callos, *Sorghum bicolor*

#### **Callus formation in the Cuban varieties 'CIAP 2E-95' and 'CIAP 132R' of *Sorghum bicolor* L. Moench**

Plant breeding by genetic transformation of plants requires efficient protocols plant regeneration via somatic embryogenesis. The grasses and forage are especially dependent on genotype. In the present work, the ability to induce callus

formation in the Cuban varieties of *Sorghum bicolor* ('CIAP 2E-95' and 'CIAP 132R') in order to obtain somatic embryos for later use in the genetic improvement of this forage species. As initial explant immature zygotic embryos were used. For induction of indirect somatic embryogenesis was studied the effect of 2,4-D concentrations (1.0, 3.0, 6.1 mg l<sup>-1</sup>) in callus formation. In the eighth week of culture, a high number of explants formed callus from immature zygotic embryos in the three treatments (1.0, 3.0, 6.0 mg.l-1) of 2,4-D studied differences between them. The highest values of the number of explants with callus were observed in the treatments with 3.0 and 6.0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D. The results show that with increasing concentration of 2,4 D in the culture medium increases the formation of callus from immature zygotic embryos varieties 'CIAP 2E-95' and 'CIAP 132R' of *Sorghum bicolor* L. Moench.

Key words: immature zygotic embryos, callus formation, *Sorghum bicolor*

#### **Sesión II: Propagación masiva de plantas por biotecnología / Plant mass propagation by biotechnology**

##### **T2.3 Effect of immersion time and add hormone Elkintin to form micro tubers in potato cv. Mondial using the temporary immersion system 'Rita'®**

Noaman Enfish\*, Abdalhmied Saleh, Mohammed Elfil, Abraham Al Falah, Kairi Alabid

Biotechnology Research Centre. Midan Algeria street, Tripoli-Libya. PO Box: 486 \*e-mail: nme755@yahoo.co.uk

Rapid multiplication systems have been developed in potato micropropagation using liquid media in Temporary Immersion System (RITA®) culture. Potato (*Solanum tuberosum* L. cvs Mondial) has been the experience of the impact of time of immersion during the formation and elongation of branches as well as the effect of growth regulator (Kinetin) on the number and size and weight of micro tubers formed. Buds to be planted to experiment in glass containers containing 250 ml of MS medium supplemented with 0.7% agar and 3% Sucrose. The plants were grown under fluorescent tubes giving an irradiance of 5000 lx (day/night-16/8 respectively), and a temperature of 23±2°C and relative humidity 45-50%. We do subculture in the same circumstances for 4 weeks, and then we take

the single node and used as explants and culturing in the temporary immersion system (RITA®) by 25-30 single node in each vessels. The results showed that the increase in the time of immersion than a minute to two minutes to five minutes without the addition of an growth regulator (Kinetin) did not lead to a significant increase in the number and weight of microtubers formed in every container while the increase in the time of immersion with the addition of (Kinetin) to a significant increase in the number of microtubers formed each container, especially in the time 2 and 5 minutes and up to 37.3, 49.5 microtuber when (Kinetin) as well as the weight of the tuber as it reached 7.43 and 16.88 mg / tuber.

Keyword: MS medium, single node, *Solanum tuberosum*

#### **T2.4 Propagación *in vitro* de orquídeas de Santander como estrategia para su conservación**

Martha Rocío Chacón Velasco\*, Helmar E Cáceres

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad de Santander, Colombia. Campus Universitario Lagos del Cacique. Bucaramanga, Colombia \*e-mail: mronchave@hotmail.com

<sup>2</sup>Grupo de investigación en Biotecnología Agroambiental, Microbiota Laboratorio de investigación en tejidos vegetales Universidad de Santander, Colombia

<sup>3</sup>Presidente asociación de orquideología de Santander. Colombia

Las orquídeas son uno de los grupos con mayores problemas para su conservación, situación que coloca a esta familia en una categoría vulnerable, por el fuerte interés en coleccionarlas junto con la destrucción de sus ambientes naturales, además presenta bajos índices de germinación natural, cuenta con periodos de crecimiento lento. Colombia registra aproximadamente 3.500 especies en 250 géneros, representando el 10% de la diversidad de la vegetación mundial, lo cual hace que la familia *orchidiaceae* posea el mayor endemismo en los países de América tropical, sin embargo cerca del 50% de las especies se encuentran amenazadas, se incluyen en este grupo los géneros *Catleya* y *Mandevilla* se ubican en esta categoría. Con el presente estudio se busca contribuir en la conservación de algunas especies de Santander que se encuentran en la categoría de amenazadas a

través de la generación de nuevo conocimiento en relación a su propagación *in vitro* mediante la germinación asimbiótica de semillas, desarrollo de protocormos y crecimiento de las plántulas, que ayude a consolidar una colección *in vitro* y *ex situ* en bancos de germoplasma en la región. Se empleó el medio Murashige y Skoog (MS) para el establecimiento de las semillas, para la fase de desarrollo y proliferación de brotes de las plántulas se utilizó el mismo medio de cultivo con variaciones hormonales de Auxinas (ANA y AIA) y citoquininas (KIN y BAP). Se realizó una (ANOVA) de dos vías con un modelo lineal general. Se logró establecer un procedimiento para reproducir y mantener *in vitro* 12 especies de orquídeas ubicadas en Santander (*Catleya mendeli*, *Catleya trianae*, *Catleya quadricolor*, *Cynoches chlorochilon*, *Schomburgkia* spp., *Mormodes* spp., *Epidendrum* spp., *Oncidium teres* (cebolleta), *Oncidium* spp., *Peristeria elata*, *Encyclia fragans*, *Rodrigueza* spp.). Los géneros de *Cynochis*, *Catleya mendeli*, *Peristeria elata*, *Mormodes* spp., *Epidendrum* spp. y *Oncidium* spp. se llevaron a condiciones *ex vitro* donde se estudió su comportamiento durante la etapa de aclimatización y endurecimiento.

Palabras clave: germinación asimbiótica, *Orchidaceae*, plantas en riesgo de extinción, estrategias de conservación

#### **T2.7 Propagación *in vitro* de cinco especies del género *Tillandsia* en vías de extinción y de potencial uso sustentable**

Carlos Orozco Castillo\*, Mak Milan Cruz, Héctor Sagastume, Uwe Feldhoff

Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala \*e-mail: carlos\_orozco34@hotmail.com

Guatemala exporta anualmente millones de especímenes de flora silvestre al extranjero con fines ornamentales. Entre las especies de mayor demanda se encuentran los "gallitos" (*Tillandsia* spp.) o "Plantas del Aire", que pertenecen a la familia *Bromeliaceae*, con cerca de 2 000 especies. Esta familia está integrada por tres subfamilias: *Bromeloideae*, *Pitcarnioideae* y *Tillandsioideae*. De ellas, la subfamilia *Tillandsioideae* es la más numerosa. El principal uso de las tillandsias es como planta ornamental, sin embargo, existen informes de que posee varios usos medicinales. La mayoría de empresas continúan con la sobrecolecta de la naturaleza para utilizarlas para pié de cría o para cumplir con la demanda extranjera. Otro factor

que también amenaza y reduce las poblaciones naturales vulnerables es la destrucción de los bosques por el avance de la frontera agrícola. Las tillandsias se encuentran incluidas en los listados de especies amenazadas. Para continuar con la comercialización de diferentes especies florísticas y, además, manejarlas de forma sustentable, es necesario mejorar los métodos de propagación convencionales *in vivo* (en invernaderos) y no convencionales *in vitro* (por medio de cultivo de tejidos en laboratorios especializados), para lo cual es necesario hacer algún tipo de investigación básica. El objetivo general del trabajo fue contribuir al desarrollo de metodologías que permitieran la propagación de cinco especies de tillandsias en vías de extinción. El objetivo específico fue determinar el efecto de cinco concentraciones de bencilaminopurina (BAP) sobre la propagación de cinco especies de tillandsias, a nivel de laboratorio, en cultivo *in vitro*. Al finalizar la investigación se obtuvo una metodología desarrollada para la propagación *in vitro* de cinco especies de tillandsias a nivel de laboratorio de Biotecnología. Este trabajo contribuirá para coadyuvar al uso y manejo sostenible de este recurso natural nativo de la biodiversidad del país, ayudará a la lucha por evitar la extinción de especies en peligro, contribuirá a generar y mantener fuentes alternas de trabajo, diversificar la producción agrícola, generar ingresos de divisas, y consecuentemente, el mejoramiento de la calidad de vida del pequeño y mediano productor de tillandsias.

Palabras clave: *Bromeliaceae*, citoquininas, cultivo *in vitro*

## **T2.9 Impactos socioeconómicos y ambientales de Biofábrica Misiones S.A. a seis años de su implementación**

Cabral, Jose<sup>1</sup>, Imbrogno Luciana, Iturrieta Luciano, Rodríguez Verónica

Biofábrica Misiones S.A. Ruta 12 km 7.5 Miguel Lanús. Misiones, Argentina. [gerencia@biofabrica.org](mailto:gerencia@biofabrica.org)

La Biofábrica ha sido para la Provincia de Misiones en Argentina y la región más que un laboratorio de micropropagación a escala industrial de clones vegetales. Ha permitido madurar un centro de investigación y desarrollo en el cultivo *in vitro* de especies nativas, forestales, medicinales y ornamentales, con el objetivo de transformar la biodiversidad en bienes y servicios; contando con alianzas estratégicas con centros de investigación en Argentina y en el

extranjero que le permiten acceso a nuevas tecnologías desde su concepción, en el presente y para el futuro. Con la primera Biofábrica de Argentina, inaugurada en 1996, con el objetivo de renovar la genética y dar sanidad a los cultivos base de la agroindustria; se iniciaron los escalados productivos de piña, eucaliptos, banano, yuca y caña de azúcar, incluso innovando en la oferta de nuevas especies como *Stevia rebaudiana* con variedades de alto contenido de rebaudiósido para su clonación a escala industrial. Estratégicamente debió ir más allá de la producción *in vitro*, acercándose al productor particular para transferir la tecnología y vinculándose al sector productivo para impulsar la conformación de las cuencas cañera y de *stevia*, ganando como socios a numerosas cooperativas y asociaciones de productores. Entre las especies ornamentales, permitió el desarrollo de productos vinculados al rescate de orquídeas de la selva misionera, trabajando hoy tanto en la oferta de plantas *in vitro* para viveros locales, y como souvenir para el mercado turístico que visita Misiones (*Cattleya* y *Miltonia*, entre otras). En el rubro medicinales, se ha desarrollado un producto completo (*Baccharis trimera*), desde la genética, a la fitoquímica, de la micropropagación al cultivo y de la hoja seca al extracto, pudiendo ofrecer trazabilidad, calidad y cantidad con continuidad al mercado nacional. Este desarrollo de gestión tecnológica, calificación de recursos humanos, flexibilización operativa sin perder rigurosidad y disciplina en los procesos, además de un acompañamiento en mantenimiento adecuado de la infraestructura y un gran esfuerzo para comunicar y concientizar a la sociedad de las bondades de esta tecnología ha permitido asumir un rol social y pensar en la ampliación del proyecto buscando acercar la biotecnología al pequeño y mediano productor de la región. Una segunda etapa industrial, permitirá desarrollar insumos agrícolas e industriales a partir del uso de microorganismos poniendo al alcance de la producción, insumos de bajo impacto ambiental, de conocimiento intensivo y común al concepto de calidad de planta y cultivos sanos. Este segundo módulo de Biofábrica, se ha iniciado con el desarrollo de productos altamente demandados por el mercado regional; los cebos biológicos contra hormigas, biofungicidas y promotores de crecimiento están siendo estudiados en este proyecto. Se espera contar con el laboratorio para el año 2013.

Palabras clave: Biotecnología, cultivo *in vitro*, especies ornamentales, escalado productivo

## **T2.10 Efecto a largo plazo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y AS en la brotación y antioxidantes en minitubérculos de *Solanum tuberosum* L.**

Daimon Keller Muñoz<sup>1, 2</sup>, Ricardo Martínez Gutiérrez<sup>1</sup>, Humberto Antonio López Delgado<sup>1\*</sup>, Martha Elena Mora Herrera<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa Nacional de Papa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), SEDAGRO Metepec, Edo. Méx. México.52140. \*e-mail: lopez.humberto@inifap.gob.mx

<sup>2</sup>Centro de Biociencias. Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera a Puerto Madero km 2.0, Tapachula, Chiapas, México. CP 30 700

<sup>3</sup>Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México. Carr. Tenancingo-Villa Guerrero km 1.5 Edo. de México CP 52 400 México

Los tubérculos de papa, durante el almacenamiento pueden presentar germinación, pudriciones y estrés oxidativo, aun cuando se encuentren en condiciones óptimas, esto genera pérdidas económicas para la industria de frituras y la producción de semilla. El estrés oxidativo genera especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que está relacionado con la dormancia. En altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibe la catalasa (CAT) y promueve la brotación; mientras que el ácido salicílico (AS) está involucrado en el crecimiento e inhibición de enzimas como CAT. En este trabajo se estudió el efecto a largo plazo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y AS en la inhibición e inducción de la brotación y la respuesta antioxidante en minitubérculos bajo almacenamiento. Se asperjaron plantas de la variedad 'Granate' con dos concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 y 5 mM), AS (10<sup>-6</sup> y 10<sup>-5</sup> M) y agua (control), los minitubérculos fueron cosechados, evaluados (fenoles, antocianinas, CAT, almidón y contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y almacenados por 64 días a 18 °C. Se observó que a 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó significativamente el contenido de compuestos fenólicos (41%) y el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (32%) en contraste con el control; mientras que el AS 10<sup>-6</sup> M aumentó significativamente el peso de minitubérculos (41%) y almidón (69%) con respecto a los otros tratamientos. Se encontró un incremento significativo de la actividad CAT por efecto de AS a 10<sup>-5</sup> M. A los 50 días de almacenamiento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo 100% de brotación e incremento el tamaño del brote (61%). AS a 10<sup>-6</sup> M, incrementó el número de brotes (10%) con respecto a todos los tratamientos. Los resultados demostraron que el uso de moléculas señal como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y AS intervino en los mecanismos de

brotación aún a largo plazo (64 días) y síntesis de antioxidantes con propiedades nutraceuticas en minitubérculos postcosecha.

Palabras clave: almidón, catalasa, estrés oxidativo, fenoles

## **Long term effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SA on the sprouting and antioxidants in mini-tubers of *Solanum tuberosum* L.**

Potato tubers can show germination, rotting and oxidative stress, even though under optimal conditions, producing economic lose for chip industry and seed production. Oxidative stress produces reactive oxygen species like hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) which in turn is associated with dormancy. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at high concentrations inhibits catalase (CAT) inducing sprouting, whereas salicylic acid (SA) is involved in growth and inhibition of enzymes like CAT. In this work the long term effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SA on inhibition and induction of sprouting and the antioxidant response were studied on stored minitubers. Plants cv. Granate were sprayed with two H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (1 and 5 mM), SA (10<sup>-6</sup> y 10<sup>-5</sup> M) and water (control). Minitubers were harvested, evaluated (phenols, anthocyanin, CAT, starch and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content) and stored 64 days at 18°C. It was observed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM significantly enhanced the phenolic compounds (41%) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content (32%) in contrast to the control, whereas SA 10<sup>-6</sup> M significantly increased the weight of tubers (41%) and starch (69%) respecting the rest of the treatments. SA significantly increased CAT activity. At 50 days of storage, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM induced 100% of sprouting and enhanced the sprout size (61%). SA 10<sup>-6</sup> M augmented the sprout number (10%) in contrast with the rest of the treatments. The results demonstrate that using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SA can intervene in sprouting mechanisms even at long term (64 days) and in synthesis of antioxidants with nutraceutic proprieties in minitubers.

Key words: catalase, oxidative stress and phenols, starch

## **T2.12 Implementación de un Sistema de Gestión de Calidad (SGC) según la norma internacional ISO 9001:2008 en Biofábrica Misiones S.A., Argentina**

Cabral José<sup>1\*</sup>, González Lucía, Imbrogno Luciana, Iturrieta Luciano, Rodríguez Verónica

<sup>1</sup>Biofábrica Misiones S.A. Ruta 12 km 7.5 Miguel Lanús, Misiones. Argentina \*e-mail: gerencia@biofabrica.org

Los SGC ofrecen una forma de trabajo estructurada y regulada por distintos requisitos; ordenan el funcionamiento global de la empresa brindando metodologías que permiten definir responsabilidades, políticas y objetivos, enfocándose a satisfacción del cliente y mejora continua, así como ayudan a lograr objetivos mediante estrategias, como la optimización de procesos, enfoque centrado en la gestión y el pensamiento disciplinado. Desarrollar un SGC basado en ISO9001:2008 representó un desafío para biofábrica. El SGC se aplica generalmente en empresas donde el modelo de producción sigue un protocolo totalmente estandarizado, sin embargo en biofábrica al trabajar con organismos vivos, y pudiendo estos no reaccionar siempre de igual manera a las mismas condiciones, se definen procedimientos rigurosos pero sensibles y flexibles con monitoreo de datos que acercan al modelo estandarizado de producción. Se implementó en 2008 definiendo áreas principales y soportes, mapa de procesos con procedimientos e instructivos escritos de cada operación, objetivos y responsabilidades. Como resultado, brinda al directorio información periódica del estado y funcionamiento de distintas áreas presentando indicadores de gestión de producción y procesos, mediante un tablero de control, junto a la documentación ordenada de sectores administrativos y su interacción con áreas productivas. En 2010 certificamos el alcance 'producción masiva y comercialización de plantas *in vitro* y plantines clonales de calidad genética y fitosanitaria' posicionando nuestros productos producidos bajo procesos certificados.

Palabras clave: biofábrica, certificación, normas ISO

### **T2.13 Caña de azúcar micropropagada y el aumento del rendimiento de los cañaverales misioneros**

Moreira Kubiak Daniela, Padován César, Cabral José, Imbrogno Luciana, Rodríguez Verónica, Iturrieta Luciano

Biofábrica Misiones S.A. Ruta 12 km 7.5 Miguel Lanús, Misiones. Argentina \*e-mail: gerencia@biofabrica.org

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) se cultiva tradicionalmente en la provincia de Misiones Argentina, con el propósito de abastecer el Ingenio azucarero San Javier. Hay

un creciente interés en el cultivo como alimento para el ganado (*in natura* o en ensilado) y en la producción de biocombustibles. El aumento de la oferta de una materia prima puede ser obtenido con el aumento del área cultivada o el aumento del rendimiento por área, que es algo que se busca a través del uso de la biotecnología. El grupo de trabajo de la Biofábrica Misiones produce plantas *in vitro* de caña de azúcar diagnosticadas como libres de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, *Xanthomonas albilineans* y *Virus del mosaico* (SCMV) que contribuyen con el aumento del promedio de rendimiento de la provincia, que históricamente es de aproximadamente 35 t/ha. En el presente trabajo, el rendimiento de los cañaverales con plantas *in vitro* de caña de azúcar de Biofábrica fue estimado a través de muestras a campo, en el estado fenológico de maduración. El método de muestreo fue el del Aro, tirado al azar y el número de repeticiones, de acuerdo con el tamaño del área. Las plantas fueron cortadas y pesadas sin las hojas. Para cada muestra del aro se sumaron los pesos de los tallos, se promediaron todas las muestras por área del aro y se extrapoló al rendimiento por hectárea. El promedio encontrado entre todas las variedades fue 65 t/ha. Los valores de mayor y menor rendimiento fueron 95 y 50 t/ha., respectivamente, este último superando en 15 t/ha el promedio histórico de Misiones, con el mismo manejo que siempre se venía practicando, o sea, sin fertilización o insuficiente para los requerimientos del cultivo.

Palabras clave: Biofábrica Misiones, plantas *in vitro*, producción agrícola, *Saccharum officinarum* L.

### **T2.14 Micropropagación para el manejo sostenible de *Hamelia patens*, una planta medicinal de México**

David Paniagua-Vega<sup>1</sup>, Carlos M. Cerda-García-Rojas<sup>2</sup>, Ana C. Ramos-Valdivia<sup>1\*</sup>

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN),

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

<sup>2</sup>Departamento de Química. México, D. F. 07360. \*e-mail: aramos@cinvestav.mx

México tiene una gran tradición en el uso de plantas medicinales (PM). Se estima que la salud del 25% de la población depende en buena medida de ellas. De acuerdo con el Instituto Nacional Indigenista (INI) en México se utilizan 3015 PM, donde destacan cerca de 1000

especies por ser las de mayor uso en los últimos 400 años. Sin embargo, sólo el 1% de ellas se ha estudiado a profundidad. Actualmente se ha incrementado la demanda de muchas PM, pero la gran mayoría se obtienen sólo por recolección de plantas silvestres. Esta situación pone en peligro la sostenibilidad de este recurso forestal. Organismos internacionales como la OMS y la WWF recomiendan cultivar PM en vez de colectarlas. La micropropagación clonal *in vitro* es una herramienta biotecnológica que no necesariamente involucra la manipulación genética. Garantiza la inocuidad y calidad de las PM, debido a que permite el control de todas las condiciones bióticas y abióticas. Además, no compete por los terrenos agrícolas, puede acoplarse a otras estrategias para adaptar las PM a tierra y así contribuir a mantener la biodiversidad en el ambiente silvestre. La PM *Hamelia patens* es una Rubiácea ampliamente utilizada en México para tratar problemas dermatológicos y digestivos. Presenta en sus hojas una alta producción de alcaloides indol y oxindol-monoterpénicos del orden de mg/g peso seco, característica por la que otras plantas como *Uncaria tomentosa* y especies de *Mitragyna* están siendo sobre explotadas. En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Cinvestav-IPN se establecieron cultivos *in vitro* de plántulas micropropagadas de *H. patens* con excelentes resultados ya que a partir de un sólo explante, se obtienen 3125 plántulas, al cabo de 6 meses. Las hojas de las plántulas presentaron mayor producción de alcaloides que las de plantas silvestres. Las plántulas se aclimataron en tierra con un 100% de sobrevivencia al ser incubadas bajo fotoperiodo de 16 h a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  a 3800 lux y después de tres meses pueden ser llevadas a su ambiente silvestre.

Palabras clave: *Hamelia patens*, manejo sostenible, micropropagación *in vitro*

#### ***In vitro* clonal micropropagation for the sustainable management of *Hamelia patens*, a traditional medicinal plant of Mexico**

Mexico has a long tradition using medicinal plants (MP). It is estimated that the health of 25% of population substantially depends on them. The National Indigenous Institute (INI) in Mexico reported 3015 MP, with ca. of 1000 species being the most popular in the last 400 years. However, only 1% of them have been studied in detail. Nowadays the use of these plants has increased, but the majority of them are obtained only by collecting wild specimens. For this reason the sustainability of forest resources is in danger. International organizations such as the WHO and

WWF recommend cultivating MP instead of collecting them. *In vitro* clonal micropropagation is a biotechnological tool that does not need for certain the use of genetic manipulation. In addition, it guarantees the innocuousness and good quality of MP, because clonal micropropagation allows control of abiotic and biotic conditions. Also, it is worth mentioning that it does not compete for agricultural land and can be merged with other strategies to maintain the biodiversity. *Hamelia patens* (Rubiaceae) is a MP widely used in Mexico to treat skin problems and digestive disorders. Leaves produce high amounts of indole and oxindole-monoterpene alkaloids within the order of mg/g dry weight as those produced by *Uncaria tomentosa* and *Mitragyna* species which actually are being overharvesting. In the Laboratory of Plant Biotechnology at CINVESTAV-IPN, micropropagated *in vitro* cultures of *H. patens* plantlets were established with excellent results. From a single explant, 3125 plantlets were obtained after 6 months. The leaves of the plantlets showed higher alkaloid production than wild plants. Plantlets were acclimated to soil and incubated under a 16 h photoperiod at  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  at 3800 lux with a 100% survival. After three months, plantlets can be transplanted to their natural environment.

Keywords: *Hamelia patens*, *in vitro* clonal micropropagation, sustainable management

#### **T2.1C Metodologías para micropropagación de raíces y tubérculos y su escalado en Biofábricas**

Víctor R. Medero Vega<sup>1\*</sup>, Manuel Cabrera Jova<sup>1</sup>, Arletys Santos Pino<sup>1</sup>, Milagros Basail Pérez<sup>1</sup>, Aymé Rayas Cabrera<sup>1</sup>, Jorge López Torres<sup>1</sup>, Yoel Beovides García<sup>1</sup>, Manuel de Fera<sup>2</sup>, Rafael G. Kosky<sup>2</sup> y Sergio Rodríguez Morales<sup>1</sup>. \*e-mail: vmadero@inivit.cu

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

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba

Las raíces y tubérculos tropicales juegan un papel fundamental en la alimentación del pueblo cubano, por tal razón el Ministerio de Agricultura se ha trazado importantes líneas de trabajo relacionadas con la multiplicación de estos cultivos y la consolidación del Esquema Nacional de Producción de Semilla. En el Laboratorio de Biotecnología del INIVIT, se ha trabajado de



forma sistemática en el desarrollo de metodologías para la micropropagación de estos cultivos y en su implementación en la Red Nacional de Biofábricas. Además, se establecieron protocolos para la multiplicación de Malanga (*Xanthosoma* y *Colocasia*), ñame, yuca y boniato, mediante el empleo del Sistema de Inmersión Temporal. Se corroboró la estabilidad genética de las plantas producidas mediante el uso de técnicas bioquímicas, moleculares y descriptores morfo-agronómicos. Se han obtenido incrementos en el rendimiento entre 25 y 35% de las plantas regeneradas debido al efecto de rejuvenecimiento con relación a las plantas del método tradicional. El ajuste de las metodologías, la asesoría técnica a las Biofábricas y la producción de explantes para su multiplicación en las mismas, han posibilitado alcanzar importantes beneficios económicos, ya que se ha fortalecido la diversificación en la producción de plantas *in vitro* y se ha garantizado la adopción de las metodologías. También, con la aplicación de estas técnicas se ha logrado la producción de un material vegetal de plantación con alta calidad genética y fitosanitaria, que facilita la introducción de nuevos genotipos comerciales, mejora la composición clonal de estos cultivos y garantiza la semilla básica para la producción de semilla certificada.

Palabras clave: biofábricas, cultivo *in vitro*, micropropagación, raíces y tubérculos tropicales

#### **Methodologies for micropropagation of roots and tubers and scaling up to Biofactories**

Tropical roots and tubers play a key role in feeding the Cuban people, for that reason the Ministry of Agriculture has set important working lines related to the multiplication of these crops and the consolidation of the National Seed Production Scheme. In the Biotechnology Laboratory at INIVIT, a systematic work is carried out to develop methodologies for the micropropagation of these crops and their implementation in the National Biofactories Network. In addition, protocols were established for the propagation of aroids (*Xanthosoma* and *Colocasia*), yam, cassava and sweet potato using Temporary Immersion System. The genetic stability of plants produced was corroborated by using biochemical, molecular and morpho-agronomic descriptors. Yield increments between 25 and 35% have been obtained in regenerated plants due to the rejuvenation effect in relation to plants from traditional methods. The methodology adjustment, technical advice to Biofactories and explants production for multiplication have

permitted to achieve significant economic benefits, as the diversification of *in vitro* plant production has been strengthened and the methodologies adoption has been confirmed. Also, the application of these techniques has facilitated the production of planting material with high genetic and phytosanitary quality, the introduction of new commercial genotypes, improvement of the clonal composition of these crops and availability of basic seed for certified seed production.

Keyword: Biofactories, *in vitro* culture, micropropagation, tropical roots and tubers

#### **T2.2C Aumento de los coeficientes de multiplicación en la micropropagación de la malanga (*Xanthosoma* spp.) mediante el empleo del Sistema de Inmersión Temporal**

Arlety Santos\*, Jorge López, Manuel Cabrera, Aymé Rayas, Milagros Basail, Víctor Medero, Yoel Beovides, Diosdada Gálvez, Damicela Reinaldo, Maricel Bauta, Alexis Ortega.

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apto 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. \*e-mail: asantos@inivit.cu

Una alternativa novedosa en la micropropagación de plantas lo constituye, el empleo del Sistema de Inmersión Temporal (SIT), basado en el contacto intermitente del medio de cultivo con los explantes, lo cual permite una mayor facilidad para el desarrollo de los procesos a gran escala y el aumento de la productividad del material vegetal propagado, lo que representa una reducción en los costos de producción. El presente trabajo se realizó con el objetivo de establecer una metodología para la multiplicación en SIT en el clon de malanga 'Viequera'. Se evaluó el efecto de dos sistemas de cultivo semi-automatizados SIT y Sistema de Inmersión Constante (SIC) en la fase de multiplicación de los brotes de yemas axilares. En el SIT se estudiaron diferentes tiempos y frecuencias de inmersión y número inicial de brotes por frasco de cultivo, para incrementar el coeficiente de multiplicación del clon objeto de estudio por esta vía de propagación. Los obtenidos permitieron demostrar la superioridad en la eficiencia del SIT respecto al SIC en la multiplicación de los brotes del clon 'Viequera'. Se estableció que para frascos de 250 ml con un tiempo de 14 minutos de inmersión cada seis horas, una densidad de ocho brotes se obtiene el mejor comportamiento del material y el mayor coeficiente de multiplicación.

Palabras clave: frecuencia de inmersión, medio de cultivo líquido, tiempo de inmersión

**Increased multiplication coefficient in cocoyam (*Xanthosoma* spp.) micropropagation via Temporary Immersion System**

An outstanding alternative for plant micropropagation is the use of Temporary Immersion System (TIS) based on intermittent contact of culture media with explants, which allows a greater facility for the development of large-scale processes and an increasing productivity of the propagated material and the corresponding cost reduction. This work was carried out to establish a multiplication methodology in TIS for cocoyam clone 'Viequera'. The effect of two semi-automated TISs and the Constant Immersion System (CIS) in the shoot multiplication stage from axillary buds was evaluated. In the TIS, different immersion times and frequencies and initial shoot number per culture flask were studied to increase the multiplication coefficient of target clone by this propagation method. Results demonstrated superiority in the efficiency of TIS in relation to CIS in the shoot multiplication from clone 'Viequera'. For 250 ml flasks and 14 minute immersion time every six hours, eight shoot density gives the best performance and the highest multiplication coefficient.

Keywords: immersion frequency, immersion time, liquid media

**T2.3C Propagación por embriogénesis somática del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' y su escalado en Biofábricas**

López J.<sup>1\*</sup>, Kosky GR<sup>2</sup>, Montano N<sup>1</sup>, Reinaldo D<sup>1</sup>, Montano D<sup>1</sup>, Mederos V<sup>1</sup>, Basail M<sup>1</sup>, Santos A<sup>1</sup>, Rayas A<sup>1</sup>, Cabrera M<sup>1</sup>, Beovidez Y<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP. 53 000, Villa Clara, Cuba. \*e-mail: jlopez@inivit.cu

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

La propagación *in vitro* a partir de yemas axilares tiene como limitantes principales los bajos coeficientes de multiplicación y la necesidad de realizar un elevado número de operaciones manuales. En cambio, el empleo de la embriogénesis somática, permite obtener

producciones superiores en un menor período de tiempo y costo más bajo. El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) y se escalado a las Biofábricas de Cienfuegos, Sancti Spíritus, Ciego de Ávila, Villa Clara y AGROFAR, con el objetivo de evaluar el comportamiento en campo de las plantas regeneradas por embriogénesis somática en el cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30'. Como control del experimento en campo se utilizaron materiales propagados por organogénesis y yemas de cormos procedentes de la propagación tradicional en campo. Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron la posibilidad de multiplicar el cultivar objeto de estudio por embriogénesis somática mediante la germinación de los embriones somáticos en la Biofábrica o la realización de tres subcultivos mediante organogénesis de los embriones. Luego en campo la estabilidad genética de las plantas obtenidas y la calidad de los racimos, corroboraron la factibilidad para su aplicación.

Palabras clave: embrión somático, estabilidad genética plantas regeneradas, *Musa* AAB

**Propagation via somatic embryogenesis of plantain cultivar 'INIVIT PV 06-30' and scaling up to Biofactories**

The main limiting factors of *in vitro* propagation from axillary buds are the low multiplication coefficients and the need to develop a high number of manual operations. However, the use of somatic embryogenesis permitted to obtain higher yields in less time and at lower cost. This work was performed at the Biotechnology Laboratory of the Research Institute of Tropical Root and Tuber Crops (INIVIT) and was scaled to the Biofactories of Cienfuegos, Sancti Spiritus, Ciego de Avila, Villa Clara and AGROFAR, in order to evaluate the field performance of somatic embryogenesis regenerated plants of plantain cultivar 'INIVIT PV 06-30'. For field experiment control, plants propagated by organogenesis and corm buds from traditional field propagation were used. Results showed the possibility of multiplying the target cultivar via somatic embryogenesis through somatic embryos germination in Biofactories or developing three subcultures through embryos organogenesis. The genetic stability of plants obtained and bunch quality confirmed the feasibility for its implementation.

Keywords: embryo somatic, genetic stability, *Musa* AAB

#### **T2.4C Uso del Ozono en la desinfección de frascos de cultivo empleados en los sistemas semiautomatizados para la propagación *in vitro* de plantas y en la desinfección del aire en las cámaras de cultivo**

José Efraín González<sup>1\*</sup>, Manuel Cabrera Jova<sup>1</sup>, Eliet Lorenzo Véliz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales. Apdo 6. Santo Domingo. Villa Clara. \*e-mail: Josee@inivit.cu

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones de Ozono. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. La Habana. Cuba

Uno de los aspectos principales a tener en cuenta para lograr el crecimiento de las plantas en condiciones *in vitro* es reducir a niveles mínimos los contaminantes ambientales. Para ello se emplean numerosas alternativas con productos químicos extremadamente tóxicos para la salud humana, mientras que para la esterilización de los frascos de sistemas de cultivo semiautomatizados comúnmente se emplea calor húmedo en autoclaves. Se requieren frascos autoclaveables y con alto consumo de energía eléctrica. El ozono es un potente oxidante desinfectante con un amplio rango de aplicaciones. La organización Mundial de la Salud ha recomendado su uso. En los ensayos se empleó un generador de ozono AQOZO AF-201, alimentando por un flujo de aire atmosférico. Las aplicaciones en las cámaras de cultivo se realizaron durante 12 horas. La descarga del gas en cámaras se efectuó en ocho puntos con concentraciones en el rango de 0.8-1 g/m<sup>3</sup> de ozono, se colocaron cuatro placas de Petri antes y luego de la aplicación de ozono, de las cuales dos contenían un medio propicio para bacterias (agar nutriente, Oxoid) y dos un medio propicio para hongos (agar almidón). Para la desinfección de los frascos de cultivo se probaron concentraciones entre 10-25 mg de ozono por litro con tiempos de tratamiento entre 20-50 minutos para volúmenes totales de frascos a tratar de 30 dm<sup>3</sup>. Se evaluaron contaminaciones microbianas visibles a partir de las 72 horas posteriores al tratamiento hasta 30 días de crecimiento del mismo. Este método reduce el consumo de energía eléctrica y ofrece la posibilidad de emplear en los sistemas de cultivo semiautomatizados frascos de cultivo alternativos más baratos. Se pudo constatar la efectividad del ozono frente a un amplio número

de microorganismos. Los microorganismos resultan incapaces de desarrollar resistencia e este debido a que su acción no presenta efecto inhibidor reversible en las enzimas intracelulares.

Palabras clave: cámaras de crecimiento, desinfección, frascos de cultivo, sistemas de inmersión temporal

#### **Use of Ozone disinfection of culture flask used in the semi-automated systems for *in vitro* propagation of plants and in air's disinfection of *in vitro* plant growth chambers**

One of the main aspects to take into account to achieve the growth of *in vitro* plants and its efficient propagation in the culture chambers is reduced to minimum levels of environmental contaminants, mainly based on the use of extremely toxic chemicals on human health and for sterilization of the culture flasks moist heat is commonly used. This technique can only be used for autoclavable culture vessels with high energy consumption. Ozone is a powerful oxidant disinfectant with a wide range of applications. The World Health Organization has recommended its use. We used an ozone generator AQOZO AF-201, with a stream of atmospheric air supplied. The gas discharge was conducted in eight previously defined points during 12 hours. The concentrations applied were in the range of 0.8 to 1 g/m<sup>3</sup> of ozone. In each of these eight environmental control points were placed, before and after application of ozone, four Petri dishes, two of which contained an enabling culture media for bacteria (nutrient agar, Oxoid) and two an enabling culture media for fungi (starch agar). For vessel's disinfection proved concentrations between 10-25 mg of ozone per liter with treatment times between 20-50 minutes for 30 dm<sup>3</sup> total volumes of bottles to try, evaluating visible contamination till 72 hours after treatment before inoculation of vegetal material or during the growth period (30 days). This method reduces the electric energy consumption and offers the possibility of using alternative flasks cheaper in semi-automated culture. It was found the effectiveness of ozone against a wide range of organisms on which they act quickly. Microorganisms are unable to develop resistance and this because ozone action does not present reversible inhibitory effect on intracellular enzymes.

Keywords: culture chambers, culture vessel, disinfection, temporary immersion systems

## **T2.5C Algunos avances en la propagación *in vitro* de Pistacho, Nogal y Pecano**

Marcos Daquinta Gradaille\*, Iris Capote, Mariela Cid

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

El pistacho (*Pistacia* sp.) es uno de los frutales menos explotados, entre las principales causas está el elevado costo del material vegetal por las dificultades de propagación de la especie. Por otra parte el Nogal (*Juglans nigra*) y el Pecano (*Carya illinoensis*) son especies forestales, de gran interés por su madera y sus nueces o almendras. La propagación *in vitro* ofrece un gran potencial para la industria de estas especies por la multiplicación a gran escala de clones seleccionados. A partir de brotes jóvenes de plantas de estas tres especies mantenidas en casas de cultivo, se procedió a su desinfección con hipoclorito de sodio al 1% durante diferentes tiempos. Las yemas apicales y axilares se establecieron en el medio de cultivo Murashige y Skoog modificado y suplementado con 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP. Los brotes de Pistacho obtenidos *in vitro* fueron enraizados con ayuda de pulsos de auxinas directamente en Jiffys.

Palabras clave: forestales, nueces, pulsos de auxinas

### **Some progress *in vitro* propagation of Pistachio, Walnut and Pecan**

Pistachio (*Pistacia* sp.) is a fruits less exploited, between the reason principals are the higher cost of plant material for difficulties in propagation of this specie. On the other hand the Walnut (*Juglans nigra*) and Pecan (*Carya illinoensis*) are forest species, of great value for wood and nuts. *In vitro* propagation permits a great potential in the industry of these species to multiplication a great scale of selection clones. From young shoots of the tree species maintains in greenhouse, were achieved the disinfection with sodium hypochlorite 1% during different times. Apical and axillaries bud were establishment in culture medium Murashige y Skoog modified and supplemented with 1 mg l<sup>-1</sup> BAP. Pistachio shoots obtained *in vitro* were rooting with held of auxins pulse directly in Jiffys.

Keyword: forest, nuts, auxins pulse

## **T2.6C Propagación *in vitro* de la *Moringa oleífera* Lam.**

Iris Capote Betancourt, Yarianne Lezcano Mas, Julia Martínez, Marcos Daquinta Gradaille

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

La *Moringa oleífera* es una planta de la familia *Moringaceae* de gran interés como planta alimenticia, ornamental y medicinal por su alto contenido de vitaminas, minerales, proteínas en sus hojas, flores y frutos. Estos compuestos tienen gran interés en la alimentación animal y del hombre. La reproducción de esta planta es por sus semillas y por estacas, estos métodos resultan insuficientes cuando se desea introducir nuevas variedades, como es el caso del presente trabajo. Con el objetivo de establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de siete variedades de esta especie, se evaluaron diferentes tiempos de desinfección de las semillas con hipoclorito de sodio a 0.5% (v/v) a diferentes tiempos, diferentes concentraciones de sales en los medios de cultivo para la germinación de semillas, así como el manejo de las explantes para la proliferación de los brotes. Se logró realizar la desinfección de las semillas escarificadas con hipoclorito de sodio durante 7 minutos, así como la germinación en un medio de cultivo con el 100% de las sales de Murashige y Skoog (MS). De los medios de cultivo evaluados para la proliferación de brotes, el medio sin suplementos de citoquininas resultó ser el mejor. Por otra parte el enraizamiento de los brotes se logró en un medio de cultivo sin suplementos de auxinas. La aclimatación de los brotes de *Moringa oleífera* Lam se realizó en un sustrato compuesto de zeolita: suelo rojo y cachaza (1:1:1) en condiciones de casa de cultivo, con un sistema de riego por microjet.

Palabras claves: semillas, hipoclorito de sodio, aclimatación

### ***In vitro* propagation of *Moringa oleífera* Lam.**

*Moringa oleífera* Lam is specie of *Moringaceae* family of great value like food, ornamental and medicinal plant by higher vitamins, minerals and proteins content in the leaves, flower and fruit. Its compoust are very interesting in animal and human food. The reproduction is from seed and cutting, but these methods do not always exit when we wish introduce new variety. With the aim to establish a protocol for *in vitro* propagation of this specie, were evaluated different times of seed disinfections with sodium hypochlorite 0.5% (v/v), several salts level in culture medium to seed germination and explant management to

proliferation. Disinfection was achieved with sodium hypochlorite during 7 min and germination in a culture medium with 100% salts Murashige y Skoog (MS). From culture medium evaluated to shoot proliferation, the medium without cytokine supplements was the best. On the other hand, the shoots rooting were achieved in a culture medium without auxins supplements. Shoots acclimatization of *Moringa oleifera* was made in a substrate composed of zeolite: red soil: sugarcane filter-cake (1:1:1), in greenhouse condition, with an irrigation system by microjet.

Key words: seed, sodium hypochlorite, acclimatization

### **T2.7C Micropropagación de plantas de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) con el empleo de Biobrás-16: determinación de estabilidad y/o variabilidad genética**

Yanelis Castilla Valdés<sup>1\*</sup>, M<sup>a</sup>. Esther González Vega<sup>1</sup>, Xonia Xiqués Martín<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Carretera a Tapaste, km 3 ½, Gaveta Postal 1, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. \*e-mail: yanelis@inca.edu.cu

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

El clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) se encuentra entre las especies de flores y plantas ornamentales más solicitadas por la población cubana. Su propagación *in vitro* con el empleo del análogo de brasinoesteroide Biobrás-16, producido en Cuba, permite obtener un elevado coeficiente de multiplicación de las plantas, pero resulta imperioso monitorear su estabilidad genética ya que en ocasiones el cultivo *in vitro* y el empleo de determinados reguladores del crecimiento, pueden ocasionar variabilidad genética en las mismas. Por ello, en el presente trabajo el objetivo fue estudiar la estabilidad y/o variabilidad genética con el empleo de marcadores citogenéticos y bioquímicos, de plantas de clavel español micropropagadas a partir del cultivo de meristemos en medios de cultivo con diferentes concentraciones de Biobrás-16 como sustituto de la citoquinina, y las plantas multiplicadas por esquejes a partir de estas. Para el estudio citogenético, fueron tomadas raíces de plantas de clavel germinadas en cámara húmeda y fueron sometidas a tres métodos de conteo de cromosomas para determinar el más efectivo. Este método fue tomado para determinar el número de cromosomas de las raíces de las plantas de los

diferentes tratamientos del cultivo de meristemos y la propagación por esquejes. Para la preparación de las muestras del estudio isoenzimático, fueron tomadas al azar hojas de plantas de los diferentes tratamientos y fueron estudiados los sistemas Peroxidasa, Fosfatasa Ácida, Malato Deshidrogenasa y Esterasa. Como resultados para el estudio citogenético, se logró determinar un método de conteo de cromosomas y se comprobó el número cromosómico  $2n=2x=30$ . Se determinó su constancia durante la propagación, lo que indica que el Biobrás-16 en las concentraciones utilizadas y en las condiciones de cultivo no provocó variación en el número cromosómico. En el estudio isoenzimático, de manera general se consideró que se mantuvo la estabilidad genética de las plántulas regeneradas, aunque el sistema isoenzimático Fosfatasa Ácida resultó polimórfico.

