

Programa

- **Sesión 1: Martes 8 de mayo.**
 - **Conferencias Magistrales.**
 - **Taller 1: Genómica.**
 - **Taller 2: Propagación.**
 - **Taller 3: Bioproductos.**
- **Sesión 2: Miércoles 9 de mayo.**
 - **Conferencias Magistrales.**
 - **Taller 1: Metabólica.**
 - **Taller 2: Ciencia de las Plantas.**
 - **Taller 3: Bioproductos.**
- **Sesión 3: Jueves 10 de mayo.**
 - **Conferencias Magistrales.**
 - **Taller 1: Proteómica.**
 - **Taller 2: Mejoramiento.**
- **Sesión 4: Viernes 11 de mayo.**
 - **Premiación de Posters.**
 - **Sesión de Negocios.**

Sesión 1: *Martes 8 de mayo*

- **Conferencias Magistrales.**

Stress in tissue culture.....
Geert-Jan de Klerk.

Combining genomics and metabolomics for the discovery of regulatory genes and their use in metabolic engineering to produce 'healthy foods'.....
Cathie Martin

- **Taller 1: *Genómica.***

Linkage disequilibrium-based association mapping in plant.....
Ermis Yanes.

Functional genomics in plant resistance to biotic and abiotic factors.....
Orlando Borrás.

Análisis genómico de la variación somaclonal en arroz.....
Mayra Rodríguez.

UcodeDetector, a bioinformatic tool for genomic analysis in phytopathogenic fungi.....
Aminael Sánchez.

Changes of differential expression of genes, carbohydrates content, sucrose phosphate synthase and soluble acid invertase activities in *Saccharum* sp. var. CP52-43 induced by Ethrel-480.....
J. Quiñonez.

Identificación de secuencias marcadas expresadas (ESTs) en tabaco (*Nicotiana tabacum* L) a partir de genotecas de ADNc y utilización de una de ellas para la caracterización molecular de variedades cubanas de tabaco.....
S. Pérez.

Aplicación del cDNA microarreglo para la identificación de genes novedosos que responden a las fitohormonas en plantas.....
D. Cabezas.

- **Taller 2: *Propagación.***

Overview of Temporary Immersion System in Plant Cell and Tissue Culture.....
Maritza Escalona.

Micropropagación de *Gynerium sagittatum* Aubl.
Isidro Suárez Padrón.

Multiplicación in vitro de zábila en de sistemas de inmersión temporal.
Nilca R. Alvany.

Efecto del paclobutrazol (PAC) y el sistema de inmersión temporal (SIT) sobre la regeneración in vitro de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)
Jericó J. Bello-Bello.

Alternative substitution of the kinetin for the brassinosteroid bb-6

- in the establishment and multiplication in vitro of papaya (*Carica papaya* L., CV. Maradol ROJA).....**
Ariannys Roque.
- Propagación in vitro de cedro rojo (*Cedrela odorata* L. (Meliaceae) y caoba (*Switenia macrophylla* King) mediante embriogenesis somática y organogénesis empleando Biorreactores BIOMINT®.....**
Y. J. Peña.
- Estudios de morfogénesis in vitro desarrollados en el guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana.....**
Oscar Concepción.
- Biotecnología del Cacao (*Theobroma cacao* L.).....**
Elizabeth Gámez.
- Influencia de diferentes factores durante la micropropagación de *Coffea canephora* y otros cultivos de interés agrícola con el empleo de metabolitos bacterianos.**
María E. González.
- Nueva metodología para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de bananos, cultivar Gran Enano (*Musa AAA*).....**
Borys Chong Pérez.
- Evaluación de la embriogenesis somática en cuatro clones de Yuca (*Manihot esculenta* CRANTZ).....**
Mayra A. Osorio.
- Avances en la micropropagación de plantas ornamentales a escala comercial en Sistemas de Inmersión Temporal.**
Marcos Daquinta.
- Propagación in vitro de Bambú (*Bambusa bambos*) en diferentes formas de cultivo.**
M. Daquinta.
- Influence of Light on the response of *Garcinia aristata* (Griseb.) Borhidi to in vitro culture.**
F. Sagarra, .
- Micobiótica epifítica y contaminantes fungosos de la fase de establecimiento in vitro de la Teca (*Tectona grandis* L.).....**
M. Acosta.
- Estudio de la producción de pigmentos clorofílicos de plántulas de café (*Coffea arabica*) en fase de multiplicación y aclimatización bajo la acción de campos electromagnéticos).**
E. Isaac.
- Establecimiento de la fase 0 y I para la implantación in vitro de níspero (*Manilkara zapota* L. Van Royen).**
E. Acosta.
- Empleo del cultivo de tejidos para la propagación del té de Riñón.....**
L. E. Francisco.
- Propagación in vitro de *Escobaria cubensis* (Britton&Rose) Hunts...**
L. E. Francisco.
- Uso de la Biotecnología en la producción de semilla de calidad de**

- papa.**
B. Paz.
- Sistema autotrófico hidropónico y sus bondades respecto al sistema de micropropagación convencional para la producción de semilla pre-básica de papa.**
B. Paz.
- Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la pérdida de peso y longitud del grelo en microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv Granola.**
J. Salas.
- Uso de técnicas biotecnológicas para acelerar la capacidad competitiva de la producción de semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el estado Mérida – Venezuela.**
J. Salas.
- Propagación in vitro de cedro rojo (*Cedrela odorata* L. (Meliaceae) y caoba (*Switenia macrophylla* King) mediante embriogénesis somática y organogénesis empleando Biorreactores BIOMINT®.....**
Y.J. Peña.
- Influencia de la concentración de 6-BAP, del período y el número de subcultivos en la multiplicación in vitro de *Ruta graveolens*.**
K. Alvarado.
- Estudio foliar en plantas de *Rosmarinus officinalis* L. propagadas con agua tratada magnéticamente.**
Y. Fung.
- Empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal para la multiplicación de segmentos nodales y producción de tubérculos en *Dioscorea alata* L.**
M. Cabrera
- Efecto de la metatopolina en la actividad antioxidante y la multiplicación in vitro del plátano CEMSA ¾ (*Musa AAB*).**.....
I. Cejas.
- Micropropagación de malanga *Xanthosoma violaceum*.**
E. Téllez.
- Comportamiento de líneas celulares durante la ES del cultivar híbrido plátano FHIA-21 (*Musa AAAB*).**
L. García.
- Las poliaminas en la embriogénesis somática de la caña de azúcar (*Sacharum* spp).**
N. Nieves.
- Efecto del campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja en la calogénesis de café (*Coffea arabica* L.).**
A. Ferrer.
- Efecto de la aplicación de poliaminas exógenas en la embriogénesis somática de la caña de azúcar (*Sacharum* spp. Híbrido). Relación con algunos compuestos nitrogenados.**
M. Cid.
- A new alternative for developing somatic embriogenesis in *Musa* spp**

and its use in the mutation induction.	J. López.
Propagación in vitro de Dracaena sanderiana en SIT.	M. Daquinta.
Propagación in vitro de cuatro variedades de Paeonias.	Y. Lezcano.
Propagación in vitro de Vriesea en BIT.	I. Capote.
Propagación in vitro de Callas (<i>Zantedeschia</i> sp) en diferentes formas de cultivo.	J. Sánchez.
SMART BIT. Biorreactor de 4ta generación.	A. Gómez.
Almacén de bases de datos biológicas de imágenes.....	Cosme E. Santiesteban Toca
Voting based editing for ALVOT.....	M. A Medina.
Improving training samples for the most similar neighbour rule.....	M. García-Borroto.
Reducing Features and Objects Selection for the nearest neighbour classifiers	Y. Villuendas

- **Taller 3: *Bioproductos.***

Estandarización de procesos para la producción biotecnológica de bioplaguicidas con base a hongos entomopatógenos para escalar a nivel semiindustrial en venezuela.	Rosaima García.
La biotecnología y la investigación de los bioproductos en Cuba.....	María Cristina Pérez.
Desarrollo y uso de la cepa hc1 de nematodos entomopatógenos para el manejo de plagas en Cuba.	Mayra Rodríguez.
Nematodos entomopatógenos en venezuela. situación actual y perspectivas...	Carolina Rosales.
Aportes del pnct biotecnología agrícola al desarrollo de los productos de bacillus thuringiensis en Cuba.	Orietta Fernández
Estandarización de un proceso para la producción biotecnológica del hongo antagonista trichoderma harzianum para escalar a nivel semiindustrial en Venezuela.....	R. García.
Potencialidades de los nematodos entomopatógenos en el manejo de la broca del café.	M. Rodríguez.
Efecto de diferentes cepas de azotobacter en el proceso de aclimatización de vitroplantas de piña (ananas comosus (l.) merr).....	