Palabras clave: Biobrás-16, citogenética, clavel español, cromosomas, isoenzimas

### **Micropropagation of plants of Spanish carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) with the use of Biobrás-16: determination of genetic stability and/or variability**

The Spanish carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) is one of the flowers and ornamental plants most requested by the Cuban population. The *in vitro* propagation of this species with the employment of the analogous of brassinoesteroid Biobrás-16, produced in Cuba, allows to obtain a high coefficient of multiplication of the plants, but it turns out necessary to supervise its genetic stability since in occasions the *in vitro* culture and the employment of certain growth regulators, can cause genetic variability in the plants. For these motives, in the present work we proposed the aim to study the stability and/or genetic variability with the employment of cytogenetic and isoenzymatic markers, of plants of carnation micropropagated by meristems culture in medium with different concentrations of Biobrás-16 as substitute of the cytokinin, and the plants propagated by cuttings from these. For the cytogenetic study, it was taken roots of plants of carnation germinated in a humid chamber. The roots were submitted to three methods of count of chromosomes to determine the most effective method. This one was taken to determine the chromosomal number of the roots of the plants of the different treatments from the meristems culture and the propagation by cuttings. For the sample preparation of the isoenzymatic study, it was taken at random leaves of plants of the different

treatments and it was studied the systems Peroxidase, Acid Phosphatase, Malate Dehydrogenase and Esterase. As results of the cytogenetic study, it was possible to determine a method of count of chromosomes and it was verified the chromosomal number ( $2n=2x=30$ ), which was constant during the propagation. It indicates that the Biobrás-16 in these concentrations and in the conditions of culture did not provoke variation in the chromosomal number. In the isoenzymatic study, in a general way it is considered that it was kept the genetic stability of the regenerated plants, although the Acid Phosphatase isoenzymatic system turned out to be polymorphic.

Keyword: Biobrás-16, chromosomes, cytogenetics, isoenzymes, Spanish carnation

### **T2.8C Estrategia de marketing para la exportación del Vitrofurul. Experiencia práctica en la introducción de nuevos mercados**

Raquel Hernández González\*, Zenaida Rodríguez Negrín, Mirta E. Cuellar de la Cruz

Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara. Villa Clara.  
\*e-mail: zenaidar@uclv.edu.cu

En el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas se fabrica el producto VITROFURAL, el cual se emplea como inhibidor de la contaminación microbiana de medios de cultivos en el proceso de producción de plantas *in vitro*. Desde hace más de 10 años se encuentra generalizado en todas las biofábricas de Cuba, sustituye el proceso convencional de esterilización mediante autoclave lo que permite un significativo ahorro de energía eléctrica, la reducción de los índices de contaminación por bacterias y hongos, la reducción del consumo de agente gelificante, el incremento de la productividad y la mejora de las condiciones de trabajo. El producto constituye un fondo exportable de interés para el centro y el país, por lo que el objetivo de esta investigación consistió en diseñar una estrategia de marketing para la exportación del Vitrofurul, para lo cual se hace necesario la investigación minuciosa del posible mercado donde se vaya a efectuar la venta y se obtienen elementos que permiten establecer el plan de acción para la exportación. Se logra la introducción e incremento gradual de las ventas del producto en los mercados de Perú, Chile y México.

Palabras clave: exportación Vitrofurul, introducción nuevos mercados, estrategia de marketing

### **Marketing strategy for the export of Vitrofurul. Practical experience in the introduction of new markets**

In the Center of Bioactive Chemicals, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas is produced the Vitrofurul, which is used as an inhibitor of microbial contamination of culture media in the production process, of *in vitro* plants. For over 10 years is widespread in all of Cuba biofactories, replacing the conventional process of sterilization by autoclave, allowing significant energy savings, lower rates of contamination by bacteria and fungi, reducing consumption gelling agent, the increased productivity and improved working conditions. The product is an export of interest to fund the center and the country, so that the objective of this research, is to design a marketing strategy for the export of Vitrofurul, for which it is necessary to completely research the market where possible will make the sale and obtain elements defining the action plan for export. Among the results obtained are relevant, is accomplished by introducing and gradual increase in product sales in the markets of Peru, Chile and Mexico.

Keywords: export Vitrofurul, entering new markets, marketing strategy

### **T2.9C Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma violaceum*, Schott)**

Enidia Téllez Fuentes\*, Loexis Rodríguez Montoya, Roberto González Valladares y Norbelis Abreu Romero

Centro de Desarrollo de la Montaña. Limonar de Monte Ruz, El Salvador, Provincia de Guantánamo \*e-mail: enidia@cdm.gtmo.inf.cu

La presente investigación se realizó en el Centro de Desarrollo de la Montaña con el objetivo de establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de *Xanthosoma violaceum*, Schott, por ser este cultivo de gran importancia por su alto valor nutritivo y de interés económico en la región. Los experimentos que se desarrollaron estuvieron dirigidos a evaluar el establecimiento *in vitro*, entre ellos tipo de sustrato para el gelado, desinfección así como la composición salina del MS. En la proliferación se evaluó la concentración de 6-BAP, estado físico del medio, así como el número y tiempo de duración del

subcultivo. También se ensayó el enraizamiento y la aclimatización de los brotes. Para la desinfección de las yemas de malanga de campo fue necesaria una doble desinfección con hipoclorito de Sodio y una bomba de vacío. En el medio de cultivo de establecimiento el empleo de las sales MS al 75% provocó brotes de mayor longitud así como adelantó el inicio de la brotación. La concentración de 4.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP estimuló significativamente la brotación de las yemas apicales y propició el mayor coeficiente de multiplicación (4.05) desde el 4<sup>to</sup> hasta el 8<sup>vo</sup> subcultivo. El enraizamiento *in vitro* de los explantes en el medio de cultivo sin reguladores del crecimiento dio lugar a altos niveles de enraizamiento, valores satisfactorios de calidad de la raíz y los mejores resultados en cuanto a la calidad del brote. En la aclimatización el empleo de la pulpa de café al 100% garantizó un 100 % de supervivencia de los brotes.

Palabras clave: propagación, malanga, *Xanthosoma violaceum*

#### **T2.10C Nueva alternativa para la propagación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa* AAB)**

Milagros Basail Pérez<sup>1\*</sup>, Víctor Medero Vega<sup>1</sup>, Eneida Otero Gálvez<sup>1</sup>, Marlenys Torres Delgado<sup>1</sup>, Jorge López Torres<sup>1</sup>, Manuel Cabrera Jova<sup>1</sup>, Arletys Santos Pino<sup>1</sup>, Aymé Rayas Cabrera<sup>1</sup>, Maricel Bauta Toledo<sup>1</sup>, Yoel Beovidez García<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP. 53 000, Villa Clara, Cuba \*e-mail: milagrosb@inivit.cu

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) se han empleado para la multiplicación *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp. y permiten obtener elevados coeficientes de multiplicación. El presente trabajo se realizó con el objetivo de multiplicar el cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB) en SIT. Se llevaron a cabo experimentos independientes y consecutivos donde se determinó el efecto del tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión, el volumen de medio de cultivo, el tiempo de cultivo y el número de explantes por frasco sobre la multiplicación de este cultivar en SIT. Con un tiempo de inmersión de 10 minutos, frecuencia de inmersión cada 6 horas, 40 ml de medio de cultivo por explante, 90 explantes por frasco de cultivo y 18 días de cultivo se obtuvieron los mejores resultados. Se logró multiplicar el cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB) en SIT. El coeficiente de

multiplicación y la calidad del material vegetal fueron elevados lo que permitirá su introducción en la producción en biofábricas.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, explantes, micropropagación

#### **New alternative for *in vitro* propagation of plantain cultivar 'INIVITPV06-30' (*Musa* AAB)**

Temporary Immersion Systems (TIS) had been used for *in vitro* multiplication of different cultivars of *Musa* spp. achieving high coefficients of multiplication. This investigation was carried out focussed on the multiplication of the plantain 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB) in (TIS). Independent and consecutive experiments were realized to determine the effect of immersion period, immersion frequency, culture medium volume, time of culture and number of explants per flask on the multiplication of this cultivar in TIS. The best results were obtained with immersions of 10 minutes, 6 ours of immersion frequency, 40 ml of culture medium per explant, 90 explants per culture flask and 18 days of culture. Plantain cultivar 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB) was multiplied in TIS. The multiplication coefficient and the quality of plant material were high allowing the scaling of them in the tissue culture commercial laboratories.

Keywords: explants, micropropagation, multiplication coefficient

#### **T2.11C Ingeniería de la producción de plantas *in vitro* de plátanos y bananos mediante embriogénesis somática en medios de cultivos semisólidos**

Miguel Suárez-Castellá<sup>1\*</sup>, Rafael G. Kosky<sup>1</sup>, Zoe Sarria<sup>1</sup>, Maritza Reyes<sup>1</sup>, Robin Triana<sup>1</sup>, Borys Chong-Pérez<sup>1</sup>, Alex Rodríguez<sup>1</sup>, Zaida Pérez<sup>1</sup>, Milagros González<sup>1</sup>, Miladys León<sup>1</sup>, Leyanis García-Águila<sup>1</sup>, Pedro Orellana<sup>1</sup>, Blanca Pérez<sup>1</sup>

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

La embriogénesis somática como tecnología de propagación ha sido reconocida por muchos autores como la futura generación en la regeneración de plantas a escala masiva, por las ventajas en la eficiencia productiva. Sin embargo, se han registrado en la literatura especializada los problemas tecnológicos que han confrontado diversas experiencias, así como la no existencia de los sistemas ingenieriles indispensables en el

trabajo empresarial para la producción masiva de plantas. El Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) ha trabajado durante los últimos tres años en el escalado para la producción comercial de más de 300 000 plantas *in vitro* de plátanos y bananos ('Grande naine', 'Cavendish enano', 'FHIA 18', 'FHIA 21') mediante una variante propia de embriogénesis somática. Partiendo de dicha experiencia en el IBP, el presente trabajo pretende mostrar un grupo de subsistemas propios de la ingeniería de la producción que garantizan su escalado masivo dentro de un sistema empresarial, donde se destaca la definición de la organización de la producción y el trabajo, el método y herramientas para la planificación y control de la producción, el sistema de aseguramiento de la calidad, todos ellos adecuados a las exigencias de esta tecnología, así como los resultados del análisis de los costos de producción. Con los resultados de la experiencia desarrollada se logra completar el ciclo desde el proyecto investigativo hasta el desarrollo e innovación de esta tecnología y confirma que el empleo de la embriogénesis somática como tecnología para la producción masiva de plantas es viable y eficiente.

Palabras clave: calidad, embrión somático, escalado de la tecnología, *Musa* spp.

#### **T2.12C Empleo de la embriogénesis somática en la propagación masiva del cultivar de plátano FHIA-21 (*Musa* AAAB)**

García-Águila L\*, Kosky RG., Zoe Sarria, Miladys León, Blanca Pérez, Alexis Concepción, Maritza Reyes y Robin Triana

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

A pesar de los avances que ha tenido la embriogénesis somática de *Musa* spp. no es suficiente el conocimiento científico para su empleo en la propagación *in vitro* del cv. de plátano 'FHIA-21'. Esta investigación tuvo como objetivos: seleccionar el explante inicial para la formación de callos con estructuras embriogénicas; determinar el efecto de la densidad de inoculación sobre la formación y maduración de los embriones somáticos en medio de cultivo líquido; así como caracterizar morfológica, agronómica y molecularmente las plantas en campo. Los resultados demostraron que la selección del explante inicial es un factor determinante en la inducción de la embriogénesis somática a partir de flores masculinas inmaduras.

La mayor formación de callos con estructuras embriogénicas se logró (8.77%) cuando el brote floral masculino se encontraba después de emitida la última flor femenina. Además, se precisó que callos con estructuras embriogénicas compuestas por masas de proembriones y embriones somáticos en etapas tempranas de desarrollo ontogénico proporcionaron un 85.0% de suspensiones celulares embriogénicas. Adicionalmente, se demostró que la densidad de inoculación influyó sobre el número de embriones somáticos, su morfología y sincronización de los cultivos embriogénicos en estas fases. El mayor número de embriones somáticos con desarrollo homogéneo se obtuvo con 1.5 gMF/30ml de densidad de inoculación. En la fase de maduración, la densidad de 0.6 gMF/30ml contribuyó a una mayor sincronización en el desarrollo morfológico de los embriones somáticos, con evidencias histológicas de los meristemos caulinar y radicular. Por su parte, las evaluaciones en campo mostraron una mejor respuesta morfológica y agronómica en plantas provenientes del cultivo *in vitro*, con respecto a las plantas originadas de semilla asexual. Los resultados con los marcadores AFLP no indicaron variaciones genéticas entre y dentro de las tres poblaciones de plantas del cv. 'FHIA-21' obtenidas por embriogénesis somática, organogénesis y semilla asexual.

Palabras clave: AFLP, densidad de inoculación, embrión somático, histología, sincronización

#### **Use of somatic embryogenesis in de mass propagation of plantain cultivar FHIA-21 (*Musa* AAAB)**

Despite the advances reached using somatic embryogenesis in *Musa* spp., is not enough scientific knowledge to employment *in vitro* propagation of cv. of plantain FHIA-21. Therefore, this study aims to: Select the initial explant for the formation of callus with embryogenic structures, to determine the effect of inoculation density on the formation and maturation of somatic embryos in liquid culture, and to characterize morphological, agronomic and molecular field plants. The results showed that the selection of initial explant is a determining factor in the induction of somatic embryogenesis from immature male flowers. The increased formation of callus with embryogenic structures was achieved (8.77%) when the male flower bud was issued after the last female flower. Furthermore, it was stated that callus with embryogenic structures composed of masses of proembryos and embryos at early stages of ontogenetic



development provided 85.0% of embryogenic cell suspensions. Additionally, it was shown that the density of inoculation influenced the number of somatic embryos, their morphology and synchronization of embryogenic cultures in these phases. The highest number of somatic embryos homogeneous development was obtained with 1.5 gMF/30ml inoculation density. In the maturation phase, the inoculation density of 0.6 gMF/30ml contributed to greater synchronization in the morphological development of somatic embryos, with histological evidence of apical and root meristems. This provided an increase of germination and regeneration of whole plants. In turn, field evaluations showed better agronomic and morphological response in plants from cultivation *in vitro*, with respect to asexual seed plants originated. The results with AFLP markers showed no genetic variation among and within three populations of plants of cv. 'FHIA-21' obtained by somatic embryogenesis, organogenesis and asexual seed. These results allowed developing a protocol for somatic embryogenesis *in vitro* propagation of this cultivar using liquid culture media.

Keywords: AFLP, inoculation density, somatic embryo, histology, synchronization

### **T2.13C Efecto del Vitrofurcal en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad ex Wendl**

Y. García-Ramírez\*, M. Freire-Seijo, Ortelio Hurtado, Miladys León, Berkis 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: yudith@ibp.co.cu

En aras de propagar plantas *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* a gran escala. El presente trabajo, se realizó con el objetivo de determinar la fitotoxicidad del Vitrofurcal sobre las plantas de *B. vulgaris* durante la multiplicación y enraizamiento *in vitro*. Para esto se cuantificó el número de brotes por explante, se calculó el coeficiente de multiplicación, se determinó el porcentaje de raíces emitidas por plantas y el porcentaje de supervivencia *ex vitro*. Como resultado se comprobó que el Vitrofurcal no fue fitotóxico sobre las plantas y puede ser empleado en la esterilización química de los medios de cultivo para la multiplicación y el enraizamiento *in vitro* de plantas de *B. vulgaris*. Los resultados demostraron que se incrementó el número de brotes por explante y el coeficiente de

multiplicación hasta el sexto subcultivo de multiplicación con respecto al medio de cultivo esterilizado en autoclave. Se obtuvo un porcentaje de raíces emitidas de 85,2% y se alcanzó un 93% de supervivencia. Estos resultados, permiten consolidar futuras estrategias para la propagación masiva de *B. vulgaris* y otras especies de bambúes, resulta de gran interés ya que contribuye a obtener explantes de óptima calidad. Esto le permite dar solución a unas de las principales problemáticas que afectan la propagación *in vitro* en varias especies de bambúes.

Palabras clave: bambú, multiplicar, enraizar, aclimatizar

### **T2.14C Propagación *in vitro* de *Moringa oleifera* L. a partir de segmentos nodales y semilla botánica**

Daniel Agramonte\*, Mileidy Pons\*, Martha Pérez, Mariana la O, Marisol Freire-Seijo, Yelenys Alvarado-Capó, Leyanis García-Águila, Felipe Jiménez-Terry

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: agramonte@ibp.co.cu; mileidypc@ibp.co.cu

*Moringa oleifera* L. se considera uno de los mejores vegetales perennes entre otros aspectos por las cualidades nutricionales excepcionales que posee. Esta especie es muy rica en proteínas, vitaminas y minerales; es por ello que resulta un complemento importante en la alimentación animal y humana. Cuba ha priorizado su introducción a escala comercial, pero no existe suficiente disponibilidad de plantas para la siembra en campo de genotipos élitos. La propagación *in vitro* de esta especie pudiera ayudar a resolver la creciente demanda de material vegetal para la plantación. El objetivo de este trabajo fue obtener un protocolo de propagación *in vitro* de *M.oleifera* L. a partir de segmentos nodales y semilla botánica. En la fase de establecimiento se obtuvieron los mejores resultados de desinfección con el empleo de Hipoclorito de sodio al 1.5% para los segmentos nodales y una doble desinfección para la semilla botánica. Se establecieron segmentos nodales de una yema axilar a partir de plantas de cuatro procedencias crecidas en casa de cultivo. El porcentaje de explantes establecidos osciló entre 48.0 y 65.5% dependiendo de las procedencias. Las semillas botánicas germinaron a los 6 días de cultivo en medio de cultivo semisólido

propuesto por Murashige y Skoog. En la fase de multiplicación las plantas mostraron un promedio de 3.5 brotes por explante. En la fase de enraizamiento no influyó el empleo o no de auxinas para la emisión de raíces. La supervivencia en la fase de aclimatización fue del 60%. Se logró establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de *Moringa oleifera* L. a partir de segmentos nodales y semilla botánica.

Palabras clave: establecimiento, propagación, enraizamiento

### ***Moringa oleifera* L. *in vitro* propagation from nodal segments and botanic seed**

*Moringa oleifera* L. is considered one of the best perennial vegetables among others by the exceptional nutritional qualities he possesses. This species is very rich in protein, vitamins and minerals is why it is an important supplement in animal feed and human. Cuba has prioritized its introduction on a commercial scale, but there is sufficient availability of plants for planting in the field of elite genotypes. *In vitro* propagation of this species could help solve the growing demand for plant material for planting. The aim of this study was to obtain a protocol for *in vitro* propagation of L. *M. oleifera* from nodal segments and seed. In the establishment phase yielded the best results was obtained by the use of sodium hypochlorite 1.5% for nodal segments and a double disinfection for seed. Nodal segments were established from an axillary bud from plants of four origins grown in greenhouse. The percentage of established explants ranged from 48.0 to 65.5% depending on sources. Botanical seeds germinated after 6 days of culture in semisolid medium proposed by Murashige and Skoog. In the multiplication phase, the plants showed an average of 3.5 shoots per explant. In the rooting phase did not affect employment or not auxin for root emission. Survival in the acclimatization phase was 60%. It was possible to establish a protocol for *in vitro* propagation of *Moringa oleifera* L. from nodal segments and seed.

Keywords: development, propagation, rooting

### **T2.15C Obtención de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigenum*) cv. 'Andinita' en Sistemas de Inmersión Temporal**

Janet Igarza Castro<sup>1</sup>, Daniel Agramonte<sup>2</sup>, Yelenys Alvarado-Capo<sup>2</sup>, Manuel de Fera<sup>2</sup>, Tatiana Pugh<sup>3</sup>, Miguel Pérez Tortoledo<sup>4</sup>, Juan Jaime Pacheco<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal. CISAT. CITMA, Cuba \*e-mail: janetigarza1901@yahoo.es, janet.igarza@holguin.inf.cu

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

<sup>3</sup>Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT). INIA-Maracay. Venezuela

<sup>4</sup>Laboratorio de Cultivo de Tejidos. INIA. Mérida. Venezuela

El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) de Venezuela, en el Plan Nacional de Semilla está produciendo semilla de papa por biotecnología, pero las necesidades del país son superiores a la capacidad instalada. La adquisición de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), posibilita desarrollar investigaciones en la producción de semilla de papa que garanticen calidad, eficiencia y reducción de los costos de producción. De esta manera, disminuiría la compra de semilla y se contribuiría a la seguridad y soberanía alimentaria del país. El objetivo de este trabajo fue obtener microtubérculos de papa cv. 'Andinita' en SIT. Se emplearon plantas *in vitro* propagadas por organogénesis y SIT de 10 litros de capacidad. Se inocularon 100 explantes por recipiente de cultivo (ápices, primer y segundo entrenudo) y después de cinco semanas se realizó un cambio de medio de cultivo para inducir la tuberización. Se probaron tres frecuencias de inmersión. Se midió la altura de las plantas y se cuantificó el número de entrenudos. Después de nueve semanas en tuberización se cuantificó el número de microtubérculos por planta, se midió su diámetro y se determinó su masa fresca. Los microtubérculos fueron plantados en casa de cultivo y campo. Fue posible obtener microtubérculos de papa cv. 'Andinita' en SIT. Los mejores resultados se obtuvieron con inmersiones cada cuatro horas y ápices como explante inicial, con un promedio de 4.9 microtubérculos por planta (491 microtubérculos por recipiente de cultivo), el 95.92% de estos con diámetro mayor de 4.0 mm y masa fresca superior a 0.5 g que pudieron ser plantados en casa de cultivo donde se obtuvieron 5,9 microtubérculos por planta; con el mejor tratamiento (inmersiones cada 4h), el 70.3% de estos con categoría de semilla. En campo, las plantas produjeron como promedio 9,5

minitubérculos, más de 1.0 kg de tubérculos por planta, y de estos el 23.0% en categoría de semilla. Los resultados indicaron que los microtubérculos de papa cv. 'Andinita' obtenidos en SIT puede ser una alternativa para la producción de semilla prebásica de este cultivar en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Campo Experimental Mucuchíes, INIA, Mérida. Este resultado constituye el primer informe para Venezuela del uso de SIT para propagación de papa y abre nuevas posibilidades para su empleo en otras variedades.

#### **T2.16C Aclimatización de plantas cultivadas *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl**

Ortelio Hurtado\*, Marisol Freire -Seijo, Michel Leiva - Mora y Yudit García -Ramírez

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

La aclimatización es una de las fases de la propagación *in vitro* que influye en la eficiencia de los protocolos de regeneración de plantas. Para lograr la aclimatización de plantas cultivadas *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl en condiciones de casas de cultivo se desarrolló este trabajo, fue considerado en la aclimatización de las mismas la altura de las plantas y la presencia de raíces o el efecto del estado de desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro*. Se determinó el número de plantas vivas a los 30 días. El desarrollo morfológico de la hoja y la raíz se analizó en plantas aclimatizadas con 0 y 90 días de sembradas, así como a plantas de campo, además se verificó la influencia del tipo de sustrato y el efecto de la fertilización en el desarrollo morfológico de plantas de *B. vulgaris* durante la aclimatización. Se cuantificó el porcentaje de supervivencia y la altura, el número de hijos por planta, la raíz y hojas, así como la masa fresca y seca. Se pudo constatar que los mayores valores de supervivencia (84.21% y 94.74%), se presentaron cuando se emplearon plantas de mayor altura y no hubo influencia de la raíz. Respecto a la utilización del tipo de sustrato el número y longitud de las raíces, así como, número de hijos por planta y masa seca y fresca de las raíces y la zona caulinar se lograron con el sustrato compuesto por una mezcla de 50% de humus de lombriz con 50% de zeolita. También se pudo comprobar que la fertilización realizada con sulfato de amonio y nitrato de potasio en

concentraciones de 3.0 g l<sup>-1</sup> y 8.0 g l<sup>-1</sup> respectivamente, favoreció el desarrollo en altura de las plantas y la emisión de nuevos hijos durante la fase de aclimatización.

Palabras clave: aclimatización, masa fresca, masa seca, fertilización, sustrato, morfología

#### **T2.17C Propagación vegetativa de plantas *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schard. ex Weld obtenidas *in vitro***

Miladys León\*, Marisol Freire-Seijo, Amado Pérez, Milagros González, Yelenys 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. miladys@ibp.co.cu

*Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schard. ex Weld. es una especie bien adaptada a las condiciones del Caribe, incluyendo Cuba, donde crece a todo lo largo y ancho del territorio nacional. El deshije de plantas propagadas vía organogénesis en vivero puede ser una alternativa para la propagación masiva de esta especie. Luego de aclimatizadas las plantas propagadas *in vitro* fueron deshijadas y plantadas en bolsas que contenían sustratos basados en una mezcla de humus de lombriz y zeolita, el riego se realizó por microaspersión. A los 30 días de plantación se evaluó la supervivencia en todas las plantas y a los 90 días se calculó el coeficiente de multiplicación, el porcentaje de supervivencia, la duración del ciclo de desarrollo óptimo para la siembra de las plantas deshijadas en viveros y casa de cultivo. el coeficiente de multiplicación como promedio fue de 2 plantas en los deshijos realizados a partir de plantas aclimatizadas y se alcanzaron porcentajes de supervivencia por encima del 70%. Se determinó que el ciclo de desarrollo de las plantas es de 90 días en la época de verano, mientras que en el invierno puede llegar a 120 días. A medida que se incrementa el deshije se determinó que los chusquines y ramas laterales son los tipos de hijos más adecuados para realizar el deshije. El empleo de esta técnica convencional posibilita realizar cuatro deshijos durante el año a partir del material vegetal inicial. Establecer esquemas de propagación de plantas en los que se combinen las facilidades de las técnicas de cultivo de tejidos y las vías de propagación tradicional constituye una excelente opción para poner en manos de los productores sistemas sostenibles y amigables con el medio ambiente. Estos resultados demuestran la posibilidad de emplear estrategias de trabajo de desarrollo local en las

que se permita el acceso de los campesinos a los productos de las altas tecnologías

Palabras claves: bambú, deshielo, supervivencia, vivero

### Sesión III: Interacción planta-patógeno/ *Plant-pathogen interaction*

#### T3.1 Study of infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz & Sacc. on *Mangifera indica* L.

A. Pandey<sup>1\*</sup>, B. K. Pandey<sup>1</sup>, M. Muthukumar<sup>1</sup>, L. P. Yadava<sup>1</sup>, U. K. Chauhan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Plant Pathology Laboratory, Central Institute for Subtropical Horticulture, Lucknow-227 107, Uttar Pradesh, INDIA \*e-mail: ashutosh.pandeybt@gmail.com

<sup>2</sup>Center for Biotechnology, School of Environmental Biology, A.P.S. University, Rewa- 486 003 Madhya Pradesh, INDIA

Anthrachnose, caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, is a serious postharvest disease of mango. The histopathological studies on anatomy of naturally infected by *Colletotrichum gloeosporioides* and artificially inoculated leaves and healthy leaves were performed to understand the infection process of *C. gloeosporioides* at various intervals after inoculation. Germination and penetration processes of the pathogen within the whole leaf were observed. The first evidence of penetration into the whole leaf was observed 48 h after invasion. It also revealed that mycelia were prominent after 120 h after invasion by the fungus (*C. gloeosporioides*). Subcuticular infection by hyphae was present in transverse leaf sections (T.S.) of the diseased sample after 72 h. Also, both inter and intra-cellular hyphal invasion were observed after 72 h. Mesophyll cells were highly affected by fungal invasion and rapidly collapsed. Swelling of epidermal cell walls was also observed. After 96 h almost all the cells became necrotized (Nc). Necrotized mycelial mats (M) of *C. gloeosporioides* was observed after 120 h and all the invaded cells became necrotized (Nc) forming a spot which eventually the cells ruptured leaving a shot hole symptom. All these observations pertained to the cells of mesophyll tissue indicating that these are the regions of fungal invasion and host tissue damage resulting in the disease symptoms. Naturally infected and artificially inoculated (*in vitro*) presented no significant differences suggesting that the pathogen invasion and

symptom development process is similar in both the conditions.

Key words: *Colletotrichum gloeosporioides*, Mango, Histopathology, Infection process, Light microscopy, Transverse section

#### T3.3 Transmisión experimental de *Tomato Venezuela virus* (ToVEV) por *Bemisia tabaci* (Aleyrodidae) a varias especies de plantas

Oriana Romero\*, Dorys T. Chirinos, Francis Geraud-Pouey

Unidad Técnica Fitosanitaria, Facultad de Agronomía, La Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. CP 4011 \*e-mail: orianaromero22@gmail.com

Con el fin de estudiar la transmisión experimental de *Tomato Venezuela Virus* (ToVEV) por *Bemisia tabaci* a especies de plantas cultivadas y silvestres para evaluarlas como posibles hospedadoras de dicho virus, se expusieron individualmente a adultos virulíferos, nueve especies de plantas, comunes en Venezuela pertenecientes a las familias: *Solanaceae*: *Solanum lycopersicum* L., *S. americanum* Mill.; *Datura stramonium* L.; *D. inoxia* DC.; *Amaranthaceae*: *Amaranthus dubius* Mart.; *Capparidaceae*: *Cleome spinosa* Jacq., y *Cucurbitaceae*: *Cucumis anguria* L.; pepinillo liso, *C. melo* var. *agrestis*; *C. melo* L. Tomate además de ser el hospedero cultivado afectado por el virus en estudio, fue aquí utilizado como testigo positivo. Como control se utilizaron plantas de las mismas especies, expuestas a adultos de *B. tabaci* criados sobre plantas de algodón libre del *Begomovirus*. Posteriormente, las plantas se mantuvieron dentro de jaulas a prueba de *B. tabaci*, sobre las cuales se hicieron observaciones diarias para detectar síntomas hasta 30 días post-período de exposición al vector. Luego se tomaron muestras de ápices foliares para determinaciones del virus mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se observaron síntomas de infección viral (amplitud 8,5 – 25,7 días) en *S. lycopersicum*, *D. stramonium*, *A. dubius*, *C. anguria*, *C. melo* var. *agrestis* y *C. melo*, lo cual fue corroborado por PCR infestándose entre el 76 y 100% de las plantas evaluadas. En la retransmisión del ToVEV hacia tomate a partir de plantas que resultaron infestadas se recuperaron síntomas a partir de *S. lycopersicum*, *D. stramonium*, *A. dubius* y *C. anguria*, lo que hace de estas últimas tres especies, potenciales hospedadoras del virus y podrían constituir parte de la cadena epidemiológica del mismo en el campo.

Palabras clave: *Bemisia tabaci*, plantas silvestres, Tomato Venezuela virus

### **Experimental transmission of Tomato Venezuela virus (ToVEV) by *Bemisia tabaci* (Aleyrodidae) to some species of plants**

To study the experimental transmission of Tomato Virus Venezuela (ToVEV) by *Bemisia tabaci* to species of wild and cultivated plants to evaluate its behavior as possible hosts of the virus were exposed individually to adult viruliferous *B. tabaci*, nine species of plants common in Venezuela in the families: Solanaceae: tomato, *Solanum lycopersicum* L., *S. americanum* Mill; Datura stramonium L., *D. inoxia* DC., Amaranthaceae, *Amaranthus dubius* Mart., Capparidaceae: *Cleome spinosa* Jacq., and Cucurbitaceae, *Cucumis anguria* L., *Cucumis melo* var. *agrestis*, *C. melo* L. Since tomato is the cultivated species affected by this virus, it was utilized as positive control. As test plants of the same species exposed to adults of *B. tabaci* reared on cotton plants free of *Begomovirus*. Afterward to the exposition, the plants were kept in cages without *B. tabaci* were observed symptoms until 30 days post-exposure period vector. Later, sample of foliar apices were taken for determination of the virus by the PCR. Symptoms of viral infection were observed (range: 8.5 to 25.7 days) in *S. lycopersicum*, *D. stramonium*, *A. dubius*, *C. anguria*, *C. melo* var. *agrestis* and *C. melo* L, which was confirmed by PCR with infection between 76 and 100% of the plants evaluated. In the back-transmission of ToVEV into tomato from infested plants were recovered symptoms only from *S. lycopersicum*, *D. stramonium*, *A. dubius* and *C. anguria*, making the latter three species, experimental host of the virus and could be part of the epidemiological chain of this virus in the field.

Key words: *Bemisia tabaci*, host plants, Tomato Venezuela virus

### **T3.4 Evaluación cualitativa *in vitro* del control biológico hecho con *Trichoderma* sp., y *Aspergillus* sp., aislados de suelos de los cerros orientales de la ciudad de Bogotá d.c. – Colombia, sobre el fitopatógeno *Sclerotinia* sp.**

Diego Zubieta C.<sup>\*</sup>, Cristian J Riveros

Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Facultad de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Ingeniería Ambiental, Av. Circunvalar con Venado de

Oro, CP 110321, Bogotá D.C.–Colombia \*e-mail: dazubietac@correo.udistrital.edu.co

El cultivo de lechuga variedad Batavia, es uno de los de mayor producción en la sabana de Bogotá y de gran importancia a escala económica en Colombia; el fitopatógeno *Sclerotinia* sp., puede llegar a generar pérdidas hasta del 70% en la cosecha. El control de dicho hongo se ha realizado con benzimidazoles y dicarboximidas, pero estos son bioacumulables en el medio, contaminantes de los recursos hídricos y edáficos llegando a causar efectos secundarios en la salud humana. En estudios recientes se ha comprobado que la utilización de biocontroladores como *Trichoderma* sp., y *Aspergillus* sp., sobre el fitopatógeno es muy eficiente y disminuye los impactos que han causado los fungicidas tradicionales sobre el medio ambiente. En el presente trabajo se evalúa la eficiencia de seis cepas aisladas (tres de *Aspergillus* sp. y tres de *Trichoderma* sp.) de suelos de los cerros orientales de Bogotá D.C. – Colombia, a través de pruebas antagonistas cualitativas *in vitro*, en agares PDA, Miel–Avena y Jugo V8, para determinar el medio que mejor favorezca el desarrollo de las cepas. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente a través de una clasificación jerárquica, utilizando como medida de distancia el coeficiente de similitud de Jaccard, y así establecer cuál es el mejor consorcio fúngico para el control del fitopatógeno. Se logró evidenciar que las mejores relaciones se encuentran entre las cepas denominadas A<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> y D<sub>1</sub> (*Aspergillus* sp., corresponden a las dos primeras cepas nombradas y las siguientes a *Trichoderma* sp.), en un porcentaje de aproximadamente 65%, teniendo un comportamiento similar en cualquiera de los sustratos evaluados, sin embargo se logró hallar que el mejor medio para el crecimiento y mantenimiento de las cepas es una combinación entre el agar de Miel – Avena y Jugo V8.

Palabras clave: *Aspergillus*, biocontrol, fitopatógeno, *Sclerotinia*, *Trichoderma*

### **T3.5 Aislamiento y caracterización en la producción de ácido salicílico de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz de cinco regiones de México**

S.B. Aldape de la Peña, E. I. Laredo Alcala, A. Iliná, J.Borjas, J.L.MartínezHernández\*

Dpto. de Biotecnología, Fac. de C. Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza

S/N. Col. República, CP 25280, Saltillo, Coahuila, México. \*e-mail: jose-martinez@uadec.edu.mx

El ácido salicílico (AS) es una componente que activa las defensas de las plantas contra diversos patógenos, por lo que existe un interés cada vez mayor de su producción a nivel industrial. Se ha demostrado que las rizobacterias tienen la capacidad de producir metabolitos de interés agrícola como las fitohormonas y el ácido salicílico. Existen reportes del empleo de diversas rizobacterias para la producción de ácido salicílico, entre las que destacan la *Pseudomonas*. El objetivo del presente estudio fue caracterizar rizobacterias asociadas a diversos cultivos en cuanto a la producción ácido salicílico. Las cepas fueron aisladas de muestras de suelo provenientes de cinco regiones diferentes de la República Mexicana y se identificaron mediante observación microscópica y pruebas bioquímicas. Se utilizaron diversas técnicas colorimétricas y cromatográficas (TLC y HPLC) para la detección del metabolito de interés. Para la selección de las mejores cepas se empleo un análisis multivariado de conglomerado jerárquico y ligamiento completo. De acuerdo a los resultados obtenidos dos cepas 1 y 9, caracterizadas como *Pseudomonas fluorescens* (provenientes de sembradíos de hortalizas de las regiones de Villagran y Pénjamo, Guanajuato, respectivamente.), presentaron los niveles más altos de producción de AS con niveles de 20 a 25 ppm, mientras que el resto produjeron AS en un rango entre 0.82 y 11.0 ppm. En literatura se reportaron niveles de producción de AS entre 3.5 y 35.0 ppm, por lo que los valores obtenidos de las cepas estudiadas se encuentran en un valor medio de producción. Se demostró que las cepas utilizadas presentan un buen rendimiento en la producción de AS, lo que evidencia que estas cepas pueden ser utilizadas en la promoción del crecimiento vegetal y para producir un formulado con aplicaciones en la agricultura en cultivos de importancia económica.

Palabras clave: ácido salicílico, rizobacterias, *Pseudomonas*, fitohormonas

### **Screening and characterization of rizobacterias associated to maize crop from different regions of Mexico to Salicylic acid production**

Salicylic acid (SA) is a plant hormone that activates the plant defense against various pathogens, given mainly for the production of siderophores, antibiosis and induction of resistance so that there is a growing interest of its

production at industrial level. It has been shown that rhizobacteria have the ability to produce metabolites of agricultural interest and the phytohormone and SA. There are reports of the use of various rhizobacteria to produce salicylic acid. The aim of this study was to characterize rhizobacteria associated with various crops in of SA production. The strains were isolated from soil samples from 5 different regions of Mexico and identified by microscopic observation and biochemical tests. Various techniques were used colorimetric and chromatographic (TLC and HPLC) for detecting the metabolite of interest. For the selection of the best strains we used a multivariate analysis of hierarchical cluster and complete linkage. According results obtained, two strain 1 and 9, characterized as *Pseudomonas fluorescens*, (isolated from vegetable crops in the regions of Villagran and Pénjamo, Gto., respectively) showed higher levels of SA production with levels of 20 to 25 ppm, while the rest are in a range 0.82 and 11.0 ppm. In literature levels of SA between 3.5 and 35.0 ppm, are reported, the obtained values of the species were found in an average value of production, but it is necessary to optimize the process. It was shown that the strains used have a good performance in the production of SA, which shows that these strains can be used in promoting plant growth and to produce a formulation with applications in agriculture in economically important crops.

Key words: salicylic acid, rhizobacteria, *Pseudomonas*, phytohormones

### **T3.7 Actividad antifúngica y fitotóxica de los extractos producidos por diferentes cepas de *Bacillus* spp.**

Erika Nava-Reyna<sup>1\*</sup>, Gergina Michelena<sup>2</sup>, José Luis Martínez-Hernández<sup>1</sup>, Anna Iliná<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma de Coahuila. V. Carranza y José Cárdenas Valdéz S/N, Col. República Ote., CP 25 000, Saltillo, Coahuila, México

<sup>2</sup>División Biotecnología, Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar. Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba \*e-mail: erinava27@hotmail.com

Se ha demostrado que algunas especies de *Bacillus* son capaces de producir una amplia variedad de metabolitos secundarios que les confiere su habilidad para el control de enfermedades en plantas. Esta investigación tuvo

como objetivo la producción de compuestos antifúngicos utilizando cepas de *Bacillus* sp. para desarrollar un producto agrícola para el control de hongos fitopatógenos. Se seleccionaron dos medios de cultivo para la producción de compuestos antifúngicos por las tres cepas probadas (*Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*), un medio básico (MA) y otro con miel final o melazas como fuente de azúcar (MB), los cuales fueron incubados a 37°C a 140 rpm y se siguió su crecimiento por absorbancia a 560 nm durante 21 horas. Se evaluó el efecto antifúngico de los extractos por el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) utilizando *Alternaria alternata* y *Fusarium sporotrichum* como hongos modelo. Se probó también la actividad fitotóxica *in vitro* de los extractos utilizando el bioensayo de fitotoxicidad aguda en semillas de lechuga y sobre hojas de romerillo. Ninguno de los extractos produjo síntomas de fitotoxicidad en las hojas de romerillo, lo que comprueba que no son tóxicos para plantas maduras. Pero todos los extractos tuvieron un porcentaje de inhibición de la germinación del 100% que indica una alta fitotoxicidad en el proceso de germinación. Por otro lado, se observó que todos los extractos del MA no alcanzaron PICR suficientemente altos para considerarse como fuente de sustancias fungistáticas. Sin embargo, los extractos presentaron propiedades fungistáticas contra *F. sporotrichum* cuando se realizó la fermentación en el MB, pero no contra *A. alternata*, lo que reflejó la utilidad de las melazas como fuente de azúcares por el favorecimiento de la síntesis de compuestos antifúngicos por las bacterias para el control de enfermedades de plantas causadas por ciertos géneros fúngicos.

Palabras clave: *Bacillus*, antifúngico, hongos fitopatógenos, enfermedades en plantas

#### Antifungal and phytotoxic activity of extracts produced by several strains of *Bacillus* spp.

It has been demonstrated that *Bacillus* strains can produce a wide variety of secondary metabolites which confers them their ability for plant's illnesses control. The developing of a novel agricultural product to phytopathogenic fungi control based in antifungal compounds produced by *Bacillus* sp. was the goal of this research. There were selected two culture mediums to produce the antifungal compounds by the three selected strains (*Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*), a basic medium (MA) and other with blackstrap molasses (MB) as sugar source, which were incubated at 37°C and growth was monitored by absorbance at 560 nm each

hour during 21 h. The antifungal effect was measured by radial growth inhibition percentage (RGIP) using *Alternaria alternata* and *Fusarium sporotrichum* as model fungi. *In vitro* phytotoxicity activity of extracts was tested by lettuce seeds germination bioassay and the phytotoxicity assay in rosemary leaves. None of extracts caused phytotoxicity symptoms in rosemary leaves, which indicate that extracts are not toxic for mature plants. However, all extracts showed a germination inhibition percent of 100% that according to Solero and Ronco, indicate a high phytotoxicity on the germination process. On the other hand, all fermentation extracts of MA medium did not reach an inhibition index high enough to be considered as fungistatic substances' sources. Nevertheless, the fermentation extracts had fungistatic activity against *F. sporotrichum* when MB medium was used for fermentation, but not against *A. alternata*, which reflects the utility of blackstrap molasses as sugar source in the culture medium for antifungal compounds' synthesis by *Bacillus* sp. to control plant illnesses caused by some fungi.

Key words: *Bacillus*, antifungal, phytopathogen fungi

#### T3.9 Análisis de expresión de dos genes que codifican proteínas de pared celular de *Mycosphaerella fijiensis*

Nuvia Kantún-Moreno<sup>1</sup>, Roberto Vázquez-Euán<sup>1</sup>, Miguel Tzec-Simá<sup>1</sup>, Ignacio Islas-Flores<sup>2</sup>, Cecilia Rodríguez-García<sup>1</sup>, Andrew James-Kay<sup>1</sup>, Leticia Peraza-Echeverría<sup>1</sup>, Rosa Grijalva-Arango<sup>1</sup>, Blondy Canto-Canché<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de biotecnología. <sup>2</sup>Unidad de bioquímica y biología molecular de plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43, No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México. \*Corresponding author. \*e-mail: cantocanche@cicy.mx

La Sigatoka negra es la principal enfermedad en los cultivos de bananos y plátanos. El agente causal es el hongo Dotideomiceto hemibiotrófico *Mycosphaerella fijiensis*. Actualmente existe poca información sobre la interacción *M. fijiensis*-*Musa* sp. Las paredes celulares del hospedante y del patógeno tienen funciones importantes ya que son las primeras barreras que protegen sus células del ataque del contrario. La pared celular fúngica es diferente en composición a la vegetal y a la bacteriana; básicamente contiene  $\beta$ -glucanos, quitina y manoproteínas. Ha sido más estudiada en levaduras pero menos

caracterizada en hongos filamentosos. Se estudió la pared celular de *M. fijiensis* con el interés de identificar proteínas que participen en su patogénesis. En este trabajo se presenta el análisis transcripcional de dos genes que presuntamente codifican  $\beta$ -1,3-Glucanosiltransferasas (Gasp), las cuales son importantes en el ensamblaje y remodelamiento de pared celular, en viabilidad y patogénesis. A partir del proteoma *in silico* de *M. fijiensis* se identificaron las proteínas MfGasp y se seleccionaron dos de los genes para evaluar su expresión mediante PCR cuantitativa. *MfGAS1* parece ser un gen constitutivo mientras que *MfGAS2* mostró regulación durante las diferentes etapas de la Sigatoka negra y en los conidios. La expresión del gen *MfGAS2* sugiere que puede estar involucrado en la patogénesis de *M. fijiensis*.

Palabras clave: Sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*, pared celular,  $\beta$ -1,3-Glucanosiltransferasas

#### Expression analysis of two cell wall genes of *Mycosphaerella fijiensis*

Black Sigatoka disease (BSD) is the major worldwide constraint for banana and plantain. The causal agent is the *Dothideomycete* hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella fijiensis*. Little is known about *M. fijiensis*-*Musa* sp. interaction. Host and pathogen cell walls play important roles because they are the respective first barriers, protecting their cells from molecules from the counterpart; cell walls are also important in various biological processes. The fungal cell wall is different in composition to plant and bacterial cell walls; basically contains  $\beta$ -glucans, chitin and mannoproteins. Fungal cell wall has been largely studied in yeast but it is poorly known in filamentous fungi. We are studying cell wall in *M. fijiensis* to further identify which cell wall proteins play important roles in *M. fijiensis* pathogenesis. Here we present the transcriptional analysis of two genes putatively codifying  $\beta$ -1,3-Glucanosyltransferases (Gasp), which are important in the assembly and remodeling of the cell wall, viability and pathogenesis. Gas proteins were identified *in silico* in the *M. fijiensis* genome. Structural analyses were *in silico* carried out. Two genes were selected for expression analysis. Transcription was studied by qPCR. *MfGAS1* seems to be constitutive. *MfGAS2* shows regulation during the different stages of the black Sigatoka disease and conidia. Expression of *MfGAS2* suggests this gene is involved in *M. fijiensis* pathogenesis.

Key words: Black Sigatoka, *Mycosphaerella fijiensis*, cell wall,  $\beta$ -1,3-Glucanosyltransferases

#### T3.10 The role of the plant cell wall in signalling and defence against phytopathogenic microorganisms

Felice Cervone

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "C. Darwin".  
Università di Roma 'La Sapienza', Piazzale Aldo Moro  
00185 Roma, Italy

The plant cell walls constitute the first line of defense against microbes. The majority of pathogenic microorganisms produce cell wall degrading enzymes (CWDEs) that are especially important for those pathogens that lack specialized penetration structures. Among the different CWDEs produced by fungi polygalacturonases (PGs) play a critical role since their action on pectin makes other cell wall components more accessible to other CWDEs. Consequently, as a strategy to optimize the action of CWDEs, PGs are often the first enzymes secreted by several pathogens growing on the plant cell walls. Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) are well characterized proteins that recognize microbial and insect PGs and interfere with the plant cell wall degradation during pathogen attacks. These proteins are leucine-rich repeat (LRR) proteins like most of the R proteins and several PAMP receptors. They not only inhibit PGs and slow down the hydrolysis of pectin but also favor the accumulation of oligogalacturonides (OGs), a class of damage-associated molecular patterns (DAMPs) that, like PAMPs, activate the plant innate immunity system. The importance of PGIPs in resistance against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* is well established: transgenic tomato and grape plants expressing a pear PGIP or transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants expressing, respectively, bean or *Arabidopsis* PGIPs are more resistant to *Botrytis* infection in greenhouse experiments. Conversely, *Arabidopsis* plants expressing an antisense pgip gene are more susceptible to this fungus.

#### T3.1C Mix infections of phytoplasma, rickettsia and potyvirus pathogens associated with Bunchy Top Symptoms in papaya 'Maradol Roja' in Cuba

K. Acosta<sup>1\*</sup>, L. Zamora<sup>2</sup>, A. Fernández<sup>1</sup>, J. Méndez<sup>3</sup>,  
M. E. Santos<sup>3</sup>, N. E. Leyva<sup>3</sup>, Y. Martínez<sup>2</sup>



<sup>1</sup>Universidad de Las Tunas. Ave. Carlos J. Finlay s/n, Reparto Santos, Las Tunas, Cuba CP 75200 \*e-mail: karel0978@gmail.com, karelap@ult.edu.cu

<sup>2</sup>National Centre for Animal and Plant Health (CENSA), San José de Las Lajas, Havana, Cuba

<sup>3</sup>Interdisciplinary Centre of Research for Integral Regional Development of National Polytechnic Institute (CIIDIR-IPN), Unit Sinaloa, Mexico

Three different papaya diseases have been previously reported in Cuba, Bunchy Top Symptom (BTS) associated with a phytoplasma of group 16SrII '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'; Papaya Bunchy Top (PBT), associated with a rickettsia and *Papaya Ring Spot Virus* (PRSV), associated with a potyvirus. Regarding the regional phytosanitary impact of three diseases for the papaya crop, the present study investigated the occurrence of possible mixed infections of phytoplasma, rickettsia and potyvirus pathogen in papaya fields in Cuba. Papaya plants showing symptoms of BTS or PBT or both and BTS or PRS or both, were collected in Las Tunas and Havana provinces from January 2008 to February 2010, and evaluated for phytoplasma and rickettsia by PCR with primers targeting the 16S ribosomal RNA gene, and the rickettsial succinate dehydrogenase (*sdhA*) gene, respectively; and for potyvirus by RT-PCR with primers amplify CP gen. Phytoplasmas and rickettsia were indistinctly detected in 76/86 papayas with BTS symptoms, and 22/22 papayas showing PBT symptoms. Phytoplasmas and rickettsia were simultaneously detected in 5/86 of the BTS symptomatic plants and 17/22 of the papayas with PBT symptoms. PRSV isolates were detected in 96/98 of BTS/PRS- affected papayas from Las Tunas. BTS and PBT were shown to occur simultaneously in papaya fields in Cuba. Mixed infections of phytoplasmas and rickettsias were revealed in 77.27% of PBT-affected papayas and in 5.81% of BTS-affected papayas; and phytoplasmas and potyvirus were amplified in 97.90% of BTS/PRS- affected papayas. Results suggest that phytoplasmas are consistently associated with BTS and PBT symptoms, and that mixed infections of both pathogens can occur, and was evident the coexistence of phytoplasma and potyvirus in eastern region.

Key works: Bunchy Top Symptoms, phytoplasmas, rickettsia, potyvirus, PCR

### **T3.2C Perfeccionamiento metodológico para evaluar Roya Parda (*Puccinia melocephala*, Sydow & P Sydow) en caña de azúcar**

Mónica Tamayo\*, Joaquín Montalbán, Yaquelin Puchades, Isabel Alfonso, Pablo Pablos, Roberto González, Reynaldo Rodríguez, Vivian Chacón

Instituto Nacional de investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera al CAI Martínez Prieto. Ciudad de La Habana. Cuba

\*e-mail: monica@etica.ciges.inf.cu

El objetivo del presente estudio consistió en aplicar el modelo AMMI como herramienta estadística a la evaluación de la respuesta de un grupo de genotipos de caña de azúcar frente a la roya común. Se utilizaron los datos correspondientes a la cepa de caña planta de un estudio en fondo de infección de roya común, plantado en la provincia Santiago de Cuba, en Septiembre del 2007. Se determinó el tamaño más frecuente de las pústulas (LP) y el tamaño de la pústula mayor (TPM) en las hojas +1, +3 y +5 y cinco momentos de evaluación (3, 4, 5, 6 y 9 meses de plantado). El análisis de varianza, para ambas variables (LP y TPM), detectó diferencias significativas entre cultivares, momento de evaluación y número de hoja evaluada, así como en las interacciones de primer y segundo orden de los factores. La aplicación del modelo AMMI, a través de la representación *Biplot*, permitió apreciar semejanzas y diferencias entre momentos de evaluación, número de hoja, y genotipos visualizando, además, los de mayor contribución a la interacción genotipo-ambiente, mayor susceptibilidad y los más estables en el nivel de reacción de respuesta frente a la roya común. Estos resultados son de utilidad para el manejo de los genotipos en cada localidad, su empleo a escala comercial y en los programas de mejora del cultivo.

Palabras clave: caña de azúcar, Modelo de efectos aditivos e interacción multiplicativa (AMMI), *Puccinia melanocephala*

### **Methodological improvement to evaluate brown rust (*Puccinia Melocephala*, Sydow & P Sydow) in sugar cane**

The aim of this study consisted in laying down new criteria to perfect the current methodology used to evaluate the resistance of varieties to sugar cane brown rust through the application of the Additive Main Effects and Multiplicative Interaction (AMMI) model as a statistical tool in the evaluation of those variables with the greatest incidence on the damage caused by the disease.

The data corresponding to two strains of plant cane and one first ratoon from three studies by infection substrate of brown rust, planted in Santiago de Cuba province in September 2007 and 2008, were used. The most frequent size of pustules (LP) and the size of the biggest pustule (TPM) on leaves +1, +3 and +5, as well as five evaluation times (at 3, 4, 5, 6 and 9 months after planting), were determined. The analysis of variance for variables (LP & TPM) found significant differences between cultivars, time of evaluation and evaluated leaf number, as well as in the first- and second-order interactions of factors. The AMMI model application through the *Biplot* representation made it possible to appreciate similarities and differences among evaluation times, leaf number and genotypes, also viewing those with the greatest contribution to the environment-genotype interaction, highest susceptibility and the most stable ones in the level of response reaction to the brown rust disease. These results are of great value in handling genotypes at every location, their commercial-scale use and in the crop breeding programmes.

Keywords: Main effects and multiplicative interaction (AMMI) model, *sugar cane*, *Puccinia melanocephala*

### **T3.3C Manejo de *Meloidogyne incognita* en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) con el empleo de lodos de depuradora**

Castro-Lizaso I<sup>1\*</sup>, Díaz-Viruliche L<sup>1</sup>, Rodríguez-Hernández MG<sup>5</sup>, Villalón-Hoffman A<sup>4</sup>, López-Pérez A<sup>2</sup>, Díez-Rojo MA<sup>3</sup>, González-López MR<sup>3</sup>, Martínez-Martínez C<sup>3</sup>, Bello-Pérez A<sup>3</sup>, Guitarra W<sup>1</sup>

Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez", San José de Las Lajas, Cuba. \*e-mail: ivanc@isch.edu.cu

En Cuba se realizan varios proyectos multidisciplinarios de investigación con diversas instituciones que estudian y proponen alternativas para una gestión agroecológica de los sistemas agrarios. Entre estas investigaciones destacan las relacionadas con la aplicación de residuos o subproductos con un gran contenido de elementos de alto valor nutricional para los cultivos. En este sentido, se han iniciado trabajos preliminares para evaluar el efecto de lodos extraídos de la depuración de aguas residuales sobre indicadores de interés en el cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), así como disminuir el efecto de fitonematodos formadores de nódulos sobre las plantas

estudiadas. Para estas investigaciones, se eligió un suelo ferralítico éutrico, en el que se estableció un diseño completamente aleatorizado de cuatro tratamientos con cinco repeticiones. Los tratamientos consistieron en mezclar el suelo con el lodo en las proporciones de 170, 180 y 190 g, además de un suelo control sin lodo, en macetas de 1 kg. Se comprobó que la mayor efectividad se obtuvo en los tratamientos donde se aplicó el lodo a razón de 180 y 190 g/kg de suelo. El control alcanzó los valores más bajos en el comportamiento de las plantas. Así mismo estos tratamientos mostraron una disminución de las poblaciones *M. incognita*; pues los índices de nodulación fueron inferiores a uno, mientras que en el control el índice fue de cinco. Por otra parte, en estas variantes las plantas tratadas presentaron un mayor vigor y calidad con valores intermedios para el tratamiento de 170 g.

Palabras clave: lodos, *M. incognita*, tabaco

### **T3.4C Uso potencial de rizobacterias para el control de patógenos fúngicos que afectan al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)**

Annia Hernández<sup>1\*</sup>, Yanelis Acebo<sup>1</sup>, Narovis Rives<sup>2</sup>, Michel Almaguer<sup>1</sup>, Teresa Rojas<sup>1</sup>, Mayra Heydrich<sup>1</sup>, M. El Jaziri<sup>3</sup>, P. Cornelis<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. \*e-mail: annia@fbio.uh.cu

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones de Granos, Cuba.

<sup>3</sup>Universidad Libre de Bruselas (ULB), Bélgica.

<sup>4</sup>Universidad Libre de Bruselas (VUB)

Una de las alternativas más prometedoras dentro del contexto agrícola mundial, lo constituye el uso de biopreparados a partir de microorganismos. Para ello se obtuvieron grupos microbianos. Entre estas, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) se destacan por sus efectos beneficiosos tanto para las plantas como para los ecosistemas. El arroz es un cultivo que brinda seguridad alimentaria a una parte de la población mundial y en Cuba el consumo per cápita actual es uno de los más altos de América Latina. Sin embargo, su productividad puede verse afectada por diversos patógenos, especialmente los de origen fúngico. Este trabajo tuvo como objetivos determinar el impacto del empleo de bacterias autóctonas en el control de patógenos fúngicos asociados al cultivo del arroz en el área objeto de estudio. En esta investigación se identificaron aislados de interés

fitopatológico pertenecientes a los géneros *Curvularia*, *Pyricularia* y *Bipolaris*. Además, se obtuvieron ocho cepas de pseudomonas fluorescentes identificadas mediante técnicas moleculares (*Pseudomonas fluorescens* AI05, AI08 y *P. putida* AI03, AI02, AJ01, AJ29, AJ30 y AJ31) con potencialidades para la promoción del crecimiento y el control biológico de los hongos fitopatógenos detectados. Bioensayos a escala de laboratorio y macetas con las cepas *P. fluorescens* AI05 (No. Acceso GenBank: HQ446870) y *P. putida* AJ31 (No. Acceso GenBank: HQ446871) demostraron su efecto en la bioprotección del cultivo contra *Pyricularia oryzae* y *Curvularia* spp. en plantas de 7, 21 y 60 días de cultivo. Estudios en HPLC-MS (Cromatografía Líquida de alta resolución-Espectro de Masas) demostraron que estas cepas producen diferentes isoformas de pioquelín (324Da), pioverdines (1160Da) y ornibactín (734Da), metabolitos que podrían estar relacionados con los efectos beneficiosos obtenidos *in vivo*. Estos resultados tienen importancia y aplicación práctica porque se denota las potencialidades de empleo de estas cepas que pueden ser incluidas en el manejo integrado de las enfermedades que afectan al cultivo del arroz.

Palabras clave: hongos fitopatógenos, Interacción planta-microorganismo, *Oryza sativa* L., rizobacterias antagonistas

#### **Potential use of rhizobacteria for the control of fungal pathogens of rice (*Oryza sativa* L.)**

One of the most promising alternatives within the world's agricultural reality is the use of bioproducts from microorganisms, using different microbial groups for it. Among them, the Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) stand out for their beneficial effects for plants and ecosystems. Rice provides food security for part of the world's population. In Cuba, per capita consumption is one of the highest of Latin America. However its productivity can be affected by several pathogens, especially fungi. This work was aimed to assess the impact of the use of autochthonous in the control of fungal pathogens associated to rice in the studied area. The results showed that phytopathogenic fungi such as *Curvularia*, *Pyricularia* and *Bipolaris* were identified. Additionally, eight strains of fluorescent pseudomonads were identified through molecular techniques (*Pseudomonas fluorescens* AI05, AI08 and *P. putida* AI03, AI02, AJ01, AJ29, AJ30 and AJ31) with potentialities for plant growth promotion and biocontrol of the detected

phytopathogenic fungi. *In vivo* bioassays in lab tubes and pots with the strains *P. fluorescens* AI05 (Access No. GenBank: HQ446870) and *P. putida* AJ31 (Access No. GenBank: HQ446871) showed their effect in the bioprotection of rice against *Pyricularia oryzae* and *Curvularia* spp. in plants of 7, 21 and 60 days old. HPLC-MS (High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry) assays demonstrated that the strains produced different isoforms of pyochelin (324 Da), pyoverdines (1160Da) and ornibactin (734Da), metabolites that could be involved in the beneficial effects observed *in vivo*. These results have relevance and practical application, since the potentialities for the use of these strains for the integrated management of rice diseases is shown.

Keywords: fungal phytopathogens, plant-microorganism interaction, *Oryza sativa* L., antagonistic rhizobacteria

#### **T3.5C Aportes al conocimiento fisiopatológico en interacciones planta-patógeno de interés para la agricultura**

Ondina León\*, María la O Echeverría, Rosemary López, Ernestina Solorzano, Belkis Peteira, Blanca de la Noval, Eduardo Gonzalez.

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA, Mayabeque, Cuba\* e-mail: ondina@censa.edu.cu

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, INCA, Mayabeque, Cuba

Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar, INICA

Los cultivos de caña de azúcar (*Saccharum* híbrido spp.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) poseen reconocidos valores alimenticios e industriales, lo que justifica la necesidad de incrementar los rendimientos en las áreas que se cultivan a nivel mundial. Sin embargo, al igual que el resto de las plantas, son afectados por diferentes microorganismos patógenos e insectos. El manejo integrado de plagas incluye diferentes tácticas, entre ellas, el empleo de variedades resistentes, considerada como una de las más eficaces para reducir el impacto de los daños que ocasionan. El desarrollo de programas de mejoramiento genético se dirige fundamentalmente a la obtención y selección de genotipos con mayor rendimiento y tolerancia a plagas, que contribuyan a incrementar la variabilidad genética disponible con una mejor adaptación a condiciones de bajos insumos. Uno

de los elementos de mayor relevancia para el logro de esta meta, es el conocimiento de la variabilidad de los patógenos y de la fisiopatología de las interacciones con sus plantas hospedantes. El presente trabajo abarca un conjunto de investigaciones encaminadas a identificar la presencia de potyvirus que afectan las poáceas en Cuba, con vistas a lograr una mayor eficiencia del programa de selección de variedades resistentes de caña de azúcar a este grupo viral y al estudio de interacciones planta-patógeno de alta complejidad y escasa información que permitieron realizar aportes de alcance mundial en algunos casos. Los resultados se estructuran en dos partes. La primera, presenta la identificación de los potyvirus que afectan a la caña de azúcar y al *Sorghum halepense* L. Pers, así como los estudios bioquímicos, moleculares y genómicos de las interacciones con los hongos *Puccinia melanocephala* H & P Sydow y *Sporisorium scitamineum* (Syd) M. Piepenbr., M. Stoll & Oberw., agentes causales de las enfermedades denominadas roya común y carbón de la caña, respectivamente. La segunda parte comprende el estudio de la fisiopatología de la interacción entre el hospedante tomate y el hongo *Alternaria solani* (Ellis & Martín) Jones & Grouet, agente causal de la enfermedad tizón temprano e incluye la evaluación del efecto de los hongos micorrízicos de forma independiente y combinados con el inductor sistémico sobre la activación de mecanismos defensivos de las plantas y en la reducción del grado de afectación producido por diversas enfermedades fungosas, entre ellas el tizón temprano. Los principales resultados obtenidos en el estudio de la familia *Potyviridae*, la más numerosa y compleja de todas las que afectan las plantas, permitieron definir la presencia de dos potyvirus diferentes: SCMV (*Sugarcane mosaic virus*) y MDMV (*Maize dwarf mosaic virus*) presentes en las poáceas en Cuba. De igual forma, los resultados alcanzados en el análisis de las interacciones hospedante-patógeno complementan el cuadro integral de la respuesta defensiva de las plantas, establecen los elementos básicos para investigaciones de genómica funcional y comparativa y aportan las bases para la genotipificación molecular de las principales fuentes de resistencia, lo cual podría ser de gran valor para los mejoradores con vistas a lograr programas de obtención y selección de variedades resistentes por vías tradicionales y/o biotecnológicas. De gran interés resultó también, el efecto en el cultivo de tomate de los hongos micorrízicos *Glomus clarum* y *Glomus fasciculatum* de forma independiente y combinados respectivamente, con la sistémica

en la reducción del grado de afectación de diversos patógenos foliares y radicales que proporcionan los fundamentos para futuros estudios que permitan definir su empleo en el manejo integrado de las enfermedades estudiadas.

### **T3.6C Understanding the plant resistance to biotic and abiotic factors**

Orlando Borrás-Hidalgo

Center for Genetic Engineering and Biotechnology,  
Havana, 10600, Cuba e-mail:  
orlando.borras@cigb.edu.cu

Modern-day plants are products of eons of evolution from primal living organisms in response to abiotic and biotic environmental changes. Plants, in nature, are generally resistant to most pathogens. The ability of a pathogen to cause disease in a host plant is usually the exception, not the rule. The interactions between plants and pathogens are specific, complex and dynamic. On the other hand, in the natural environment, plants often grow under unfavorable conditions, such as drought, salinity, chilling, freezing, high temperature, flooding, or strong light. These conditions are known collectively as abiotic stresses, and any of them could delay the growth, development and reduce the productivity. Our group carried out several strategies to identification, characterization and functional analysis of plant genes involved in resistance and tolerance to biotic and abiotic factors. We use SuperSAGE and microRNA technology combined with next-generation sequencing and gene function analysis to characterize the biotic and abiotic stress. Finally, we show some results related with the use of promissory plant genes to confer high resistance or tolerance to biotic and abiotic stress.

Keywords: Innate immunity, SuperSAGE, microRNA

### **T3.7C Determinación de la actividad fitotóxica de la fase acuosa y del extracto orgánico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en hojas de bananos**

Jenella Garraway<sup>1</sup>, Nayanci Portal González<sup>1\*</sup>, Karlina García Sosa<sup>3</sup>, Ermis Yanes<sup>2</sup>, Barbarita Companioni<sup>2</sup>, Luis Manuel Peña Rodríguez<sup>3</sup>, Ramón Santos Bermúdez<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Ciego de Ávila 'Máximo Gómez Báez'. Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila. Cuba \*e-mail: nayanci@agronomia.unica.cu

<sup>2</sup>Centro de Bioplantitas. Universidad de Ciego de Ávila "Máximo Gómez Báez". Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila. Cuba

<sup>3</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Mérida. Yucatán. México

El Mal de Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, se encuentra entre las diez enfermedades más importantes en la agricultura. En los mecanismos de interacción planta patógeno se plantea que son imprescindibles las proteínas de avirulencia emitidas por el patógeno para que ocurra el reconocimiento inicial y la inducción de la respuesta defensiva de la planta contra el patógeno. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* es un hongo necrotrófico, sus fitotoxinas juegan un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad. En previos trabajos se ha obtenido un filtrado de cultivo de 15 días con actividad fitotóxica diferencial frente cultivares susceptible y resistente a la enfermedad, además se ha obtenido un extracto orgánico con mayor actividad biológica en el cultivar resistente. En el presente trabajo se determina la actividad fitotóxica de la fase acuosa y del extracto orgánico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en hojas de bananos en tres intervalos de tiempo. La fase acuosa no tuvo actividad biológica sobre el cultivar susceptible 'Gros Michel' y el cultivar resistente 'FHIA-01' al Mal de Panamá. Con la aplicación simultánea de la fase acuosa y extracto orgánico se logra diferenciar entre los cultivares susceptible y resistente a la enfermedad. Palabras clave: filtrado de cultivo, Mal de Panamá, resistente y susceptible.

#### **Determination of the phytotoxic activity of the aqueous phase and the organic extract of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana leaves**

Panama disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, is among the ten most important diseases in the agriculture. In the interaction mechanisms the pathogen-plants are indispensable for avirulence proteins emitted by the pathogen for the initial recognition occurs and the induction of the defensive answer of the plant against the pathogen. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* is a necrotrophic fungus, its phototoxin play a fundamental role in the development of the disease. In previous works a culture filtrate of 15

days was obtained with differential phototoxic activity in susceptible and resistant plants to the disease, an organic extract was also obtained with more biological activity in resistant plants. This present work determines the phototoxic activity of the aqueous phase and the organic extract of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in leaves of banana plants in three intervals of time. The aqueous phase doesn't have biological activity on the susceptible plant 'Gros Michel' and resistant plant 'FHIA-01' to the Panama disease. With the simultaneous application of the aqueous phase and organic extract is possible to differentiate among the susceptible and resistant plants to the disease.

Key words: culture filtrate, Panama disease, resistant and susceptible

#### **T3.8C Analysis of response of two silencing events immune to TYLCV in different tomato genotypes under extreme conditions**

Natacha Carlos<sup>1\*</sup>, Yoslane Ruiz<sup>1</sup>, Danay Callard<sup>1</sup>, Yadira Sánchez<sup>1</sup>, Ernesto González<sup>1</sup>, Osvaldo Oliva<sup>1</sup>, Mayte Piñón<sup>2</sup>, Rosa María Hernández<sup>2</sup>, Vivian Doreste<sup>1</sup>, Ángela Sosa<sup>1</sup>, Aneisi Reyes<sup>1</sup>, Jorge López<sup>1</sup>, Merardo Pujol<sup>1</sup>, Alejandro Fuentes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Avenida 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 10 600, Cuba \*e-mail: natacha.carlos@cigb.edu.cu

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova, Habana, Cuba

*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) is considered the most important threat to tomato production around the world. One of the ways to control the tomato yellow leaf curl disease is the induction of the post-transcriptional gene silencing mechanism directed against replication associated viral gene, *c1*. *C1* is the only viral protein really required for replication of TYLCV. Two transgenic tomato events were developed to produce a double RNA hairpin structure which induces the silencing process against *C1*. Both events reflect an immune phenotype after inoculation of TYLCV and they are stably inherited for at least six plant generations. The transference of these silencing events to other tomato varieties could enlarge the repertoire of varieties resistant to TYLCV. This would help producers to satisfy a more demanding market. The present work aims to analyze the TYLCV resistance of the silencing events above mentioned in two varieties from tomato national

production programs that have acquired this character by induced sexual crosses. The evaluation of these new genotypes was carried on under inoculation of TYLCV in open field conditions during the summer season. Symptoms severity in plants carrying transgene was determined according to Lapidot scale. Dot blot hybridization reflected the levels of TYLCV genome in inoculated plants. TYLCV accumulation in some plants points to the presence of some kind of factor(s) or situation in which the silencing mechanism can be suppressed in extreme conditions of summer. The resistant phenotype characterized all tomato genotypes carrying silencing transgenes.

Keywords: silencing, tomato genotypes, TYLCV

### **Análisis de la respuesta de dos eventos de silenciamiento inmunes a TYLCV en diferentes genotipos de tomate bajo condiciones extremas.**

El *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) es considerado la más importante amenaza a la producción de tomate en todo el mundo. Una de las formas de controlar la enfermedad del encrespamiento y amarillamiento de la hoja del tomate es la inducción del mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional dirigido contra *c1*, gen viral asociado a la replicación. *C1* es la única proteína viral realmente requerida para la replicación de TYLCV. Se desarrollaron dos eventos transgénicos de tomate para producir una estructura de horquilla de doble cadena de ARN que induce el proceso de silenciamiento contra *C1*. Ambos eventos reflejan un fenotipo inmune después de inoculación con TYLCV y son heredados establemente por al menos seis generaciones de plantas. La transferencia de estos eventos de silenciamiento a otras variedades de tomate ampliará el repertorio de variedades resistentes a TYLCV. Esto puede ayudar a los productores a satisfacer un mercado más exigente. El presente trabajo tiene como objetivo analizar la resistencia a TYLCV de los eventos de silenciamiento antes mencionados, en dos variedades de tomate de los programas de producción nacional que han adquirido este carácter por cruzamiento sexual inducido. La evaluación de estos nuevos genotipos se llevó a cabo bajo inoculación con TYLCV en condiciones de campo abierto durante el verano. Con el empleo de la escala de Lapidot, se estimó la severidad de los síntomas en las plantas que portan el transgén. La hibridación por *Dot blot* reflejó los niveles de TYLCV en plantas inoculadas. La acumulación de TYLCV en

algunas plantas apunta a la presencia de algún factor/factores o situación en la que el mecanismo de silenciamiento puede ser suprimido en condiciones extremas de verano. El fenotipo resistente caracterizó todos los genotipos de tomate que portan los transgenes de silenciamiento.

Palabras clave: silenciamiento, genotipos de tomate, TYLCV

### **T3.9C Influence of leaf scald in sugar cane juice quality**

Mario Alberto Casas<sup>1\*</sup>, Dolores Piñón<sup>1</sup>, Juana Pérez<sup>1</sup>, Miguel Ramos-Leal<sup>2</sup>, Carlos W. Rodríguez<sup>2</sup>, Joaquín Montalván<sup>1</sup>, María Estrella Legaz<sup>3</sup>, Carlos Vicente<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Plant Protection Department, National Sugar Cane Research Institute, km 2½ CUJAE Rd., 19390 Rancho Boyeros, Havana, Cuba.

\*e-mail: mcasas@inica.minaz.cu

<sup>2</sup>Department Microbiology, Faculty of Biology, Universidad de La Habana, 25 y J, Vedado C .Habana, Cuba

<sup>3</sup>Plant Biology Department, Faculty of Biology, Universidad Complutense de Madrid, 28 040 Madrid, Spain

Leaf scald is a sugar cane systemic disease having the Gram negative bacterium *Xanthomonas albilineans* as casual agent and becoming nowadays a major disease according to reports of damages and yield losses caused to the crops worldwide. The plant may or may not develop the typical disease symptoms whether the cultivar is resistant or the bacterium is in a latent phase masking some other non observable features. Studies of the disease have been carried out in different directions but a few is known about the influence of the bacterial infection in the quality of juices. In this work juice quality indicators (Brix grade, Pol %, reducing sugars, starch, purity, invertase activity, sucrose level and xanthan content) were measured in non inoculated and *X. albilineans* inoculated treatments in whole juice samples and fractionated ones of cultivars My5514 and C88-382, reported as resistant and susceptible to leaf scald respectively. Results lead to confirm alterations caused by the infection in the juice quality being in general of less magnitude in the resistant cultivar as should be expected with the consequent implications in the industrial production of sugar and other juice derivatives.

Key words: juice quality, leaf scald, sugarcane, *Xanthomonas albilineans*

### **Influencia de la escaldadura foliar en la calidad del jugo de la caña de azúcar**

La escaldadura foliar es una enfermedad sistémica de la caña de azúcar, causada por la bacteria Gram negativa *Xanthomonas albilineans*, considerándose en la actualidad una enfermedad principal del cultivo por los daños y pérdidas que causa en el mundo. La planta puede o no desarrollar los síntomas típicos de la enfermedad tanto si el cultivar es resistente o no a la enfermedad, o si la bacteria se encuentra en fase latente. Los estudios de la enfermedad han estado dirigidos a diferentes aspectos, pero poco se conoce acerca de la influencia de la infección bacteriana en la calidad de los jugos. En este trabajo diferentes indicadores de calidad de los jugos (Brix, Pol %, azúcares reductores, almidón, pureza, actividad invertasa, nivel de sacarosa y contenido de xantano), fueron determinados en tratamientos inoculados y no inoculados con *Xanthomonas albilineans* en jugos completos y fraccionados de los cultivares My5514 y C88-382, informados como resistente y susceptible a la enfermedad respectivamente. Los resultados confirman alteraciones causadas por la infección en la calidad de los jugos, con las implicaciones consecuentes en la producción industrial del azúcar y otros derivados, siendo como es de esperar de menor magnitud en el cultivar resistente.

Palabras clave: calidad del jugo, caña de azúcar, escaldadura foliar y *Xanthomonas albilineans*

### **T3.10C Genes de resistencia al carbón útiles para la selección de variedades de caña de azúcar**

María de los Angeles Zardón Navarro<sup>\*1</sup>, María La O Hechavarría<sup>1</sup>, Miguel Sautié Castellanos<sup>2</sup>, Yaquelin Puchades Izaguirre<sup>1</sup>, José María Mesa López, Yatali Montero-Sánchez Rojas<sup>3</sup>, Leonor Sabina Medina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Carretera CUJAE km 2 ½, Boyeros, La Habana, Cuba. e-mail: mzardon@inica.minaz.cu; e-mail: inica@inica.minaz.cu

<sup>2</sup>Centro de Cibernética Aplicada a la Medicina. Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, Cuba. Calle 146 Esq. 31 #3102. Playa. La Habana, Cuba. e-mail: cecam@cecam.sld.cu

<sup>3</sup>Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (Sede Boyeros) Carretera CUJAE km 2 ½, Boyeros, La Habana, Cuba

La resistencia a enfermedades es uno de los elementos más importantes en los programas de mejoramiento y selección de variedades. Por ello es crucial la identificación de genes de resistencia mediante procedimientos de Biología molecular y Bioinformática. Con este propósito se seleccionaron 243 transcritos asociados a la interacción caña de azúcar-carbón, procedentes de estudios de expresión diferencial previamente realizados. Estas secuencias se analizaron empleando varios programas dirigidos a la predicción de secuencias codificadoras de proteínas, dominios funcionales así como a la asignación de categorías de la Ontología de genes (funciones biológicas, procesos moleculares y componentes celulares). Asimismo, se buscaron en bases de datos del NCBI secuencias muy similares (*Evalue* < 10<sup>-20</sup> en BLASTn y <10<sup>-4</sup> BLASTp) relacionadas con otros tipos de estrés biótico y abiótico. Teniendo en cuenta diferentes criterios se seleccionaron 15 secuencias génicas para el diseño de cebadores específicos. Posteriormente, se llevó a cabo un experimento en condiciones controladas; esporas de este hongo, previamente cultivadas en medio Papa-Dextrosa-Agar, fueron inoculadas en cinco cultivares susceptibles y cinco resistentes. Además, se emplearon controles sin inocular. Se tomaron las muestras a las 24 h y a los siete días posteriores a la inoculación. En todos los cultivares resistentes inoculados se demostró la presencia de 13 de los 15 segmentos génicos; en los cultivares susceptibles inoculados se encontró la presencia de dos de los genes estudiados. Se evidenció la expresión constitutiva de cuatro de los genes estudiados, solo en los cultivares resistentes. Estos genes serían de gran utilidad para el programa de selección de variedades de caña de azúcar.

Palabras clave: bioinformática, expresión diferencial, mejoramiento genético

### **Smut resistance genes useful for sugarcane varieties selection**

The resistance disease is one of the most important elements in the breeding programs as well as in the varieties selection. For this reason it is crucial the identification of the resistance genes using the techniques of Molecular Biology and Bioinformatics. With this aim, 243 different transcripts related to sugarcane-smut interaction were chosen from previous differential expression studies. These sequences were analyzed using some bioinformatics' tools for predicting coding sequences, functional domains, as well as for assigning functional categories from Gene

Ontology (biological function, molecular process and cellular component). Moreover, in NCBI data bases very similar sequences were found (*Evalue* < 10<sup>-20</sup> en BLASTn y <10<sup>-4</sup> BLASTp) associated with other kinds of abiotic and biotic stresses. Taking into account different criteria 15 gene sequences were selected for designing specific primers. An experiment was performed in controlled conditions; five cultivars susceptible and five resistant to smut were inoculated with smut spores, previously cultivated in Potato-Dextrose-Agar medium. A control group was not exposed to smut. It was taken samples 24 h and seven days after de inoculation. In all inoculated resistant cultivars it was demonstrated the presence of 13 of the 15 genes; on the other hand, in susceptible inoculated cultivars it was seen only two of this genes. We observed that four of the chosen genes had constitutive expression, only in resistance cultivars. These genes would be very useful for the sugarcane varieties selection program.

**Key words:** Bioinformatics, differential expression, genetic breeding

### **T3.11C Development of a monoclonal Antibody-based TAS-ELISA for quantitative detection of *Mycosphaerella fijiensis* antigens**

A. J. Otero<sup>1</sup>, J. Sarracent<sup>2</sup>, H. Hernández<sup>2</sup>, M. Sánchez<sup>3</sup>, D. Muirragui<sup>3</sup>, M. Villamar<sup>3</sup>, D. Moreta<sup>3</sup>, M. I. Jiménez<sup>3</sup>, L. Pérez<sup>4</sup>, R. H. Maribona<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centre for Protein Studies, Faculty of Biology, Havana University, Havana, Cuba

<sup>2</sup>Pedro Kourí Institute of Tropical Medicine, Havana, Cuba

<sup>3</sup>Centre for Biotechnological Research of Ecuador (CIBE), Superior Polytechnic School of Litoral (ESPOL), Guayaquil, Ecuador

<sup>4</sup>Plant Health Research Institute, Havana, Cuba

Black Sigatoka caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet is the most dangerous and devastating disease of banana around the world. Disease control is carried out by integrating cultural, genetic and chemical measures. *Mycosphaerella musicola* has been replaced by *M. fijiensis* wherever Black Sigatoka has been introduced in America and elsewhere and remains as a significant problem at sites located at relatively high altitudes. To optimize fungicide applications for disease management a presymptomatic quantification of fungal proteins in leaves is desirable. In this study, we describe

the generation of a mouse monoclonal antibody (Mab) reactive to a high-molecular weight antigens from *M. fijiensis* mycelial single ascospore *in vitro* culture, but not reactive to mycelial antigens from *M. musicola*, *M. musae* and *M. minima* single ascospore cultures. A rabbit-specific polyclonal antibody against the same *M. fijiensis* antigen, reactive also to fungal secreted proteins, was able to discriminate naturally *M. fijiensis* infected from healthy leaves as well as other concomitant fungi. The Mab was used as a capturing reagent and the polyclonal preparation as a second antibody for a triple antibody enzyme linked immunosorbent assay able to quantify mycelial protein antigens in a range of 10–40 µg/ml and differentiate it from healthy banana leaf extracts. The aim of this study was the analytical setting up of a Mab-based immunoassay for the quantification of mycelial and secreted proteins of *M. fijiensis*. It is intended for the further establishment and optimization of an asymptomatic leaf assay for an improved forecast and warning system applied to Black Sigatoka disease management.

### **T3.12C *Fusarium oxysporum* un complejo de especies. Estudio de caso: variabilidad y evolución de la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* agente causal del Mal de Panamá y avances en el diagnóstico**

Luis Pérez Vicente

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Ministerio de Agricultura.

*Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr., es un complejo de especies de hongos anamórficos morfológicamente similares que contienen saprófitos, antagonistas y fitopatógenos causantes de marchiteces y *damping off* en un gran número de plantas. Uno de los problemas al estudiar microorganismos fitopatógenos es la definición de la población, problema complejo en *F. oxysporum* donde falta una clara delineación de las especies. Los aislamientos con un rango de hospedantes idéntico o similar han sido clasificados en más de 150 formae speciales y la interpretación evolutiva, es que cada una son monofiléticas y derivadas de un genotipo patogénico. Las razas de *F. oxysporum* han sido definidas según la especificidad a nivel del genotipo de la planta hospedante y alternativamente, por la capacidad de infectar un cultivar particular como en el caso de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*). En los estudios de diversidad se han utilizado marcadores más estables (VCGs, isozimas, DNA *fingerprinting*,



RFLP, RAPDs, AFLP, cariotipo electroforético y análisis de las secuencias del ADN) para la delimitación de las especies y rangos subespecíficos. Los análisis de secuencias de los espacios ITS e IGS del rADN, de la  $\beta$ -tubulina, han permitido definir a *F. oxysporum* como un complejo de especies. El Mal de Panamá causado por *Foc* es una destructiva enfermedad de las musáceas. El patógeno infecta las raíces de los genotipos susceptibles y se desarrolla a través del sistema vascular causando una marchitez letal. Las poblaciones de *Foc* han sido diferenciadas en función de la patogenicidad (R1, R2, R4 subtropical y R4 tropical), la compatibilidad vegetativa (21 VCGs), el cariotipo electroforético y en linajes a partir de análisis de RFLP, RAPD PCR y AFLP. La raza 1 afecta el cultivo 'Gros Michel' y 'Manzano' y fue causante de pérdidas por más de 2,300 millones de USD. Hasta los 90s, los Cavendish solo se habían visto afectados bajo condiciones de estrés de temperatura (R4 subtropical en Islas Canarias, África del Sur, Australia, Brasil y Taiwán). El mercado actual de bananos Cavendish representa casi 4 mil millones de USD. A principios de los 90s aparecieron en el sudeste asiático, poblaciones de *Foc* (RT4, VCG 01213) capaces de infectar los Cavendish en los trópicos y los genotipos que ocupan el 80% de la superficie cultivada mundial y no existen medidas eficientes de control. La introducción a América de *Foc* RT4 puede tener un fuerte impacto económico y social. Los factores que contribuyeron a la diseminación e impacto de la raza 1 en América permanecen presentes. En Cuba se informó la presencia de los VCGs 01210, 0124, 0124/0125 y 0128 así como que la actual clasificación de razas aunque útil no tiene sentido genético. Las poblaciones de *Foc* son de origen polifilético. Han sido desarrollados sistemas diagnósticos por PCR y qPCR para la identificación de las razas existentes. Diferentes linajes afectan diferentes cultivares y los genes subyacentes para la resistencia en bananos y la virulencia *Foc* pueden diferir en cada situación; nuevos parentales pueden ser necesarios para controlar *Foc* RT4 y otras razas que puedan surgir en el futuro.