R. González.

Influencia del hongo micorrizógeno arbuscular *Glomus mosseae* aislado a partir de suelo canario sobre crecimiento y desarrollo de batata.....
F. Valdés.

Combining genomics and metabolomics for the discovery of regulatory genes and their use in metabolic engineering to produce 'healthy foods'.

Cathie Martin¹, Jie Lu¹, Benedicte Lebouteillé¹, Hans Peter-Mock², Andrea Matros², Silke Peterke², Elio G W M Schijlen³, Robert Hafl⁴, Laetitia Shintú⁴, Ian Colquhoun⁴, Bernd Weisshaar⁵ and Eugenio Butelli

¹John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, United Kingdom.

²Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben, Germany.

³Plant Research International, Business Bioscience, P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands.

⁴Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, United Kingdom.

⁵Department of Genome Research, University of Bielefeld, D-33594 Bielefeld, Germany.

Plants produce a very broad array of metabolites, which are not essential for growth, but which are used to provide protection against stress and pathogens, to attract pollinators and dispersal agents and as signals for development. These are often referred to as 'secondary metabolites' but are known more generally as plant 'natural products'. Natural products have recently become recognised as important components of the diet, offering protection against cardiovascular diseases, certain cancers and age-related degenerative diseases. They are also important components of beauty products and natural remedies for diseases.

Plants often accumulate their natural products to relatively low levels, so there is a lot of interest in breeding or engineering plants that produce higher levels. It has been shown that the most effective way to increase the accumulation of secondary metabolites is to increase the activity of genes that regulate the activity of the biosynthetic pathways that make different natural products. Regulatory genes of this type encode proteins called transcription factors. The biggest bottleneck in using this strategy to develop plants that accumulate significantly higher levels of important natural products is that not many transcription factors regulating secondary metabolism have yet been identified at the molecular level. Genes encoding transcription factors can be identified from model plants with sequenced genomes. The ability of such genes to regulate metabolism can be assayed by examination of mutants (reverse genetics) and by investigating the metabolic effects of high levels of expression of the genes. The combined techniques of metabolic fingerprinting and metabolite profiling of mutant and transgenic plants are allowing us to identify new genes encoding transcription factors controlling secondary metabolism, that can be used as tools for engineering natural product accumulation.

The effectiveness of metabolic engineering using genes encoding transcription factors has been demonstrated in crops by the production of high-flavonoid tomatoes which have 3-4 fold higher antioxidant capacities. These are predicted to offer protection against a range of diseases and are currently being assessed on animal models.

Linkage Disequilibrium-based Association Mapping in Plants: An Alternative to Linkage Analysis

Ermis Yanes Páez¹, Grit Haseneyer², Silke Strack², Nils Steir²

Bioplants Center, University of Ciego de Ávila, Carretera a Morón km 8 ½, CP 69450, Ciego de Ávila, Cuba. Tel.(5333) 224016. email:eyanes@bioplantacuba.cu

Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) Correnstrasse 3, D 06466 Gatersleben, Germany Tel: ++ 49 39482

One of the major uses of DNA polymorphisms is for the study of linkage between molecular markers and important agronomic traits. However, for the study of linkage, one needs to perform suitably crosses, leading to the development of mapping populations or near isogenic lines (NILs). This is a serious limitation on the use of molecular markers in some cases, because the mapping populations are examined for this purpose are sometimes too small, with only two alleles at a locus sampled. Also the number of recombinations is too low to get good resolution. In view of this, alternative methods have been developed. One such method is linkage disequilibrium (LD)-based association analysis that has received increased attention among plant geneticists during the last few years. Association analysis is a population based survey used to identify trait-marker relationships based on LD. To carry out this analysis it is necessary to use phenotypic and genotypic diverse, unstructured collection for the trait of interest and collect phenotypic data under appropriate experimental conditions. Later, candidate gene must be selected and a population structure analysis must be carried out. After SNPs discovery, the linkage analysis is carried out to find association between gene polymorphism and trait variation. We present here the basics to carry out LD-based association mapping as an alternative to linkage analysis and present preliminary data on the use of this approach to find association between gene polymorphism and trait variation in a Barley collection.

Análisis genómico de la variación somaclonal en arroz.

Mayra Rodríguez García¹, María Caridad González Cepeda², Yúnior López Regalón,
Eduardo Canales¹, Noraida Pérez y Orlando Borrás

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

² Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

Autor por correspondencia: mayra.rodriguez@cigb.edu.cu

Resumen

La obtención de nuevas variedades de arroz con tolerancia a factores abióticos es un objetivo de vital importancia en los programas de mejoramiento genético. La variación somaclonal constituye una fuente de variabilidad genética proporcionada por el cultivo de tejidos. En el presente trabajo se evaluó mediante marcadores moleculares AFLP, un grupo de somaclones de arroz que mostraban características agronómicas y otros que, además, se destacaron por la tolerancia a la salinidad en el campo. Se utilizaron 4 combinaciones de cebadores, las cuales produjeron un buen nivel de resolución y

polimorfismo, mostrando un 65.4 % de polimorfismo entre los somaclones y la variedad donante. Además, mediante el análisis genómico del comportamiento de la tolerancia a la salinidad se encontró un 62.37 % de polimorfismo. El análisis de agrupamiento molecular se realizó a partir de la matriz de similitud, usando el método de agrupamiento UPGMA, según el coeficiente Dice. Los somaclones ~~form~~ ~~son~~ ~~de~~ ~~dos~~ ~~grupos~~ ~~principales~~, en uno de los cuales, el somaclón LP-8 mostró una distancia genética más cercana a la variedad tolerante a la salinidad, en correspondencia con su comportamiento en el campo en condiciones de estrés salino.

UCodeDetector: una herramienta bioinformática para el estudio genómico de hongos fitopatógenos.

Aminael Sánchez^{1,2,*}, Doi Pham An², María I. Oloriz¹, Orelvis Portáland Ricardo Graú

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

² Grupo de Bioinformática, Centro de Estudios Informáticos, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
E-mail: aminael@ibp.co.cu

Resumen

El estudio del lenguaje molecular de la interacción planta-patógeno y por lo tanto de los genes expresados en esta interfaz, requieren a menudo la construcción de las bibliotecas que contengan la información genética mezclada proveniente de ambos organismos. El proceso ulterior de separación enfrenta muchas dificultades debido a: las semejanzas de secuencia existente entre plantas y hongos, la presencia de información del tipo secuencias de ADN, y la corta longitud de los fragmentos aislados. Una vez sobrepasada esta etapa, la anotación de las secuencias únicas obtenidas localización física sobre el genoma en estudio o en su defecto, sobre otros similares continúa siendo un reto. Para ello, contar con herramientas que permitan la detección de genes con alto potencial codificante para proteínas es de elevada utilidad. En el presente trabajo se reporta una metodología que combina el análisis probabilístico mediante un Modelo Oculto de Markov, con la selección de motivos de secuencia lineal. La misma resulta eficiente para la predicción de secuencias codificantes y sus vecindades cercanas o codificantes. Este algoritmo alcanza una exactitud en la clasificación del origen de las secuencias del 95.2%, del 96,1% en la predicción del ORF biológico de los fragmentos codificantes y del 93% en cuanto a la ubicación de sitios aceptores de splicing. Estas características, convierten a UCodeDetector en una herramienta bioinformática novedosa que tiene como objetivo asistir la investigación genómica en hongos fitopatógenos.