### **T3.13C Specific qPCR diagnostic of tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, causal agent of *Fusarium* wilt or Panama disease of banana**

Luis Pérez-Vicente<sup>1\*</sup>, Einar Martínez-de la Parte<sup>2</sup>, Orlando Borrás-Hidalgo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Plant Health Research Institute (INISAV). Ministry of Agriculture. Havana city. Cuba.

\*e-mail: lperezvicente@inisav.cu

<sup>2</sup>Central Plant Quarantine Laboratory. National Centre of Plant Health, Ministry of Agriculture. Havana city. Cuba. e-mail: micologia@sanidadvegetal.cu

<sup>3</sup>Genetic Engineering and Biotechnology Centre (CIGB). State Council, Siboney, Havana city, Cuba. e-mail: orlando.borras@cigb.edu.cu

*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (*Foc*) is one of the most important pathogens affecting banana. The disease has a long incubation period that difficult an early diagnostics and complicates the development of epidemiological and control studies. Total DNA from two isolates belonging to race 1 (*Foc* R1, VCG 01210 and 0124), nine race 2 isolates (*Foc* R2, VCGs 0124, 0124/0125, 0128 and 1210), five Nit M isolates of tropical race 4 (VCG 01213), one isolate of subtropical race 4, three isolates Nit M (VCGs, 0120, 0123 and 0124/0125) as well as isolates of *F. oxysporum* associated to necrotic lesions in banana roots and *F. pallidoroseum* from banana crown rot lesions, were purified. Identities of the TR4 isolates were confirmed by PCR analysis. The intergenic spacer region (IGS) of the nuclear ribosomal operon, were amplified using the primers combination CNS1-CNL12, and amplicons were sequenced. Based on nucleotide polymorphisms, pairs of primers for PCR and qPCR diagnostics tools were developed to quantitative identification of *Foc* races TR4 (qFocR4T-f and qFocR4T-r1) and R1/R2 (qFocR1R2-f and qFocR1R2-r) for isolates or banana infected tissues. Validation of these PCR-based diagnostic tools involved *Foc* isolates and infected tissues, as well as *F. oxysporum* associated to necrotic lesions in banana roots and *F. pallidoroseum* from banana crown rot lesions from Cuba. These PCR procedures are advanced tools that will contribute to get a better understanding of *Foc* epidemiology, host-pathogen interaction, efficacy of different management tools and an early diagnostic of an eventual *Foc* TR4 outbreak in the country.

Palabras clave: fungal disease, molecular tool, plant pathogen interaction

### **T3.14C Caracterización bioquímica de la respuesta defensiva de plantas de *Musa* sp. ante la inoculación con *Mycosphaerella fijiensis*, en casa de cultivo**

Cynthia Sánchez-García, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Mileidy Cruz-Martín, Michel Leiva-Mora y Berkis 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

Aún es muy limitado el conocimiento de los eventos bioquímicos involucrados en la interacción *Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis*, por lo que su estudio resulta de gran interés para la comunidad científica. El objetivo de este trabajo fue caracterizar mediante herramientas bioquímicas la interacción compatible e incompatible en dos genotipos de *Musa* inoculados con *M. fijiensis* en casa de cultivo. Se realizó una caracterización fenotípica de ambos genotipos ('Grande naine' y 'Calcutta 4'), se detectó la presencia de compuestos bioquímicos en los diferentes estados de síntomas y se cuantificó su acumulación en el tiempo después de la inoculación. Como resultado, se observó la presencia de deposiciones de lignina, así como la acumulación de peróxido de hidrógeno y de compuestos fenólicos en el tejido vegetal correspondiente a cada estado de síntoma, lo cual aumentó a medida que estos evolucionaron. Esta acumulación se observó en mayor grado en el tejido vegetal de las plantas de 'Calcutta 4'. Se comprobó además, que hubo un incremento significativo en la actividad peroxidasa, PAL y  $\beta$ -1,3 glucanasa, así como en el contenido de fenoles totales, anión superóxido y antocianinas, en las plantas inoculadas de dicho genotipo, respecto a las plantas no inoculadas; y que este incremento fue mayor en comparación con las plantas de 'Grande naine'. Se demostró la relación entre el aumento de estos compuestos bioquímicos y la respuesta de la planta ante la inoculación del patógeno, en ambos tipos de interacción. Además, que la inducción de la mayoría de ellos estuvo relacionada directamente con la aparición de los primeros síntomas, la que ocurrió más tempranamente en la interacción incompatible. Estos resultados ofrecen nuevas evidencias de los mecanismos de respuesta defensiva de las plantas de *Musa* spp. ante la infección con *M. fijiensis*, a la vez que brindan nuevas herramientas para los programas de mejoramiento genético para el control de la enfermedad.

Palabras clave: 'Calcutta 4', 'Grande naine', Sigatoka negra

### T3.15C Actividad antimicrobiana de exudados foliares de diferentes líneas de tabaco por el método de microdilución

Capdesuñer Y\*, Quiñones J<sup>1</sup>, Borrás O<sup>2</sup>, Mock HP<sup>3</sup>, Hernández M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ingeniería metabólica, Centro de Bioplasmas CP 69 450, Cuba \*e-mail: ycapdesuner@bioplasmas.cu

<sup>2</sup>Laboratorio de genómica funcional de Plantas. Centro de ingeniería Genética y Biotecnología. CP 10 600, Cuba

<sup>3</sup>Applied Biochemistry Group, IPK Gatersleben, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. D-06466. Germany

Uno de los retos del mejoramiento genético de cultivos con usos para la agricultura es lograr la resistencia a enfermedades ocasionadas por microorganismos, y en particular por hongos que son los microorganismos más agresivos. El objetivo de este estudio preliminar fue determinar el efecto de exudados foliares de líneas de tabaco en el crecimiento de hongos fitopatógenos para seleccionar candidatos vegetales potenciales en el control de enfermedades en el cultivo del tabaco y enfermedades de plantas, por mejoramiento genético o explorando la posibilidad de usar los extractos foliares como antimicrobianos de origen natural. Se evaluó la actividad antimicrobiana de ocho extractos foliares diclorometánicos de diferentes líneas de tabaco contra seis hongos fitopatógenos: (*Verticillium dahliae*, *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora infestans*). Los exudados foliares se obtuvieron sumergiendo las hojas de plantas crecidas en casas verdes. El perfil de diterpenos y ésteres de azúcares se determinó por HPLC. El efecto inhibitorio del crecimiento de microorganismos se obtuvo utilizando el método de microdilución. Los resultados indicaron que las líneas Nic 1006, Nic 1016 y Nic 1019 exhibieron una tendencia disminuir el crecimiento de *R. solani* (más del 70 % de inhibición del crecimiento). Se observaron diferencias significativas en Nic 1016 a la concentración de 500 µg/ml. A partir de extractos foliares provenientes de un experimento independiente se obtuvo inhibición del crecimiento para el caso de las líneas Nic 1016, Nic 1019 and Nic 1061 y *Phytophthora infestans* y *Phytophthora parasitica* en algunos casos usando una concentración de 250 y 125 µg/ml. Nic 1061 y Nic 1019 mostraron también inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysp* f. sp. *cubense*. Estas líneas tienen en común el perfil de ésteres

de azúcares y pueden ser candidatos potenciales para el control de enfermedades ocasionadas por microorganismos.

Palabras clave: exudados foliares, hongos fitopatogénicos. microdilución, *Nicotiana tabacum*

#### **Antimicrobial activity of leaf exudates from different tobacco lines by microdilution method**

One of the challenges of genetic improvement of cultivars for agriculture uses is to get resistance to plant microbial diseases, in particular, fungi being the most aggressive. The aim of this preliminary study was to determine the effect of certain leaf exudates components on the growth of some phytopathogenic fungi to later on select potential candidates for controlling tobacco or plant diseases by genetic improvement of tobacco lines or exploring the possibility of using antimicrobial compounds extracted from tobacco leaf exudates. Eight dichloromethane leaf exudates from eight different tobacco lines were investigated for antifungal activity against six phytopathogens (*Verticillium dahliae*, *Phytophthora aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora infestans*). We obtained the leaf exudates by dipping all the leaves of three plants growing in greenhouse conditions. The sucrose esters and diterpenoids profiling was done by HPLC. Subsequently the inhibitory effect of exudates at various concentrations was determined by microdilution method. Results indicated that the lines Nic 1006, Nic 1016 and Nic 1019 exhibited a tendency of antifungal activity against *R. solani* in these conditions (more than 70 % of percentage of growth inhibition). Significant differences were observed in Nic 1016 at the concentration of 500 µg/ml of the crude extract. Results of the lines Nic 1016, Nic 1019 and Nic 1061 from other independent experiment showed a tendency to growth inhibition effect in *Phytophthora infestans* and *Phytophthora parasitica* in some of the cases using the concentration of 250 and 125 µg/ml of the crude extract. Nic 1061 and Nic 1019 showed also inhibition effect in *Fusarium oxysporum*. These lines have in common the sucrose ester profile and could be potential candidates for controlling these fungal diseases.

Key words: leaf exudates, Phytopathogenic fungi, microdilution, *Nicotiana tabacum*

#### **T3.18C Identification and functional analysis of genes involved in host defense to *Verticillium* in Tomato**

Ermis Yanes-Paz<sup>1,3\*</sup>, Sajid Rehman<sup>1</sup>, Yuling Bai<sup>2</sup>, Ramón Santos Bermudez<sup>3</sup>, Orlando Borrás-Hidalgo<sup>4</sup>, Bart P.H.J. Thomma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, The Netherlands. \*e-mail: eyanes@bioplantas.cu

<sup>2</sup>Laboratory of Plant Breeding, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, The Netherlands.

<sup>3</sup>Bioplas Center, Ciego de Avila, Cuba.

<sup>4</sup>Center 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. In the present work we present the progress of the project 'Unravelling the molecular basis of *Verticillium* wilt diseases in *Nicotiana* species to be applied in Cuban tobacco cultivars'. In a first series of experiments we aimed to identify key components involved in the interaction between *Verticillium* and tomato. For that purpose 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. Ve1 transgenic MoneyMaker was used as a resistant line. A total number of 176 selective primer combinations were tested and 1434 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). Five candidates were selected and the role on HR and fungal biomass was investigated. In a second series of experiments, we present the results on the determination of Ve1 expression patterns by using reciprocal grafting and expression of Ve1 promoter: GUS fusions in tomato and *Arabidopsis*.

Key words: cDNA-AFLP, tomato, *Verticillium*, VIGS

#### **Identificación y Análisis Funcional de genes involucrados en la defensa de la planta a *Verticillium***

A pesar de la importancia económica de *Verticillium* spp, se sabe poco acerca de las bases moleculares de la patogenicidad de *Verticillium* y la resistencia de la planta a este hongo. En este trabajo presentamos los resultados relacionados con el proyecto “Estudio de las bases moleculares de las enfermedades causadas por *Verticillium* en especies de *Nicotiana* para su aplicación a la mejora del tabaco en Cuba”. En una primera serie de experimentos nos trazamos como objetivos la identificación de componentes claves involucrados en la resistencia del tomate a *Verticillium*. Con ese fin se realizó un análisis transcriptómico en líneas de tomate del cultivar MoneyMaker, resistentes y susceptibles infectadas con la raza 1 de *Verticillium* con el empleo de cDNA-AFLP. Como línea resistente se empleó MoneyMaker sobreexpresando en gen *Ve1*. Se probaron un total de 176 combinaciones de cebadores y se identificaron un total de 1434 transcriptos expresados diferencialmente. Debido a que los transcriptos que se sobreexpresaron en el cultivar resistente luego de la inoculación con *Verticillium* (302) pueden estar involucrados en la resistencia, fueron analizados usando silenciamiento usando vectores virales. Se estudió el papel sobre la respuesta de hipersensibilidad y el crecimiento fúngico de cinco candidatos seleccionados. En una segunda serie de experimentos, se determinaron los patrones de expresión de *Ve1* usando injertos recíprocos y la expresión de fusiones promotor de *Ve1*: GUS en tomate y *Arabidopsis*.

Palabras clave: cDNA-AFLP, tomate, *Verticillium*, Silenciamiento de genes

### **T3.19C Patrón de expresión de una lipasa tipo-GDSL en las interacciones compatible y no compatible entre bananos- *Mycosphaerella fijiensis* Morelet**

Mairenys Concepción<sup>1\*</sup>, Orelvis Portal<sup>1</sup>, Neyda Bacallao<sup>1</sup>, Mayra Acosta-Suárez<sup>1</sup>, Berkis Roque<sup>1</sup>, Milady Mendoza-Rodríguez<sup>1</sup>, Monica Hofte<sup>2</sup>, Elio Jiménez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central ‘Marta Abreu’ de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara 54 830, Cuba e-mail: mairenys@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Faculty of Bioscience Engineering. Ghent University. Coupure Links 653, Gent 9000, Belgium

La Sigatoka negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis*, es la enfermedad foliar más devastadora

que afecta a los bananos y plátanos. Sin embargo, los estudios de este patosistema a nivel molecular son aun limitados. Recientemente se describieron patrones de expresión diferencial de genes en el cultivar ‘Grande naine’ durante la interacción compatible. Uno de los genes que se sobreexpresa en etapas tardías de la infección codifica para una lipasa tipo-GDSL. En otros patosistemas, este gen está relacionado con la resistencia a patógenos de forma directa mediante la ruptura de hifas y esporas, e indirectamente mediante la inducción de una respuesta de defensa mediada por etileno. Por lo cual, la lipasa tipo-GDSL identificada pudiera modular la respuesta de la planta frente a *M. fijiensis*. Para dilucidar el papel de la lipasa tipo-GDSL en el patosistema *Musa-M. fijiensis* se compararon sus perfiles de expresión en respuesta a la infección con *M. fijiensis* mediante PCR cuantitativo en las interacciones compatible (‘Grande naine’) e incompatible (‘Calcutta 4’). En el cultivar susceptible se observó una sobreexpresión significativa al tercer día después de la inoculación, lo cual coincide con el período de penetración del hongo y que va disminuyendo en el tiempo, mientras que en el cultivar resistente la expresión de la lipasa tipo-GDSL es reprimida. Este resultado pudiera indicar un posible papel de esta enzima en procesos de susceptibilidad, aunque son necesarios otros estudios para comprobar esta hipótesis.

Palabras clave: lipasa, patogénesis, RT-PCR cuantitativo, Sigatoka negra, transcripción

### **Expression profile of a GDSL-like lipase during compatible and incompatible interactions between banana and *Mycosphaerella fijiensis* Morelet**

Black leaf streak disease caused by *Mycosphaerella fijiensis* is the most harmful foliar disease affecting bananas and plantains worldwide. Nevertheless, studies of this pathosystem at molecular level are very limited. Recently, differential expression profiles of genes activated in the ‘Grande naine’ cultivar during compatible interaction were described. One of these genes encodes a GDSL-like lipase which is overexpressed in late stages of the infection. In other pathosystems, this gene is related to direct antifungal activity by disrupting fungal hyphae and spores, and indirectly through induction of ethylene-mediated defence response. Therefore, the identified GDSL-like lipase could modulate the plant response to *M. fijiensis*. To elucidate GDSL-like lipase role in *Musa-M. fijiensis* pathosystem, expression profiles during compatible (‘Grande naine’) and incompatible

('Calcutta 4') interactions were compared through quantitative PCR. In the susceptible cultivar a significant overexpression was observed three days after fungus inoculation, which is in consonance with fungal entry into the plant leaf, while in the resistant cultivar the GDSL-like lipase expression is repressed. This result could indicate a possible role of this enzyme on susceptibility processes, although further studies are necessary to prove this hypothesis.

Keywords: black Sigatoka, lipase, pathogenesis, quantitative RT-PCR, transcription

### **T3.20C Uso del sistema de la proteína de fusión MBP para incrementar la solubilidad y el recobrado de la toxina recombinante Cry1Fa1 de *Bacillus thuringiensis* expresada en *Escherichia coli***

Daily Hernández Hernández<sup>1</sup> \*, Ernesto M. González Ramos<sup>2</sup>, Lianet Rodríguez-Cabrera<sup>1</sup>, Ivis Morán-Bertot<sup>1</sup>, Milagro Ponce Castillo, Pilar Téllez-Rodríguez<sup>1</sup>, Camilo Ayra-Pardo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Biología Ambiental y <sup>2</sup>Laboratorio de Purificación de Proteínas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Habana 10 600, Cuba \*e-mail: daily.hernandez@cigb.edu.cu

La toxina Cry1Fa1 de *Bacillus thuringiensis* (Bt) es altamente específica para diferentes insectos lepidópteros que representan plagas de importancia económica para los cultivos. Además, el gen *cry1Fa1* ha sido introducido en plantas de maíz transgénico disponibles comercialmente, para conferir protección al menos contra cinco plagas de insectos del hemisferio Occidental. En Cuba, la variedad de maíz transgénico que expresa la toxina *cry1Fa1* ha sido introducida comercialmente en la agricultura desde el 2009 para proteger al maíz del ataque de su plaga principal: la palomilla del maíz [*Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)]. Con el objetivo de producir cantidades suficientes de la proteína Cry1Fa para la realización de bioensayos de laboratorio con larvas colectadas en el campo, para monitorear la resistencia al insecto, así como para el desarrollo de un ensayo inmunoquímico para la Bt-Cry1Fa1, el gen de la *cry1Fa1* fue clonado del *B. thuringiensis* y se probó su expresión en *Escherichia coli*. Debido a que la expresión de la protoxina Cry1Fa1 en *E. coli* y la cepa no cristalina IPS 78/11 de *B. thuringiensis* bajo diferentes señales de transcripción (promotores) y condiciones de cultivo produce inclusiones cristalinas con muy baja solubilidad en las

diferentes soluciones tampón probadas, se procedió a expresar la forma activa de la toxina Cry1Fa1 como una proteína de fusión con la MBP (Proteína de unión a la maltosa). La proteína de fusión recombinante MBP-Cry1Fa1 mostró un peso molecular aproximado de 100 kDa y presentó una expresión y solubilidad incrementadas en *E. coli*. La proteína MBP fue usada como un marcador de afinidad para la purificación del producto recombinante en una columna que contenía amilosa. Finalmente, la toxina Cry1Fa1 fue obtenida de forma pura después de cortar la proteína con una serina proteasa de tipo tripsina.

Palabras clave: insectos lepidópteros, maíz, proteína, toxina

### **Use of the MBP-fusion protein system to enhance solubility and recovery of the recombinant *Bacillus thuringiensis* Cry1Fa1 toxin expressed in *Escherichia coli*.**

*Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Fa1 toxin is highly specific for different lepidopteran insects that represent pests of economically important crops. Moreover, *cry1Fa1* gene has been introduced in commercially available transgenic maize plants to confer protection from at least five insect pests of the Western hemisphere. In Cuba, a transgenic maize variety expressing the Cry1Fa1 toxin has been commercially introduced in the agriculture since 2009 to protect maize from infestations with the major crop pest: the fall armyworm [*Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)]. In order to produce enough Cry1Fa protein for laboratory-conducted bioassays of field-collected larvae for insect resistance monitoring, as well as, for the development of a Bt-Cry1Fa1 immunochemical assays, the *cry1Fa1* gene was cloned from *B. thuringiensis* and the expression attempted in *Escherichia coli*. Since recombinant expression of Cry1Fa1 protoxin in *E. coli* and the acrySTALLIFEROUS *B. thuringiensis* IPS 78/11 strain under different transcription signals (promoters) and growth conditions yielded crystal inclusions with a very low solubility in the different buffers tested, we proceeded to express the activated form of Cry1Fa1 toxin as a MBP (Maltose Binding Protein)-fusion protein. The recombinant MBP-Cry1Fa1 fusion protein showed around 100 kDa of molecular size and had an enhanced expression and solubility in *E. coli*. Then, MBP was used as an affinity tag for purification of the recombinant product in a commercial amylose column. Finally, the Cry1Fa1 toxin core was obtained in purified form after cleaving MBP with the trypsin serin-protease.

Keywords: lepidoptera insects, maize, protein, toxin

### **T3.21C Nuevos elementos genéticos involucrados en la resistencia a *Bacillus thuringiensis* en *Plutella xylostella***

Lianet Rodríguez-Cabrera<sup>1</sup>, Camilo Ayra-Pardo<sup>1\*</sup>, Asim Gulzar<sup>2</sup>, Ivis Morán-Bertot<sup>1</sup>, Ben Raymond<sup>3</sup>, Denis J. Wright<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Environmental Biotechnology Department, Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), Havana 10 600, Cuba \*e-mail: camilo.ayra@cigb.edu

<sup>2</sup> Division of Biology, Department of Life Sciences, Faculty of Natural Sciences, Imperial College London, Silwood Park campus, Ascot, Berkshire SL5 7PY, UK

<sup>3</sup> School of Biological Sciences, Royal Holloway University of London, Egham, Surrey, TW20 0EX, UK

La explotación amplia y sostenible del entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) en el control de plagas y el uso de las plantas transgénicas que expresan las toxinas de *Bt* se enfrentan continuamente a la evolución de resistencia en los insectos. Sin embargo, las bases moleculares de la resistencia aún se desconocen en gran medida. En el presente trabajo se combinaron la hibridación substractiva con supresión y la supresión de la expresión génica para identificar las bases moleculares de la resistencia a *Bt* en la polilla de la col *Plutella xylostella*. Se aislaron los transcritos de los genes expresados diferencialmente en el intestino de las larvas no tratadas de poblaciones resistentes y susceptibles genéticamente similares, así como, de larvas tratadas con *B. thuringiensis kurstaki* HD1 (DiPel). El análisis cuantitativo por RT-PCR en tiempo real confirmó una expresión basal diferencial de un grupo de estos genes y reveló nuevas características de la regulación génica en el intestino larval durante la patogénesis de *Bt*. Tres nuevos genes de *P. xylostella*, dos relacionados con la respuesta a estrés y uno que codifica para una metaloproteasa, se seleccionaron por su perfil de expresión para la evaluación funcional y se clonaron. La supresión de la expresión génica de estos genes por interferencia de ARN incrementó la patogenicidad de *Btk* hacia todos los insectos, siendo el incremento significativamente superior en las poblaciones resistentes. Estos resultados proveen de nuevas pistas sobre la resistencia y la respuesta del hospedante a la infección por *Bt*. Potencialmente, estos genes pueden ser utilizados como blanco en la generación de nuevas estrategias para el manejo de la insecto

resistencia a *Bt* y el incremento de la potencia insecticida de las toxinas Cry de *Bt*.

Palabras clave: Bt-cultivos, Bt resistencia, expresión génica, genómica funcional

### **New genetic elements involved in resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella***

The widespread and sustainable exploitation of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) in pest control and more recently, the use of toxin-expressing transgenic '*Bt*-crops', is continuously challenged by the evolution of resistance. However, the molecular basis of much of this resistance is poorly understood. Here we used a combination of suppressive subtractive hybridization and gene expression suppression to identify molecular components required for *Bt* resistance in the diamondback moth *Plutella xylostella*. We isolated transcripts from genes that were differentially expressed in the midgut of untreated insect larvae from genetically similar resistant and susceptible populations and in larvae following ingestion of *B. thuringiensis kurstaki* HD1 (DiPel). Quantitative real-time RT-PCR analysis confirmed the differential basal expression of a subset of these genes and revealed new features of gene expression regulation in the larval midgut during *Bt* pathogenesis. Based on their expression profiles, three novel *P. xylostella* genes encoding two stress-responsive genes and a metalloproteinase were cloned and chosen for functional analysis. Gene expression suppression of these genes by environmental RNA interference increased the pathogenicity of *Btk* in all insects; however this effect was significantly stronger in the *Bt* resistant populations. Our results provide new clues about resistance and host responses to *Bt* infections. Potentially, these genes can be targeted to engineer new strategies of *Bt* resistance management and to enhance the activity of *Bt* Cry toxins.

Key words: Bt-crops, Bt Resistance, Gene Expression, Functional genomics

### **T3.22C Caracterización molecular de diferentes aislados de *Phytophthora nicotianae* agente causal de la enfermedad pata prieta en *Nicotiana tabacum* L.**

Yussuan K. Silva\*, Eduardo Canales, Orlando Borrás Hidalgo

Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT). Dirección Postal: 32 500. \*e-mail: yussuan@iitabaco.co.cu; tarminastir36@gmail.com

*Phytophthora nicotianae* es un patógeno de suelo que ataca a numerosas plantas ornamentales, de interés agrícola y hortícola tales como tomate, cítrico y tabaco. En los últimos años el PCR convencional y en tiempo real han surgido como herramientas fundamentales para el diagnóstico fitosanitario y los estudios filogenéticos de las especies del género *Phytophthora* sp. Numerosas regiones del ADN del patógeno han sido seleccionadas para estos objetivos tales como los espaciadores internos que se transcriben (ITS), sin embargo, en especies muy relacionadas las secuencias de esta región son ineficientes para una discriminación de las mismas. Los intrones y los fragmentos intergénicos de las regiones nucleares y mitocondriales han mostrado variabilidad suficiente y por tanto son más efectivas para el desarrollo de un diagnóstico más preciso en la detección de este patógeno, por ejemplo está la región intergénica espaciadora de las mitocondrias (*mt DNA- IGS*) y el gen *ypt1*. La diversidad genética en *Phytophthora* ha sido investigada en el gen par A1 que codifica para una familia de elicinas. La expresión del gen de la elicina par A1 produce HR y SAR en la interacción incompatible de *Nicotiana tabacum*-*P. nicotianae*. La diversidad genética de 40 aislados cubanos de *P. nicotianae* fue realizada con la amplificación por PCR de los genes ITS, *ypt1* y par A1. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del Genbank y se realizaron alineamientos para encontrar las diferencias y similitudes entre ellas y los aislamientos de otras regiones previamente depositadas e informadas. Las secuencias obtenidas constituyen los primeros informes de secuencias genómicas en aislados cubanos de *P. nicotianae* en Cuba.

Palabras clave: *Phytophthora nicotianae*, ITS, Interacción planta-patógeno, Diversidad genética

#### **Molecular characterization from different *Phytophthora nicotianae* isolates, causal agent of black shank disease in *Nicotiana tabacum* L.**

*Phytophthora nicotianae* is a common and destructive pathogen of numerous ornamental, agronomic and horticultural crops such as tomato, citrus and tobacco. In recent years conventional and real-time PCR has emerged as an important tool for diagnosis and phylogenetics

related to *Phytophthora* species. Several DNA target regions has been selected to research this issue such as the Internal Transcribed Spacers (ITS); however in some cases the ITS sequences are not sufficient variable to discriminate and detect closely taxa or races. Introns and intergenic fragments of the nuclear and mitochondrial genome has showed variable enough and therefore more effective to develop an accuracy diagnostic to the plant pathogens for example intergenic mitochondrial DNA spacer (*mt DNA- IGS*) and *ras* related protein (*ypt 1* gene). Genetic diversity has been researched on the *Phytophthora* elicins, like an elicin Par A1 encoded by a multi-gene family. HR and SAR on Tobacco are current by the expression of the gene throughout the *Nicotiana tabacum*-*P. nicotianae* interactions. A portion of intergenic mitochondrial DNA region (*mt DNA- IGS*), ITS, *ypt 1* gene and a fragment of the par A1 elicin gene of *P. nicotianae* were amplified and sequenced in forty pathogenic isolates. Sequence analyses were performed showing in diagram alignments variable and conserved regions. The sequences that were obtained represent a first approach to Cuba in the genetic analysis of *P. nicotianae* isolates that affect every year dark tobacco varieties in the crops.

Key words: *Phytophthora nicotianae*, ITS, Interaction plant-pathogens, Genetic variability

#### **T3.23C Molecular characterization of begomoviruses (family Geminiviridae) affecting solanaceous crops and weeds in Cuba**

Elvira Fiallo-Olivé<sup>1,2\*</sup>, Yamila Martínez<sup>1</sup>, Jesús Navas-Castillo<sup>2</sup>, Enrique Moriones<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup>Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', La Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), 29 750 Algarrobo-Costa, Málaga, España \*e-mail. elvira@censa.edu.cu

The genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) is composed of viruses containing circular single stranded DNA as genetic material, which infect a large number of plant species, causing economic losses in different crops. The wide host range of their vector, the whitefly *Bemisia tabaci*, contributes to the widespread of begomoviruses. In this work we present the characterization of isolates belonging to five new species of bipartite begomoviruses from Cuba (*Tomato yellow leaf*

*distortion virus*, *Tobacco yellow crinkle virus*, *Rhynchosia rugose golden mosaic virus*, *Rhynchosia golden mosaic Havana virus* and *Sida yellow mottle virus*) and two new strains (*Sida golden mosaic Florida virus*-*Malvastrum* and *Sida golden yellow vein virus*-*Malvastrum*) by using rolling circle amplification. Two of the new species were found infecting economically important crops (tomato, pepper and tobacco), while the other three new species and the two new strains were identified infecting weeds [*Rhynchosia minima* (L.) DC., *Sida rhombifolia* L. and *Malvastrum coromandelianum* (L.) Garcke]. The novel begomoviruses have the typical genome organization of the bipartite New World begomoviruses and are phylogenetically related to species from Central America, Florida and the Caribbean. We also found that the bipartite begomoviruses identified are involved in recombination events with other begomoviruses from nearby countries, which probably contributed to their evolution. We also found that *Tomato yellow leaf curl virus*, Israel strain (TYLCV-IL) is the predominant begomovirus in tomato and pepper crops in Cuba, and it is even found in mixed infections with *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (genus *Crinivirus*, family *Closteroviridae*), another virus transmitted by whiteflies. This is the first identification of a member of the genus *Crinivirus* in Cuba.

Palabras clave: *Begomovirus*, cultivos, arvenses

#### **Caracterización molecular de begomovirus (familia *Geminiviridae*) que afectan cultivos solanáceos y arvenses asociadas en Cuba**

El género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*) está compuesto por virus que contienen ADN circular de simple cadena como material genético e infectan un gran número de especies vegetales, lo que causa pérdidas económicas en diferentes cultivos. Ello está dado en gran medida porque el vector que los transmite, la mosca blanca *Bemisia tabaci*, tiene un amplio rango hospedante. En este trabajo se describe la caracterización, mediante el empleo de la amplificación por círculo rodante, de cinco nuevas especies de begomovirus bipartitos de Cuba (*Tomato yellow leaf distortion virus*, *Tobacco yellow crinkle virus*, *Rhynchosia rugose golden mosaic virus*, *Rhynchosia golden mosaic Havana virus* y *Sida yellow mottle virus*), así como dos nuevas cepas (*Sida golden mosaic Florida virus*-*Malvastrum* y *Sida golden yellow vein virus*-*Malvastrum*). Dos de las nuevas especies se encontraron en cultivos de importancia económica (tomate, pimiento y

tabaco), mientras que las otras tres especies y las dos nuevas cepas se encontraron infectando arvenses [*Rhynchosia minima* (L.) DC., *Sida rhombifolia* L. y *Malvastrum coromandelianum* (L.) Garcke]. Los begomovirus caracterizados presentan la organización genómica típica de los begomovirus bipartitos del Nuevo Mundo y están relacionados filogenéticamente con begomovirus de América Central, la Florida y el Caribe. En esta investigación se demuestra que los begomovirus bipartitos que se identificaron están involucrados en eventos de recombinación con otros begomovirus de regiones geográficas cercanas a Cuba, lo que probablemente contribuyó a la evolución de los mismos. En este trabajo se determina asimismo que *Tomato yellow leaf curl virus*, cepa Israel (TYLCV-IL) es el begomovirus predominante en el cultivo del tomate y del pimiento en Cuba, y que se encuentra incluso en coinfecciones con *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*), otro virus transmitido por mosca blanca. Ésta es la primera identificación de un miembro del género *Crinivirus* en Cuba.

Keywords: *Begomovirus*, crops, weeds

#### **Sesión IV: Metabolitos secundarios de plantas / Plant secondary metabolites**

##### **T4.1 Antioxidant activity of *Smilax spinosa* Mill. root extract**

Shanda Y. Solis<sup>1\*</sup>, Horng-Liang Lay<sup>2</sup>, Tsai-Bor Yen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Tropical Agriculture and International Cooperation. Parque Tecnológico. Universidad Nacional de Ingeniería UNI Nicaragua

<sup>2</sup>Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, R.O.C, 912

*Smilax spinosa* Mill. is popularly used in Nicaragua's traditional medicine, however, studies on its antioxidant properties are few. Scientific evidence is required to verify its medicinal effects. In this research, the antioxidant activity of the root's methanolic extract (ME) and its ethyl acetate (EA), *n*-butanol and water soluble fractions were investigated. Phenols and flavonoids were present in all four extracts in relatively high concentrations. EA fraction revealed the highest (95.56 mg/g DW) gallic acid equivalence (GAE) at a concentration of 0.5 mg/ml. Quercetin equivalence was also higher (173.93 mg/g DW) in EA fraction at 5 mg/mL. All 4 solvent extracts demonstrated a 1,1-Diphenyl-



2-Picrylhydrazyl (DPPH) scavenging capacity and Iron (II) chelating activity above 70%. The cytotoxic effect of *S. spinosa* root EA fraction on the proliferation of human liver cancer cells (HepG2) was demonstrated. At 1500 µg/mL EA fraction was capable of interrupting the development and proliferation of 100% of the HepG2 cells. In addition, EA fraction was capable of protecting human healthy liver cells (FL83B) viability against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress. At 12.5 µg/ml the EA fraction enhanced a protective effect on cells viability allowing 77% survival rate. Results gave a scientific support to the antioxidant properties of *S. spinosa* root *in vitro*. Further evaluation on the specific flavonoids present in the root, its antioxidative properties and cytotoxicity *in vivo* is needed to ensure functionality and safety.

Key words: antioxidant, cell viability, cytotoxicity, flavonoid, *Smilax spinosa* Mill

#### Actividad antioxidante del extracto de la raíz de *Smilax spinosa* Mill.

*Smilax spinosa* Mill. es popularmente utilizada en la medicina tradicional nicaraguense, sin embargo, los estudios relacionados a sus propiedades antioxidantes son pocos. Se hace necesaria la investigación científica para verificar sus efectos medicinales. En este trabajo, la actividad antioxidante del extracto metanólico (EM) de la raíz y sus fracciones solubles de acetato de etilo (AE), *n*-butanol y agua fueron investigados. Se demostró la presencia de polifenoles y flavonoides en el extracto metanólico, así como en sus fracciones solubles en concentraciones relativamente altas. La fracción de AE demostró el equivalente de ácido gálico (EAG) más alto (95.56 mg/g PS) a una concentración de 0.5 mg/ml. La equivalencia a la quercetina en la fracción AE (173.93 mg/g PS) fue también mayor en 5 mg/ml. Las cuatro fracciones demostraron una capacidad de captación de 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y actividad quelante de hierro (II) mayor a 70%. El efecto citotóxico de la fracción AE de la raíz de *S. spinosa* sobre la proliferación de células cancerosas de hígado humano (HepG2) fue demostrado. A una concentración de 1,500 µg/mL, la fracción AE fue capaz de interrumpir el desarrollo y proliferación del 100% de las células HepG2. Además, la fracción AE fue capaz de proteger la viabilidad de células sanas de hígado humano (FL83B) contra el estrés oxidativo inducido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A una concentración de 12,5 µg/mL la fracción AE ejerció un efecto protector sobre las células permitiendo una supervivencia

del 77%. Los resultados dieron un soporte científico a las propiedades antioxidantes del extracto de la raíz de *S. spinosa* Mill *in vitro*. Una evaluación profunda de los flavonoides específicos presentes en la raíz, sus propiedades antioxidantes y su citotoxicidad *in vivo* se hace necesaria para asegurar su funcionalidad y seguridad.

Palabras clave: antioxidante, citotoxicidad, flavonoide, viabilidad celular, *Smilax spinosa* Mill.

#### T4.4 Biological activities of *Duabanga grandiflora* (ROXB. ex DC.) Walp. and *Diospyros cauliflora* blume and their secondary metabolites

Wanida Auamcharoen<sup>1\*</sup>, Angsumarn Chandrapatya<sup>1</sup>, Anake Kijjoa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, 50 Ngamwongwan Road, Bangkok 10900 Thailand

<sup>2</sup>ICBAS-Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar and CIIMAR, Universidade do Porto, 4099-003- Porto, Portugal

Insecticidal activities of wild plant species of Thailand are still lacking, so it is interesting to study their biological activities on insect under laboratory condition and secondary metabolites of these plants. The objectives of this study are to investigate the biological activities of the crude extracts of *Duabanga grandiflora* and *Diospyros cauliflora* against diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) and rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) and to isolate and identify the secondary metabolites from both plants. The dried powdered of stem branches of *D. grandiflora* and roots of *D. cauliflora* were extracted with methanol at room temperature to give methanol crude extract which was dissolved and sonicated in chloroform. The chloroform extract was subjected to column chromatography, eluting with mixture of petroleum ether/chloroform and chloroform/acetone in various proportions. The compounds were purified by crystallization and preparative TLC of silica gel. The structure of the compounds were elucidated by analyses of spectroscopic methods and comparison with the literature data. Crude methanol extracts of *D. grandiflora* and crude chloroform extract of *D. cauliflora* exhibited feeding deterrence activity to the third instar *P. xylostella* larvae on the leaf disc choice and no choice tests but did not show any toxicity on the same insect. On the other hand, the crude methanol extract of *D. grandiflora*

showed low toxicity on *S. oryzae* adult in the no choice test using treated filter paper and rice grains. In contrast, this extract showed high repellency effect in the choice test using treated filter paper. Chloroform extract of *D. grandiflora* furnished betulinic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, oleanolic acid, acacetin, vanillic acid, 6H-dibenzo[*b,d*]pyran-3,9-dihydroxy-6-one, apigenin, arjunolic acid, 3-glycosyl- $\beta$ -sitosterol, acacetin 7-O-glucoside (tilianin), 4-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-3'-methoxyellagic acid whereas chloroform extract of *D. cauliflora* yielded a new compound of 3, 4-dihydro-4 $\beta$ ,6-dihydroxy-5-methoxy-2 $\alpha$ -methyl-1(2*H*)-naphthalenone, besides, lupeol, betulinic acid, 7-hydroxy-4'-methoxyflavone (pratol), 2,5-dimethyl-7-hydroxychromone, vanillic acid and nicotinamide. The information from these studies not only provides an insight on phytochemical and bioinsecticidal properties of the selected plant species, but also exploits as an alternative way to control such pests for safe and environmental friendly situation.

**Key words:** Biological activity, *Duabanga grandiflora*, *Diospyros cauliflora*, Secondary metabolites

#### **T4.5 Inducción de callos de *Canavalia ensiformis* alternativa en la producción de metabolitos secundarios *in vitro***

Liliana Rocío Botero Botero<sup>1\*</sup>; Juan Fernando Saldarriaga<sup>2</sup> Diego Martínez Rivillas<sup>3</sup>; Carolina Montoya Vallejo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Grupo de investigación en Biotecnología, Biodiversidad y Bioingeniería (GRINBIO). Universidad de Medellín. Dirección postal 1983 e-mail: lbotero@udem.edu.co; <sup>2</sup>jfsaldarriaga@udem.edu.co, <sup>4</sup>caromontoya@udem.edu.co,

<sup>2</sup>Grupo de Investigación Biología CES-EIA, Universidad CES

*Canavalia ensiformis* es una leguminosa originaria de India y Centroamérica. Esta planta es usada popularmente para el control de plagas en algunas zonas del Urabá antioqueño. *C. ensiformis* posee las proteínas concanavalina A y B, el aminoácido canavanina y la proteína ureasa relacionados con el control de plagas y con las propiedades anticancerígenas descritas para esta especie. El cultivo *in vitro* de callos y suspensiones celulares es una metodología que permite controlar y optimizar condiciones como pH, temperatura, iluminación, nutrientes y reguladores de crecimiento. El establecimiento y multiplicación callogénica es el primer paso para obtener suspensiones celulares que permitan

realizar procesos de elicitación y cultivo en biorreactor con el fin de obtener los metabolitos secundarios mencionados. En este estudio se determinó el efecto conjunto de las longitudes de onda lumínica (luces roja, amarilla, azul y blanca, y oscuridad) y reguladores de crecimiento, utilizando combinaciones de ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D), en diferentes concentraciones. Después de 30 días de cultivo se evaluó cuantitativa y cualitativamente el desarrollo de los callos. Los resultados permitieron establecer que la mejor respuesta callogénica se presentó usando luz blanca y una combinación de auxinas de AIA 1 mg l<sup>-1</sup> y ANA 0,5mg l<sup>-1</sup>. Estos resultados indican además que el 2,4 D inhibe la multiplicación, mientras que las otras auxinas promueven la elongación celular y la formación de calo. Además no se evidenciaron diferencias significativas en la multiplicación callogénica respecto a la longitud de onda lumínica. La inducción y multiplicación callogénica obtenida en este estudio es el primer paso para estudios de elicitación y obtención de metabolitos secundarios presentes en *C. ensiformis*.

**Key words:** cultivo *in vitro*, *Canavalia ensiformis*, luz

#### **Callus induction of *Canavalia ensiformis*: alternative in the production of secondary metabolites *in vitro***

*Canavalia ensiformis*, is a legume native from India and Central America. This plant is popularly used to pests control in some areas of Uraba. *C. ensiformis* has proteins concanavalin A and B, urease and canavanine amino acid, related to pest control and anti-cancer properties described for this species. Callus culture and cell suspension are useful technics to control and optimize factors like pH, temperature, light, nutrients and growth regulators. Both Induction and calli cultivation are the first step to obtain cell suspension that allow elicitation and culture in bioreactors in order to obtain the secondary metabolites mentioned. In this study, the combined effect of light wavelengths (red, yellow, blue and white and dark) and growth regulators, using combinations of naphthaleneacetic acid (NAA), indoleacetic acid (IAA) acid and 2, 4 dichlorophenoxyacetic (2.4 D) in different concentrations Calli development was evaluated quantitatively and qualitatively after 30 days. Results show that the best callogenic response was obtained using white light in combination of both IAA 1 mg l<sup>-1</sup> and NAA 0.5 mg l<sup>-1</sup> These

results indicate that 2.4 D is inhibitory for calli multiplication, while the others auxins used on this work promotes the cell elongation and callus growth. Results did not show significant differences in callogenic multiplication in relation to wavelength of light. Both induction and calli multiplication obtained in this study are the first step to elicitation studies and secondary metabolites production in *C. ensiformis*.

Key words: cultivo *in vitro*, *Canavalia ensiformis*; light quality

#### **T4.6 Optimization of the biomass production and cardenolide biosynthesis in micropropagating *Digitalis purpurea* L. by improving the bioreactor design**

André Gerth<sup>1\*</sup>, Anika Schumann<sup>1</sup>, Diana Claus<sup>1</sup>, Elio Jimenez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>BioPlanta GmbH, Deutscher Platz 5, 04103 Leipzig, Germany. \*e-mail: info@bioplanta-leipzig.de

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara, Villa Clara. CP 54830, Cuba

Cardiotonic glycosides mostly extracted from leaves of different *Digitalis* species are used for treatment of heart disease. The commercial production of bioactive secondary metabolites by traditional farming methods is an inefficient process affected by climatic conditions and soil. *In vitro* culture techniques have been extensively studied to improve the biosynthesis of specific secondary plant metabolites. Approaches to influence the growth conditions and the cardenolide content in the bioreactor by different kinds of lighting (LED or fluorescence light), types of immersion system (backflow of nutrient media via compressed air or gravity), bioreactor material (glass vessels or PET as disposables) and the position between light source and culture vessel (vertical or horizontal) are discussed. *In vitro* shoots of *D. purpurea* were cultured in 5 L bioreactor vessels for four weeks using the temporary immersion system (TIS). Applying disposables as bioreactor type caused in a 1.7-fold higher biomass production compared to the control standard TIS. HPLC analysis revealed the presence of lanatoside C, digoxin, gitoxin and digitoxin for all examined conditions. Related to the biomass production the highest content of cardiotonic glycosides was determined applying LED as lighting and using gravity for the backflow of nutrient medium (in respect to the fresh

weight). Although the lowest concentration of cardenolides was received in culturing *D. purpurea* in disposables (0.67-fold lower than control, respectively), the highest amount in relation to the total content of measured cardenolides produced in four weeks in the different variants was determined by applying disposables as bioreactor vessel. In conclusion, combining the different parameters for high biomass production and high biosynthesis of cardiotonic glycosides resulted in an advanced TIS design which has to be evaluated for improved yield and quality.

Key words: *Digitalis purpurea*, temporary immersion system, cardiotonic glycosides

#### **T4.8 Establecimiento de cultivos *in vitro* de plántulas, raíces, callos y células de *Hamelia patens***

David Paniagua-Vega<sup>1</sup>, Carlos M. Cerda-García-Rojas<sup>2</sup>, Ana C. Ramos-Valdivia<sup>1\*</sup>

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN),

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

<sup>2</sup>Departamento de Química. México, D. F. 07360.

\*e-mail: aramos@cinvestav.mx

La planta *Hamelia patens* (*Rubiaceae*) produce diferentes metabolitos secundarios destacando, por su gran interés farmacológico, los alcaloides oxindol-monoterpénicos (AOM) que son compuestos con un alto grado de oxidación. Los cultivos *in vitro* son una alternativa para la producción e investigación de la biosíntesis de los alcaloides. El objetivo de este trabajo fue establecer, a partir de semillas silvestres de *H. patens*, cuatro tipos de cultivos *in vitro* y comparar sus perfiles de producción de AOM y/o sus precursores por HPLC. Para cada cultivo se evaluaron de dos a cuatro medios de cultivo. El establecimiento *in vitro* de plántulas micropropagadas (Hpp1) se realizó a partir de explantes meristemáticos y axilares de plántulas germinadas de semillas silvestres desinfectadas de *H. patens*, en medio de cultivo basal Nitsch y Nitsch modificado (NNm) semisólido, adicionado con 2% (p/v) de sacarosa sin el uso de fitohormonas e incubadas bajo fotoperiodo de 16 h a 25 ± 2 °C. El cultivo de raíces (Hpr1) se hizo a partir de Hpp1 en medio líquido basal completo Murashige y Skoog (MS) con 2% (p/v) de sacarosa sin fitohormonas, subcultivando cada mes en luz continua a 100 rpm. Para la inducción

de callos Hpc1 se utilizaron hojas y tallos de Hpp1 en medio basal completo Gamborg B-5 (B5) semisólido, suplementado con polivinilpirrolidona (PVP) y picloram, incubados con un fotoperiodo de 16 h y subcultivando cada mes. El cultivo de células (Hpcel1) en suspensión se realizó a partir de callos utilizando el medio de cultivo líquido B5 con PVP y picloram, en luz continua a 100 rpm y subcultivando cada 20 días. El cultivo Hpp1 de dos meses produjo  $8.10 \pm 1.50$  mg/g P.S. de AOM, es decir dos veces más que las hojas de plantas silvestres. Los cultivos Hpr1, Hpc1 y Hpcel1 sólo produjeron derivados triptamínicos.

Palabras clave: Alcaloides oxindol-monoterpénicos, cultivos *in vitro*, *Hamelia patens*

#### **Establishment of *in vitro* plantlet, root, callus and cell cultures of *Hamelia patens***

*Hamelia patens* (Rubiaceae) is a tropical plant that produces several secondary metabolites of pharmacological interest as the highly oxidized monoterpenoid oxindol alkaloids (MOA). *In vitro* cultures have been considered as an alternative for alkaloid production and for the study of its biosynthesis. The aim of this work was to achieve the *in vitro* establishment of four types of cultures from wild seeds of *H. patens* and to determine their production profiles of MOA and/or their precursors by HPLC. For each culture, it was evaluated from two to four different culture media. Micropropagated plantlets (Hpp1) were achieved from meristems and axillary explants of *H. patens* seedlings germinated from wild seeds. *In vitro* plantlets were cultured in modified Nitsch and Nitsch (NNm) semisolid basal medium, with sucrose (2%), and without phytohormones, incubating at  $25 \pm 2$  °C under 16 h light photoperiod. The root cultures (Hpr1) came from Hpp1 plantlets; they were cultivated on the complete basal liquid medium Murashige and Skoog (MS) with sucrose (2%), and propagated each month in continuous light at 100 rpm. Callus (Hpc1) were obtained from leaf and stem explants of Hpp1 on complete Gamborg B-5 (B5) semisolid basal medium supplemented with polyvinylpyrrolidone (PVP) and picloram, incubating under a 16 h light photoperiod. The cell suspension cultures (Hpcel1) were performed in suspension from callus using the B5 liquid culture medium and picloram with PVP, under continuous light at 100 rpm, subculturing every 20 days. Hpp1 after two months produced  $8.10 \pm 1.50$  mg of MOA/g dry weight, which represents twice the alkaloids present in the leaves of wild

plants. Hpr1, Hpc1 and Hpcel1 cultures produced tryptamine derivatives.

Key words: *Hamelia patens*, *in vitro* cultures, monoterpenoid oxindol alkaloids

#### **T4.10 Establecimiento y elicitación de células cultivadas en suspensión e inmovilizadas de *Thevetia peruviana***

Mario Arias Zabala\*, Mónica Juliana Angarita, Juan Manuel Restrepo, Ana María Aguirre, Juan Pablo Arias\*

Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín. Núcleo el Volador, Calle 59ª No 63-20 Medellín - Colombia Bloque 19-313 Laboratorio de Bioconversiones \*e-mail: jpariase@unal.edu.co; marioari@unal.edu.co

*Thevetia peruviana* es un arbusto perteneciente a las *Apocynaceae* productor de metabolitos secundarios tipo glicósidos cardiotónicos entre otros. En cuanto a metodología, se establecieron protocolos de desinfección, cultivos de células de *T. peruviana* en suspensión e inmovilizadas en medio MS suplementado a partir de pulpa de frutos. Los cultivos se mantienen a 110 rpm, 25°C, fotoperiodo natural. En cultivos en suspensión el Metil Jasmonato mostró un efecto elicitor sobre la producción de peruvósido (9.223 mg/ml), el ácido salicílico induce la producción de un compuesto tipo glicósido cardiotónico (0.068 mg/g FW) con tiempo de retención similar al reportado para el terevidósido. En cultivos inmovilizados se evaluó la concentración celular de peruvósido y betulina, la viabilidad celular y las características de las esferas de alginato obtenidas. Bajo inmovilización se observa un excelente crecimiento celular. La fase de crecimiento exponencial inicia desde el día cinco y se mantienen durante el resto del cultivo. La viabilidad celular en la suspensión madre fue de 77.84%; este porcentaje cae casi 17 puntos durante los primeros 5 días de cultivo, después del quinto día la viabilidad se repone y se mantiene por encima del 75% durante los siguientes 20 días. Finalmente se evaluó en cultivos celulares en suspensión el efecto de la concentración inicial de sacarosa y el tamaño del inóculo sobre la producción de biomasa y glicósidos cardiotónicos a escala de matraz agitado. En estos, se alcanzó la mayor concentración de biomasa con una concentración inicial de sacarosa de  $80 \text{ g l}^{-1}$  e inóculo de  $5,068 \text{ g l}^{-1}$  (DW). Sin embargo el máximo rendimiento biomasa/sustrato ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,652 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$  fue alcanzado con una concentración inicial de

sacarosa de 28,05 g l<sup>-1</sup> e inóculo de 2,432 g/l (DW).

Palabras clave: cultivo de células vegetales en suspensión, glicósidos cardiotónicos, metabolitos secundarios, *Thevetia peruviana*

#### **Establishment and elicitation of cultured cells in suspension and immobilized of *Thevetia peruviana***

*Thevetia peruviana* is a bush belonging to the family Apocynaceae producer, among other metabolites, cardiac glycosides. As for methodology were established disinfection protocols, cell cultures of *T. peruviana* in suspension and immobilized on a medium supplemented from fruit pulp. Cultures were maintained at 110 rpm, 25°C, natural photoperiod. In suspension cultures Methyl Jasmonate showed an elicitor effect on the production of peruvoside (9.223 mg/ml), salicylic acid induces the production of a cardiac glycoside type compound (0.068 mg/g FW) with a retention time similar to that reported for the therevidoside. In immobilized cell cultures was evaluated the concentration of peruvoside and betulin, cell viability and characteristics of the alginate spheres obtained. Under immobilization is observed excellent cell growth. The exponential growth phase starts from day 5 and maintained for the remainder of the culture. Cell viability in the stock suspension was 77.84%, this percentage dropped nearly 17 points during the first 5 days of culture, after the fifth day viability is reset and remains above 75% over the next 20 days. Finally evaluated on cell suspensions cultures the effect of the initial concentration of sucrose and inoculum size on biomass production and cardiotonic glycosides at shake flask scale. In these, we reached the highest concentration of biomass with an initial concentration of sucrose of 80 g l<sup>-1</sup> and inoculum of 5.068 g l<sup>-1</sup> (DW). However the maximum yield biomass/ substrate (YX/S) of 0.652 <sub>gbiomass/gsubstrate</sub> was achieved with an initial concentration of 28.05 g of sucrose and 2.432 g l<sup>-1</sup> (DW) as inoculum size

Key words: cardiac glycoside, plant cell suspension cultures, secondary metabolites, *Thevetia peruviana*

#### **T4.11 Evaluation of non-enzymatic antioxidants during the ripening of Mexican tomatoes**

O. López Vidal<sup>1</sup>, H. Escalona-Buendía<sup>2</sup>, J. Cruz-Salazar<sup>1</sup>, F. Rivera-Cabrera<sup>1</sup>, L. Pérez-Flores, F<sup>1</sup>. Díaz de León-Sánchez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departments of Health Sciences and <sup>2</sup>Biotechnology, Universidad Autónoma Metropolitana, D.F., 09340, México. \*e-mail: fdls5@yahoo.com.mx

Tomatoes are among the three most important vegetables in the world. The consumption of fresh tomatoes has increased regularly during the last 10 years. The overall tomato consumption is important because its natural composition in secondary metabolites make this fruit an important source of antioxidant and vitamin compounds. Tomato consumption has been shown to reduce the risk of certain types of cancer and cardiovascular diseases. Much of the health benefits derived from tomatoes can be attributed to lycopene content, but tomatoes are also an important source of vitamin C, glutathione and antioxidant enzymes. The role of different carotenoids in the prevention of degenerative diseases has been attributed to their antioxidant properties and their ability to scavenge active oxygen species that play an important role in the pathogenesis of such degenerative diseases. Several features of tomato make it an extremely interesting model system to study the ripening of climacteric fleshy fruits. The aim of this work was to determine the composition of different non-enzymatic antioxidants, such as carotenes, ascorbic acid, citric acid and GSH, at different ripening stages (mature green, breaker, pink and red) in Saladette tomato. Levels of these components were determinate by HPLC and their antioxidant capacity by the DPPH method. Results showed an increased on carotenes and ascorbic acid levels during ripening process while GSH levels showed a pickat the pink ripening stages. Citric acid did not change during the ripening fruit process. These findings showed that different non-antioxidant systems operate along the ripening phenomenon whose levels correlate well with the antioxidant capacity which increased during ripening process.

Key words: antioxidants, ripening, tomatoes

#### **Antioxidantes no-enzimáticos durante la maduración de jitomate cultivado en México**

El jitomate es uno de los tres frutos más importantes del mundo. El consumo de jitomates frescos ha aumentado durante los últimos 10 años debido entre otras cosas a su composición química que hacen de este fruto una importante fuente de antioxidantes y vitaminas. El consumo del jitomate ha mostrado reducir el riesgo de

ciertos tipos de cáncer como el de próstata y enfermedades cardiovasculares. Gran parte de los beneficios para la salud del jitomate se puede atribuir a su contenido de carotenoides en especial de licopeno, sin embargo son también una fuente importante de vitamina C, glutatión y enzimas antioxidantes. El papel de los carotenoides en la prevención de las enfermedades degenerativas se ha atribuido a sus propiedades antioxidantes y su capacidad para eliminar las especies reactivas de oxígeno que tienen un papel importante en la patogénesis de estas enfermedades. Varias características del jitomate lo han hecho un sistema modelo de estudio de los procesos de maduración de consumo en frutos carnosos climatéricos, como el jitomate. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición de diferentes antioxidantes no enzimáticos, como carotenos, ácido ascórbico, ácido cítrico y GSH, en diferentes etapas de maduración (verde, rompiente, naranja y rojo) de jitomate Saladette. Los niveles de estos compuestos fueron determinados por HPLC y la capacidad antioxidante por el método DPPH. Se observó un aumento en los niveles de carotenos y ácido ascórbico durante el proceso de maduración, mientras que los niveles de GSH mostraron un incremento en la etapa de maduración naranja. Los niveles de ácido cítrico no cambiaron durante el proceso de maduración. Se encontró que los diferentes sistemas antioxidantes no enzimáticos operan a lo largo del proceso de maduración, y sus niveles correlacionan con la capacidad antioxidante que aumentó durante el proceso de maduración.

Palabras clave: antioxidantes, jitomates, maduración

#### **T4.12 Caracterización de goma de mezquite producida por células en suspensión de *Prosopis laevigata* cultivadas en biorreactor**

Osorio-Ramírez Karina<sup>1</sup>, Cárdenas-Sandoval Blanca<sup>3</sup>, López-Laredo Alma Rosa<sup>3</sup>, Rodríguez-Monroy Mario<sup>3</sup>, Cruz-Sosa Francisco<sup>2</sup>, Vernon-Carter Jaime<sup>2</sup> y José Luis Trejo-Espino<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache; <sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa; <sup>3</sup>Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla Km. 8, Calle Ceprobi No. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México. CP 62731, Apartado postal 24, \*e-mail: jtrejo@ipn.mx, jl\_trejo@yahoo.com

Los árboles de *Prosopis laevigata* (Mezquite) producen en sus cavidades del xilema y floema una goma (goma de mezquite; GM), que fluye a través de su corteza y es exudado por su tronco y ramas, principalmente cuando se enfrentan a alguna condición de estrés ambiental como heridas, temperaturas extremas o deficiencia de agua. La GM presenta propiedades funcionales importantes, entre las que destaca su capacidad para formar y estabilizar emulsiones aceite en agua. El objetivo de esta investigación fue estudiar la composición química (polisacáridos, proteínas y Arabinogalactano proteínas (AGPs)) de GM silvestre y GM producida mediante el cultivo de células en suspensión de *Prosopis laevigata* a nivel de biorreactor, e identificaron los pesos moleculares de las diferentes proteínas presentes en dichas gomas a través de electroforesis. No se encontró diferencia en el contenido de proteína total de ambas muestras (0.45 µg/µg de goma), pero si se apreció una diferencia del 20% en el contenido de carbohidratos totales de ambas muestras, la mayor cantidad (0.587 µg/µg de goma) se obtuvo para la GM silvestre. Por otra parte, se encontró que en las muestras de GM silvestre y GM obtenidas *in vitro*, no hay diferencia en el contenido de AGPs (0.84 µg AGPs/ µg de goma). Los resultados de la electroforesis mostraron que en la GM de cultivos *in vitro* se presentan 5 bandas que corresponden a proteínas de diferente peso molecular (123.27, 95.89, 34.37, 21.54 y 14.37 kDa), mientras que para la GM silvestre hay también 5 bandas con pesos moleculares de 85.15, 68.11, 41.79 y de 21.08 kDa. De todas ellas, solo se encontró una banda que presenta pesos moleculares similares, 21.54 KDa (GM *in vitro*) y 21.08 KDa (GM silvestre), lo que sugiere que puede tratarse de la misma proteína.

Palabras clave: Arabinogalactano proteínas, biorreactor, cultivo de células en suspensión, goma de mezquite, *Prosopis laevigata*.

#### **Characterization of mesquite gum produced by *Prosopis laevigata* cell suspension cultured in bioreactor**

*Prosopis laevigata* trees (mesquite) produced in the cavities of the xylem and phloem a gum (mesquite gum; MG), which flows through the bark and exuding from the trunk and branches, especially in environmental stresses such as wounds, extreme temperatures or water deficit. MG has important functional properties, most notably its ability to form and stabilize oil in water emulsions. The aim of this investigation was to

study the chemical composition (polysaccharides, proteins and Arabinogalactan proteins (AGPs)) of wild-MG and MG produced by *Prosopis laevigata* cells suspension culture in bioreactor and identified the molecular weights of different proteins present in such gums using electrophoresis. There was no difference in total protein content of both samples (0.45 µg / µg of gum), but there is a difference of 20% in total carbohydrate content of both samples, the highest content (0.587 µg / µg of gum) was obtained for the wild-MG. Moreover, it was found that samples of wild-MG and in vitro MG, no difference in the content of AGPs (0.84 µg AGPs / µg of gum). The results of electrophoresis showed that the MG from in vitro cultures are 5 bands corresponding to different molecular weight proteins (123.27, 95.89, 34.37, 21.54 and 14.37 kDa), while for the wild-MG there are also 5 bands, corresponding to proteins of molecular weights of 85.15, 68.11, 41.79 and 21.08 kDa. Of these, only one band has a similar molecular weight, 21.54 kDa (*in vitro* MG) and 21.08 kDa (wild-MG), suggesting that this may be the same protein.

Key words: *Arabinogalactan-proteins*, bioreactor, cell suspension culture, mesquite gum, *Prosopis laevigata*

#### **T4.13 Empleo de extractos de *Botryodiplodia* para el control de patógenos y fitoestimulador en manzanos y arroz**

E. I. Laredo Alcala<sup>1</sup>, G. Gallegos M.<sup>2</sup>, D. Hernández C.<sup>2</sup>, G. Michelena<sup>3</sup>, A. Iliná<sup>1</sup>, J. L. Martínez Hernández<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México \*e-mail: jose-martinez@uadec.edu.mx.

<sup>2</sup>Depto. de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Coahuila

<sup>3</sup>División Biotecnología, ICIDCA, Vía Blanca 807 esq. a Carretera Central, La Habana, Cuba

El ácido jasmónico(AJ) es un regulador del crecimiento vegetal endógeno, sintetizado de manera natural por una gran variedad de plantas. Sin embargo, estudios realizados con *Botryodiplodia theobromae*, demostraron que es capaz de producir este tipo de sustancia con rendimientos satisfactorios y que puede ser empleado en la inducción de resistencia, en plantas. Este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto del ácido jasmónico en cultivos de manzanos y arroz y su influencia en la

generación de resistencia. La producción de AJ se realizó mediante fermentación superficial, para ello se inocularon fragmentos miceliales de *Botryodiplodia theobromae* en medio de cultivo Miersch modificado, se incubaron a 28°C por un 15 días. Se siguieron cinéticas de formación de ácido jasmónico y se evaluaron los parámetros de producción. Se evaluó el efecto de los extractos con AJ sobre los tejidos vegetales seleccionados, estos fueron aplicados en hojas de árbol de manzano y cultivo de arroz, a diferentes concentraciones. Los tratamientos con AJ sobre las manchas cafés de síntomas de *Alternaria*, presentaron el desprendimiento del área lesionada a manera de tiro de munición, siendo este un mecanismo reportado como de defensa natural de las plantas que impide que el hongo colonice el resto de la superficie de la hoja, disminuyendo los síntomas, la clorosis de venas se manifestó más rápidamente en el testigo, efecto retardado en las hojas donde se aplicó el extracto. Mientras que en el cultivo de arroz la prueba de medias indica que los resultados obtenidos con los tratamientos de caldos de *B. Theobromae* sobre arroz son estadísticamente diferentes al testigo, por lo que resulta favorable el uso de este bioproducto como fitoestimulador. Se demostró la efectividad de la aplicación de caldos de *Botryodiplodia* para el control de *Alternaria alternata* en manzano y el efecto fitoestimulador al incrementar más del doble de la altura de las plantas de arroz.

Palabras clave: *Botryodiplodia theobromae*, ácido jasmónico, fitohormonas.

#### **Employment of extracts of *Botryodiplodia* to control of pathogens and phytostimulation on apple trees and rice**

Jasmonic acid (AJ) is an endogenous plant growth regulator, synthesized naturally by a variety of plants. Studies in liquid culture revealed that *Botryodiplodia theobromae* is capable of producing such substance as a result of secondary metabolism with satisfactory yields and can be employed in the formulations for treating plants in the induction of resistance. The aim of this study was to evaluate the effect of jasmonic acid in apple trees and crops of rice, and its influence on the generation of resistance. The JA production was performed by surface fermentation this was inoculated with mycelial fragments of *Botryodiplodia theobromae* in Miersch culture medium, incubated at 28 ° C for 15 days. The kinetics of formation of jasmonic acid and the production parameters were evaluated. The effect of the extracts with AJ on

selected plant tissues was evaluated; these were applied in apple tree leaves and rice at different concentrations. AJ treatments brown spots on the symptoms of *Alternaria*, showed the release of the injured area, this being reported as a mechanism of natural plant defense that prevents the fungus colonize the rest of the surface of the sheet, reducing the symptoms, vein chlorosis quickly manifested in the control, delayed on the leaves where the extract was applied. While in the rice, mean test indicates that the results obtained with treatments of jasmonic acid are statistically different with the control, which is favorable for the use of this byproduct as phyto stimulator. Was demonstrated the effectiveness of applying of *Botryodiplodia* extracts in the control of *Alternaria alternata* in apple and the effect to increase more than twice the height of the rice plants.

Key words: *Botryodiplodia theobromae*, jasmonic acid, phytohormones

#### **T4.14 Seed germination, regeneration and radical scavenging potential of *Carthamus oxyacantha***

Mohammad Ali\* and Bilal Haider Abbasi

Department of Biotechnology, Quaid-i-Azam University Islamabad-45320, Pakistan  
\*e-mail: ham\_dard007@hotmail.com

*In vitro* seed germination and regeneration protocols were optimized and antioxidant activities were determined for the recalcitrant specie, *Carthamus oxyacantha*. Root derived from 35 day old *in vitro* seed germinated plantlets was used as explant. Seeds were germinated on MS0 Murashige and Skoog, media, MS media incorporated with 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 mg l<sup>-1</sup> of BA (benzyl adenine), IAA (Indol acetic acid), NAA (Naphthalene acetic acid) and GA<sub>3</sub> (Gibberellic acid). For regeneration, Root explants were incubated on MS media supplemented with BA or Kinetin (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg l<sup>-1</sup>) either alone or in combination with NAA (1.0 mg l<sup>-1</sup>). For the *in vitro* rooting, regenerated plantlets were incubated on MS media with 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg l<sup>-1</sup> of IAA, NAA and IBA and MS0 and MS half. The media supplemented with BA alone and in combination with NAA was superior to Kin alone and in combination with NAA for the *in vitro* regeneration and highest percentage of callus (86%) and shooting (78%) were obtained on BA (1.0 mg l<sup>-1</sup>) + NAA (1.0 mg l<sup>-1</sup>) while maximum shoots (18) per explant with maximum shoot length of 3.7 cm were obtained on BA (2.0 mg l<sup>-1</sup>).

Furthermore, highest frequency of *in vitro* seed germination (46%) and *in vitro* rooting (35%) were achieved on MS media supplemented with 0.5 mg l<sup>-1</sup> BA and 1.0 mg l<sup>-1</sup> NAA respectively. The radical scavenging activity of the callus and regenerated shoots was determined with DPPH as a free radical. Regenerated shoots showed highest activity (73%) compared to callus (54%). The overall work shows that the recalcitrant and medicinally important specie *Carthamus oxyacantha* is amenable to regeneration and the protocol can be scaled up for improved production of medicinally important secondary metabolites.

Key words: *Carthamus*, Benzyl adenine, Seed germination, Rooting, DPPH

#### **T4.1C Potencialidades fitoquímicas de siete especies de interés forestal en Pinar del Río, Cuba**

Alpha Saliou Taran Diallo\*, Héctor Barrero Medel, C Leila Carballo

Universidad Pinar del Río 'Hermanos Saiz Montes de Oca' \*e-mail: alpha@ext.upr.edu.cu, hbarrero@af.upr.edu.cu, leilar@af.upr.edu.cu

En el trabajo se identifican los metabolitos secundarios presentes en siete especies de interés forestal como son: *Caesalpinia violacea*, *Taliparitis elatum*, *Bursera simaruba*, *Peltophorum adnatum*, *Gerascantus gerascantoide*, *Pinus caribaea* var. Barret, *Golfari caribaea* y *Tectona grandis*. Las muestras proceden de tres Empresas Forestales Integrales: Pinar del Río, Macurije y Guanahacabibes. Como resultado de un muestreo aleatorio de las masa se seleccionaron 34 árboles a los que se les tomó el follaje diferentes partes de la copa, el que fue sometido a ensayos químicos tanto en extractos acuosos como etanólicos para determinar los metabolitos siguientes: alcaloides, cumarinas, saponinas, carbohidratos reductores, flavonoides, fenoles, taninos, catequinas, nihidrina y mucílagos. Se realiza, además, un estudio etnobotánico para evaluar el conocimiento de los especialistas en relación a la posible utilización del follaje de estas especies, el cual constituye una fuente de ingresos para la economía forestal de esta empresa. Los resultados obtenidos permitieron comprobar la variabilidad de compuestos químicos presentes en cada planta.

Palabras clave: metabolitos secundarios, análisis fitoquímico, follaje, extractos



## Phytochemical Potential seven species of forestry interest in the province of Pinar del Río. Cuba

The paper identifies the secondary metabolites present in seven species of forestry interest as: *Caesalpinia violacea*, *Taliparitis elatum*, *Bursera simaruba*, *Peltophorum adnatum*, *Gerascantus gerascantoide*, *Pinus caribaea* var. Barrett and *Golfari caribaea* and *Tectona grandis*. Samples from three Integrated Forest Enterprises: Pinar del Río, Guanahacabibes Macurijes. And as a result of a random sampling of 34 trees were selected mass to which the foliage will take different parts of the cup, which was subjected to different chemical assays in both aqueous and ethanolic extract to determine the following metabolites: alkaloids, coumarins, saponins, reducing carbohydrates, flavonoids, phenols, tannins, catechins, ninhydrin and mucilage. It also performs an ethnobotanical study to assess the knowledge of specialists in relation to the possible use of the foliage of these species, which is a source of income for the forest economy of this company. The result obtained showed the variability of chemical compounds in each plant.

Key words: secondary metabolite, phytochemical analysis, leaves, extracts

### T4.2C Increased cardenolides production by elicitation of *Digitalis lanata* shoots cultured in temporary immersion systems

Naivy Pérez-Alonso<sup>1</sup>, Alina Capote<sup>1</sup>, André Gerth<sup>2</sup>, Elio Jiménez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara, Villa Clara, CP 54 830 Cuba

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

*Digitalis lanata* is an important source of cardenolides such as digoxin and lanatoside C, which have been widely applied in the treatment of cardiac insufficiencies. Elicitation is one of the most effective methods to enhance the biosynthesis of several secondary metabolites in medicinal plants. We studied the effect of elicitation with Chitoplant®, Silioplant® and methyl jasmonate on biomass and cardenolides accumulation in shoots of *D. lanata* cultivated in temporary immersion systems. Morphological response of the shoots was influenced by elicitor

treatment, a reduction in length and number of shoots per explant was marked with methyl jasmonate. Regarding biomass production, Chitoplant® (0.1 g l<sup>-1</sup>) was found to impact significantly on fresh and dry weight of the shoots. HPLC analysis revealed a higher content of lanatoside C compared to digoxin in all treatments. The highest accumulation of lanatoside C was achieved with Chitoplant® (0.1 g l<sup>-1</sup>), which resulted in 316 µg g-DW<sup>-1</sup> and with Silioplant® (0.01 g l<sup>-1</sup>) (310 µg g-DW<sup>-1</sup>), which account for 2.2 fold increase lanatoside C content compared to non-elicited cultures. Besides, elicitation of *D. lanata* shoots in temporary immersion systems resulted in an oxidative stress characterized by hydrogen peroxide and malondialdehyde accumulation. These observations point to a connection between hydrogen peroxide generation, lipid peroxidation and lanatoside C accumulation. The optimization of elicitor treatment and culture conditions for cardenolides production as well as the advantages of TIS for this purpose are discussed.

Key words: cardiotonic glycosides, chitoplant, silioplant, methyl jasmonate, temporary immersion systems, oxidative stress

### T4.3C Aportes al estudio de los mecanismos de acción del PECTIMORF®

Lorenzo Suárez\*, Simone Ferrari, Daniel Savatin, Felice Cervone, Ma Margarita Hernández

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

El Pectimorf® es una mezcla de oligogalacturónidos (OG (DP 7-16)), es considerado un regulador de crecimiento no tradicional y se obtiene por la degradación enzimática parcial de la pared celular de la corteza de los cítricos, es producido por el Departamento de Fisiología y Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, presenta la particularidad de activar mecanismos de defensa y de modificación de los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas. Lo antes expuesto motivo el desarrollo del siguiente trabajo, cuyo objetivo fue estudiar la eficiencia del Pectimorf® realizando ensayos moleculares comparativos con oligogalacturónidos puros (DP 10- 15) y esta sustancia cubana en *Arabidopsis thaliana*. El Pectimorf® fue capaz de activar genes asociados a mecanismos de protección contra patógenos y otras rutas moleculares:

liberación de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y la activación de genes relacionados al antagonismo auxina- OG.

Palabras clave: Pectimorf, Oligogalacturonidos, *Arabidopsis*, estudios moleculares

#### **Contributions to the study of mechanisms of actions of PECTIMORF®**

Pectimorf® is a mixture of oligogalacturonides (OG (DP 7-16)), is considered a non-traditional growth regulator and is obtained by partial enzymatic degradation of cell walls of citrus rind, is produced by the Department. Physiology and Biochemistry of the National Institute of Agricultural Sciences, has the particularity to activate defense mechanisms and modification of the processes of growth and development of plants. The above reason, the development of the next work, whose aim was to study the efficiency of molecular assays Pectimorf® by comparison with pure oligogalacturonides (DP 10 - 15) and this Cuban substance *Arabidopsis thaliana*. The Pectimorf® was able to activate genes associated with protective mechanisms against pathogens and other molecular pathways: release of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and activation of genes related to auxin-OG antagonism.

Key words: Pectimorf®, Oligogalacturonides, *Arabidopsis*, molecular studies

#### **T4.4C Efecto del ácido salicílico en la formación de callos, diferenciación y producción de metabolitos secundarios en tres clones de *Theobroma cacao***

Lillien Fajardo Rosabal\*, Juan J. Silva Pupo, Yosvel Viera Tamayo, Yoeldis Cobas Rodríguez, Angel Espinosa Reyes

Universidad de Granma, Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Carretera vía Manzanillo, km 7.5, Apdo 21 CP 85 100. Bayamo. Granma. Cuba \*e-mail: lfajardor@udg.co.cu

Son insuficientes aún los estudios acerca de la producción e identificación de metabolitos secundarios de interés y de relaciones entre éstos y variables morfológicas en cultivo *in vitro* de cacao. Por lo que se realiza este trabajo con el objetivo de evaluar el efecto del ácido salicílico en la formación de callos, diferenciación celular e identificación de metabolitos secundarios en *Theobroma cacao*, clones: UF-613, UF-650 y Pound-7. Para la formación de callos se adicionó ácido salicílico, a concentraciones de 0.02, 0.05,

0.10, y 0.15  $mg\ l^{-1}$ . A los 15 y 28 días de cultivo se evaluó el número de callos formados (%), coloración y consistencia. Se evaluó en etapa de diferenciación de callos de cacao, el número de callos con estructuras embriogénicas (%) y sus características histológicas. Se identificaron los metabolitos secundarios presentes en los callos y medios de cultivo, mediante tamizaje fitoquímico. Se obtuvo un 100% de formación de callos potencialmente embriogénicos con empleo del ácido salicílico (0.15  $mg\ l^{-1}$ ) en el clon Pound-7; (0.05  $mg\ l^{-1}$ ) en el clon UF-613 y con (0.02  $mg\ l^{-1}$ ) para UF-650. Los mayores porcentajes de callos con estructuras embriogénicas se obtuvieron con 0.15  $mg\ l^{-1}$  de ácido salicílico para Pound-7 (91.66%); 0.05  $mg\ l^{-1}$ , clon UF-613 (100%) y tratamiento control en UF-650 (83%). Se obtuvo una embriogénesis somática de baja frecuencia, se identificaron masas pro-embriogénicas y embriones en diferentes estados de desarrollo, predominando los estados: globular y torpedo. En los callos se identificó presencia de alcaloides, coumarinas, ácidos grasos saponinas, carbohidratos reductores, fenoles y/o taninos y flavonoides. En el medio de cultivo se identificaron fenoles y/o taninos, coumarinas, alcaloides, antocianidinas y carbohidratos reductores.

Palabras clave: callo, elicitor; metabolitos secundarios

#### **Effect of the salicylic acid in the formation of callus, differentiation and production of secondary metabolites in three clones of *Theobroma cacao***

There are still few studies 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 of evaluate the effect of salicylic acid in the formation of callus, cellular differentiation and identification of secondary metabolites in *Theobroma cacao* clones: UF-613, UF-650 and POUND-7. For the formation of callus was added 0.02, 0.05, 0.10, and 0.15  $mg\ l^{-1}$  of salicylic acid. After 15 and 28 days of cultivation the number of formed callus was evaluated (%) as well as color and consistency. It was evaluated in stage of differentiation of calluses of cocoa, the number of calluses with embryogenic structures (%) and its histological characteristics. It was identified the secondary metabolites presents in the calluses and culture medium, by means of phytochemical screening. It was achieved a 100% of formation of calluses with employment of the salicylic acid

(0.5 mg l<sup>-1</sup>) in the clone Pound, 7; (0.05 mg l<sup>-1</sup>) in the clone UF 613 and with (0.02 mg l<sup>-1</sup>) for UF 650. The bigger percentages of calluses with embryogenic structures obtained with 0.15 mg l<sup>-1</sup> of salicylic acid for Pound, 7 (91.66%); 0.05 mg l<sup>-1</sup>, clone UF-613 a (100%) and control treatment in UF-650 (83%). It was achieved an embryogenesis of low frequency, identified pro-embryogenic mass and embryos in different stages of development, by predominating the stages: globular and torpedo. In the calluses it was identified presence of saponins, alkaloids, coumarins, fatty acids, reducing carbohydrates, phenols and/or tannins and flavonoides. In the culture medium were identified phenols and/or tannins, coumarins, alkaloids, antocianidins and reducing carbohydrates.

Key words: callus, elicitor; secondary metabolites

#### **T4.5C Actividad antifúngica *in vitro* y modo de acción de extractos de hojas de *Citrus* spp. frente a *Passalora fulva* Cook. y *Alternaria solani* Sor., hongos patógenos de *Solanum lycopersicum* L.**

Katia Ojito-Ramos<sup>1\*</sup>, Dianella Iglesias Rodríguez<sup>1</sup>, Daykeni González Hernández<sup>1</sup>, Orelvis Portal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara 54 830, Cuba \*e-mail: kojito@uclv.edu.cu

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

Las enfermedades producidas por *Passalora fulva* y *Alternaria solani* constituyen uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta al cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*), cuyo control es básicamente mediante el uso de fungicidas sintéticos. La creciente demanda de agroquímicos ambientalmente seguros generada por los sistemas de agricultura alternativa que promueven la producción sustentable y sana de alimentos, ha incentivado el desarrollo de investigaciones orientadas a proporcionar estrategias de control, entre las cuales se encuentra el uso de plantas como fuente de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas. El género *Citrus* es considerado una fuente importante de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, con acentuada actividad antifúngica. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* y el modo de acción de extractos alcohólicos de hojas

de *Citrus* spp. frente a *P. fulva* y *A. solani*. Los extractos se obtuvieron mediante extracción asistida por ultrasonido, se caracterizaron fitoquímicamente y se cuantificó el contenido de fenoles totales. Para cada extracto se determinó la concentración mínima inhibitoria, el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y de la germinación de conidios de ambos patógenos. El efecto de los mismos se evaluó sobre la respiración celular, integridad de la membrana plasmática y grado de estrés oxidativo. El extracto de *Citrus reticulata* Blanco. mostró la menor concentración mínima inhibitoria. Todos los extractos mostraron capacidad de inhibir el crecimiento micelial y la germinación de los conidios, siendo el extracto de *Citrus x latifolia* Tan. en etanol el más efectivo (>95%). Los extractos alteraron el proceso de respiración celular y la permeabilidad de la membrana plasmática. Además, modificaron la actividad de enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa) y la lipoperoxidación de las membranas. El presente estudio demostró la potencialidad del uso de extractos de hojas de *Citrus* spp. en el manejo agroecológico de estos patógenos.

Palabras clave: actividad antifúngica, *Alternaria solani*, extractos vegetales, modo de acción, *Passalora fulva*

#### ***In vitro* antifungal activity and action mode of *Citrus* spp. leaf extracts against *Passalora fulva* Cook. and *Alternaria solani* Sor., fungal pathogens of *Solanum lycopersicum* L.**

The diseases produced by *Passalora fulva* and *Alternaria solani* are one of the main phytosanitary problems that affects the production of tomato (*Solanum lycopersicum*), whose control is basically by means the use of the synthetic fungicides. The growing demand of environmentally safe agro-chemicals generated by alternative agriculture system that promote the viable and healthy production of foods, has stimulated the development of research to provide control strategies, among which is the use of plants as a source secondary metabolites with antifungal properties. The *Citrus* genus is considered an important source of secondary metabolites like phenolic compounds, with marked antifungal activity. The objective of this work was to determine the *in vitro* antifungal activity and the action mode of *Citrus* spp. alcoholic leaf extracts against *P. fulva* and *A. solani*. The extracts were obtained by means of ultrasound-assisted extraction, phytochemically characterized and the total content of phenols

was quantified. For each extract, the minimum inhibitory concentration, percentage of mycelial growth inhibition and conidia germination of both pathogens were determined. The effect of these extracts on the cellular respiration, plasmatic membrane integrity and degree of oxidative stress was evaluated. In all the extracts, it was detected the presence of saponins, phenols, tannins, amino acids, amines, quinons, alkaloids and flavonoids. The extract from *Citrus reticulata* Blanco showed the smaller minimum inhibitory concentration. In addition, all the extracts showed capacity to inhibit the mycelial growth and conidia germination, being the extract of *Citrus x latifolia* Tan. the most effective (>95%). The alcoholic extracts altered the cellular respiration and permeability of the plasmatic membrane. Furthermore, they modified the activity of antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase, catalase and superoxide dismutase) and the membrane lipoperoxidation. The present study demonstrated the potentiality of the use of *Citrus* spp. leaf extracts in the agro-ecological management of *P. fulva* and *A. solani*.

Key words: Action mode, *Alternaria solani*, antifungal activity, *Passalora fulva*, plant extracts

#### **T4.7C Efecto del ethrel en la acumulación de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.**

Pérez A\*, Aragón C, Mora M, Díaz-López L, Carvajal C, Rodríguez R, González J, Lorenzo, JC, Hernández M

Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila, CP 69 450, Cuba. \*e-mail: aperez@bioplantass.cu

Las plantas de la familia *Bromeliaceae* usualmente contienen alta concentración de cisteino proteasas. *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich) Mez., planta epífita que habita en los ecosistemas cubanos, pertenece a esta familia. En investigaciones previas se demostró la presencia de actividad proteolítica en extractos enzimáticos de órganos de esta planta y se aisló una nueva cisteino proteasa (pendulifloraina I) a partir de los tallos. Para evitar los daños a la biodiversidad que puede causar la extracción de estas plantas de su hábitat natural se estableció el protocolo de propagación *in vitro* de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich) Mez. Los extractos proteolíticos provenientes de plantas aclimatizadas mostraron menores contenidos de proteasas que los obtenidos a partir de plantas que crecen en su hábitat natural. El presente

estudio se realizó con el objetivo de incrementar la acumulación de proteasas en tallos de plantas aclimatizadas. Se evaluó el efecto de la concentración de ethrel y el tiempo de aplicación del producto sobre la actividad proteolítica, la concentración de proteínas y la actividad proteolítica específica en tallos de plantas aclimatizadas. Para explicar la influencia del ethrel en el incremento de la actividad proteolítica se estudiaron algunos indicadores de crecimiento y fisiológicos. La mayor actividad proteolítica específica en los tallos de plantas aclimatizadas se obtuvo con 4.5 mg l<sup>-1</sup> de ethrel a los tres días de aplicado el producto. En las hojas tratadas con ethrel se detectaron los principales cambios fisiológicos. En el contenido de clorofilas, la actividad superóxido dismutasa y la actividad guayacol peroxidasa se registró la mayor influencia del madurador.

Palabras clave: proteasas, plantas aclimatizadas, ethrel

#### **Effect of ethrel on proteases accumulation in stems of acclimatized plant of *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.**

*Bromeliaceae* family plants usually contain high concentration of thiol proteases. *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich) Mez., an epiphytic plant that inhabits Cuban ecosystems, is a member of this family. In previous investigation it was demonstrated the presence of proteolytic activity in enzymatic extract of organs of this plant and isolated a new cysteine proteases (pendulifloraina I) from stems. To prevent the biodiversity damages would cause the plants extraction from their natural habitats was established *in vitro* propagation protocol of *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich) Mez. Proteolytic extracts from stems of acclimatized plant were showed lower proteases content than those grown in their natural habitat. The present research was conducted in order to increase protease accumulation in stems of acclimatized plant. We evaluated the effect of ethrel concentration and application time on protein contents, proteolytic activities and specific proteolytic activities of stems of acclimatized plant. To explain the ethrel influence in proteolytic activity increase, we studied other developmental and physiology indicators. The highest specific protease activity in stems of acclimatized plant was recorded at 4.5 mg l<sup>-1</sup> of ethrel and three days after application. The main physiology changes were detected in leaves-treated. The major maturator influence was detected in

chlorophylls content, SOD activity and guaiacol peroxidase activity.