Palabras clave: modelo oculto de markov, hongos fitopatógenos, secuencias codificantes.

Identificación de secuencias marcadas expresadas (ESTs) en tabaco (*Nicotiana tabacum* L) a partir de genotecas de ADNc y utilización de una de ellas para la caracterización molecular de variedades cubanas de tabaco.

Autores: Sandra Perez Alva¹, Evelyn Valera Rojas¹, Daniel Cabezas Montero¹, Orlando Coto Arbelo² y Miguel Ramos Leal³

¹ Universidad Agraria de la Habana Autopista Nacional Km 23 ½. San José de las Lajas. Habana, sandra05@isch.edu.cu

² Instituto de Investigaciones Fruticultura Tropical (IIFT), 7^{ma} entre 32 y 34, Playa, C. de la Habana,.

³Facultad de Biología de la Universidad de la Habana (UH): Calle 25 entre J y K, Plaza. C. Habana

Resumen

Esta investigación se realizó con el objetivo de identificar posibles genes de interés en variedades de tabaco mediante el uso del microarreglo ESTs asociadas con plagas, sequía, salinidad y metales pesados, así como caracterizar a nivel molecular en germoplasma cubano una de las ESTs identificadas diseñando cebadores específicos para de esta forma asistir al Programa de Mejoramiento del tabaco resistencia al virus del mosaico del tabaco (VMT). A través del empleo de técnica de secuencias marcadas expresadas (ESTs) combinada con el microarreglo y mediante utilización de diferentes variedades de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) se generaron 5927 ESTs de los extremos 3' de clones seleccionados de las genotecas de ADNc. Consulta del microarreglo se obtuvieron dos ESTs relacionadas con el VMT, la proteína relacionada con la patogenicidad (TBT012G08) y la ubiquitina (TBT087G01) las dos se encontraron en la variedad Hongda. Otras ESTs importantes se agruparon en dos grupos relacionados con el desarrollo de las plantas como por ejemplo las relacionadas con el proceso fotosintético (la proteína de unión a Clorofila a-b, Fotosistema I, Ferredoxina III y ATP sintasa) y el otro grupo que incluye las ESTs relacionadas con la respuesta de la planta al estrés del medioambiente (Ubiquitina, Ubiquitina SMT3, Histonas y Metalotioneína); también se encontró una proteína hidrofílica llamada proteína tumoral controlada en la traducción (TCTP) la que esta dotada de múltiples actividades biológicas. Los resultados del microarreglo fueron confirmados utilizando el RT-PCR (PCR en tiempo real). Utilizando la EST ubiquitina se diseñaron cebadores para caracterizar molecularmente 8 variedades de tabaco cubanas donde se obtuvo como resultado que esta se expresó de manera constitutiva en todas las variedades probadas con diferentes niveles de expresión.

Palabras claves: Secuencias marcadas expresadas ESTs, microarreglo, ubiquitina, virus del mosaico del tabaco (VMT).

Aplicación del cDNA microarreglo para la identificación de genes novedosos que responden a las fitohormonas en plantas.

Daniel Cabezas Montañez, Sandra Pérez Álvarez, Dong Haitao, Li Debao

•1 Doctor in Science, Agrarian University of Havana. San José de las Lajas, Havana, Cuba. cabezas05@isch.edu.cu

•1 Master in Science, Agrarian University of Havana. San José de las Lajas, Havana, Cuba.

•2 Doctor in Science, Zhejiang University, Plant Protection Department, Zhejiang University.

Kaixuan Road #268, Hangzhou, Zhejiang. P.R. of China.

Resumen.

Una colección disponibles de 2860 expresiones de secuencias etiquetadas (ESTs) se han generado en este estudio del tallo de arroz aplicaciones de giberelinas en dos tiempos diferentes (12 y 36 horas). La meta de este gran potencial de EST es catalogar la mayoría de los genes expresados en el tallo de arroz incluso los genes específicos inducidos por la fitohormona giberelina, y las expresiones -específicas en tejido-específicos de desarrollo. Este banco de datos de EST nos servirá como punto de partida para el estudio de la expresión de los genes y la regulación de estos en este importante cultivo. La caracterización del genoma de la variedad Hanfeng mediante el estudio del ARNm facilitará la identificación de nuevos genes que controlan determinadas características agrícolas importantes en los cultivos..

Una sucesión de expresiones de secuencias etiquetadas (EST) en el cultivo de arroz (*sativa*) se estableció usando una estricta selección de 4704 clones de la biblioteca de ADNc del tejido del tallo donde la planta tenía solamente de 5 a 6 hojas lo cual representan las fases de desarrollo y tratamientos ambientales. La aplicación mediante aspersión de la fitohormona giberelina fue usada en diferentes intervalos de tiempo (12 y 36 h), se usó expresiones de secuencias etiquetadas (EST) para descubrir las singularmente expresiones de los nuevos genes o grupos de genes inducidos por los tratamientos de GA.

Palabras claves: Arroz, Expresiones de Secuencias Etiquetadas (ESTs), Tejidos del tallo, Fitohormona giberelina (GA)

OVERVIEW OF TEMPORARY IMMERSION SYSTEM IN PLANT CELL AND TISSUE CULTURE.

M. ESCALONA¹ Bioplant Centre, University of Ciego de Avila, Cuba: e-mail: mescalona@bioplantas.cu

Temporary immersion has been shown to reduce problems usually encountered in liquid culture. Based on this concept, a collective researcher belong to Bioplant Center adapted a semi-automated system for large-scale propagation of plants. This bioreactor has been named as Twin Flasks system (BIT) and grouped into the systems with complete immersion by pneumatic driven transfer of liquid medium without medium replenishment. BIT[®] is relatively simple and easy to use. They enable contact between all parts of the explants and the liquid medium. The culture environment is renewal by forced ventilation during each immersion period. For special type of plants, a forced aeration in the culture recipient can be used. The injection of CO₂ permits to improve the photomixotrophic culture. BIT[®] has been used for *in vitro* commercial propagation of a wide range crops: *Ananas*, *Saccharum sp*, *Musa sp*, *Colocasia sp*, *Araceae*, *Eucalyptus sp*, *Rosaceae*, *Bromelias*, *Paeony*. In order to establish a micropropagation procedure and increase the efficacy of BIT[®]-technology, different parameters should be optimized. Among them, the immersion time, immersion frequency, the volume of nutrient medium, the volume of culture container, the duration of proliferation phase, the use of plant growth retardant, the number of cycle in BIT[®]. Plants regenerated by BIT[®] have not showed somaclonal variation detected by molecular probes and evaluations in the field. The simplicity and low cost of BIT[®] is compatible with large-scale propagation. It permits important lower labor, better biological yield and consecutively reduces production cost.

Panorámica del sistema de inmersión temporal en el cultivo de células y tejidos de las plantas.