Key words: proteases, acclimatized plant, ethrel

#### **T4.8C Propagación *in vitro* de la planta medicinal *Aloe vera* L.**

Alina Capote, Naivy Pérez-Alonso, Anabel Pérez, Elio Jiménez

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

*Aloe vera* L. contiene importantes metabolitos secundarios de acción cicatrizante, antiinflamatoria y protectora de la piel; además presenta propiedades bactericidas, laxantes y agentes desintoxicantes. La alta demanda en las industrias de cosméticos y medicinal de esta especie ha provocado que el cultivo tradicional sea insuficiente para satisfacer el mercado actual, por lo que la propagación *in vitro* es una de las alternativas para incrementar la disponibilidad de biomasa de esta especie. Con este objetivo se logró el establecimiento *in vitro* de ápices con un 93% de explantes libres de contaminantes microbianos con el empleo de NaOCl al 2% durante 15 min y no se observó necrosis ni muerte de los ápices. Para inducir la multiplicación de los brotes se evaluaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (6-BAP y AIB). Se obtuvo la mayor tasa de multiplicación con la combinación de 8 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 2 mg l<sup>-1</sup> de AIB y realizando un corte transversal a los brotes. Los resultados permiten disponer de un método de multiplicación vía yemas axilares que constituye la base de nuevos estudios con el objetivo de lograr un protocolo para la propagación comercial y la obtención de compuestos activos de esta especie medicinal.

Palabras clave: sábila, metabolitos secundarios, multiplicación *in vitro*, yemas axilares

#### ***In vitro* propagation of medicinal plant *Aloe vera* L.**

*Aloe vera* L. contains important secondary metabolites with healing action, anti-inflammatory, and skin protective; additionally it has also bactericidal, laxative and detoxifying properties. The high demand of this plant species in the cosmetic and medicinal industries has caused the traditional culture becomes

insufficient to satisfy the actual market, so that *in vitro* propagation became one of the alternatives to increase biomass availability of biomass of this species. With the objective of developing an *in vitro* propagation protocol, shoots tips were disinfected with NaOCl 2% during 15 min showing 93% of explants free of microbial contaminants and no death or necrotic explants were observed. To induce shoot multiplication different concentrations of growth regulators (6-BAP and IBA) were evaluated. The highest multiplication rate was obtained with 8 mg l<sup>-1</sup> 6-BAP and 2 mg l<sup>-1</sup> IBA, combined with the transversal cut of the shoots. The results obtained provide an efficient method for shoot multiplication and provides a reliable alternative for commercial propagation and production of active compounds of this medicinal species.

Key words: *Aloe*, axillary buds, *in vitro* multiplication, secondary metabolites

#### **T4.10C Contenido de fenoles en hojas, ramas y semillas de plantas de campo de *Theobroma cacao*. Actividad antioxidante**

Quiñones-Gálvez J<sup>1\*</sup>, Hernández de la Torre M,<sup>1</sup> Dávila R<sup>2</sup>, Infante D<sup>2</sup>, Sosa D<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ingeniería metabólica, Centro de Bioplasmas CP 69450, Ciego de Ávila, Cuba.

<sup>2</sup>Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA, Caracas, Venezuela

*Theobroma cacao* L. (cacao), familia *Esterculiaceae*, es una planta rica en fenoles. Los fenoles de plantas son de especial interés por su potente actividad antioxidante, dada esencialmente por sus propiedades redox, que pueden jugar un papel importante en la absorción y neutralización de los radicales libres. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el contenido de fenoles y la actividad antioxidante de extractos fenólicos en una colección de 28 clones de cacao, provenientes del banco de germoplasma del "INIA-Miranda", Venezuela. Se cuantificó el contenido de fenoles totales de extractos de hojas, ramas y semillas. La actividad antioxidante se determinó para la actividad de reducción del radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Se encontró mayor contenido de fenoles en extractos de semillas de los clones EET-250, UF-654 y PV-1xIMC-11. Todos los extractos mostraron actividad antioxidante, reduciendo el 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. La mayor actividad se encontró en los extractos de semillas de los clones SC-10, PV-1xIMC-11,

IMC-67xSC10 y EET-250. Estos resultados proporcionan una información básica prometedora para el uso potencial de genotipos de cacao para obtener antioxidantes para la salud humana.

Palabras clave: antioxidante, fenoles, *Theobroma cacao*

#### **Phenol content in leaves, branches and seeds of *Theobroma cacao* field plant. Antioxidant activity**

*Theobroma cacao* L. (cocoa), *Sterculiaceae* family, is a phenol rich plant. Phenols in plants are of special interest by their powerful antioxidant activity, it is given essentially by its redox properties, which can be play, an important role in the absorption and neutralization of the free radicals. The aim of this work was to determine the content of phenols and the antioxidant activity of its extracts in 28 clones of cacao collection from 'INIA-Miranda' germplasm bank of Venezuela. The phenol content in leaves, branches and seed extracts were quantified. The antioxidant activity was determined for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. More phenolic content was found in seeds extracts of the clones EET-250, UF-654 and PV-1xIMC-11. All of methanol extracts showed antioxidant activity, quenching of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. More antioxidant activity was found in seeds extracts of the clones SC-10, PV-1xIMC-11, IMC-67xSC10 y EET-250. These results provide promising baseline information for the potential use of the cacao genotypes to obtain antioxidant for human health. Key words: Antioxidant, phenols, cacao

#### **T4.11C Efecto del choque térmico en la regeneración de callos de *Digitalis purpurea* para su empleo en un sistema de transformación genética libre de marcadores de selección**

Elizabeth Kairúz Hernández-Díaz<sup>1\*</sup>, Borys Chong-Pérez<sup>2</sup>, Naivy Pérez-Alonso<sup>2</sup>, Alina Capote<sup>2</sup>, Anabel Pérez<sup>2</sup>, Elio Jiménez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara 54 830, Cuba; \*e-mail: kairuzhd@uclv.edu.cu

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

Los cardenólidos son metabolitos secundarios producidos por las plantas del género *Digitalis* que poseen marcada actividad cardiotónica. El fracaso en los intentos por potenciar su producción a partir de técnicas de cultivo *in vitro*, ha señalado a la transformación genética como una estrategia promisorio para la obtención de plantas altamente productoras de glucósidos cardíacos. En *D. purpurea* se ha desarrollado un sistema de transformación de discos foliares vía *Agrobacterium tumefaciens*. Los genes codificantes para la resistencia a antibióticos no son necesarios luego del proceso de selección, además afectan la percepción pública y provocan problemas tecnológicos. El empleo de sistemas recombinantes sitio-específicos, permite eliminar los genes de resistencia y brinda ventajas como la retransformación empleando el mismo marcador de selección y simplifica los sistemas de integración complejos. Para el empleo de vectores de T-DNA que contengan el gen *cre* codificante para una recombinasa bajo el control de un promotor inducible por choque térmico, es necesario determinar la temperatura a la cual es posible activar la recombinación y regenerar el mayor número de plantas. Con este objetivo se sometieron a choque térmico callos de *D. purpurea* a las temperaturas de 37, 40, 42 y 45°C. No se produjo regeneración de plantas a partir de los callos sometidos a temperaturas de 45°C, a diferencia de los restantes tratamientos. Los callos mantenidos a 40°C mostraron características morfológicas significativamente favorables y mayor eficiencia de regeneración, en comparación con los callos no sometidos a choque térmico. Este estudio demuestra la posibilidad de obtener plantas transgénicas de *D. purpurea* libres de marcadores de selección, empleando un sistema de escisión sitio-específico activado por choque térmico a 40°C en callos de este cultivo.

Palabras clave: transformación genética, recombinación sitio-específica, marcadores de selección, ingeniería metabólica

#### **Effect of heat shock on callus regeneration from *Digitalis purpurea* for its use in a selection marker-free genetic transformation system**

Cardenolides are secondary metabolites produced by plants of the genus *Digitalis* with marked cardiotonic activity. Failure in attempts to boost its production by *in vitro* culture techniques, has brought to the genetic transformation as a promising strategy to generate high-producing plant genotypes. A leaf disc transformation

protocol via *Agrobacterium tumefaciens* was previously developed for *D. purpurea*. Genes coding for antibiotic resistance are not necessary after the selection process, they also affect public perception and can cause technological problems. Using available site-specific recombinant systems to eliminate antibiotic resistance genes provides benefits such as re-transformation using the same selection marker and simplifies complex integration systems. In order to use a T-DNA vectors containing cre gene, coding for a recombinase, under the control of a heat shock inducible promoter, it is necessary first to determine the temperature at which recombination can be activated and at the same time to regenerate the largest number of plants. To this end *D. purpurea* leaf callus were subjected to heat shock at temperatures of 37, 40, 42 and 45°C. There was no regeneration of plants from calli subjected to temperatures of 45°C, unlike the other treatments. Callus maintained at 40°C showed morphologic characteristics significantly more favorable and higher regeneration efficiency, compared to callus not subjected to heat shock. This study demonstrates the possibility of obtaining *D. purpurea* transgenic plants free of selection markers, using a site-specific recombination system activated by heat shock at 40°C.

Key words: genetic transformacion, site-specific recombination, selection marker free plants, metabolic engineering

## **Sesión V: Métodos avanzados de mejoramiento genético de plantas / *Advanced methods in plant breeding***

### **T5.2 The short breeding cycle protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.)**

Nazan Dağüstü\*, G. Bayram, M. Sincik, M. Bayraktaroğlu

Uludag University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, 16 059 Görükle Bursa/TURKEY \*e-mail: ndagustu@uludag.edu.tr

Immature embryo culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.) was studied for shortening the generation time in breeding programs. The seed development from pollination to maturity in sunflower takes 50-60% (60 days) of the life cycle duration (120-150 days). This technique allows the production of fertile plants from immature embryos of 11 sunflower genotypes. Immature

embryos of 10-12 days after pollination were dissected from seed- grown-plants (SGP), were transferred into MS medium allowing shoot and root development for 5-10 days. Young plantlets transferred to soil, develop to maturity and were then self pollinated and seed-set. The first cycle of immature embryo-raised plants (ERP) was obtained. When these plants were at flowering stage, they were pollinated and 10-12 day old embryos were dissected. Therefore, four cycle of ERP were obtained from immature embryo culture technique in contrast to one generation per year with conventional breeding. The majority of cultured embryos developed into vigorous plantlets with 3-6 leaves. Out of 1320 immature embryos, the average response of the explants were 92.1% (1216). The 75% of the developed plantlets had vigorous root and were transplanted into viol containing a 1:1:2 peat: perlite: soil mixture (v/v) at  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  in 16h/8 h (light/dark) in a growth chamber. The only 70.3% of them was grown to maturity, self-pollinated and set seeds. The overall result was average 40-45 regenerated and matured plant per 100 immature zygotic embryos. The regenerated plants showed no morphological changes. The analysis of variance for all agronomic characters (plant height, head diameter, number of leaves, stem diameter, number of branches and seed number per head) taken from the mean of four generations *in vitro* grown plants resulted in significant differences among genotypes at 5% level. All the agronomic characters examined at *in vitro* regenerated plants decreased compared to field grown plants.

Key words: sunflower, immature embryo, fertile plant regeneration, shortening the breeding cycle

### **T5.3 Introduction of virus resistance gene into tobacco plants**

Snežana Milošević<sup>1\*</sup>, Aleksandar Cingel<sup>1</sup>, Dragana Nikolić<sup>2</sup>, Ana Simonović<sup>1</sup>, Slađana Jevremović<sup>1</sup>, Angelina Subotić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Biological Research, University of Belgrade, Bul. despota Stefana 142, 11060 Belgrade, Serbia \*e-mail: snezana@ibiss.bg.ac.rs

<sup>2</sup>Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, 11010 Belgrade, Serbia

Viral infections affect the quality and costs of plant production. The production of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38), an industrially important crop on worldwide is

threatened by various pathogens including *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV). Since TSWV has RNA genome and replicate via a double stranded RNA (dsRNA) intermediate, it can be good target for suppression by the dsRNA-specific ribonuclease, *pac1*. *Pac1* gene, isolated from *Schizosaccharomyces pombe*, was introduced in tobacco to confer tolerance against virus diseases. *In vitro* grown tobacco leaf explants were inoculated with the *Agrobacterium tumefaciens* C58C1*pac1* and co-cultivated on MS (Murashige-Skoog) media containing 2.5  $\mu$ M benzylaminopurine (BAP). Following co-cultivation, explants were transferred onto same medium supplemented with 300 mg l<sup>-1</sup> cefotaxime and 50 mg l<sup>-1</sup> kanamycin until the shoots were regenerated. The individual regenerated shoots (one shoot per explant) were maintained on the selective medium in the next few months. Integration of the *pac1* gene was confirmed by PCR analysis using *pac1* gene specific primers. The efficiency of transformation, based on the number of transgenic shoots in total number of analyzed shoots, was 78.9%. Absence of *A. tumefaciens* was showed by PCR using specific *virG* gene primers. Transcriptional expression of *pac1* gene was confirmed by RT-PCR analysis in all PCR positive tobacco transgenic lines. Detrimental effects of *pac1* gene integration and expression on tobacco plant physiology and morphology were not observed. Four selected transgenic lines were challenge with TSWV *in vitro* and showed enhanced tolerance to virus infection.

Key words: genetic transformation, *pac1*, tobacco, TSWV, virus tolerance

#### **T5.4 Análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real durante el suavizamiento de frutos de papaya (*Carica papaya* L.)**

Dessirée Zerpa\*, Víctor M. Jiménez

CIGRAS. Universidad de Costa Rica 2060 San Pedro, Costa Rica \*e-mail: dessiree.zerpa@ucr.ac.cr

Los frutos de la papaya (*Carica papaya* L.), un cultivo de gran importancia, presentan algunos problemas durante su maduración, ya que su rápido suavizamiento en esta etapa reduce su vida útil. Dicho suavizamiento se ha relacionado con degradación o modificación de paredes celulares, debido a la actividad de enzimas hidrolasas y otras proteínas asociadas a la pared celular. El estudio, entendimiento y control del proceso de suavizamiento de los frutos permitiría buscar alternativas para incrementar la vida útil

de los mismos. El objetivo de este trabajo fue determinar y comparar el patrón de expresión de cuatro genes involucrados en el suavizamiento de frutos de papaya durante el proceso de maduración y en relación con la aplicación de diferentes tratamientos poscosecha. Para ello, se utilizaron frutos de papaya del híbrido 'Pococi' (con un grado de maduración 1-2) tratados con etileno (275-300 ppm), 1-metilciclopropeno (1-MCP, 300 ppb) o sin tratar. Dichos frutos se colocaron en cámara de maduración por 11 días (18-20°C, 95% H.R). Durante el período de evaluación se determinó color (L\*, a\* y b\*) y firmeza (N) de la pulpa y la cáscara; pH, acidez titulable y sólidos solubles de la pulpa; además se extrajo ARN de la pulpa y la cáscara de cinco frutos para cada tratamiento. Posteriormente, se determinó el patrón de expresión de los genes que codifican para poligalacturonasa, endoxilanasas, pectinesterasa y expansina mediante PCR en tiempo real. Los tratamientos ocasionaron diferencias en cuanto a color, firmeza, pH, acidez titulable, sólidos solubles, y patrón de expresión de la poligalacturonasa y endoxilanasas; mientras que no se presentaron diferencias en el patrón de expresión de la pectinesterasa y expansina. Los resultados sugieren que el 1-MCP retarda la maduración y el suavizamiento de los frutos mediante inhibición de la expresión génica de la poligalacturonasa y endoxilanasas.

Palabras clave: *Carica papaya*, etileno, expresión génica, 1-metilciclopropeno, Pococi

#### **Gene expression analysis by real time PCR during the softening of papaya fruits (*Carica papaya* L.)**

The fruits of papaya (*C. papaya* L.), an economically important crop, have some problems during ripening, because the rapid softening reduces their shelf life. This softening is directly related to degradation and modification of cell walls, due to enzyme activity of hydrolases and other proteins associated to cell walls. Therefore, studying, understanding and controlling the softening process are necessary to increase papaya shelf life. The main objective of this work was to determine and compare the expression pattern of four genes involved in papaya fruit softening during the ripening process and in relation to postharvest treatments. Papaya fruits ('Pococi' hybrid) were selected (ripening grade 1-2) and subjected to different treatments: ethylene (275-300 ppm), 1-methylcyclopropene (1-MCP, 300 ppb) and control (without treatment). The fruits were stored for 11 days at 18-20°C and



95% R.H. During the evaluation period, color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) and firmness (N) of pulp and peel were determined; pH, titratable acidity and soluble solids of pulp were also measured; and RNA from pulp and peel of five fruits per treatment was extracted as well. Subsequently, the expression pattern of polygalacturonase, endoxylanase, pectinesterase and expansin were determined using real time PCR. Treatments induced differences in color, firmness, pH, titratable acidity, soluble solids and pattern of expression of polygalacturonase and endoxylanase genes; whereas there were no differences in pattern of expression of pectinesterase and expansin genes. These results suggest that 1-MCP inhibited the gene expression of polygalacturonase and endoxylanase and it could be the reason for the delayed ripening and softening observed.

Key words: *Carica papaya*, ethylene, gene expression, 1-methylcyclopropene, Pococí

#### **T5.5 Using callus cultures for selection of pea genotypes with drought tolerance**

László Zsombik\*, Katalin Magyar-Tábori, Ildikó Hudák

Research Institute of Nyíregyháza, Centre for Agricultural Sciences and Engineering, University of Debrecen, H-4400 Nyíregyháza, Westsik V. u. 4-6., Hungary, e-mail: zsombik@agr.unideb.hu

The pea (*Pisum sativum* L.) is one of the most important vegetables but the growing area is limited because of its relatively low yield stability under unfavourable field conditions, such as restricted water supply. Breeding of cultivars well-adapted to dry conditions, has been one of the major tasks of breeding programmes. Osmoregulation plays a role in the maintenance of turgor pressure under water stress conditions, and can help selection for drought resistance. The present study was performed to investigate the growth of calli of different dry pea genotypes under *in vitro* stress condition induced by mannitol. Leaf segments of *in vitro* plantlets were placed on Gamborg medium supplemented with  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  6-benzylaminopurine, 3% sucrose and 0.8% agar-agar and 2.0 or 4.0  $\text{mg l}^{-1}$  indole-3-butyric acid depending on genotype. The cultures were incubated in darkness for 3 weeks at 26°C, then for 4 weeks at 22°C with a 16 h photoperiod. Calli were further grown for four weeks on media contained mannitol. Three concentrations (0.2, 0.6 and 1.0 M) of mannitol were tested for growth inhibition of callus cultures and the rate of the growth inhibition was compared to control callus

grown on mannitol-free medium. The data were analysed statistically. Based on the detected differences in growth inhibition 0.6 M mannitol applied in the medium was suitable for distinction of genotypes according to their osmotic stress tolerance. These results obtained at cell level were well-comparable with field behaviour of genotypes under drought stress conditions.

Keywords: mannitol, 2,4-D,  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid, indole-3-butyric acid, osmotic stress, callus weight

#### **T5.7 Polinización estigmática *in vitro* de fresa (*Fragaria vesca*) a partir de las variedades Monterey, Albeón y Diamante con miras a la obtención de un nuevo genotipo**

K. Rivera, A. Rivera y C. Peña

Universidad Tecnológica Equinoccial, Departamento de Ciencia de la Ingeniería, Quito-Ecuador

El cultivo de fresa es muy promisorio en el Ecuador y sus cultivos se encuentran en crecimiento. Se ha visto la necesidad de contar con variedades propias para la producción interna. El objetivo de este estudio fue obtener un nuevo genotipo, a partir de variedades promisorias en campo. Se aisló plantas élite de las tres variedades a condiciones de invernadero y se les sometió a floraciones continuas con ácido giberélico, se emasculó flores semi abiertas, y se introdujeron a condiciones *in vitro* con una desinfección previa evaluando los desinfectantes hipoclorito de sodio 0.5% y fungicida al 1.5% en tiempos de 6, 8, 10 y 15 minutos de inmersión de los pistilos. Posteriormente se eliminaron los sépalos, pétalos y anteras y se introdujeron *in vitro* en medios de cultivo MS, se valoró la oxidación y presencia de exudado en la base del estigma. En los gametos masculinos (polen) se realizaron pruebas de viabilidad con la germinación del tubo polínico a partir de anteras que no habían sufrido dehiscencia, el polen inmaduro fue capaz de geminar en una solución de medio de cultivo BK con  $50 \text{ mg l}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{HO}_3$  y sacarosa al 10%, se obtuvieron tubos polínicos largos y vitales a las 12 horas de incubación. Esta investigación constituye el punto de partida para la búsqueda de un nuevo genotipo por medio de una fertilización *in vitro* que podría permitir mezclar dos variedades distintas para la obtención de un espécimen con características de los dos progenitores.

### T5.1C Mejoramiento genético en frijol y arroz para la tolerancia a las altas temperaturas mediante mutaciones inducidas

María Caridad González Cepero<sup>1</sup>, Elizabeth Cristo<sup>1</sup>, Noraida Reyes<sup>1</sup>, Yanelis Reyes<sup>1</sup>, Odile Rodríguez<sup>1</sup>, Alba Álvarez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Carretera de San José-Tapaste km 3 ½, Mayabeque, La Habana \*e-mail: mcaridad09@yahoo.es

<sup>2</sup>Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear (CEADEN)

La agricultura es el sector más afectado por los efectos del cambio climático y los principales impactos son ocasionados por el incremento de la temperatura y las variaciones en la distribución espacial y temporal de las precipitaciones las que provocan una reducción sustancial de los rendimientos, por lo que se hace necesario desarrollar nuevas variedades tolerantes a dichas condiciones para garantizar la seguridad alimentaria de la población. Teniendo en cuenta esta problemática la Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA), implementó un proyecto dirigido a la obtención de genotipos de arroz (*Oriza sativa* L. y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerantes a las altas temperaturas, dos productos básicos esenciales en la dieta de millones de poblaciones empobrecidas y vulnerables del mundo. En dicho proyecto participan varios países y entre ellos Cuba. Los objetivos fundamentales fueron: evaluar el comportamiento de germoplasma de arroz y frijol en condiciones de alta temperatura y la selección participativa de los mejores genotipos, así como establecer protocolos experimentales para la evaluación morfológica, fisiológica y molecular de mutantes y líneas avanzadas en condiciones de altas temperaturas y bajos suministros de agua. Se ha avanzado en la evaluación del germoplasma de arroz y frijol en condiciones de campo y se ha logrado seleccionar mutantes y somaclones de arroz de buen comportamiento en condiciones de altas temperaturas y humedad mínima y un grupo de líneas de frijol. Asimismo se trabaja en la identificación de indicadores fisiológicos para la selección temprana de genotipos promisorios.

Palabras clave: *Oriza sativa*, *Phaseolus vulgaris*

### T5.2C Regeneración de plantas y expresión transitoria del gen *uidA* en embriones somáticos de *Glycine max* cultivar INCASoy-27

Jorge L. Pérez-Pérez<sup>1,2(\*)</sup>, L.R. García<sup>1</sup>, N. Veitía<sup>1</sup>, I. Bermúdez-Carballoso<sup>1</sup>, R. Collado<sup>1</sup>, D. Torres<sup>1</sup>, C. Romero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba CP 54 830

<sup>2</sup>Universidad Granma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Carretera vía Manzanillo, km 17.5, Peralejo, Bayamo, Granma, Cuba, CP 85100 \*e-mail: jperez@udg.co.cu

El frijol de soya [*Glycine max*, (L.) Merrill] es uno de los diez cultivos de mayor importancia económica en la agricultura mundial, debido a su alto contenido en aceite y proteínas. En soya, los programas de mejora genética a través de hibridación son limitados, debido a que es un cultivo autopolinizado con bajo potencial de variabilidad genética. Esto ha motivado el uso de la Ingeniería Genética, con la posibilidad de obtener plantas transgénicas que portan combinaciones genéticas que no existen en la naturaleza. Para la transformación genética, se requiere de un sistema para la transferencia de genes, un método de selección y una metodología de regeneración de plantas. La transformación genética de embriones somáticos en soya vía *Agrobacterium tumefaciens* ha mostrado dificultades, debido a que los protocolos establecidos tienen baja reproducibilidad y son específicos para determinados cultivares, con capacidad para desarrollar la embriogénesis somática eficiente. El trabajo tuvo como objetivo, definir un sistema de regeneración de plantas vía embriogénesis somática, así como, evaluar el efecto del tiempo de sonicación y la densidad óptica de la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* en la expresión transitoria del gen *uidA* en embriones somáticos de soya cultivar Incasoy-27. Se logró la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en este cultivar. Los tratamientos de sonicación, provocaron microheridas en los embriones somáticos y favoreció la infección de la bacteria. La expresión del gen *uidA* fue detectada mediante la tinción *GUS*. Se refiere por primera vez en Cuba, la expresión transitoria del gen *uidA* con el empleo de *A. tumefaciens* asistido con sonicación en la transformación de embriones somáticos de soya.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*, *GUS*, sonicación, soya, transformación genética

### T5.3C Caracterización morfológica y molecular de somaclones de tomate (*Solanum*

## ***lycopersicum* L.) obtenidos mediante técnicas biotecnológicas**

Amelia Capote Rodríguez\*, Odalys Pérez Díaz y Norma Marrero Granado

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical 'Alejandro de Humboldt' (INIFAT). Calle 2 esq. 1, Santiago de las Vegas, La Habana CP 12 700, e-mail: amelia@liliana.co.cu

Una de las principales enfermedades que afectan el cultivo del tomate en Cuba es el tizón temprano causada por el hongo *Alternaria solani* Sor., el cual produce considerables pérdidas en los rendimientos. Sin embargo, los programas de mejoramiento genético se han visto limitados por la poca variabilidad existente en la especie y las dificultades para transferir los genes de resistencia presentes en las especies silvestres. Por tales motivos, la obtención de nueva variabilidad y la inducción de tolerancia mediante los métodos *in vitro* resultan alternativas promisorias. Para evaluar el potencial de variación somaclonal y determinar los caracteres de mayor contribución y la frecuencia de la misma, se evaluaron 15 somaclones de tomate obtenidos por el cultivo *in vitro* de segmentos nodales del cv. Cuba C-2781 (altamente susceptible) en medio de cultivo MS suplementado con 75% de filtrado del hongo como agente selectivo. Los resultados obtenidos del análisis de componentes principales realizado con los caracteres evaluados en condiciones de campo para cada una de las generaciones estudiadas (SC1 a SC4), permitieron identificar al número total de frutos, peso total de los frutos, peso promedio de los frutos y diámetro polar y ecuatorial como los caracteres que más contribuyen a la variabilidad obtenida. Se seleccionaron seis somaclones que se caracterizan por el aumento del peso promedio de los frutos y la disminución del grado de afectación al patógeno hasta alcanzar valores muy cercanos al cultivar original. Se destacan los somaclones L-35 y L-14 por mostrar los mayores valores de peso total de los frutos (556.12 g y 348.73 g respectivamente) y peso promedio de los frutos (195.95 g y 197.14 g). Las distancias genéticas determinadas mediante el análisis factorial determinante permitieron ubicar los somaclones en grupos diferentes del cultivar original (altamente susceptible), lo cual fue comprobado mediante la utilización de marcadores RAPDs.

Palabras clave: marcadores moleculares, selección *in vitro*, variación somaclonal

## **Morphological and molecular characterization of tomato somaclones (*Solanum lycopersicum* L.) obtained by biotechnological techniques**

Early blight caused by *Alternaria solani* Sor., is one of the most important disease of tomato in Cuba, because produced yields losses. However, breeding programs have been limited by its reduced genetic base and the difficult for transfer the resistance genes present in wild species. Plant improvement through somaclonal variation and *in vitro* selection results promissory alternatives. To evaluate the potential of somaclonal variation and to determine the characters of higher contribution and frequency, 15 somaclones of tomato obtained by *in vitro* culture of nodal segments of cv. Cuba C-2781 (susceptible) on medium MS supplemented with 75% of fungi culture filtrate as 'selective agent' were studied. Results obtained with the principal component analyses realized with the characters evaluated in fields' conditions of the generations studied (SC1 to SC4) allowed to identify to total number and weight of fruits, average of weight fruits and polar and equatorial diameter as the characters with highest variability. Six somaclones were selected because of its greater average weight of fruits and smaller affection by pathogen, among them L-35 and L-14 were the best. The somaclones were characterized by RAPD's and were separate in three genetic diversity groups.

Key words: *in vitro* selection, molecular markers, somaclonal variation

## **T5.4C Genetic transformation of Cuban soybean variety Incasoy-36 mediated by particle bombardment of embryonic axis**

Natacha Soto\*, Celia Delgado, Yamilka Rosabal; Aleines Ferreira, & Gil A. Enríquez

Plant Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Ave. 31 e/ 158 & 190, Playa, AP 6162, CP 10 600, Havana, Cuba \*e-mail: natacha.soto@cigb.edu.cu

An efficient procedure for genetic transformation of soybean (*Glycine max*) makes possible the introduction of desirable agronomic characteristics in this culture. We have developed a simple protocol which allows the production of transgenic soybean plants resistant to Glyphosate using embryonic axis derived from mature seeds. Bombardment parameters were optimized resulting in 50-56.5% of explants

showing transient expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene. The plasmid pCP4-EPSPS was delivered into explants at acceleration helium gas pressure of 1200 psi. After shoot pre-induction in 5m g l<sup>-1</sup> of BAP explants were placed in a selection medium MSB5 with 25 mg l<sup>-1</sup> of Glyphosate. Elongated shoots were rooted after 10-15 days on a MSB5 medium without further selection. Plantlets were adapted to soil in the greenhouse. *epsps* gene was confirmed to be present in transformed soybean plants by PCR and Roundup Ready (CP4 EPSPS) ImmunoStrip Test. Transformation efficiency (the number of PCR positive plants/the number of total embryos x 100) achieved 8.7%. The obtained efficiency was suitable for production of transgenic soybean plants with high resistance to herbicide.

Key words: *Glycine max*, glyphosate, transgenic plants

#### **T5.5C Optimización de protocolos *in vitro* para el mejoramiento genético de *Zoysia* spp. en Cuba**

Mislaidys López Rodríguez, M. C. González, W. Ramírez, L. Hernández, J. M. Pérez

Estación Experimental de Pastos y Forrajes 'Indio Hatuey'. Central España Republicana, Perico, Matanzas, Cuba.

\*e-mail: mislaidys.lopez@indio.atenas.inf.cu

El establecimiento de un servicio de encespado requiere la introducción de nuevas variedades adaptadas a condiciones edafoclimáticas locales. El mejoramiento genético es la vía más efectiva para obtención de estas nuevas variedades de césped con excelentes características agromorfológicas y adaptadas a condiciones de suelo y clima particulares. A la hora de emplear una variedad de césped en instalaciones costeras uno de los objetivos fundamentales de los mejoradores debe estar dirigido a la obtención de variedades resistentes a factores de estrés abiótico (ej. salinidad y sequía). La combinación de la variación somaclonal generada por el cultivo de tejidos con la acción de mutágenos físicos (e.j radiaciones gamma) seguido de un proceso de selección bajo condiciones controladas de estrés ofrece la mejor opción para la obtención de variedades resistentes. Sin embargo, el establecimiento de programas de mejora basados en esta biotecnología, requieren de la optimización de los protocolos de cultivo y/o tratamientos *in vitro* del material de partida (semilla agámica y botánica). En el marco de la obtención de especies

cespitosas tolerantes a la salinidad, en este trabajo presentamos un programa de mejoramiento genético con técnicas nucleares y biotecnológicas de *Zoysia* spp. teniendo en cuenta su conocida tolerancia a la sequía. Se describen los métodos de desinfección de las semillas, parámetros y dosis óptimas radiación incluyendo la curva de radiosensibilidad así como las variantes más promisorias de los medios de cultivo a emplear en la formación de callos y regeneración de plantas. Además, se discuten los marcadores morfológicos empleados para la selección de líneas tolerantes a la salinidad.

Palabras clave: césped, mutagénesis, variación somaclonal

#### **T5.6C Improving resistance to sweet potato weevil attack in transgenic sweet potato plants**

Irene Alvarez<sup>\*1</sup>, Rolando Morán Valdivia<sup>1</sup>, Bárbaro Usatorres<sup>1</sup>, Danalay Somonte<sup>1</sup>, Sonia Casas<sup>1</sup>, Yordanka Verde<sup>1</sup>, Aylín Nordelo Valdivia<sup>1</sup>, Meilyn Rodríguez<sup>2</sup>, Alfredo Morales<sup>3</sup>, Manuel Lima<sup>3</sup>, María del Carmen Castellón<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Camagüey, Cuba

<sup>2</sup> Center for Genetic Engineering and Biotechnology, CIGB, Havana, Cuba

<sup>3</sup> Institute of Tropical Roots Researches (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara, Cuba

Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) is the world's seventh most important food crop. Approximately 98% of the sweet potatoes are grown in the tropical and temperate zones of the developing world. Sweet potato weevil (*Cylas formicarius elegantulus*) is the most serious pest of sweet potato around the world causing damages in the field and in storage. In Cuba, around 45% of production is affected by this pest. No natural source of resistance to weevil is reported in germplasm collections. Integrated Pest Management practices have been carried out to reduce damages caused by the insect; however, resistant plants could be of paramount importance in such strategies. In our lab, transgenic sweet potato plants carrying a plant-like version of the cry3Aa1 gene have been obtained. Several transgenic clones have been evaluated with a sweet potato weevil infestation under field conditions. An evaluation of tuber damage allowed for the selection of some five of the clones as resistant to weevil attack, confirmed by molecular characterization methods. Even

when correspondence between toxin expression levels and resistance was observed, there was still slight damage in tubers of clones considered resistant. With the aim to improve the insecticide capacity of the plants against sweet potato weevil, a strategy embracing the cry7Aa1 gene has been performed. The activity of Cry7Aa1 toxin against two kinds of African coleopterans of *Cylas* genus has been reported. A codon-optimized version of this gene was synthesized and transferred to sweet potato plants. Tubers of transformed plants carrying the cry7Aa1 gene were challenged in cage experiments with highly infested tubers of untransformed sweet potato plants. Evaluation of insect damage was performed after a 30 day period and selection of resistant tubers was carried out. An experiment with plants expressing the Cry7Aa1 toxin under field conditions is underway. Comparisons of the levels of resistance to sweet potato weevil among higher expresser clones of every construct, carrying either cry3Aa1 or cry7Aa1 genes will be carried out. Taking into account that one of the recommended approaches to prevent or delay the development of insect resistance to these toxins is the use of two or more in the same variety, plants expressing both toxins are intended.

Key words: *B.t* toxins, transgenic plants

#### **Mejoramiento de la resistencia al ataque del Tetuán en plantas transgénicas de boniato**

El boniato (*Ipomoea batatas* L.) es el séptimo cultivo utilizado como alimento a nivel mundial. El 98 % de sus cosechas se ubica en zonas tropicales y templadas de países subdesarrollados. El tetuán (*Cylas formicarius elegantulus*) es la plaga más importante de este cultivo, causa daños en el campo y en almacenamiento, en Cuba se afectan a su causa el 45% de las producciones. En colecciones de germoplasma no existe ninguna fuente natural con resistencia a este insecto y con prácticas convencionales de manejo integrado no se han reducido las afectaciones. La obtención de plantas transgénicas con niveles de resistencia al ataque del tetuán podría ser efectiva en el control de la plaga. Nuestro grupo de trabajo ha obtenido plantas transgénicas de boniato portadoras de una versión vegetalizada del gen cry3Aa1 evaluadas en desafío con la plaga en condiciones de campo. Considerando el daño del tubérculo se seleccionaron cinco clones transgénicos resistentes al ataque del Tetuán. La incorporación del gen insecticida fue confirmada por métodos de caracterización moleculares. Los

niveles de expresión de la toxina y de resistencia se corresponden, no obstante en algunos clones que se consideraron resistentes existían daños superficiales. Teniendo en cuenta que la actividad de la toxina Cry7Aa1 contra dos clases de coleópteros africanos del género *Cylas* ha sido informada se planteó y ejecutó la transformación de las plantas de boniato con una versión codón-optimizada del gen cry7Aa1. Los tubérculos de las plantas transformadas fueron desafiados en experimentos en cajas junto a tubérculos sobre infestados de plantas no transformadas. La evaluación del daño fue realizada después de un período de 30 días, acompañada de la selección de los clones resistentes. Se encuentran en progreso un experimento en condiciones de campo con los mejores clones. Serán comparados los niveles de resistencia de los clones más altos expresores portadores del gen cry3Aa1 o cry7Aa1. Uno de los ensayos recomendados para prevenir o demorar el desarrollo de insecto resistencia a estas toxinas es el uso de dos o más de ellas en la misma variedad. Se trabaja en una única construcción molecular portadora de los dos genes que permita la obtención de plantas que expresen ambas toxinas.

Palabras clave: plantas transgénicas, toxinas *B.t*

#### **T5.7C Molecular analysis of transgenic soybean plants resistant to glyphosate**

Aneisi Reyes\*, Yamilka Rosabal, Aleines Ferreira, Emilio Carpio, Carlos Hernández, Natacha Soto, Celia Delgado, Gil A Enríquez, Ernesto González, Merardo Pujol

Plant Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Ave. 31 e/ 158 & 190, Playa, A.P. 6162, CP 10 600, Havana, Cuba \*e-mail: aneisi.reyes@cigb.edu.cu

The increase of demand and cultivation of soybean has required the development of new cultivars with improved and novel features. More than seventy million hectares of herbicide resistant soybean are planted worldwide, accounting for the 50% of total area of genetically modified crops in the world. Biochemical analysis of the introduced genes and its products, as well as composition studies for the determination of the equivalence with non-transgenic counterpart cultivars is a requirement in order to proceed with the safety and regulatory evaluation process by the corresponding authorities. We present here the results of the characterization of the glyphosate resistant transgenic soybean variety

C-IL1 An ELISA system based on polyclonal and monoclonal antibodies generated using the purified recombinant EPSPS protein expressed in *E. coli* was established. Results of PCR amplification of the epsps resistance gene, ELISA and Western quantification of the EPSPS protein in different plant organs and developmental stages, as well as the analysis of the composition of the C-IL1 transgenic plants, as compared with non-transgenic INCA-36 plants, are presented.

Key words: ELISA, EPSPS protein, soybean

### **Análisis molecular de plantas transgénicas de soja resistentes a glifosato**

El incremento de la demanda y el cultivo de la soja ha requerido el desarrollo de nuevos cultivares con caracteres novedosos y mejorado. En la actualidad se plantan en todo el mundo más de 70 millones de hectáreas de soja resistente a herbicida, las cuales significan el 50% del área total de cultivos genéticamente modificados. El análisis bioquímico de los genes introducidos y sus productos así como los estudios de composición para la determinación de la equivalencia con la contraparte no transgénica, es un requerimiento para proceder con la evaluación regulatoria y de seguridad por las autoridades correspondientes. Aquí presentamos los resultados de la caracterización de la variedad transgénica de soja C IL1 resistente a glifosato. Se estableció un sistema ELISA basado en anticuerpos monoclonales y policlonales generados, usando la proteína recombinante EPSPS expresada en *E. coli*. Se presentan resultados de la amplificación por PCR del gen *epsps*, de la cuantificación por ELISA y Western de la proteína EPSPS en diferentes órganos, estados de desarrollo de la planta así como el análisis de composición de las plantas transgénicas en comparación con las plantas no transgénicas de la variedad INCA 36.

Palabras clave: ELISA, proteína EPSPS

### **T5.8C Expresión génica de SPS en caña de azúcar**

Maribel Quintana\*, T. Terauchi, M. Matsuoka

Estación Experimental de Sancti Spíritus, Inst. de Inv. Pastos y Forrajes, Cuba. Apdo. 2228, Zona Postal 1, Sancti Spíritus, Cuba \*e-mail: pastosp@yayabo.inf.cu

La sacarosa fosfato sintetasa (SPS) es una de las principales enzimas vinculadas con el metabolismo energético en caña de azúcar, por

ello se estudió su expresión génica en diferentes tejidos. Se analizó una variedad de alto contenido de sacarosa (NiF8) en la cual se determinó la expresión del gen a nivel del tallo y hojas a través de un análisis de Northern blot con ARN total extraído de hojas jóvenes y el entrenudo número 15. Como sonda se usó un fragmento de cDNA procedente del gen SPS referido en maíz, cortado enzimáticamente con *Hin* d III (0.73 kbp). La reverso transcripción se realizó por el método 3'Full RACE diseñando los primers de acuerdo con una secuencia conservada del gen SPS para varias especies monocotiledoneas. Los productos de la reacción PCR fueron amplificados y clonados en un plásmido apropiado para la secuenciación del ADN. El fragmento del gen SPS clonado del tallo y cortado enzimáticamente con *Pst* I (1.19 kbp) fue usado como sonda para el análisis del Southern blot, con ADN genómico extraído de caña (NiF8) y maíz, digerido enzimáticamente con *Hin* d III, *Sac* I y *Xba* I. Se observó una expresión del gen más elevada en el tejido de las hojas, confirmándose esta enzima predominante en el tejido fotosintético, pero con actividad también donde se lleva a efecto el almacenamiento de la sacarosa. Se verificó la sacarosa fosfato sintetasa en caña de azúcar codificada por múltiples genes, que muestran especificidad ante diferentes tejidos con el clonaje de diferentes SPS cDNAs, expresando mayor diversidad el tejido del tallo. Las secuencias parciales obtenidas mostraron gran homología con las reportadas para este gen en varias especies vegetales, incluyendo la caña de azúcar.

Palabras clave: *Saccharum* spp., sacarosa fosfato sintetasa (SPS)

### **Tissue specific SPS gene expression in sugarcane**

Sucrose phosphate synthase (SPS) is believed to be of major importance in the pathway of sucrose accumulation in sugarcane, thus it was studied the level of SPS gene expression in leaf and stem tissue. A high sucrose content sugarcane variety (NiF8) was used to study the level of SPS gene expression in leaf and stem tissue. Northern blot analysis was performed with total RNA extracted from leaves and stem (15<sup>th</sup> internode). Partial Maize SPS cDNA fragment cut by *Hin* d III (0.73 kbp) was used as a probe. Reverse transcription was performed using 3'-Full RACE method and the upstream primer was based on a conserved SPS gene sequence. PCR reaction products from leaf and stem tissue were cloned for sequence analysis. A SPS cDNA fragment cloned from the

stem and cut by *Pst* I (1.19 kbp) was used as a probe for Southern blot analysis. The DNA surveyed was extracted from sugarcane (NiF8) and maize, and digested by *Hin* d III, *Sac* I and *Xba* I. Differences were found in the level of tissue specific SPS cDNA expression. A much higher level of SPS transcription was detected in leaves. This result confirms that SPS is a predominant enzyme of the photosynthetic tissues, but it is also active in stored tissue. Different SPS cDNA clones were found, with more diversity expressed in the stem tissue. Partially sequenced clones have shown high homologies with the SPS gene reported for several plant species, including sugarcane.

Key words: *Saccharum* spp., sucrose phosphate synthase (SPS)

### **T5.9C Caracterización isoenzimática de 10 especies del género *Lilium***

Regla M. Lara<sup>1\*</sup>, Marta Álvarez<sup>1</sup>, Marilyn florido<sup>1</sup>,  
<sup>2</sup>Lourdes Bao

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)  
mlara@inca.edu.cu

<sup>2</sup>Facultad de Biología. Universidad de La Habana

En Cuba, algunos especialistas y productores de la rama ornamental, se han dado a la tarea de incursionar en la búsqueda de nuevas metodología de propagación en el cultivo del lirio, trabajando fundamentalmente sobre la base del rescate y conservación de numerosas especies formas del género *Lilium*. Conocer la variabilidad genética del material existente es de gran utilidad para los programas de mejora genética y la identificación de los genotipos incorporados en el cultivo. Los marcadores isoenzimáticos han sido ampliamente utilizados en estudios de diversidad genética de diversas especies. En el presente trabajo se realizó la caracterización isoenzimática de 10 especies de lirio provenientes de diferentes localidades de la provincia Mayabeque. Se emplearon los sistemas enzimáticos peroxidasa, esterasas, anhidrasas carbónica, polifenoloxidasas, enzima málica así como las proteínas totales. Fue detectado un alto grado de polimorfismo entre las especies estudiadas, siendo los más polimórficos los sistemas peroxidasa, esterasas y anhidrasas carbónicas con un 100%. Los resultados permitieron conocer el grado de variabilidad existente en las especies colectadas en diferentes localidades.

Palabras clave: *Easter lily*, isoenzimas, variabilidad

### **T5.10C Uso integrado de marcadores de proteínas y ADN sobre el efecto de biorreguladores cubanos en mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.)**

Reina Margarita Hernández<sup>1</sup>, Esther Diosdado<sup>2</sup>, Belkis Peteira<sup>3</sup>, Belkis Pino<sup>3</sup>, Rosario Linacero<sup>4</sup>, Ana Vázquez<sup>4</sup>, Juan C. Cabrera<sup>5</sup>, Francisco Coll<sup>6\*</sup>, Erik García-Machado<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitario Isla de la Juventud, Cuba

<sup>2</sup>Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba

<sup>3</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Provincia Habana, Cuba

<sup>4</sup>Departamento de Genética, Universidad Complutense, Madrid

<sup>5</sup>Universidad de Notre-Dame de la Paix, Namur 5000, Bélgica

<sup>6</sup>Facultad de Química, Universidad de la Habana, Cuba

<sup>7</sup>Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana, Calle 16, No. 114 entre 1ra y 3ra, Miramar, Playa, Ciudad Habana 11300, Cuba \*e-mail: egarcia@fbio.uh.cu

El desarrollo de la Biotecnología en la solución de problemas concretos en la agricultura ha adquirido un gran auge en los últimos años, tal es el caso de la utilización de marcadores moleculares, para obtener información acerca de la estabilidad genética de las plantas regeneradas, mediante estas tecnologías. El descubrimiento de las isoenzimas ha permitido desde entonces la utilización de marcadores genéticos más eficientes que los morfológicos. Existen también diversos procedimientos para estudiar la variabilidad presente en las secuencias de ADN, sin ser necesario un conocimiento previo de las mismas. Entre estas técnicas están los RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). El objetivo de este trabajo consistió en la aplicación combinada de las técnicas moleculares de proteínas y ADN para determinar la variabilidad genética que pudieran inducir diferentes brasinoesteroides, obtenidos por la Facultad de Química, Universidad de la Habana) y el Pectimorf® (Oligogalacturónido, obtenido por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, MES) al utilizarse en el cultivo *in vitro* de mandarina Cleopatra, en sustitución de fitohormonas comerciales de alto costo y que

generalmente producen variabilidad genética. Se utilizaron plántulas obtenidas a partir de la embriogénesis somática en medio de cultivo de Murashige y Skoog con diferentes concentraciones de biorreguladores cubanos, para un total de cinco tratamientos. Se realizaron análisis electroforéticos de seis sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales. Además, se emplearon las condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y 18 cebadores del *Operon Technologies Alameda* California. La PCR mostró amplificación con 16 cebadores de RAPD, de 18 empleados. Se consideró el total de bandas por tratamiento para ambos marcadores, las que se compararon con el control, lo que permitió detectar la baja variabilidad genética en las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos.

Palabras clave: Brasinoesteroides, isoenzimas, PCR, Pectimorf®, RAPDs

#### **Integrated use of protein and DNA markers over the effect of cuban bioregulators of Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.)**

The development of biotechnology in solving specific problems in agriculture has become a boom in recent years, such is the case of the use of molecular markers to obtain information about the genetic stability of plants regenerated through these technologies. The discovery of the isoenzymes has since allowed the use of genetic markers more efficient than morphological. There are also various methods for studying the variability present in the DNA sequences, without requiring a prior knowledge of the same. These techniques are RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Were used plantlets from somatic embryogenesis in culture medium of Murashige and Skoog, with different concentrations of cuban bioregulators, for a total of five treatments. The aim of this study was the combined application of molecular techniques and DNA protein to determine the genetic variability that may induce different brassinosteroids, obtained by the Faculty of Chemistry, University of Havana) and Pectimorf® (oligogalacturonide, obtained by National Institute of Agricultural Sciences, MES) when used *in vitro* culture of Cleopatra mandarin, replacing high-cost commercial phytohormones and generally produce genetic variability. Electrophoretic analyzes were performed six isoenzyme and total protein. Also, we used the reaction conditions Chain Reaction (PCR) primers and 18 *Operon Technologies Alameda* California. The PCR

amplification showed 16 RAPD primers of 18 employees. We considered total treatment bands for both markers, which were compared with control, allowing detection of low genetic variability in plants obtained from somatic embryos.

Key words: brassinosteroids, isoenzymes, PCR, Pectimorf®, RAPDs

#### **T5.11C Caracterización mediante marcadores morfoagronómicos y bioquímicos de cultivares de fresa existentes en Cuba**

Argelys Kessel Domini<sup>1</sup>, Mercedes Lara<sup>1</sup>, María Margarita Hernández<sup>1</sup>, Orlando Coto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)

\*e-mail: argelys@inca.edu.cu

<sup>2</sup>Instituto de Fruticultura Tropical y Subtropical (IIFT)

En Cuba, en los últimos años se ha incrementado la demanda por la fresa, debido a que su propagación se ha visto muy limitada por la incidencia de factores bióticos y abióticos tales como: las plagas y enfermedades, las altas temperaturas en los meses de julio y agosto que provoca la muerte de un alto porcentaje de plantaciones durante esta temporada y a la vez se ha observado que los insuficientes cultivares con los que se cuenta presentan muy mala calidad de fruto. Es por ello que se hace necesario fomentar programas de mejora genética con el fin de aumentar las producciones de fresa y a la vez obtener variedades cubanas más resistentes. Teniendo en cuenta que la evaluación morfoagronómica de las accesiones es un método relativamente económico y constituye la base de la caracterización de las plantas y que las isoenzimas han sido una herramienta poderosa para el estudio de la variabilidad genética en estas especies, nos propusimos realizar una caracterización mediante marcadores morfoagronómicos y bioquímicos de los cultivares de fresa existentes en Cuba, para dar inicio a los programas de mejoramiento genético en el cultivo. Las caracterizaciones se hicieron mediante el descriptor para el cultivo y se emplearon cinco sistemas isoenzimáticos.

Palabras clave: fresa, caracterización morfoagronómica, bioquímica

#### **Characterization by biochemical markers morphoagronomic and strawberry cultivars existing in Cuba**



In Cuba, in recent years has increased the demand for strawberries, because its spread has been greatly limited by the incidence of biotic and abiotic factors such as pests and diseases, high temperatures that hit our country in July and August that kills a high percentage recorded during this season and also has been observed that insufficient cultivars with which we have very poor quality fruit, which is why it is necessary to promote programs breeding in order to expand the number of productions cutter while Cuban varieties resistant. Given that the evaluation of accessions morphoagronomic is a relatively inexpensive method and is the basis of the characterization of plants and isozymes have been a powerful tool for studying genetic variation in species, we undertook a characterization by and biochemical markers morphoagronomic strawberry cultivars existing in Cuba, to begin breeding programs in the crop. The characterizations were done using the descriptor for the cultivation and 5 isozyme systems were used. Sample design was used to make assessments.

Keywords: strawberry, biochemical characterization morphoagronomic

#### **T5.12C Análisis bioquímico y genético de la organogénesis indirecta de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 en presencia de NaCl**

Leticia Fuentes Alfonso<sup>1</sup>, María Luisa Ruíz Sánchez<sup>2</sup>, Pedro García<sup>2</sup>, Ana Llorente del Pozo<sup>2</sup>, Penélope García Angulo<sup>2</sup>, Rafael Álvarez Nogal<sup>2</sup>, Yunel Pérez Hernández<sup>1</sup>, Amalia Domínguez Suárez<sup>1</sup>, Anesio Mesa Sardiñas<sup>3</sup>, Sergio González Suárez<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup>Facultad de CC. Biológicas y Ambientales, Universidad de León, España

<sup>3</sup>Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba

<sup>4</sup>Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

El género *Stylosanthes* (*Fabaceae*) agrupa a la tercera parte de leguminosas forrajeras y se caracteriza por su persistencia en suelos poco fértiles. Aunque es considerado un modelo de regeneración *in vitro*, no existen referencias sobre su comportamiento en altas concentraciones salinas. En el presente trabajo se evaluó el proceso morfogenético en presencia

de NaCl de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, a partir de algunos parámetros morfológicos, fisiológicos y genéticos. Para inducir la callogénesis se evaluaron diferentes combinaciones de 2,4-D y 6-BAP, mientras que medios de cultivo con 6-BAP sólo o en combinaciones con ANA se utilizaron para evaluar la regeneración de brotes en callos de diferentes subcultivos. Posteriormente se cultivaron fragmentos de hipocótilos, hojas cotiledonales y hojas trifoliadas en un medio de cultivo formado por 1 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 4 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP con diferentes concentraciones de NaCl (0-300 mmol l<sup>-1</sup>). Para la regeneración de brotes se utilizó un medio de cultivo formado por 0.5 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y NaCl (100 y 200 mmol l<sup>-1</sup>). Ambas concentraciones de la sal también fueron utilizadas para evaluar el enraizamiento en un medio de cultivo MS a la mitad de su fuerza iónica. Aunque hubo formación de callos hasta 200 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl, para concentraciones superiores a 100 mmol l<sup>-1</sup> hubo diferencias significativas en el índice de incremento relativo diario de las masas frescas, en las masas secas, actividades de enzimas antioxidantes; así como en componentes de paredes celulares determinados mediante inmunomarcaje y espectroscopia infrarroja. Los cortes histológicos de callos con 100 mmol l<sup>-1</sup> revelaron que a los 20 días de colocados los explantes ya se evidenció la formación de yemas adventicias, lo cual no sucedió para los callos inducidos en 200 mmol l<sup>-1</sup>. La amplificación de marcadores ADN de tipo ISSR no reveló diferencias en la variabilidad genética entre regenerantes obtenidos en presencia de NaCl, aunque si permitieron detectar la ausencia de bandas específicas en brotes obtenidos del mismo callo.

Palabras clave: *Stylosanthes guianensis* CIAT-184, organogénesis indirecta, NaCl

#### **T5.14C Empleo de cepas bacterianas aisladas del cultivo *in vitro* de caña de azúcar para detectar la transferencia génica horizontal**

Leonardo J. Moreno Bermúdez\*, José Manuel Machado Rodríguez, Yelenys Alvarado-Capó, Mileidy Cruz-Martín

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

La transferencia génica horizontal es un fenómeno que debe tenerse en cuenta al realizar las evaluaciones de riesgo en plantas genéticamente modificadas, ya que estas pudieran transmitir por

esta vía los transgenes incorporados artificialmente a otros organismos con los que estén en estrecho contacto en el ambiente y afectarlos de alguna manera. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los riesgos de la transferencia génica horizontal, en especies bacterianas contaminantes de los cultivos *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) no transgénica, que en algunos casos coinciden con especies endofíticas y/o habitantes de la rizosfera de plantas transgénicas. Se determinó la capacidad de transformación natural de doce cepas de bacterias con un plásmido que contenía genes que confieren resistencia a los antibióticos Ampicilina, Estreptomicina y Espectinomicina, utilizado como vector para la transformación genética de plantas, y a partir del cálculo de las frecuencias de transformación de cada especie se establecieron los niveles de riesgo. Se obtuvieron bacterias no transformadas y otras que sí lo fueron a frecuencias desde muy bajas, en *Escherichia coli* ( $0,09 \times 10^{-7}$ ) hasta elevadas en *Pseudomonas stutzeri* ( $266,6 \times 10^{-7}$ ) con lo cual los niveles de riesgo fueron no significativos para algunas especies y significativos para otras. El hecho de que algunas de las bacterias estudiadas hayan sido naturalmente transformables constituye un factor de riesgo para las mismas, y pueden emplearse como un modelo para estudiar la transferencia horizontal de genes, en caso de encontrarse como endofíticas o asociadas a la rizosfera de plantas que hayan sido modificadas genéticamente, a la hora de realizar las evaluaciones de riesgos a dichas plantas.

Palabras clave: evaluación de riesgos, transferencia génica horizontal

The horizontal gene transfer is a phenomenon that must be taken into account when performing risk evaluation of genetically modified plants, because these ones could transmit by this method the artificially incorporated transgenes to other organisms with those they are in strait contact in the environment and affect them somehow. The aim of this study was to evaluate the risks of horizontal gene transfer in contaminant bacterial species of *in vitro* non-transgenic sugarcane cultivations (*Saccharum* spp. hybrid), which in some cases coincide with endophytic species and/or residents of the rhizosphere of transgenic plants. It was determined the capacity of natural transformation of twelve bacteria with a plasmid containing genes that confer resistance to antibiotics Ampicillin, Streptomycin and Spectinomycin, used as a vector for plant genetic transformation, and

from the calculation of the transformation frequencies, the risk levels of each species were established. Non transformed and transformed bacteria at frequencies from very low in *Escherichia coli* ( $0.09 \times 10^{-7}$ ) until very high in *Pseudomonas stutzeri* ( $266.6 \times 10^{-7}$ ) were obtained and therefore the risk levels were not significant for some species and significant to others. The fact that some of the studied bacteria were naturally transformable is a risk factor for them, and they can be used as a model to study horizontal gene transfer, in case to be found as endophytic or associated with the rhizosphere of plants that have been genetically modified when conducting risks assessments to such plants.

Key words: risks evaluation, horizontal gene transfer

#### **T5.15C Optimización de la transformación genética en *Phaseolus vulgaris* vía *Agrobacterium tumefaciens***

I. Bermúdez-Carabaloso<sup>1\*</sup>, R. Collado<sup>1</sup>, L.R. García<sup>1</sup>, N. Veitía<sup>1</sup>, D. Torres<sup>1</sup>, C. Romero<sup>1</sup>, G. Angenon<sup>2</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>Laboratory of Plant Genetics. Vrije Universiteit Brussel. Belgium

Para lograr la transferencia del ADN durante la transformación genética de *Phaseolus vulgaris* vía *Agrobacterium tumefaciens*, se hace necesario optimizar varios parámetros que intervienen en el proceso. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de: la cepa, la concentración de la bacteria, el plasmidio, el tiempo y condiciones de cocultivo y edad del explante en callos organogénicos del cultivar de frijol CIAP 7247F. Para ello, se empleó la evaluación de la expresión transitoria por ensayo histoquímico de la  $\beta$ -glucuronidasa. Como resultados de la evaluación visual, se desarrolló una escala descriptiva en grados del área del callo cubierta de puntos azules para la evaluación de la expresión transitoria GUS. Se encontró que la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* fue más efectiva en la transferencia del ADN que la C58C1. Cuando se evaluó el efecto del plasmidio, el pC3301 fue el que logró mayor expresión transitoria GUS con más del 50% de la superficie del callo cubierta con puntos azules

(Grado 3 de la escala). En lo referido a las condiciones de cocultivo con seis días y 16/8 horas de luz/oscuridad se logró entre un 50 y un 75% del área del callo cubierta de puntos azules (Grados 3 y 4 de la escala). La concentración de la bacteria de 0.5 de  $OD_{600}$  resultó la más efectiva. Se concluyó que callos en el segundo subcultivo de multiplicación son los óptimos al lograr hasta el 50% del área del callo cubierta de puntos azules. Con los resultados alcanzados en esta investigación se logró optimizar el protocolo de transformación empleando como explantes callos organogénicos de frijol. Se logró la expresión transitoria GUS a nivel de planta completa.

Palabras clave: callos, frijol, transferencia de ADN

#### **Optimization the genetic transformations of *Phaseolus vulgaris* by *Agrobacterium tumefaciens***

To achieve transfer of DNA for the genetic transformation in *Phaseolus vulgaris* by *Agrobacterium tumefaciens*, it is necessary to optimize various parameters involved in the process. Therefore, the objective of this work was to study the effect of: the strain, the concentration of bacteria, the plasmid, time and co-culture conditions and age of explant in bean organogenic callus cultivar CIAP 7247F. This was used for evaluation of transient expression by histochemical assay of  $\beta$ -glucuronidase. As a result of visual evaluation, we developed a descriptive scale in degrees callus area of blue spots cover for the evaluation of transient GUS expression. It was found that the EHA105 strain of *Agrobacterium tumefaciens* was more effective in transferring DNA which C58C1. When we evaluated the effect of the plasmid, the pC3301 was that GUS transient expression achieved greater than 50% over the surface of the callus covered with blue spots (Grade 3 scale). In regard to the conditions of coculture with six days and 16/8 h light / dark was achieved between 50 and 75% of callus area covered with blue spots (Grades 3 and 4 of the scale). The concentration of the bacteria of 0.5  $OD_{600}$  was the most effective. We concluded that callus in the second multiplication subculture are optimal to achieve up to 50% of the callus area cover with blue spots. With the results obtained in this investigation are managed to optimize the transformation protocol using as explants organogenic callus of beans. Transient expression was achieved GUS whole plant level.

Key words: beans, callus, DNA transference

#### **T5.16C Extracción eficiente de ADN genómico por lisis alcalina para el análisis de plantas genéticamente modificadas**

Luis E. Rojas\*, Maritza Reyes, Borys Chong-Pérez, Orelvis Portal

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: luis@ibp.co.cu

Los métodos de extracción de ADN genómico en plantas son generalmente trabajosos y particularmente peligrosos por el uso frecuente de solventes orgánicos (cloroformo y fenol) que atentan contra la salud. Con vistas a revertir esta situación en este trabajo se emplea un protocolo de extracción de ADN genómico por lisis alcalina con el objetivo de amplificar regiones del ADN en plantas de banano 'Grande naine' genéticamente modificadas. Como resultado de este procedimiento se obtuvo ADN nuclear con suficiente calidad y cantidad para amplificar un fragmento del gen AP 24 de tabaco en las plantas transformadas de banano. Como parte de esta investigación el método se hizo extensivo a otras especies de plantas como caña de azúcar, papaya y *Digitalis*, donde se logró amplificar mediante PCR con cebadores específicos diferentes regiones del genoma. También se logró amplificar la región avr-4 de ADN purificado a partir de micelio de *Mycosphaerella fijiensis*. Los resultados fueron similares a los logrados por métodos convencionales de extracción de ADN. La importancia de esta técnica consiste en que se logra disminuir los costos, es fiable, reduce la peligrosidad por la ausencia de solventes orgánicos, permite monitorear regiones de interés en el genoma de un amplio número de muestras y reduce el tiempo de extracción por individuo a 15 minutos.

Palabras clave: ADN, lisis alcalina, PCR, plantas transgénicas

#### **Efficient genomic DNA extraction by alkaline lysis for the analysis of genetically modified plants**

The methods for genomic DNA extraction plants are usually laborious and particularly hazardous by the frequent use of organic solvents (chloroform and phenol) that undermine health. In order to reverse this situation in this paper we used a protocol for genomic DNA extraction by

alkaline lysis in order to amplify regions of DNA in genetically modified 'Grande naine' banana plants. As a result of this procedure nuclear DNA was obtained with sufficient quality and quantity to amplify a gene fragment of AP 24 from banana transformed plants. As part of this investigation the method was extended to other non-transgenic crops like sugarcane, papaya variety Maradol roja and *Digitalis*, where it was possible to amplify different regions of the genome using specific primers. It also was amplified the *avr-4* region of the fungus *Mycosphaerella fijiensis* from lyophilized tissue. The results obtained were similar to those achieved by conventional methods of DNA extraction. The importance of this technique is that it achieves lower costs, reliable, reduces the danger by the absence of organic solvents allowing us to monitor regions of interest in the genome of a large number of samples and reduces the extraction time per individual at 15 minutes.

Key words: alkaline lysis, DNA, PCR, transgenic plants

#### **T5.17C Evaluation of ISSR markers to assess genetic variability and relationship among transgenic and non transgenic soybean genotypes**

Celia Delgado<sup>1\*</sup>, Marlyn I. Valdés<sup>2</sup>, Yuniel Hernández<sup>1</sup>, Julio R. Fernández<sup>1</sup>, Natacha Soto<sup>1</sup>, Odet Céspedes<sup>1</sup>, Aneisi Reyes<sup>1</sup>, Gil A. Enríquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Ave. 31 e/ 158 & 190, Playa, A.P. 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba \*e-mail: celia.delgado@cigb.edu.cu

<sup>2</sup>Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Calle 25 No. 455 Vedado, Ciudad Habana, Cuba

Knowledge of genetic relationships in crop breeding programs provides valuable information that can be used by plant breeders as a parental line selection tool. Therefore, DNA fingerprinting techniques have been developed for measuring genetic variability and cultivar identification. In this study, the ISSR technique was used to identify genetic relationships in 13 soybean genotypes. Twenty ISSR primers were tested and only five of them amplified clear and reproducible bands. The number of ISSR fragments generated per primer set ranged from 5 to 17. A total of 57 ISSR fragments were detected, of which 23 were polymorphic (40.35%). A dendrogram was produced according to the un-weighted pair-group mean arithmetic method (UPGMA) using

NTSYS-pc software. UPGMA dendrogram splits the 13 soybean genotypes into 9 clusters, 6 of them contained only 1 variety whereas all other genotypes were grouped into 3 clusters, each with 2 or 3 varieties. The polymorphic patterns generated by ISSR profiles showed different degrees of genetic relationship among the genotypes studied. The results indicate that ISSR may constitute a relatively simple and efficient method for analyzing genetic variation in transgenic and non transgenic soybean genotypes.

Keywords: DNA fingerprinting, *Glycine max*

#### **Evaluación de marcadores ISSR para determinar variabilidad y relación genética entre genotipos de soja transgénicos y no transgénicos**

El conocimiento de las relaciones genéticas entre los distintos genotipos de soja provee de una valiosa información a los mejoradores de esta leguminosa, ya que constituye una herramienta para seleccionar genotipos de interés que se utilizarían como parentales según el programa de mejoramiento trazado. Con el desarrollo de técnicas moleculares de análisis del ADN, es posible determinar variabilidad genética e identificación de cultivares. En el presente trabajo se usó la técnica ISSR para identificar las relaciones genéticas entre 13 genotipos de soja. Inicialmente se probaron 20 marcadores ISSR, pero solo 5 de ellos amplificaron bandas claras y reproducibles. El número de fragmentos generados por cebador estuvo en un rango de 5 a 17 fragmentos. De un total de 57 fragmentos detectados, 23 de ellos fueron polimórficos (40.35%). El dendrograma se construyó por el método UPGMA usando el programa NTSYS versión 2.1. El mismo distribuyó los 13 genotipos de soja en 9 grupos, 6 de ellos solo contenían un genotipo mientras que los demás genotipos fueron agrupados en 3 grupos, cada uno con 2 o 3 genotipos. Los patrones polimórficos generados por los perfiles de ISSR mostraron diferentes grados de relación genética entre los genotipos estudiados. Los resultados indicaron que la técnica ISSR es un método eficiente y relativamente simple para analizar la variación genética entre genotipos de soja, sean transgénicos o no transgénicos.

Palabras clave: *Glycine max*, técnicas moleculares de análisis ADN

### **T5.18C Incremento de la actividad de la $\beta$ -glucuronidasa en plantas transgénicas de tabaco que expresan la proteína P19 del *Tomato bushy stunt virus***

Danay Callard, Vivian Doreste, Yaira Sánchez, Tatiana González, Mayra Wood, Yoslane Ruiz\*, Natacha Carlos, Margarita Simón, Osvaldo Oliva, Merardo Pujol, Alejandro Fuentes

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).  
Ave 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa. Apdo 6162,  
Habana 10 600, Cuba. \*e-mail:  
yoslane.ruiz@cigb.edu.cu

Las plantas representan hoy en día un sistema alternativo de expresión para la producción de proteínas recombinantes con numerosas aplicaciones. Sin embargo, la expresión de genes heterólogos en plantas transgénicas no alcanzan con frecuencia los niveles deseados. Diferentes estudios han revelado estrategias alternativas que posibiliten la estabilidad y el incremento de los niveles de expresión de un transgén. La co-expresión de supresores del silenciamiento mediante la infiltración transitoria vía *Agrobacterium tumefaciens* ha demostrado ser una forma rápida y eficaz para aumentar los niveles de expresión de genes heterólogos en plantas. En el presente trabajo se evaluó la actividad de la proteína supresora P19 del TBSV expresada en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* L. Las hojas de plantas transgénicas obtenidas se agroinfiltraron con el gen *uidA* y mostraron un aumento de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa de hasta cuatro veces. Este enfoque puede ser útil para estudiar la expresión de otras proteínas de interés.

Palabras clave: infiltración transitoria, P19, transformación tabaco

### **P19 protein of *Tomato bushy stunt virus* stable expressed in tobacco plants enhanced $\beta$ -glucuronidase activity**

High recombinant protein expression is needed for numerous applications. However, heterologous gene expression in transgenic plants does not achieve frequently the convenient level. Hence, approaches providing tools for efficient expression of foreign genes in plants are of great interest. Transient co-expression of silencing suppressor genes by *Agrobacterium tumefaciens* infiltration has been demonstrated to be a quick and effective way to increase the expression of heterologous genes in plants. Following this idea, the activity of the P19 protein of TBSV stable expressed in transgenic *Nicotiana*

*tabacum* L. plants was assessed in this work. These transgenic plants showed a 4 fold increase in  $\beta$ -glucuronidase activity after agroinfiltration of *uidA* gene in leaves. This approach could be useful for studying the expression of other proteins of interest.

Keys words: P19, tobacco transformation, transient infiltration

### **T5.19C Enfoque práctico para la detección del evento LLrice en granos de arroz**

Ivis Morán Bertot, Lianet Rodríguez Cabrera, Camilo Ayra Pardo\*, Rolando Morán Valdivia, Orlando Borrás Hidalgo, Merardo Pujol Ferrer, Milagros Ponce Castillo y Carlos Borroto Nordelo

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).  
Ave 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa. Apdo 6162,  
Habana 10 600, Cuba \*e-mail:  
camilo.ayra@cigb.edu.cu

A menudo es complicado contar con un método fiable para comprobar la presencia de productos genéticamente modificados en una muestra, principalmente debido a la falta de materiales de referencia certificados y la información molecular de la variedad genéticamente modificada. En 2006 Bayer CropSciences notificó la presencia, en niveles bajos, del evento no regulado LLrice601 en algunas muestras de semillas de arroz comercial. En el presente trabajo se describe un enfoque práctico analítico desarrollado en nuestro laboratorio para verificar las importaciones de arroz de la posible presencia del evento LLrice601. El aislamiento de ADN genómico a partir de granos de arroz es a veces difícil debido al alto contenido de almidón en comparación con el bajo contenido de ADN, que puede estar fragmentado. Aquí se describe el uso del método de bisulfito de sodio con modificaciones menores para obtener ADN genómico de alta calidad para amplificación por PCR y qPCR. La combinación entre ambos PCR, punto final y en tiempo real (RT-PCR) permite determinar de manera cualitativa la presencia del gen bar, bar-35S y en el caso específico LLrice601 usando un plásmido de ADN sintético o eventos específicos en lugar de fragmentos de materiales de referencia certificados. Para el análisis RT-PCR se utilizó el Kit de Qiagen QuantiTect SYBR Green PCR, en equivalencia con los métodos oficiales de la CE de detección, PCR semi-cuantitativo Taqman, tanto para P35S:: Bar y en el caso específico de la detección LLrice601.

Palabras clave: ADN genómico, LLrice601, *Oriza sativa* RT-PCR

### **A practical approach to screen for the presence of LLrice events in rice grains**

To count on a reliable method to test for the presence of GM products is often complicated mainly because of the lack of certified reference materials and molecular information of the GM variety. In 2006 Bayer CropSciences notified that unregulated LLrice601 was present in some samples of commercial rice seed at low levels. In the present work we describe a practical analytical approach developed in our laboratory to check on rice imports for the possible presence of genetically modified rice LLrice601. The isolation of genomic DNA from rice grains is sometimes tricky because of the high starch content in this material compared with the low content of DNA that might be fragmented. Here we describe the use of the sodium bisulfite method with minor modifications to obtain genomic DNA with high quality for PCR and qPCR amplification. A combination of both end-point PCR and Real Time PCR to qualitatively test for the presence of bar gene, 35S-bar and the specific event LLrice601 using either plasmid DNA or a synthetic event-specific fragment instead of certified reference materials is reported. For RT-PCR analysis we used the QIAGEN QuantiTect SYBR Green PCR Kit as compared with the EC official methods for P35S: Bar and LLrice601 event-specific detection that both performed Taqman PCR procedures for semi-quantitative detection.

Key words: genomic DNA, LLrice601, *Oriza sativa*, RT-PCR

## **Sesión VI: Biotecnología, cambio climático y seguridad alimentaria / *Biotechnology, climate change and food security***

### **T6.2 Regeneración *in vitro* de *Viguiera dentata*: una planta acumuladora de metales contaminantes con uso potencial para la fitorremediación de suelos**

Rodrigo Ramos Arrieta<sup>1\*</sup>, Marisela González Avila<sup>2</sup>, Antonia Gutiérrez Mora<sup>2</sup> y José L Blasco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Politécnica de Pachuca, Zempoala, Hidalgo

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Guadalajara, Jalisco \*e-mail: rodarrieta@hotmail.com

La fitorremediación de suelos se basa en la capacidad de algunas especies vegetales para tolerar, absorber, acumular y degradar compuestos contaminantes. Se conocen diferentes especies de plantas nativas del estado de Hidalgo con capacidad de acumular metales pesados como el caso de *Viguiera dentata*. La micropropagación permite una producción masiva de individuos idénticos a la planta madre en este caso acumuladores de metales contaminantes, las cuales a futuro pueden ser aplicadas en fitorremediación. El objetivo de este trabajo es desarrollar un protocolo de micropropagación para *Viguiera dentata*. Se colectaron plantas en la región minera de Zimapán, Hidalgo. Se transportaron en solución hidropónica de Hoagland y Arnon. Se desinfectaron explantes de tallo y hoja con choques térmicos seguidos de 1 g l<sup>-1</sup> de Bactrol® y Captan® por 15 min, después 300 mg l<sup>-1</sup> de Rifampicina en agua estéril por 24 h en agitación constante, posteriormente alcohol etílico al 70%, seguido de NaClO al 3%. Se sembraron ápices en medio de cultivo MS complementado con los reguladores 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y Bencilaminopurina (BAP). Finalmente, se realizó, un gradiente de concentraciones con 0.5 y 1.0 mg l<sup>-1</sup> de Ácido Naftalenacético (ANA) y 0, 0.5, 1.0, 2, 4 mg l<sup>-1</sup> de Bencilaminopurina (BAP) para la regeneración de plantas a través de organogénesis. Sólo sobrevivió un explante de tallo de *Viguiera dentata* que produjo callo friable. Otras observaciones mostraron la regeneración de hojas en 0.0 mg l<sup>-1</sup> de ANA y 2.0 mg l<sup>-1</sup> de BAP en aproximadamente dos semanas. Con 2,4-D y BAP se logró la obtención de callo friable para regeneración y con el factorial de concentraciones de ANA y BAP se obtuvo la regeneración de hojas en aproximadamente dos semanas con 0.0 mg l<sup>-1</sup> de auxinas y 2.0 mg l<sup>-1</sup> de citocininas.

Palabras clave: callo friable, explante, micropropagación, organogénesis

### **Regeneration *in vitro* *Viguiera dentata*: a plant metal accumulating contaminants with potential use for phytoremediation of soils**

Phytoremediation of soils is based on the ability of some plant species to tolerate, absorb, accumulate and degrade contaminants<sup>1</sup>. Known species of plants native to the state of Hidalgo with ability to accumulate heavy metals such as

*Viguiera dentata*<sup>2</sup> case. Micropropagation allows mass production of individuals identical to the parent plant in this case accumulators of contaminant metals, which in future can be applied in phytoremediation. The objective of this work is to develop a micropropagation protocol for *Viguiera dentata*. Plants were collected in the mining region of Zimapán, Hidalgo. Were transported in hydroponic solution of Hoagland and Arnon<sup>3</sup>. Were disinfected stem and leaf explants with thermal shock followed by 1 g l<sup>-1</sup> Bactrol ® and Captan ® for 15 min, then 300 mg l<sup>-1</sup> of Rifampicin in sterile water for 24 h under constant stirring, then ethyl alcohol at 70 %, followed by NaClO 3%. Were cultured on MS medium supplemented with regulators 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and benzylaminopurine (BAP). Finally, a declivity of concentrations 0.5 and 1.0 mg l<sup>-1</sup> naphthaleneacetic acid (NAA) and 0, 0.5, 1.0, 2, 4 mg l<sup>-1</sup> of benzylaminopurine (BAP) for plant regeneration through organogenesis was performed. Only survived a stem explant of *Viguiera dentata* that produced callus friable. Recent observations showed regeneration of leaves in 0.0 mg l<sup>-1</sup> NAA and 2.0 mg l<sup>-1</sup> of BAP in about two weeks. With 2,4-D and BAP was achieved to obtain friable callus to regeneration and the factorial of ANA and BAP concentrations was obtained regeneration of leaves in about two weeks with 0.0 mg l<sup>-1</sup> auxin and 2.0 mg l<sup>-1</sup> of cytokinins.

Key words: friable callus, explant, micropropagation, organogenesis

## **T6.6 Farming in the cloud: advantages and challenges of utilizing cloud computing in plant informatics**

Robert Dourandish

Quimba Software, California, United States e-mail: bob@quimba.com

Worldwide some 925 million people are chronically hungry due to extreme poverty, while up to 2 billion people lack food security intermittently due to varying degrees of poverty. Six million children die of hunger every year – 17,000 each day. Further, the steadily increasing global demand for biofuel crops is likely to provide economic incentive to divert farmland from essential food crops, thus pushing food prices higher through lowering supply while the demand (population) continues to grow. Such global statistics and trends highlight the need to improve global food security through lowering of

prices for staple foods, especially cereals, by increasing crop yields, and to increase retained nutrition, particularly in staple foods in poverty-stricken regions around the world. A time- and cost-efficient approach to achieve these objectives is to use Plant Informatics as a key, though not the only component of agricultural research. Specifically, use of Plant Informatics techniques, through data mining and simulation, could significantly accelerate time-consuming tasks such as location and characterization of protein binding sites, e.g., for pesticide or fertilizer development; "dry" testing, through simulation, of hypothesis to create plant hybrids; or predicting potential eventual success of methods to improve single plant attributes, such as grain size (crop yield) in some cereals; or creating nutritionally fortified foods, such as Golden Rice. The advantages of Plant Informatics, however, are quickly offset by the rather high cost of creating and maintaining a minimally-efficient computing environment. This is particularly true because such computing environments need to be maintained by a dedicated team of highly trained Information Technology professionals. Further, if the Informatics environment is to support simulation the cost will increase by at least several orders of magnitude as compared to systems purposed exclusively for data mining. Cloud Computing offers a solution to the cost of creating an infrastructure suitable for Plant Informatics research through various of its properties such as on-demand scalability, shared cost of collecting, organizing, and maintaining the peta-scale data volumes that are necessary for most data mining or simulation projects in Informatics, and minimizing, if not entirely eliminating, the requirement that organizations maintain their own local staff of Information Technology professionals. In fact, the collective of the Cloud Computing attributes have fundamentally changed, for the better, the economics of creating Informatics-centric agriculture research. This paper focuses on the particular needs of financially-constrained research organizations, e.g., small universities, particularly in developing countries, in creating a Cloud-based Plant Informatics laboratory. The paper will first introduce Cloud Computing to non-computing professionals. We then consider functions of a prototypical Plant Informatics project and will present a high-level view of all elements needed to implement this project in the Cloud. Finally we will conclude with a discussion of how Cloud Computing is poised to become an important tool in food production.

## T6.9 Evaluación de la capacidad de bioacumulación de manganeso en *Thelypteris kunthii* en condiciones de cultivo hidropónico

Juan I. Guerrero-Gutiérrez<sup>1</sup>, Claudia C. Gómez-López<sup>1</sup>, Leticia Pacheco<sup>2</sup>, Myriam Arriaga-Alba<sup>3</sup>, Marisela González-Avila<sup>4</sup>, José Luis Blasco<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Área de Biotecnología, Universidad Politécnica de Pachuca, Carr. Pachuca-Cd. Sahagún km. 20, Rancho Luna, Ex-Hacienda de Santa Bárbara, Municipio de Zempoala, Hidalgo, México CP 43 830. e-mail: jlblascoc@yahoo.com.mx

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, DF, México

<sup>3</sup>Hospital Juárez de México, México, DF, México

<sup>4</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco AC, Guadalajara, Jalisco, México

Las plantas acumuladoras de metales y metaloides tienen un amplio potencial para la fitoremediación de ambientes contaminados. El helecho *Thelypteris kunthii* crece en el distrito minero de Molango, Hgo., y es una planta acumuladora de manganeso como muestran estudios previos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la acumulación de Mn en esta planta en condiciones de cultivo hidropónico en invernadero. Se aplicaron 0, 0.1, 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 mmol l<sup>-1</sup> de Mn en solución nutritiva de Arnon y Hoagland a ejemplares de *T. kunthii*, colectados en Molango, Hgo. Los parámetros ambientales medidos diariamente durante el tratamiento con Mn fueron: temperatura, humedad relativa, CO<sub>2</sub> y radiación PAR, mientras que en la solución nutritiva se monitorearon pH y CE durante 28 días. La solución fue aireada de forma continua y reemplazada cada cuatro días. Se realizaron determinaciones de Mn en raíces y lámina mediante espectrofotometría de absorción atómica. A concentraciones de 25 mmol l<sup>-1</sup> Mn se obtuvo la máxima acumulación en lámina (34,544.50 mg kg<sup>-1</sup> PS), mientras que en raíz fue con 50 mmol l<sup>-1</sup> (29,275.83 mg kg<sup>-1</sup> PS). Ambas concentraciones ocasionaron la mayor toxicidad en toda la planta. La presencia de nuevos brotes en lámina se observó con la aplicación de 0.1 mmol l<sup>-1</sup> Mn; sin embargo, a 25 y 50 mmol l<sup>-1</sup> aparecieron nuevos rizomas. Estos resultados indican que *T. kunthii* es una planta hiperacumuladora que puede ser usada para remediación de medios contaminados con Mn, especialmente en estrategias de rizofiltración.

Palabras clave: fitoremediación, hidroponía, manganeso, Molango Hgo. México, *Thelypteris kunthii*

## Evaluation of the manganese bioaccumulation capacity by *Thelypteris kunthii* in hydroponic culture conditions

Metal and metalloid accumulator plants have a high capacity for phytoremediation of contaminated environments. The fern *Thelypteris kunthii* grows in the mining district of Molango, Hgo. and as previous studies show, it is a manganese accumulator plant. The aim of this work was to evaluate the Mn accumulation in this plant in hydroponic culture conditions in greenhouse. Mn concentrations of 0, 0.1, 1, 2.5, 5, 10, 25 and 50 mmol l<sup>-1</sup> were applied to *T. kunthii* specimens in Arnon and Hoagland nutrient solution, collected in Molango, Hgo. The following ambient parameters were measured daily during Mn treatment: temperature, relative humidity, CO<sub>2</sub> and PAR radiation, while pH and EC were monitored in nutrient solution for 28 days. Solution was aired continuously and replaced every four days. Mn quantification was done in roots and blades by atomic absorption spectrophotometry. Maximum Mn accumulation was observed in roots treated with concentration of 25 mmol l<sup>-1</sup> Mn (20,892.98 mg kg<sup>-1</sup> DW), while the highest in blade was reached with 50 mmol l<sup>-1</sup> (22,301.94 mg kg<sup>-1</sup> DW). Both concentrations caused the highest toxicity in the whole plant. New shoots were observed in blade when 0.1 mmol l<sup>-1</sup> Mn was applied; nevertheless, new rhizomes appeared with 25 and 50 mmol l<sup>-1</sup>. These results indicate that *T. kunthii* is a hyperaccumulator plant that can be used for remediation of Mn-contaminated media, specially in rhizofiltration strategies.

Keywords: hydroponics, manganese, Molango Hgo. México, phytoremediation, *Thelypteris kunthii*

## T6.1C La biotecnología al servicio de la agricultura. Fundamentos y aplicaciones

Leidy Cortegaza<sup>1</sup>, O. Santana<sup>23</sup>, G. Pérez<sup>1</sup>, Yenima Pellón<sup>1</sup>, Odalmis Dihigo<sup>1</sup>, Ilaisy Gago<sup>1</sup>, Yuraimi Delgado<sup>1</sup>, Odalis Nodarse<sup>4</sup>, L. Cabrera<sup>1</sup> y I. Santana<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Estación Provincial de Investigación de la Caña de Azúcar. Matanzas. Cuba.

\*e-mail: lcortegaza75@epica.atenas.inf.cu

<sup>2</sup>Centro de Investigación Agraria de Albaladejito. Carretera Toledo-Cuenca km 174, 16194 Cuenca. España.