M. Escalona¹ Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Avila, Cuba: e-mail: mescalona@bioplantas.cu

La Inmersión Temporal es una técnica que reduce los problemas que se presentan con el uso del cultivo en medio líquido. Basado en este concepto, un colectivo de investigadores del Centro de Bioplantas adaptaron un sistema semi-automatizado para la propagación de planta a gran escala. El biorreactor de inmersión temporal se conoce comercialmente como BIT[®] y se agrupa entre los sistemas clasificados con inmersión completa de los explantes sin renovación del medio de cultivo. BIT[®] es relativamente simple de utilizar y facilita el contacto completo de los explantes con el medio líquido y reduce la hiperhidricidad. Cuando se emplea para plantas con facilidad a la hiperhidratación, se puede emplear un sistema de ventilación forzada. La inyección de CO₂ permite mejorar el cultivo fotomixotrófico de los brotes. El BIT[®] ha sido utilizado para la propagación comercial de un amplio rango de cultivo, entre ellas *Ananas*, *Saccharum sp*, *Musa sp*, *Colocasia sp*,

Araceae, Eucalyptus sp, Rosaceae, Bromelias, Paeony. Para establecer un protocolo de propagación con el uso de estas técnicas, deben ser optimizadas diferentes variables, entre ellas, el tiempo y frecuencia de inmersión, el volumen de medio de cultivo, el tamaño del frasco, la duración de la fase de proliferación, el uso de retardantes del crecimiento, el número de ciclos en el BIT entre otros. Las plantas regeneradas con el empleo de esta técnica de cultivo han mostrado una baja variación somaclonal evaluada tanto por pruebas moleculares y evaluaciones en el campo. La simplicidad y bajo costo del BIT hace factible para la propagación a gran escala permitiendo disminuir la mano de obra, aumentar el rendimiento biológico y como consecuencia reduce los costos de producción.

Micropropagación De *Gynerium Sagittatum* Aubl.

Isidro Elías Suárez Padrón e Ivan Javier Pastrana Vargas**

*Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural, Universidad de Córdoba, Carrera 6 No. 76 – 103 Montería (Colombia) Email: isuarez@sinu.unicordoba.edu.co

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo contribuir a desarrollar un protocolo de micropropagación para la producción clonal masiva de plantas de *Gynerium sagittatum* Aubl para la siembra de cultivos comerciales. Los explantes, consistentes de segmentos nodales de 2-3 cm de longitud fueron obtenidos de plantas adultas, enjuagados y desinfectados superficialmente. Tres diferentes formulaciones de medios de cultivo de Murashige y Skoog (MS completo, MS diluido a la mitad y MS completo con 0.44 μ M BAP y 1.61 μ MNAA) fueron utilizados para determinar la respuesta de los explantes a las condiciones in vitro. La tasa de multiplicación de propágulo fue evaluada con cinco (0.0, 2.22, 4.44, 8.88, y 17.76 μ M) concentraciones de BAP y un tratamiento consistente de 0.44 μ M BAP con 1.61 μ MNAA. El enraizamiento in vitro fue evaluado con seis concentraciones (0.0, 2.69, 5.37, 10.74, 16.11 y 21.48 μ M) de ANA, y un tratamiento consistente de 100 mg¹ de carbón activado. Finalmente, las plantas enraizadas y tallos micropropagados fueron transplantados a inóculos in vitro. Los resultados permitieron concluir que los explantes se adaptaron mejor (80% supervivencia) y desarrollaron una mayor tasa de multiplicación ($P < 0.0001$) (~12 brotes por explante) cuando fueron cultivados en medio MS completo con 0.44 μ M BAP y 1.61 μ MNAA. Los tallos micropropagados tratados con ANA produjeron un mayor número de raíces ($P < 0.0001$) (>50 raíces por explante) que aquellos cultivados en medio con carbón activado o sin suplemento de ANA. Los brotes enraizados in vitro y aquellos sin enraizamiento previo provenientes del estado de multiplicación se adaptaron 100% a las condiciones ex vitro demostrando la posibilidad de transplantar brotes del estado de multiplicación a la adaptación ex vitro directamente.

Palabras claves: Caña flecha, in vitro, multiplicación in vitro, enraizamiento, aclimatización ex vitro.

Multiplicación in vitro de zábila en de sistemas de inmersión temporal¹

Nilca Albany², Jorge Vilchez³ y Orlek Ferré⁴

¹Investigación subvencionada por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, proyecto CONDES CC-0633-04

²Departamento de Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo 4005ZU, Venezuela. e-mail: nilca_albany@cantv.net (Autor para correspondencia).

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

⁴Laboratorio de Cultivo de Tejido, Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo 4005ZU, Venezuela. e-mail: orlekferrer@yahoo.com

Resumen

Uno de los elementos que encarece las metodologías de micropropagación comercial de plantas es el empleo de agentes gelificantes en los medios de cultivo. La tendencia actual en los protocolos de propagación *in vitro* es disminuir los costos de las plantas micropropagadas, por lo que el empleo de medios líquidos mediante los sistemas de inmersión temporal representan una posibilidad para lograr este objetivo; además facilitan la automatización o semi-automatización del proceso *in vitro*. Aunque la zábila ha sido micropropagada exitosamente por las técnicas convencionales en medios gelificados, el empleo de sistemas de inmersión temporal no ha sido estudiado, por tanto se podría aumentar la eficiencia biológica y productiva de la fase de multiplicación de esta especie. Razón por la cual, se estudió en el efecto de la frecuencia y el tiempo de inmersión en la fase de multiplicación *in vitro* de zábila. En un primer ensayo se evaluó el efecto de la frecuencia de inmersión (2, 3 y 4 veces al día) empleando cuatro recipientes de inmersión temporal automatizados (RITA®) para cada tratamiento y en un segundo ensayo se estudió el efecto del tiempo de inmersión (1, 2 y 3 min.), con cuatro repeticiones (RITA®) por tratamiento; en ambos ensayos se inocularon ocho brotes por sistema de inmersión temporal. Transcurridas cuatro semanas de cultivo para cada ensayo se evaluó la longitud de los explantes, número y longitud de los brotes. Los análisis estadísticos indicaron que la frecuencia de inmersión de tres veces al día permitió alcanzar los mayores valores de número de brotes (2,75); longitud de los explantes (6,04 cm.) y longitud de brotes (0,85 cm.); infiriendo que el crecimiento fue dirigido tanto a la emisión de brotes como al crecimiento del explante inoculado. Para el segundo ensayo se determinó estadísticamente que el periodo de inmersión de 1 min. permitió obtener explantes de 5,01 cm. de longitud, siendo estos valores superiores a los obtenidos en la multiplicación *in vitro* zábila en medios de cultivo gelificados. Se observó que los tiempos de inmersión superiores al minuto indujeron características de hiperhidricidad en los explantes.

Palabras clave: *Aloe vera* (L.) Burm. f., frecuencia de inmersión, tiempo de inmersión, RITA®

Efecto del paclobutrazol (PAC) y el sistema de inmersión temporal (SIT) sobre la regeneración *in vitro* de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).

Jericó J. Bello-Bello, Adriana Canto-Flick, Felipe Barahona-Pérez, Lourdes G. Iglesias Andreu, Manuel L. Robert y Nancy Santana-Buzzy*.

(*) Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán. CP 97000 México. Autor de correspondencia: buzzy@cicy.mx

Resumen

El empleo de paclobutrazol en los sistemas de inmersión temporal ha sido utilizado últimamente en los procesos de morfogénesis *in vitro*, el cual permite aumentar la eficiencia de la propagación masiva de plantas de interés comercial. En el presente trabajo se describe un protocolo para la regeneración *in vitro* de plantas de chile habanero vía organogénesis directa a partir de nudos como fuente de explante de 65 días de edad. Se evaluó el efecto del paclobutrazol (PAC) combinado con tidiazurón (TDZ) y el uso del

sistema de inmersión temporal (SIT), como una nueva metodología para la regeneración de plantas que son conservadas en un banco de germoplasma, en este protocolo se combinan dos sistemas: el medio de cultivo semisólido y el sistema de inmersión temporal, la combinación de TDZ ($3.4\mu\text{M}$) con PAC ($3.4\mu\text{M}$) en medio semisólido resultó el mejor tratamiento para inducir organogénesis directa en el biorreactor modular de inmersión temporal (BioMINTM) no se logró la regeneración de los brotes, sin embargo, con 2 minutos de inmersión cada 8 horas se obtuvo la mejor condición de cultivo para su elongación en medio líquido MS + GA₃ ($2.77\mu\text{M}$) + AgNO₃ ($10\mu\text{M}$) y el enraizamiento de los brotes en medio MS + AIA ($1.7\mu\text{M}$), en ambos casos los brotes fueron más vigorosos y el tiempo de cultivo fue más corto comparándolo con las condiciones de medio semisólido. Durante la elongación de los brotes se observó una alta frecuencia de neoformaciones, que posteriormente se convirtieron en brotes (16 a 18 brotes por explante). Contamos con un protocolo eficiente y reproducible que supera los resultados reportados en *Capsicum chinense* Jacq y en el género *Capsicum*, a la fecha.