<sup>3</sup>Parque Científico y Tecnológico de Albacete. Paseo de la Innovación 1, 02006 Albacete<sup>4</sup>

<sup>4</sup>Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Carretera Cujae Ciudad de La Habana

En el curso de los últimos años, la investigación en el campo de la Biotecnología aplicada a la Agricultura cañera ha asumido una importancia creciente, conforme se ha puesto de manifiesto por la urgente necesidad de dar una respuesta a problemas cruciales derivados del crecimiento de la población mundial, como el aumento de la demanda de alimento, la exigencia de un mayor nivel de vida saludable y la expansión de las áreas urbanas en detrimento de las zonas de cultivo y los espacios naturales. Por otra parte existe un claro peligro de extinción de gran número de plantas y especies animales, y esa pérdida entraña la desaparición de recursos naturales cuyo potencial todavía es impredecible, si bien lo conocido hasta el momento hace albergar las mejores esperanzas a los especialistas. Se ofrece una amplia revisión bibliográfica que abarca los períodos de desarrollo por los que ha atravesado la Biotecnología, las categorías principales en las que se agrupa la Biotecnología moderna, la relación existente entre esta disciplina y el desarrollo de la Agricultura, los fundamentos y aplicaciones del cultivo de tejidos con especial énfasis en el cultivo de la caña de azúcar, destacando las principales áreas de aplicación como la micropropagación acelerada, el mejoramiento genético *in vitro*, la obtención de metabolitos secundarios de amplio espectro de acción y gran multifuncionalidad así como la conservación de germoplasma en condiciones controladas. Se presentan los resultados prácticos de la aplicación de las técnicas del cultivo *in vitro* en el saneamiento de variedades de caña de azúcar, la conservación *in vitro* de formas originales del género *Saccharum* spp. así como la selección de somaclones resistentes al carbón de la caña de azúcar a partir de variedades susceptibles.

Palabras clave: biotecnología, caña de azúcar, aplicaciones, *in vitro*

#### **Biotechnology at the service of sugarcane agriculture. Base and applications**

During last years, research on applied biotechnology to sugar cane agriculture has assumed an increasing importance, according with the urgent necessity to answer to important problems resulting from worldwide population growth, as increase of food demand, grater

healthy life level and expansion of urban areas in detriment of cultural activities and natural spaces. By the other hand, we face danger of extinction of plant and animal species and their loss represent disappearance of natural resources whose potential is unpredictable, knowledge's obtained until now give, best hope to specialist. An ample bibliography revision Offered here in include development periods that has been taken into account to biotechnology and its relation ships between this discipline and development of agriculture, fundamentation and application of tissue culture, with particular emphasis in sugarcane culture, explaining main application subjects as rapid micropropagation *in vitro* genetic improvement, obtention of secondary metabolites with ample spectrum of action and high multifunctionality, as well as germplasm conservation in controlled conditions. In this paper presented practical results on *in vitro* culture to clean sugarcane varieties, conservation of original form of *Saccharum* genus, as well as selection of resistant somaclone to sugarcane smut disease, beginning from susceptible genotypes.

Key words: Applied biotechnology, tissue culture, rapid micropropagation

#### **T6.2C El cambio climático y la biodiversidad: impactos esperables sobre los bosques cubanos**

Alicia Mercadet\*, Arnaldo Álvarez, Arlety Ajete, Osiris Ortiz

Instituto de Investigaciones Agro-Forestales. Calle 174 # 1723 e/ 17B Y 17C. Rpto. Siboney, municipio Playa. La Habana. Cuba \*e-mail: mercadet@forestales.co.cu

Reiteradamente se ha alertado sobre los riesgos que implican para la biodiversidad los impactos del cambio climático tales como el aumento de la temperatura, el nivel medio del mar, la intrusión salina en los acuíferos subterráneos y la reducción de las lluvias, entre otros. Debido a que el tiempo requerido por los sistemas naturales para adaptarse a esos procesos es mucho mayor que la velocidad a la que ellos ocurren y en consecuencia, los sistemas naturales se desestabilizan, aumentan sus vulnerabilidades ante otros efectos negativos y las especies con menor capacidad adaptativa general o las más adaptadas a condiciones específicas propias de hábitat restringidos, elevan sus riesgos de extinción. El objetivo del estudio se centra en la evaluación de los impactos del cambio climático sobre el recurso

forestal, utilizando los escenarios definidos por el IPCC. Se presenta una síntesis de los principales resultados alcanzados en diversos estudios de caso que incluyen la evaluación de los impactos registrados o esperables sobre la biodiversidad forestal debido al aumento de la temperatura (Sierra Maestra) con la variación de las lluvias (Baracoa), así como por el aumento del nivel medio del mar (Ciénaga de Zapata), resaltando la importancia de acometer a tiempo estudios que permitan la elaboración de estrategias adecuadas para la conservación de estos recursos, incluyendo no solo el empleo de los métodos convencionales habitualmente utilizados, sino también métodos biotecnológicos que faciliten la protección tanto de la variabilidad interespecífica, como de la intraespecífica.

Palabras clave: biodiversidad, bosques, cambio climático, conservación, impactos

#### **Climatic change and biodiversity: expected impacts on Cuban forests**

It has been alerted frequently about the risks that for the biodiversity imply impacts of climatic change such as the increase of temperature, the mean level of the sea, the saline intrusion in underground aquifers and reduction of the rains, among others, because the time required by the natural systems to adapt to those processes is much bigger than the speed to which they happen and as consequence, the natural systems are destabilized, their vulnerabilities increase with other negative effects and the species with smaller general capacity of adaptation, or those more adapted to specific conditions characteristic of restricted environments, elevate their extinction risks. The objective of the study is centered in the evaluation of the impacts of the climatic change on the forest resource, using the scenarios defined by the IPCC. A synthesis of the main results is presented, reached in diverse study of cases that include the evaluation of expected or registered impacts on forest biodiversity due to the increase of the temperature (Sierra Maestra), with the variation of the rains (Baracoa), as well as for the increase of the mean level of the sea (Ciénaga de Zapata), standing out the importance of studies that allow the elaboration of appropriate strategies for the conservation of these resources, including not only the employment of the habitually used conventional methods, but also biotechnological methods that facilitated the protection of the interspecific, as so the intraspecific variability.

Key words: biodiversity, climatic change, conservation, forests, impacts

#### **T6.3C Cambio climático y seguridad alimentaria: un desafío para los mejoradores**

Arnaldo Álvarez Brito

Instituto de Investigaciones Forestales, MINAG, Calle 174 No. 1723 entre 17B y 17C, Siboney, Playa. La Habana. e-mail: archie@minag.cu

Las especies vegetales que intervienen en la seguridad alimentaria de la especie humana son vulnerables a los impactos del cambio climático. La temperatura máxima en Cuba en los últimos 20 años ha aumentado 0.8°C, mientras que la mínima se incrementó en 1.6°C. Asimismo, el acumulado anual de lluvias en Cuba durante los últimos 40 años del pasado siglo descendió en 200 mm mientras que en los últimos 10 años del presente siglo, hubo una reducción adicional de 300 mm. Por otra parte, el nivel medio del mar ha aumentado en 1.43 mm anuales durante los últimos 50 años. En Cuba se aprecia una mayor frecuencia de sequías y un aumento en la intensidad de las lluvias, el incremento de la merma del potencial hídrico y el avance en profundidad, tanto horizontal como verticalmente de la intrusión salina. Además se ha registrado un aumento en la erosión y degradación física y agroproductiva de los suelos. En base a este futuro escenario cubano del cambio climático, nuestro país se trazó como prioridades lograr la adaptación a futuros impactos en las fuentes de importancia energética, la producción de papa, arroz, viandas, en especial la yuca. Asimismo se brindará apoyo a las fuentes de proteínas como: leche bovina, carne de cerdo y de huevos. Finalmente por su importancia financiera para el país se priorizará la producción de tabaco cubano. La agricultura cubana para lograr un eficiente enfrentamiento de los impactos del cambio climático tendrá que implementar programas de mejoramiento genético como una alternativa de adaptación, ya sea empleando los métodos convencionales de trabajo en esta disciplina (cruzamientos, hibridación, selección poblacional, inducción de mutaciones y otros), como con la utilización de la biotecnología vegetal (cultivo de tejido, variación somaclonal, embriogénesis somática, ingeniería genética, marcadores moleculares y aplicación de la Fisiología vegetal).

Palabras clave: adaptación al cambio climático, mejoramiento genético, producción de alimentos

#### **T6.4C Microalgas como fuente de biodiesel y alimento animal. Por el camino hacia la seguridad alimentaria y energética en Cuba**

Yatali Montero-Sánchez Rojas\*, Leonor Sabina Medina, Marlén C. Alfonso Lorenzo

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, Sede Boyeros. Carretera al ISPJAE km 2.5. La Habana, Boyeros, Cuba CP 19 390  
\*e-mail: yatali.montero@icinaz.minaz.cu

La sustitución de los combustibles fósiles por biocombustibles como el biodiesel es una necesidad para toda la humanidad considerando la disminución gradual de sus reservas mundiales así como el enorme impacto ambiental producido por su sobreexplotación. El crecimiento reciente del mercado de biodiésel, por encima del 50% anual, y las políticas de subsidios a los biocombustibles han provocado que cada vez se destinen más tierras para el cultivo de plantas oleaginosas que antiguamente se empleaban en la producción de alimentos. De continuar con esta situación pronto el mundo se verá en la encrucijada de seguridad energética vs seguridad alimentaria. Para Cuba, una isla carente de grandes reservas de petróleo, contar con fuentes renovables y sustentables de energía es un asunto de seguridad nacional. La producción de biocombustibles a partir de microalgas tiene como principal ventaja su gran productividad, como resultado de su elevado contenido de lípidos (20-50% masa seca) así como la posibilidad de obtener varias cosechas anuales, gracias a su corto ciclo de vida. Además, evita los problemas asociados a la competencia por las superficies cultivables pues no necesitan tierras de calidad y pueden ser, además, cultivadas a partir de aguas residuales con el beneficio agregado de la biorremediación. Por otra parte la torta resultante de la extracción de los lípidos presenta un elevado valor nutricional pues no solo es muy rica en proteínas de alta calidad que pueden ser empleadas como forraje sino también contiene cantidades importantes de carbohidratos y  $\beta$ -carotenos de gran importancia fisiológica. La implantación de una tecnología basada en el concepto de biorefinería en la que a partir de aguas residuales como sustrato fundamental se produzca biomasa microalgal como fuente protéica y energética; constituye una solución atractiva tanto desde el punto de vista ambiental como económico.

Palabras clave: alimento animal, biodiesel, biorefinería, microalgas

#### **T6.5C Preliminary assessment of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) for its potential use as biodiesel precursor in Cuba**

Déborah Geadá<sup>1\*</sup>, Humberto García<sup>2</sup>, Gretel Geadá<sup>1</sup>, Marlene Álvarez<sup>2</sup>, Yudelkis Martín<sup>2</sup>, Eglis Cruz<sup>2</sup>, Madelín García<sup>2</sup>, Manuel Cuza<sup>2</sup>, Yatelier Hernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Calle 25 e/ J e I. Vedado. Plaza de la Revolución. La Habana, Cuba \*e-mail: gabriel@af.upr.edu.cu

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera al Tumbadero km 8 ½. SAB 3500. Artemisa. Cuba

Tobacco seeds can offer meal and oils. It is a by-product of leaves production in several countries. Tobacco seed oil (TSO) is considered as a renewable potential energy source and almost 38% of seed is oil. Major fatty acid is linoleic acid (66-76%), its drying index and iodine values are 55-75 & 135-147 respectively. Hence, TSO is classified as semi-drying linoleic oil, is also free from nicotine and is comparable to edible oils. Because of low proportion of saturated fatty acids, could be considered as nutritionally appropriate, compared to high-saturated-fat vegetable oils. Vegetable oils are common raw materials in coating industry, especially for alkyd resins. However recently was shown that TSO could be a feedstock for biodiesel production. The biodiesel obtained had fuel properties within the limits prescribed by American and European standards. In this work, the results of open-field experiments for preliminary selection of promissory genotypes for high production of seeds and TSO (*Nicotiana rustica*, blond tobacco line 15.5C, etc) are shown, as well as a comparison different extraction method of TSO at lab scale (petroleum ether and n-hexane) was done to define a method to assist genotypes selection. The physical, chemical and fuel related properties of tobacco seed oil were investigated and reported. These properties were comparable to those of other vegetable oils and to current European specifications. This study suggests that TSO is non edible may be an appropriate substitute for diesel fuel and offers new challenges for the exploitation of this crop in Cuba. Environmental advantages of TSO as a fuel can be exploited for specific niche markets. TSO represents a possible hope for 'healthy' tobacco use and for future tobacco agriculture.

Key words: biodiesel, oil, tobacco

### **Análisis preliminar del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) para su empleo potencial como precursor de biodiesel en Cuba**

Las semillas de tabaco pueden aportar alimento y aceites. En muchos países es un bioproducto en los procesos de obtención de hojas. El aceite de la semilla de tabaco se considera una fuente potencial de energía renovable. El ácido graso mayoritario del TSO es el ácido linoleico y sus índices de secado y yodo permiten clasificarlo como un aceite semi-secante linoleico, además está libre de nicotina y es comparable a los aceites comestibles. Debido a su baja proporción de ácidos grasos saturados, se considera como nutricionalmente apropiado. Asimismo, puede ser materia prima común de las cubiertas, especialmente para las alquilesinas. Sin embargo, se conoce que el TSO es un recurso para la producción de biodiesel. El biocombustible obtenido tiene propiedades dentro de los límites prescritos por los estándares americanos y europeos. En este trabajo se muestran experimentos de campo para la selección preliminar de los genotipos promisorios altos productores de semillas y aceite (*Nicotiana rustica*, línea de tabaco rubio 15.5C), se compararon diferentes métodos de extracción del TSO a nivel de laboratorio (extracciones con éter de petróleo y n-hexano) para definir uno de estos con el cual asistir la selección de dichos genotipos, y el potencial futuro de esta investigación en Cuba. Se investigó e informó también las propiedades físicas, químicas y combustibles del TSO. Este estudio sugiere que el TSO puede ser un apropiado sustituto para los biocombustibles y ofrece nuevos desafíos para la explotación de este cultivo en Cuba. Las ventajas ambientales del TSO como combustible deben ser explotadas para nichos de mercado más específicos. Por lo que el TSO representa la posible esperanza de un uso saludable del tabaco y la agricultura futura del cultivo.

Palabras clave: aceite, biodiesel, tabaco

### **T6.6C Desarrollo forestal sostenible. Estrategia de continuidad para futuras generaciones**

Noel Pousa Sañudo

Empresa Forestal Integral Villa Clara. Especialista en Asuntos Jurídicos. Profesor Asistente de la Facultad de Derecho de la Universidad Central 'Marta Abreu' de las Villas. Cuba e-mail: noelp@ccb.uclv.edu.cu

El presente trabajo pretende brindar un análisis de la eficacia de la legislación forestal cubana como expresión de la política del Estado en aras de lograr un desarrollo económico de la actividad forestal, en equilibrio con la conservación y protección de los recursos del bosque, así como alcanzar un verdadero desarrollo socio cultural de los asentamientos humanos ubicados dentro de los ecosistemas forestales. En tal sentido se ofrece una profusa conceptualización de los términos de ordenación forestal sostenible, como instrumento imprescindible para una adecuada gestión de los recursos naturales. Se refiere en el presente trabajo, la necesidad de regular la utilización de los bosques, en virtud de un marco normativo idóneo, así como leyes y reglamentos adecuados para lograr los desafíos del milenio, preceptuándose, para tales efectos, aquellas disposiciones devenidas de los acuerdos y convenios internacionales de los que nuestro país ha sido signatario. En tal sentido, el objetivo de este trabajo ha sido determinar la eficacia de la legislación forestal en aras de lograr un desarrollo económico y humano sostenible.

Palabras clave: bosques, conservación, desarrollo sostenible

### **T6.7C Tolerancia de plántulas de *Jatropha curcas* a NaCl: un análisis ecofisiológico**

L. Díaz-López<sup>1\*</sup>, V. Gimeno<sup>2</sup>, V. Lidon<sup>3</sup>, V. Martínez<sup>2</sup>, F. García-Sánchez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Ctra a Morón, km 9 ½, Ciego De Ávila, Cuba \*e-mail: leyanes@bioplasmas.cu

<sup>2</sup>Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CSIC, Campus Universitario de Espinardo, Espinardo, 30100, Murcia, España

<sup>3</sup>EPSO (Univ. Miguel Hernández), Ctra. Beniel km 3.2 03312 Orihuela (Alicante), España

*Jatropha curcas* L. recientemente ha llamado la atención debido a su potencial como productora de biocombustible, habiéndose establecido que es resistente al estrés hídrico. Sin embargo, su tolerancia a la salinidad no ha sido bien estudiada. Fueron cultivadas plántulas de cuatro semanas de edad para evaluar los efectos del estrés salino en el crecimiento, relaciones hídricas de la hoja y solutos orgánicos, concentraciones minerales de las hojas y raíces, parámetros de fluorescencia de la clorofila, y concentración de carbohidratos. Se evaluaron seis tratamientos con diferentes concentraciones

de NaCl (mM) en el agua de riego: 0 (control), 30, 60, 90, 120 y 150. La biomasa total mostró una disminución inducida por la sal a concentraciones iguales o superiores a 60 mM NaCl. Por el contrario, los parámetros referidos a la acumulación de la biomasa: peso seco de la hoja, peso seco del tallo, peso seco de la raíz y la relación parte aérea/raíz no fueron afectados. La concentración de  $\text{Cl}^-$  fue significativamente superior a la de  $\text{Na}^+$  en cualquiera de los tejidos analizados. Los máximos valores de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  se observaron a 60 y 90 mM NaCl, respectivamente. La salinidad no afectó el potencial hídrico y contenido relativo de agua foliar. Sin embargo, indujo una disminución en la concentración de  $\text{K}^+$  en hojas, acompañado de una importante promoción en los niveles foliares de P, S, Fe, Zn, Mn, Cu. La asimilación de  $\text{CO}_2$  se vio limitada por los tratamientos salinos. Esto estuvo condicionado por limitaciones no estomáticas a partir del aumento en  $\text{Ca}/\text{Ci}$  y la disminución de la eficiencia máxima del fotosistema II. Los resultados sugieren una moderada tolerancia de plántulas de *J. curcas* a la salinidad, a partir de que toleraron hasta  $4 \text{ dS m}^{-1}$  (CE agua de riego; 30 mM NaCl). Estos efectos negativos se debieron a la toxicidad inducida por  $\text{Cl}^-$  and  $\text{Na}^+$ , acompañado por un desbalance nutricional causado por el incremento en la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . El efecto osmótico de la salinidad en esta especie resultó insignificante, quizá debido a un fuerte control de la transpiración foliar para evitar la pérdida de agua.

Palabras clave: conductancia estomática, intercambio gaseoso, nutrición mineral, salinidad

#### **Tolerance of *Jatropha curcas* seedlings to NaCl: an ecophysiological analysis**

*Jatropha curcas* L. has recently drawn the attention of the international research community due to its potential as a biodiesel crop. In addition, it is known that this plant species is drought-stress resistant. However, their salt tolerance has not been studied to date. Four weeks-old *J. curcas* were grown in fertilized substrate to evaluate the effects of NaCl salinity stress on growth, leaf water relation and organic solutes, leaf and root mineral concentration, chlorophyll fluorescence parameters, and leaf carbohydrate concentration. The experiment consisted of six treatments using different NaCl concentrations (mM) in the irrigation water: 0 (control), 30, 60, 90, 120 and 150. Total biomass decreased above 60 mM NaCl treatment but the calculated allocation parameter leaf weight ratio, shoot weight ratio, relative root weight and root to

shoot ratio did not change by salt treatments. All salt treatments increased  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  concentration but the  $\text{Cl}^-$  concentration was higher in all plant tissues than the  $\text{Na}^+$  concentration, reaching the maximum values for 60 and 90 mM NaCl, respectively. Leaf water potential and leaf relative water content were not affected by any salt treatments. However, leaf  $\text{K}^+$  concentration was decreased and leaf P, S, Fe, Zn, Mn, Cu was significantly increased by the salt treatments. Net assimilation  $\text{CO}_2$  was decreased by salt treatment due in part to non-stomatal limitation as supported by  $\text{Ca}/\text{Ci}$  was increased and maximum quantum efficiency of photosystem II were decreased. These results suggest that *J. curcas* seedlings are moderately salt tolerance as were able to tolerate up to  $4 \text{ dS m}^{-1}$  (EC water irrigation; 30 mM NaCl). Negative effect of the salinity are due to  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  toxicity and nutritional imbalances caused by an increase in the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio. Osmotic effect of the salinity on this specie is negligible perhaps due to a strong control of the leaf transpiration avoiding water loss.

Key words: leaf gas exchange, mineral nutrition, salinity stress, stomatal conductance

#### **T6.8C Uso de la biotecnología vegetal en apoyo del sector forestal y agrícola para facilitar la adaptación al cambio climático**

Leiva-Mora M\*, Y. Pérez Bravo, R. Sánchez-Morales, O Hurtado, S Torres, A Álvarez Brito, Y. Alvarado-Capó, A Mercadet Portillo, M. Acosta-Suárez, M. Cruz-Martín, C. Sánchez-García, B. Roque, M Freire-Seijo

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: michel@ibp.co.cu

La biotecnología vegetal se basa en el cultivo de células, tejidos y órganos en medios de cultivos artificiales. La micropropagación puede ser usada para el cultivo de numerosas poblaciones de plantas élite de especies agrícolas y forestales, las que son genéticamente idénticas y pueden propagarse en breves periodos de tiempo. La biotecnología también resulta útil para multiplicar aceleradamente varias especies agrícolas como la yuca, papa, caña, frutas pequeñas y árboles frutales, ya que la mayoría de ellas son macropropagadas vegetativamente mediante técnicas tradicionales. En los escenarios climáticos futuros de Cuba, se espera un incremento en la sequía, el nivel medio del mar,

la intrusión salina, la temperatura y la concentración del CO<sub>2</sub> atmosférico. Estos retos climáticos podrían ser grandes oportunidades para la biotecnología vegetal en la determinación de los mecanismos fisiológicos y moleculares de la tolerancia al estrés abiótico, en la evaluación de la respuesta fotosintética e índices fisiológicos, así como de la productividad de los principales cultivos cubanos. Asimismo, la biotecnología vegetal podría ayudar al entendimiento de la eficiencia en el uso del agua por las plantas en relación con la producción de alimentos y biomasa vegetal. En el presente trabajo se evaluó la productividad, el potencial de secuestro de carbono, el contenido de agua de tres especies de bambúes y además se determinaron índices fisiológicos asociados al crecimiento de variedades de papa, para poder predecir la respuesta de dichas especies bajo los futuros escenarios de clima en Cuba. Nuevas alternativas de adaptación al cambio climático pueden surgir en apoyo de los sectores agrícola y forestal en Cuba para facilitar la disponibilidad de alimentos, incrementar el poder adquisitivo, permitir una distribución apropiada de alimentos y lograr su uso eficiente.

#### **Use of plant biotechnology to support forestry and agriculture for facilitate adaptation to climate change**

Plant biotechnology is based on tissue culture for growing plant cells, tissues and organs on artificial media. It includes techniques and methods used to research into many scientific disciplines and has several practical objectives. Micropropagation may be used for cultivation of many agricultural and forestry elites populations of plants, which are genetically identical and can be propagated in a short time. Biotechnology are suitable also for multiply in a short time many agricultural crop plants as cassava, potato, sugarcane, soft (small) fruits and fruit trees, because most of them are traditional 'macropropagated' vegetatively. In the future Cuban climate scenarios is expected the increase of drought, mean sea level, saline intrusion, temperature and atmospheric CO<sub>2</sub> concentration. Those climate challenges could be great opportunities to plant biotechnology and ecophysiology to elucidate physiological and molecular mechanisms of abiotic stress tolerance and for determining photosynthetic response and productivity of main Cuban crops. Similarly, in the future scenarios plant ecophysiology could help to understand the water use efficiency in relation with food and biomass production. In the present work productivity, carbon sequestration potential,

water content of three bamboo species were evaluated and also, physiological indexes were determined for growing of potato's varieties, in order to predict responses of those species under the future climate scenarios in Cuba. New adaptation alternatives to climate change could emerge to support forestry and agriculture sectors in Cuba to facilitate secure access to food, purchasing power, appropriate food distribution, and adequate use of food at the household level.

#### **T6.9C Efecto de diferentes dosis y momentos de aplicación de quitosana en la respuesta productiva del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad 'Spunta'**

Lliddrey Torres Hernández<sup>1\*</sup>, Donaldo Morales Guevara<sup>2</sup>, Yenisel de la Rosa<sup>2</sup>, Alexander Guerrero<sup>2</sup> y Yanett Mora<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Matanzas 'Camilo Cienfuegos', Cuba  
\*e-mail: lliddrey.torres@umcc.cu

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología y Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba

La investigación se desarrolló en la finca 'Las Papas', perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, en el período de enero-abril de los años 2010 y 2011, con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes dosis y momentos de aplicación del polímero quitosana sobre la respuesta productiva del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Spunta. Se estableció un diseño de bloques al azar con cuatro réplicas en un área de 0.14 y 0.25 hectáreas para la primera y segunda campaña, respectivamente. Se realizaron mediciones no destructivas de algunas variables tales como: longitud y diámetro de los tallos por planta, número de hojas; además en el momento de la cosecha se determinó la cantidad de tubérculos y la masa fresca de los mismos por planta, así como la acumulación de biomasa seca. Los resultados evidenciaron que la aplicación de 150 mg ha<sup>-1</sup> a los 30 y 50 ddp, presentó los mejores resultados para los parámetros más importantes que definen la respuesta productiva de la planta, demostrando la actividad bioestimulante del polímero cuando se realizan aplicaciones foliares fraccionadas de las menores dosis empleadas en el cultivo de la papa.

Palabras clave: polímero, quitosana, *Solanum tuberosum*

#### **T6.10C Manejo de recursos fitogenéticos en peligro de erosión genética en agroecosistemas tradicionales del paisaje natural protegido Gran Piedra**

En el Paisaje Natural Protegido Gran Piedra, área protegida de significación nacional, se llevó a cabo durante el año 2011 una investigación dirigida a conocer el estatus de manejo de especies en peligro de erosión genética (afió-*Arracacia xanthorriza*, sagú-*Maranta arundinacea* y yerén-*Calatea allouia*). Para la investigación se realizaron recorridos de campo que abarcaron todas las formas de producción agrícola existentes en dicha área: CPA, CCS y conucos. Las entrevistas y observaciones de campo semiestructuradas realizadas, evidenciaron que estas especies son mantenidas *in situ* por los campesinos en sus conucos, siendo los comunitarios los predominantes en este accionar. Se identificaron más de 10 usos tradicionales de estas especies, destacándose como los de mayor peso el alimenticio (59%, como promedio) y el medicinal (46%, como promedio). Para el caso del manejo generacional de estas especies, la investigación comprobó que los hombres predominan sobre las mujeres, mientras que éstas se destacan en el uso doméstico (culinario) de estas especies. La comparación relativa del manejo de estas especies hacia el interior del área protegida demostró que el sagú y el afiό, son las especies que mayormente se manejan (53 y 48%, respectivamente), en detrimento del yerén (15%), lo cual indica a su vez el bajo estatus conservacionista de estas especies. Igualmente se identifican dentro de las causales de su bajo nivel de presencia en los agroecosistemas tradicionales de la zona el escaso valor comercial (83%), la migración rural (81%) y el desconocimiento de su agrotécnica (67%).

Palabras clave: área protegida, especies en peligro de erosión genética, conservación *in situ*

#### **T6.11C Tolerancia a la salinidad durante la germinación en accesiones de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) pertenecientes a la colección tradicional de Cuba**

Nelson León\*, Leonor Castiņeiras, Tomas Shagarodsky, Adriana Torres, Odalis Pérez  
Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical. Calle 2 esq a 1. Santiago de las Vegas CP 17 200, La Habana, Cuba;  
nleon@inifat.co.cu

Los estudios del germoplasma de frijol conservado *ex situ*, así como la caracterización, evaluación y documentación de las colecciones, permiten identificar aquellas accesiones que satisfacen determinadas características y contribuye a la obtención de variedades superiores a las que se encuentran en explotación en los sistemas agrícolas, y/o tolerantes a condiciones limitantes del cultivo. En este trabajo se evaluaron, 45 accesiones de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) pertenecientes a la colección tradicional de Cuba, durante la germinación en soluciones salinas al 0, 50, 100, 150 y 200 mM l<sup>-1</sup> de NaCl. Se determinó el porcentaje de germinación de los cultivares, el largo de la radícula y del hipocόtilo y la masa fresca y seca para cada accesión en cada una de las soluciones. Se obtuvieron los índices de estrés para cada una de las soluciones y los de susceptibilidad para cada uno de los caracteres evaluados, y con esto se determinó el orden de las accesiones en cuanto a tolerancia al estrés. La longitud de la radícula fue el carácter más afectado con un índice de estrés superior al 44% en todas las soluciones. El índice de estrés de masa seca se afectó a partir de 150 mM de NaCl. Se puso de manifiesto la variabilidad entre las accesiones en estrés salino durante la germinación. Entre las accesiones evaluadas se identificó un grupo que superó el comportamiento medio observado y representa un recurso genético importante en el mejoramiento del frijol común para reducir la vulnerabilidad del cultivo ante los cambios climáticos.

Palabras clave: estrés salino, fitomejoramiento, germoplasma, *Phaseolus vulgaris*

#### **Salinity tolerance during germination in common bean accessions (*Phaseolus vulgaris* L.) concern to the traditional collection of Cuba**

Studies on bean germplasm that is *ex situ* conserved and its characterization, evaluation and record allow selecting the main accessions that satisfy certain characteristics. The management of these collections contributes to obtain the best varieties for different agricultural systems or those that are tolerant to principal restriction factors of bean crop. Salinity tolerance during germination was evaluated for 45 accessions of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) concern to the traditional collection of Cuba at 0, 50, 100, 150, 200 mM l<sup>-1</sup> NaCl. It was determined for each accession in all solutions: the germination percentage, the large of radicles and hypocotyls, and the fresh and dry weight.

The stress index for each solution and the susceptibility index for character were determined and the accessions were ranked by these index. The large of radicles was the more affected character over 44%. The stress index of dry weight was affected from 150 mM NaCl. The variability of the accessions was evident in salinity during the germination period. Among the evaluated accessions it was identified a group that exceeded the observed mean behavior and represents an important genetic resource for the common bean breeding and reduce the vulnerability to confront the environmental changes.

Key words: germplasm, plant breeding, *Phaseolus vulgaris*, salt stress

#### **T6.12C Estabilidad de la membrana celular como medidor de la tolerancia del tomate a estrés por sequía y salinidad**

Marilyn Florido<sup>1\*</sup>, Marta Alvarez<sup>1</sup>, Lourdes Bao<sup>2</sup>, Regla M. Lara<sup>2</sup>, Francisco Dueñas<sup>2</sup>, Dagmara Plana<sup>2</sup>, Alianny Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Cuba \*e-mail: luli@fbio.uh.cu

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) Cuba \*e-mail: mflorido@inca.edu.cu

La sequía y la salinidad son factores climáticos que afectan el crecimiento y la productividad de los cultivos. Teniendo en cuenta que muchos lugares experimentan la intensificación de estos eventos y por lo tanto la disminución en la producción de alimentos. El objetivo de este trabajo fue determinar la tolerancia del tomate (*Solanum lycopersicon*) a condiciones de sequía y salinidad, utilizando como indicador la medida conductimétrica de la estabilidad de la membrana celular. Para el desarrollo del mismo se tomaron discos de hojas de tres accesiones de tomate ('Ciapan-31-5', perteneciente a *S. pimpinellifolium* y los cultivares 'Campbel-28' y 'Moneymaker') y se lavaron tres veces con agua destilada. Posteriormente se sometieron a tratamientos con PEG-6000 utilizando los potenciales osmóticos 0.5, 1, 1.5 y 2 MPa y NaCl a las concentraciones de 50, 100, 150 y 200 mM, utilizando como control agua destilada. Se escogieron las mejores dosis para cada tipo de estrés, sobre la base de la detección de las mayores diferencias en los porcentajes de estabilidad de la membrana. Las dosis seleccionadas permitirán la evaluación del

germoplasma de tomate del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

Palabras clave: membrana celular, salinidad, sequía, *Solanum lycopersicon*

#### **Cell membrane stability as a measure of tolerance of tomato to drought stress and salinity**

Drought and salinity are climatic factors that affect growth and productivity of crops. Given that many places experiencing an intensification of these events and therefore the decline in food production, our objective here was to determine the tolerance of tomato (*Solanum lycopersicon*) to drought and salinity, as measured by conductivity measurement stability of the cell membrane. The leaf discs were taken from three accessions of tomato (Ciapan-31-5, belonging to *S. pimpinellifolium* and the cultivars Campbel-28 y Moneymaker) and they was washed with distilled water for three times. Then subjected to treatment with PEG-6000 using osmotic potentials 0.5, 1, 1.5 and 2 MPa and NaCl at concentrations of 50, 100, 150 and 200 mM, using distilled water as control. We chose the best dose for each type of stress, based on the detection of the major differences in the percentages of membrane stability. The selected dose will allow the evaluation of tomato germplasm at the National Institute of Agricultural Sciences.

Key words: cell membrane, drought, salinity, *Solanum lycopersicon*

#### **T6.13C La funcionalidad del agua en cuencas hidrográficas y su relevancia para la seguridad alimentaria en el contexto de adaptación al cambio climático**

Sánchez-Morales R\*, M. Leiva-Mora

Centro de Estudio de Química Aplicada, Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba CP 54 830 \*e-mail: rodolfoism@uclv.edu.cu

El cambio climático invalida el supuesto tradicionalmente aceptado de que las condiciones climáticas e hidrológicas del pasado se mantendrán en el futuro. Se plantea así, un gran desafío conceptual para la gestión sostenible de los recursos hídricos que requiere de un nuevo enfoque, que garantice su adaptación al cambio climático, bajo el principio



inviolable de una real integración del uso de los recursos hídricos en la cuenca con su ciclo hidrológico natural. Así, la gestión sostenible de los recursos hídricos debe ser basada en la funcionalidad del agua en las cuencas hidrográficas, e hidrogeológicas asociadas, lo supone asegurar las múltiples funciones del agua, y hacer posible su uso racional, ahora y en el futuro. Para este propósito, se requiere el desarrollo de herramientas de control, manejo y pronóstico como son: un sistema de indicadores apropiado, nuevas tecnologías para el monitoreo y evaluación de la calidad y cantidad del agua en las diferentes fases del ciclo hidrológico, modelos matemáticos a nivel de cultivos y de cuencas hidrográficas. En Cuba, las proyecciones climáticas muestran una tendencia al incremento de la temperatura atmosférica con la consecuente intensificación y extensión espacial de la aridez, y una mayor frecuencia de los procesos de sequía; a lo que se debe unir la posible modificación de las necesidades hídricas óptimas de los cultivos. También, se pronostica la elevación del nivel del mar, que conllevaría a la intrusión marina en los acuíferos costeros y la significativa reducción en la disponibilidad del agua subterránea debida su salinización definitiva. Además, otros factores ajenos al cambio climático como la contaminación puntual con residuales industriales y urbanos, o difusa debido a los residuos de fertilizantes y productos fitosanitarios atentan contra la calidad del agua. En tales circunstancias, la disminución de los recursos hídricos potenciales será notable, lo cual afectaría sensiblemente la relación disponibilidad - demanda - entrega - uso del agua en general, y en particular a sectores sensibles como la producción de alimentos y el consumo humano. Bajo este escenario, los rendimientos agrícolas y la estabilidad de la producción de alimentos de los cultivos en secano tienden a ser cada día menos previsibles y seguros debido a irregularidad de las lluvias. Esto hace que el incremento del área de cultivo bajo riego sea una de las principales medidas de adaptación al cambio climático en la agricultura. La reutilización del agua dentro de la cuenca es parte del concepto de funcionalidad que posibilita disponer de más agua en la cuenca que la tradicionalmente considerada; lo que conjuntamente con otras acciones como el adecuado uso de la capacidad instalada de almacenamiento de agua y uso eficiente del agua almacenada, el incremento de la eficiencia general del riego, la determinación del requerimiento hídrico de cada cultivo, elevando la eficiencia del uso del agua por la biomasa del

cultivo permiten el uso sostenible de los recursos hídricos y su adaptación al cambio climático.

### **Watershed water functionality and its relevance for food security in the context of climate change adaptation**

Climate change invalidates the traditionally accepted supposition that climatic and hydrologic conditions for the past will keep in the future. It is stated a great conceptual challenge for the sustainable management of water resources, that requires of a new approach for warranting its adaptation to climate change, under the inviolable principle of a real integration of water resources use with natural hydrologic cycle in watershed. So, the sustainable management of water resources must be based on water functionality at watersheds, and its related underground aquifers, what supposes water multi-functions are assured in order to make a rational water use, now and in the future. For this propose, it is required the development of tools for controlling, managing and forecasting like a proper system of indicators, new technologies for monitoring and assessing the quality and quantity of water at different phases of the hydrologic cycle and mathematical models for crop and watershed levels. In Cuba, climatic predictions show a tendency of atmospheric temperature to increase with the consequent intensification and spatial extension of aridity, and higher frequency of drought processes to which must be joint a possible modification of the optimal water need of crops. Also, it is foreseen a sea level raising that will conduce to sea water intrusion in near of the shore aquifers and a significant water availability reduction due to their definitive salinization. In addition to this, other issues non related with climate change like point pollution with industrial and urban wastewaters and non-point pollution due to fertilizers and fito-sanitary products are provoking water quality decrease. Under such circumstances, the diminishing of potential water resources will be noticeable affecting sensibly the relationship availability – demand – withdrawal – water use in general, and particularly in sensitive sectors like food production and human water consumption. Under this scenario the agricultural yields and stability of food production of rain depending crops become less foreseen and assured due to rain irregularity. This situation makes crop area under irrigation increasing a very important adaptation measure for climate change adaptation. Inside watershed water reuse is part of water functionality concept that makes possible greater water availability in watershed than those traditionally considered; what jointly

with another actions like an adequate use of the water storage installed capacity and storage water efficient use, the increase of the general irrigation efficiency, determining the real water requirement of each crop, rising biomass water use efficiency permit a sustainable use of water resources and its adaptation to climate change.

#### **T6.14C Evaluación de la tolerancia a la sequía durante la germinación en 30 accesiones de tomate (*Solanum lycopersicon* L.)**

Lourdes Bao<sup>1\*</sup>, Marilyn Florido<sup>2</sup>, Marta Alvarez<sup>2</sup>, Regla M. Lara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Cuba \*e-mail: luli@fbio.uh.cu

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba \*e-mail: mflorido@inca.edu.cu

El presente trabajo se desarrolló con vistas a evaluar el efecto de la sequía simulada con polietilenglicol sobre la germinación de semillas en tomate. Para el desarrollo del mismo se tomaron 50 semillas de dos accesiones de tomate con diferente grado de tolerancia a la sequía ('Campbell-28', 'cultivar comercial' y 'Ciapan 31-5', accesión tolerante perteneciente a *S. pimpinellifolium*) y se pusieron a germinar en la oscuridad en placas Petri con PEG 6000 simulando los potenciales osmóticos 0 (agua destilada); -0.25; -0.5; -0.75 y -1 MPa. Se utilizaron tres réplicas por tratamiento y se evaluó el porcentaje de germinación, días a la germinación y días al 50% de germinación. Posteriormente se evaluaron estos parámetros en 30 accesiones de tomate donde se incluyeron accesiones de *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* y *S. habrochaites*. En condiciones de estrés hídrico se retrasa la germinación, siendo las mayores diferencias entre las accesiones 'Campbell-28' y 'Ciapan 31-5' con potencial hídrico de -1 MPa, por lo que se utilizó éste en el ensayo posterior. Las 30 accesiones de tomate mostraron diferencias en su comportamiento frente al estrés hídrico. Existieron accesiones, fundamentalmente de *S. pimpinellifolium*, con respuesta similar al control, lo que confirma las perspectivas de ser utilizadas en los programas de mejoramiento genético para estrés por sequía en el cultivo.

Palabras clave: germinación, polietilenglicol-6000, sequía, tomate

#### **Evaluation of drought tolerance during germination in 30 accessions of tomato (*Solanum lycopersicon* L.)**

The aim of this research was to evaluate the effect of drought stress using polyethylene glycol-6000 over tomato seeds germination. In this experiment were taken 50 seeds from two tomato accessions with different levels of drought tolerance ('Campbell-28', 'cultivar comercial' y 'Ciapan 31-5', tolerant accession belonging to *S. pimpinellifolium*). This genotypes germinate under dark in Petri dishes containing PEG 6000 osmotic potentials simulating 0 (distilled water); -0.25; -0.5; -0.75 y -1 MPa. The experiment had three replicates per treatment and evaluated the germination percentage, days to germination and days to 50% germination. Then these parameters were evaluated in 30 accessions which included tomato accessions of *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* y *S. habrochaites*. Under conditions of water stress delayed germination, with the greatest differences between accessions 'Ciapan Campbell-28' and 31-5 with water potential of -1 MPa, so it was used in the subsequent trial. The 30 tomato accessions showed differences during germination under water stress, existing accessions, mainly of *S. pimpinellifolium*, with similar response to the control, confirming the prospects for use in breeding programs for drought stress in the crop.

Key words: drought, germination, polyethylene glycol- 6000, tomato

#### **T6.15C Caracterización florística de un área del bosque semidecídúo de la península de Guanahacabibes, municipio Sandino, Pinar del Río**

Kety Germonne Vodounou\*, Alpha Saliou Taran Diallo, Adrian Battles Estevez, Altangadas Janchivdorj, José Antonio Quintana Collazo

Universidad Pinar del Río 'Hermanos Saiz Montes de Oca'. Pinar del Río, Cuba

\*e-mail: ferdikety@ext.upr.edu.cu

La investigación se realizó en un bosque natural semidecídúo sobre suelo calizo, perteneciente al rodal 1, lote 28 de la Unidad Silvícola Cortés en la Empresa Forestal Integral de Guanahacabibes, del municipio Sandino, Pinar del Río, con el objetivo de caracterizar florísticamente el bosque semidecídúo. Para el levantamiento de las parcelas se utilizó un diseño aleatorio, con un total de doce parcelas cuadradas de 100 m<sup>2</sup>. Donde se midieron las variables dasométricas

diámetro y altura así como las hojas de cada especie lo que permitió obtener el tipo biológico, el tamaño y la textura de la hoja para cada especie. En tres parcelas se midió el radio de copa y las coordenadas de cada árbol, para el análisis de la estructura vertical y horizontal de las especies que se encuentran en bosque. Además se determinaron la diversidad alfa y beta y el índice de valor de importancia ecológico (IVIE). Las parcelas fueron ordenadas en una tabla fitocenológica por sus semejanzas mientras que las especies a partir del IVIE. Como resultado se identificaron un total de 34 especies pertenecientes a 22 familias, con un predominio de especie Microfanerófitas, con hojas cartáceas y mesófilas. Los efectos de las perturbaciones identificados fueron la ausencia de clase diamétrica superior en las especies de valor económico, la extracción ilícita de especies maderables y la presencia de claros en los bosques.

Palabras clave: perturbación, antropización, bosques semidecídulo, bosque natural