Palabras claves: *Capsicum chinense* Jacq., paclobutrazol, tidiazurón, organogénesis, biorreactor modular de inmersión temporal (BioMINTM).

Alternativa De Sustitución De La Kinetina Por El Brasinoesteroide Bb-6 En El Establecimiento Y Multiplicación In Vitro De La Papaya (*Carica Papaya* L., Cv. Maradol Roja)

Autores: Ing. Ariannys Roque López, Dr. C. Miriam Núñez Hernández, Dr. C. Eduardo Héctor Ardisan, Dr. C. Miriam Isidró Pérez, Dr. C. Antonio Torres García, Ing. Solvig Rodríguez Troche, Lic. Lianette Godoy del Pozo

1. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro Universitario de Las Tunas. Ave. Carlos J. Finlay s/n. Las Tunas. Cuba. ariannys@isch.edu.cu
2. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
3. Universidad Agraria de La Habana
4. Instituto de Normalización

Resumen

En el presente trabajo se tomaron segmentos nodales de plantas jóvenes de papaya (*Carica papaya* L.) cv. Maradol Roja para el establecimiento y multiplicación *in vitro*. El medio de cultivo empleado fue el MS modificado (Roque *et al.*, 2001) suplementado con $30.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa. Como soporte se empleó en el establecimiento papel de filtro y en la multiplicación Agar ($7.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Para sustituir la mitad y la totalidad de las concentraciones de kinetina empleadas en la metodología propuesta por Roque (2001) se empleó 0.02 y $0.1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BB-6, según lo recomendado por Rodríguez (1999) en el cultivo del plátano (*Musa sp.*), y la combinación de estas concentraciones con $1.1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de kinetina en el establecimiento y multiplicación. En esta última etapa se añadió además $2.88\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃. Se realizaron evaluaciones en el comportamiento de la morfogénesis *in vitro*. Los datos se procesaron por un ANOVA con ayuda del paquete estadístico STATGRAPHIC. Los resultados muestran que es posible sustituir totalmente la kinetina por el brasinoesteroide BB-6.

Palabras claves: brasinoesteroide, *in vitro*, papaya

Alternative substitution of the kinetin for the brassinoesteroid bb-6 in the establishment and multiplication in vitro of papaya (*Carica papaya* L., CV. Maradol ROJA)

Abstract

In this research nodal segments from young plants of papaya (*Caryocarpus papaya* L.) cv. Maradol Roja were used for the establishment and multiplication of this crop. The MS medium modified by Roque et al. (2001) was used in this study supplemented with 30.0 g. L⁻¹ of sucrose. In the establishment and multiplication of the vitroplants, filter paper was used in the first case and Agar (7.0 g. L⁻¹) in the second one as support. To substitute the half and the totality of the kinetin concentrations used in the methodology proposed by Roque et al (2001), 0.02 and 0.1 μmol. L⁻¹ of BB-6 were used, according to the recommendation of Rodríguez (1999) for the *in vitro* culture of banana (*Musa* sp.), and the combination of these concentrations with 1 μmol. L⁻¹ of kinetin in the establishment and multiplication. In this last stage, 2.88 μmol. L⁻¹ GA₃ was also added. Evaluations of the behavior of the morphogenesis *in vitro* were carried out. The data were analyzed with ANOVA using the statistical package STATGRAPHICS. The results showed possible to substitute the kinetin totally for the brassinosteroid BB-6.

Key words: Brassinosteroid, *in vitro*, papaya.

Propagación *in vitro* de cedro rojo (*Cedrela odorata* L. [Meliaceae]) y caoba (*Swietenia macrophylla* King. [Meliaceae]) mediante embriogénesis somática y organogénesis empleando biorreactores BIOMINT®.

Yuri Jorge Peña Ramírez José Antonio González Rodríguez Juan Juárez Gómez Alfredo Domínguez Hernández Lucero Gómez López Felipe Sánchez Tellez Manuel L. Robert

¹Unidad de Investigación en Biotecnología Vegetal Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Carretera Costera del Golfo Km. 246 Col. Agrícola Michapan. Acayucan, Veracruz, México. C. P. 96100. Tel. / Fax +52 924 2457410 Ext. 429. unibve@itsacayucan.edu.mx. Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 # 130 Col. Chuburná de Hidalgo. Mérida, Yucatán. México. C. P. 97206. +52 999 9813923 Ext. 165 robert@cicy.mx.

Resumen.

El Cedro rojo y la caoba son las dos especies forestales tropicales de mayor importancia económica y ambiental en Latinoamérica. Ambas especies han sido sobre explotadas y urge un esquema de mejoramiento genético apoyado en un sistema de producción de plántulas de calidad. La propagación clonal de árboles ha demostrado su enorme éxito en este campo y es un estándar de calidad en sistemas comerciales para la producción de muchas especies de clima frío. En nuestro grupo hemos establecido un sistema reproducible y altamente eficiente de reproducción clonal de cedro rojo y caoba tanto por vía organogénica como embriogénica. En este reporte mostramos el efecto organogénico del regulador de crecimiento vegetal bencil amino purina a una concentración de 3¹ mg/L del regulador tidiazurona a la misma concentración en capacidad regenerativa en fragmentos de hipocotilo y epicótilo de cedro rojo y caoba respectivamente. Asimismo, demostramos que el cultivo de embriones cigóticos maduros de ambas especies en presencia de 2, 4-D (3 mg L⁻¹) es capaz de la inducción de estructuras embrionarias en ambas especies. Finalmente mostramos el efecto del cultivo de propágulos de cedro rojo en biorreactores BIOMINT® en donde se logró incrementar cerca de 400% la longitud radicular respecto del cultivo de estos propágulos en medio semisólido.

Estudios de morfogénesis *in vitro* desarrollados en el guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana.

Oscar Concepción Laffitte Lelurlys Nápoles Borreiro Ninel Peralta Balbué Aurora T. Pérez, Reinaldo Trujillo Sánchez

¹Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos; ²Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Avila. Carretera a Morón, Km 9. CP 69450. Ciego de Avila. Cuba. E-mail: lnapoles@bioplasmas.cu

Resumen

El presente trabajo se realizó en el Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Avila, con el objetivo de desarrollar en el guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. Enana Roja Cubana protocolos de morfogénesis *in vitro* que permitieran la regeneración de plantas completas con vistas a su utilización en propagación, mejoramiento genético y manejo de germoplasma en esta especie. Para ello el trabajo se dividió en tres partes fundamentales, cada una con un objetivo específico. El primero, establecer un procedimiento de propagación *in vitro* por organogénesis a partir de yemas de plantas de campo, el segundo, desarrollar un procedimiento de regeneración de plantas por organogénesis adventicia a partir de hojas cultivadas *in vitro*, y tercero, implementar un procedimiento de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros. Los mejores resultados se alcanzaron al emplear yemas de brotes de la raíz de árboles de campo, que mostraron el menor contenido de compuestos fenólicos totales y lograron los mejores resultados en el establecimiento. La multiplicación por segmentación nodal y ramificación axilar, así como el enraizamiento *in vitro* con una adecuada conexión vascular tallo-raíz y la aclimatación *in vitro* con altos índices de supervivencia, permitieron una buena eficiencia en la propagación. En el primer año de plantadas en campo, las vitroplantas no mostraron variaciones fenotípicas significativas en comparación con plantas procedentes de estacas enraizadas para descriptores de crecimiento del árbol y de calidad del fruto. Para las variables reproductivas, las vitroplantas mostraron un retraso de 10-12 meses y un menor rendimiento promedio por árbol. Con relación a la organogénesis adventicia, los mejores resultados se alcanzaron con el uso del medio basal MS + BAP 3.33 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ + NAA 0.54 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, utilizando hojas con heridas en forma de pinchazos en el nervio central, provenientes de brotes con nodos subcultivos de multiplicación, ubicadas en el primer o segundo nudo del tallo. Histológicamente se demostró que los brotes adventicios se forman a través de un proceso organogénico indirecto, a partir de protuberancias que tienen un origen pluritissular, según los tejidos que son afectados por la herida, la cual resultó ser el promotor fundamental. Finalmente se implementó un procedimiento de embriogénesis somática, que contempla la inducción y liberación del tejido o callo con estructuras embriogénicas a partir de embriones cigóticos inmaduros extraídos de frutos de 45 d de edad en presencia de 2,4-D a histodiferenciación de los embriones somáticos mejoró significativamente en presencia de sacarosa 60.0 g/L y ABA 15.0-20.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. El uso del medio líquido y el cribado de las suspensiones celulares heterogéneas en tamices de 250-1000 μm , permitieron incrementar los rendimientos y la calidad de la histodiferenciación, con un efecto positivo sobre la germinación *in vitro* normal y el porcentaje de conversión en planta.

Palabras claves: Morfogénesis *in vitro*, organogénesis, embriogénesis somática, histología, *Psidium guajava*, frutales tropicales, leñosa.

***In vitro* morphogenesis studies development in guava (*Psidium guajava* L.) cv. Cuban Red Dwarf.**

Abstract

This work was carried out at the Bioplasmas Centre in the University of Ciego de Avila, in order to develop protocols for *in vitro* morphogenesis and plant regeneration of guava (*P. guajava* L.) cv. Cuban Red Dwarf. These protocols could be a tool for the propagation, breeding and manipulation of germplasm of guava specie. The work was divided in three

specific goals. First, to establish a protocol for *in vitro* propagation through organogenesis from buds of field-grown plants; second, to develop a procedure for adventitious shoot regeneration from *in vitro* derived leaves; and third, to achieve a protocol for somatic embryogenesis from immature zygotic embryos. The best results were obtained with apical buds from root sprouts. These explants showed the lowest contents of phenolic compounds and the greatest efficiency during *in vitro* establishment. On the other hand, the multiplication through nodal segments and axilar branching, *in vitro* rooting with adequate vascular connection stem-root and *in vitro* acclimatization with high survival percentage, allowed an appropriate efficiency in propagation. Plants from *in vitro* culture showed no significant phenotypic variations during the first years of field plantation compared with plants propagated by rooted cuttings with respect to the growth of tree and fruit quality descriptors. For reproductive variables, the vitroploids showed a delay of 10-12 months and lower yields per plant. With respect to adventitious organogenesis, the best results were reached on MS basal medium + BAP 3.33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + IAA 0.54 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, using wounded young leaves at the main vein. Young leaves were obtained from shoots with few multiplication subcultures. The formation of adventitious shoot through an indirect organogenic process was histologically demonstrated. Shoots were originated from protuberances with a plural tissue origin, affected by wounding. Finally, a somatic embryogenesis protocol was achieved. This procedure includes the induction and proliferation of embryogenic callus produced from immature zygotic embryos, excised from 45-days old fruits after anthesis with 2,4-D. The histodifferentiation of somatic embryos was improved with sucrose 60 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and ABA 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The use of liquid medium and the sieving of heterogeneous cell suspensions by 250-1000 μm porous size mesh, allowed increasing the quality and yield of histodifferentiation, with a positive effect on normal *in vitro* germination and plant conversion of somatic embryos.

Key words: *In vitro* morphogenesis, organogenesis, somatic embryogenesis, histology, *Psidium guajava*, tropical fruit, woody plants.

Biología del Cacao (*Theobroma cacao* L.)

Elizabeth Gámez, Diógenes Infante

Centro de Biotecnología, Unidad de Plantas, Instituto de Estudios Avanzados- IDEA, Apdo.17606, Parque Central Caracas 1015-A, Venezuela.

egamez@idea.gob.ve, dinfante@idea.gob.ve

Desde los tiempos coloniales el cacao venezolano ha sido considerado como el mejor del mundo. La ubicación geográfica de las localidades donde se produce da una gama de diferencias en el sabor y olor para el realce de su calidad. Entre ellos se destacan los cacaos de la zona central: Chuao, Ocumare y Choroni, los de Barlovento: Carenero Superior y Caracas Natura, Los del Sur del Lago Maracaibo: Porcelana, Occidente del país: Guasare y los del Oriente del país: Río Caribe. Aunque nuestro cacao se ha cruzado con los trinitarios y forasteros, aun posee muchas características del cacao criollo con almendras blancas que al ser procesadas dan una variedad de sabores y aromas, especialmente a frutas y nueces, muy apetecidos por los amantes del chocolate. El cacao pasó de ser uno de los principales rubros en tiempos de la colonia a un descenso brusco en los niveles de exportación después del auge petrolero. Muchas plantaciones fueron abandonadas y solo pequeñas áreas marginales quedaron para ser cuidadas por un grupo familiar campesino con escasos recursos. En años recientes líneas implementadas por el gobierno están dándole un nuevo impulso al cultivo para mejorar toda su cadena productiva, para elevar el nivel de vida de los agricultores y volver a posicionarlo en el mercado internacional sobre todo por su excelente calidad. En el Instituto de estudios Avanzados IDEA y específicamente en Unidad de Plantas se llevan varias líneas de investigación en

Biotecnología del cacao que abarcan desde la propagación de nuestros materiales élites mediante embriogénesis somática, utilización de marcadores moleculares para la identificación y diferenciación de plantas en bancos de germoplasma, el estudio de estabilidad genética de las plantas propagadas in vitro, la identificación molecular de las bacterias que intervienen en el proceso de fermentación y de los patógenos que inciden en la baja de los rendimientos. Mediante esta charla queremos dar a conocer estas líneas de investigación desarrolladas en nuestra institución con miras al intercambio científico que ayuden a su fortalecimiento y el establecimiento de relaciones institucionales con otros países donde el cultivo es de interés.

Palabras Claves: Cacao, *Theobroma cacao* embriogénesis somática, marcadores moleculares.

Influencia de diferentes factores durante la micropropagación de *Coffea canephora* y otros cultivos de interés agrícola con el empleo de metabolitos bacterianos

Maria Esther González¹, María M. Hernández¹, Yanelis Castilla¹, Annia Hernández²

1. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba.

email: esther@inca.edu.cu

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

En el presente trabajo se estudió la influencia de diferentes factores durante el proceso de micropropagación, utilizando la especie *Coffea canephora* como cultivo modelo y considerando los efectos benéficos de cepas nativas de *Bordetella cepacia* en cuanto a producción de metabolitos activos. Para esto se trabajó en el establecimiento de una metodología con el uso de biopreparados bacterianos como sustitutos de reguladores del crecimiento convencionales que abarca desde la obtención de plantas en laboratorio hasta su establecimiento y producción en condiciones de campo. Se realizaron estudios morfohistológicos, bioquímicos y moleculares del proceso en general mediante el empleo de técnicas de avanzada. Los resultados mostraron la influencia del factor genotípico y la época del año en el potencial embriogénico del material vegetal. El biopreparado bacteriano resultó beneficioso en diferentes fases de la embriogénesis somática, siendo 0.5-0.7 mg.L⁻¹ las dosis recomendables, favoreciendo color, consistencia, peso de los callos y desarrollo de embriones somáticos cuya asincronía disminuyó con 0.5-1.0 mg.L⁻¹.

El biopreparado bacteriano influyó positivamente en el crecimiento de las vitroplantas. Se demostró la eficiencia de esta vía de propagación al obtenerse mayor número de plantas en menos tiempo de cultivo y a menor costo, además, se comprobó la estabilidad genética en las plantas regeneradas para los sistemas isoenzimáticos analizados y el fragmento de ADN amplificado, se demostró por HPLC una reducción del contenido de cafeína en fruto. Se comprobó la factibilidad de empleo de la tecnología propuesta en cultivos de interés agrícola en diferentes laboratorios de propagación masiva y biofabricas del país; sustituyéndose en los medios de cultivo, por primera vez, los reguladores de crecimiento importados por metabolitos bacterianos con significativos ahorros desde el punto de vista económico y contribuyendo a la preservación y cuidado del medio ambiente.

Nueva metodología para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de banano cv Gran Enano (*Musa AAA*)

Borys Chong Pérez, Rafael Gómez Koslowski, Maritza Reyes Vega, Idalmis Bermúdez Carballoso, Jorge Gallardo Colina, Marisol Fe Seijo, Laisyn Posada Pérez e Idalia Herrera O'Farril.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas.

Resumen.

La regeneración de plantas por medio de la embriogénesis somática permite disponer de una vía alternativa para la propagación masiva y un sistema para el mejoramiento genético mediante inducción de mutaciones o la transformación genética. La embriogénesis somática en plátanos y bananos se ha obtenido de diferentes tipos de explantes, tales como: embriones cigóticos, meristemos en proliferación, estambres masculinos inmaduros y flores femeninas inmaduras. En el caso del cultivar de banano Gran Enano, la mayoría de los grupos de investigación obtienen suspensiones celulares a partir de callos con estructuras embriogénicas obtenidos de agregados florales masculinos. Sin embargo, esta metodología necesita entre cinco y seis meses para la formación del callo con las estructuras embriogénicas, presentando un bajo porcentaje de obtención de estas (3-10%). Además, después de obtenidas estas estructuras, el porcentaje de obtención de suspensiones celulares embriogénicas no excede el 30%, en un tiempo de dos meses hasta alcanzar su homogeneidad. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de obtener suspensiones celulares embriogénicas cultivando directamente en medios de cultivo líquido agregados florales masculinos del cultivar de banano Gran Enano (AAA). Los resultados demostraron que es posible el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas homogéneas a partir de estos explantes, obteniendo los mejores resultados con el agregado floral de rango ocho, cultivado en 5.0 ml de medio de cultivo M1 propuesto por Escalant *et al.*, (1994) en frascos Erlenmeyer de 50 ml de capacidad. Al comparar las suspensiones obtenidas por esta metodología a las suspensiones obtenidas por la metodología propuesta por Côté *et al.*, (1996), no se obtuvieron diferencias en cuanto al crecimiento de la suspensión celular, la formación de embriones y germinación de estos. Otros resultados alcanzados en este trabajo revelaron que los embriones somáticos necesitaban ser transferidos a un medio de cultivo para su maduración durante un período de 30 días para mejorar los porcentajes de germinación. La metodología propuesta en este trabajo para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar de banano Gran Enano, fue más rápida y con un mayor porcentaje de establecimiento que la propuesta por Côté *et al.*, (1996).

Avances en la micropropagación de plantas ornamentales a escala comercial en Sistemas de Inmersión Temporal.

Marcos Daquinta, Osbel Mosqueda, Reinaldo Trujillo.

Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 9.
mdaquinta@bioplantas.cu

Resumen

La micropropagación de plantas ornamentales encontró gran aplicación en el campo de la horticultura. La comercialización de plantas ornamentales de follajes y flores es de cientos de millones de unidades, de las cuales alrededor del 80% se produce con el empleo de esta tecnología. Se prevé un crecimiento anual del consumo en el mercado mundial de productos florícolas, por lo que es necesario mejorar las metodologías de propagación *in vitro* para satisfacer estas crecientes demandas. El uso de medios de cultivo líquido para la propagación *in vitro* tiene algunas ventajas y reconsidera una técnica ideal para la propagación masiva de plantas, porque reduce la manipulación y es un requisito indispensable para la automatización del proceso. La inmersión temporal es una técnica que ha permitido el incremento de los coeficientes de multiplicación con la disminución de los costos de producción. En el presente trabajo se informan los resultados de la propagación

de diversas plantas ornamentales (Rosas, Spathiphyllum, Syngonium, Alstroemerias, Bromelias, Anthurium, entre otras) con ~~tierras~~ de bajos costos, sin esterilización de medios de cultivo y demás cambios tecnológicos. También se brindan los resultados de la propagación de estas plantas en los ~~Sistemas~~ Sistema de Inmersión Temporal, en el Centro de Bioplantas de Cuba, siendo significativos los resultados obtenidos con algunas especies de la Familia Araceas y Broemeliaceas, entre otras.

Propagación *in vitro* de Bambú (*Bambusa bambos*) en diferentes formas de cultivo.

Marcos Daquinta, Mariela Cid, Yarianne Lezcano.
Laboratorio de Células y Tejidos. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila.
Carretera a Morón Km 9. CP 69450. Cuba
Email:mdaquinta@bioplantas.cu

Resumen

Los bambúes son de vital importancia para los programas de construcción y de fabricación de muebles, entre otras aplicaciones. ~~Bambusa bambos~~ *Bambusa bambos* es un bambú originario de la India con ciertas características particulares, ~~que~~ es de interés para los programas de reforestación. Las vías de propagación vegetativas son limitadas, aún más cuando se desea introducir la especie a la producción. El ~~objetivo~~ objetivo del presente trabajo fue lograr la propagación *in vitro* de plantas a partir de segmentos nodales obtenidos de ramas de plantas adultas de *Bambusa bambos* para el establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro*. Se utilizaron ramas plagiotropicas en activo crecimiento. Se realizó un proceso de lavado con detergente comercial y la ~~desinfección~~ desinfección con bicloruro de mercurio al 0.2% durante 10 minutos. Los brotes obtenidos a partir de segmentos nodales en el medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con BAP y ANA, se subcultivaron en el propio medio enriquecido con 50 mg/L ácido cítrico y 25 mg/L de cisteína. Se logró la multiplicación de brotes de *Bambusa bambos* bajo diferentes formas de cultivo.

Influence of light on the response of *Garcinia aristata* (Griseb.) Borhidi to *in vitro* culture.

Authors: Fernando Sagarrá Oscar Concepción, Lelurlys Nápoles, Danilo Pina, Marcos Daquinta.

Laboratory for Plant Cell and Tissue Culture, Bioplant Centre, University of Ciego de Ávila, Cuba. PO Box: 69450. E-mail: fsagarra@bioplantas.cu

Abstract:

Garcinia aristata (Griseb.) Borhidi is a slow-growing woody specie native to Cuba, widely used for traditionally medicine. Therefore, the tissue culture techniques could be a useful tool for conservation and sustainable utilization of this specie. Aiming to establish its *in vitro* culture, seeds coats were removed and the resulting endosperm (including embryos) were disinfected in 10% mercuric chloride for seven minutes and then rinsed three times for 10 minutes with distilled water. Uncoated seeds germinated on Murashige and Skoog (MS) basal medium and seedlings were grown ~~in vitro~~ *in vitro* under darkness conditions for a week. At day seven, two treatments were established ~~light~~ light and etiolation culture conditions. After five weeks of culture, seedlings from both treatments were compared for morphological and biochemical parameters. Shoot tips and single node explants from both etiolated and non-etiolated 35 d-old seedlings were also compared for shoot formation. Light inhibited the stem elongation, the number of nodes per seedling and enhanced the content of phenolics

(free and cell wall-linked) and the peroxidase activity of explants at day 35 of culture. However, the levels of total soluble proteins were not significantly affected. Interaction between light and 6-benzyladenine concentration significantly affected the shoot induction. Maximum percentage of shoot formation for shoot tips and single nodes were achieved always in the darkness on Murashige and Skoog media supplemented with 4.44 and 6.67 μM of 6-benzyladenine, respectively. Etiolation also promoted adventitious buds regeneration on the internodes segment for all concentrations of the cytokinin evaluated. Evidences suggest that light induced recalcitrance to *de vitro* culture through a mechanism involving the induction of rigidity in the plant material.

Key words: *in vitro* culture, light, peroxidase, phenolics, protein, rigidity.

Micobiota epifítica y contaminantes fungosos de la fase de establecimiento *in vitro* de la teca (*Tectona grandis* L.)

Mayra Acosta, Eliza Quiala, Yelenys Alvarado, Mileidy Cruz, Cynthia Sánchez, Michel Leiva, Berkis Roque, Maite Chávez y Raúl Barbón.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 Santa Clara. Villa Clara, Cuba. e.mail: yelenys@ibp.co.cu

RESUMEN

El uso de fungicidas en el tratamiento de las plantas donadoras durante la fase preparativa de la micro-propagación es muy importante para prevenir o eliminar los hongos filamentosos saprofiticos o parásitos causantes de contaminaciones durante la fase de establecimiento. En los forestales este problema se ve incrementado por las características anatómicas de los mismos que dificultaron su desinfección. Conocer la micobiota epifítica de las plantas donadoras, los hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro*, y realizar pruebas de susceptibilidad frente a fungicidas nos permite crear un esquema de tratamiento a las plantas donadoras dirigidos a disminuir la contaminación en la micropropagación de las especies leñosas. Por ello los objetivos de este trabajo fueron: Determinar la micobiota epifítica de las plantas donadoras de teca (*Tectona grandis* L.). Identificar y determinar los hongos filamentosos contaminantes más frecuentes de la fase de establecimiento *in vitro*. Evaluar la susceptibilidad de los hongos filamentosos contaminantes más frecuentes frente al fungicida Silvacur combi. Para la determinación de la micobiota epifítica se utilizó el método de la cámara húmeda y se realizaron preparaciones directas al microscopio óptico del crecimiento fungoso. En la identificación de los hongos filamentosos durante la fase de establecimiento se tuvieron en cuenta las características culturales sobre medio de establecimiento de la teca y se hicieron preparaciones directas al microscopio óptico con objetivo de 400x. Se determinó la frecuencia de aparición por observación visual del crecimiento micelial alrededor de la base de los explantes, agrupándose según sus caracteres culturales y se calculó el porcentaje de contaminación. Se utilizó el método de difusión en agar para evaluar la susceptibilidad de los hongos filamentosos más frecuentes frente al fungicida Silvacur combi. Se identificaron seis géneros de hongos filamentosos en las plantas donadoras los cuales fueron *Botryodiplodia* sp, *Cercospora* sp, *Cladosporium* sp, *Colletotrichum* sp, *Curvularia* sp y *Fusarium* sp. Los géneros *Botryodiplodia* sp, *Alternaria* sp, *Curvularia* sp, *Colletotrichum* sp, *Helminthosporium* sp, *Fusarium* sp, *Nigrospora* sp y *Cladosporium* sp se detectaron durante la fase de establecimiento siendo más frecuentes los tres primeros. Se observó susceptibilidad de los hongos filamentosos más frecuentes frente al fungicida Silvacur Combi a la concentración ensayada.

Palabras clave: micropropagación, contaminación fúngica, susceptibilidad, fungicida.

Estudio de la producción de pigmentos clorofílicos de plántulas de café (*Coffea arabica*) en fase multiplicación y aclimatización, bajo la acción de campos electromagnéticos.

Autores: Elizabeth Isaac Alemán, Yilan Fung Boix, Albys Ferrer Dubois.
Dpto. Bioelectromagnetismo. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado.
Ave. Las Américas s/n, Aptdo 4078, CP 90400, Santiago de Cuba, Cuba.
email: elizabeth@cnea.uo.edu.cu, eli3073@yahoo.com

Resumen.

Se propuso como objetivo estudiar el efecto del campo magnético en la producción de pigmentos clorofílicos durante las fases de multiplicación y aclimatización de plántulas de café obtenidas *in vitro*, para lo cual se emplearon plántulas en fase de multiplicación de 7 semanas de edad y se les realizó un tratamiento con campo electromagnético durante 3 y 9 minutos (3' y 9'), y se realizó la estimulación electromagnética con niveles de inducción de 20, 40 y 60 Gauss estableciendo un tratamiento control que no recibió estimulación electromagnética. En fase de aclimatización plantando plántulas de café de 10 semanas de edad que se sembraron en bolsos de polietileno durante un periodo de 8 semanas se estableció un control y un tratamiento con agua tratada magnéticamente en un rango de inducción entre 500 y 1200 Gauss, realizando por método espectrofotométrico la determinación de contenidos fotosintéticos, obteniéndose los mejores resultados de producción de pigmentos clorofílicos *a* y *b* y carotenos en las plántulas que recibieron campos electromagnéticos con respecto al control.

Palabras claves: clorofila, café, *in vitro*, multiplicación, aclimatización, campos electromagnéticos.

Abstract.

To study the effect of the magnetic field in the production of chlorophyllian pigments during multiplication and acclimatization phases coffee plants obtained *in vitro* was used. In multiplication phase plants of 7 weeks of age were carried out a treatment with electromagnetic field during 3 and 9 minutes (3' and 9') and received an electromagnetic stimulation with levels of induction of 20, 40 and 60 Gauss; a treatment control didn't receive electromagnetic stimulation. In acclimatization phase plants of coffee of 10 weeks of age that were sowed in polyethylene handbags during a period of 8 weeks settled down a control and a treatment with water treated magnetically in an induction range between 500 and 1200 Gauss, carrying out for spectrophotometric method to determination of chlorophyllian pigments *a* and *b* and carotenoids in the *in vitro* coffee plants that received electromagnetic fields with regard to the control.

Key words: chlorophyll, coffee, *in vitro*, multiplication, acclimatization, electromagnetic fields

Establecimiento De La Fase 0 Y 1 Para La Implantación In Vitro De Níspero (Manilkara Zapota L. Van Royen).

Autores: Ing: Edgar Acosta Acosta*, Dra. C. Ariannys Yolanda Roque López, Dra. C. Lidia Galindo Menendez, MSc Fanklyn Aranabrada, MSc. Karel Acosta Perez, Ing. Yianne Barreto Guerrero.

Centro Universitario Las Tunas. Avenidada Carlos J. Finlay S/N. Reparto Buena vista. Las Tunas.

*Autor para correspondencia: eacosta@ult.edu.cu

Resumen

En la región de Gayol en Vázquez, Las Tunas, se identificaron varias accesiones del níspero (*Manilkara zapota* L. Van Royen) resistentes a la sequía, los cuales presentan una gran variabilidad en el fruto. Por lo que el objetivo del trabajo fue determinar la variabilidad genética del níspero como frutal de interés en el norte de la provincia de Las Tunas, y determinar las condiciones para la implantación de material vegetal en condiciones in vitro. Se evaluó la variabilidad genética de la población de árboles de 18 años de sembrados, que ocupan alrededor de 13.42 ha a través de un análisis multivariado con ayuda del paquete estadístico STATISTICA. Para la desinfección se tomaron como explantes hojas de las partes más jóvenes de las plantas. Se tomaron explantes de plantas en invernadero y en campo. Se probaron diferentes tiempos de exposición al hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 % en los explantes del invernadero y luego diferentes dosis de NaOCl (0.4-1 %) en los explantes provenientes del campo durante 20 minutos. Los resultados permitieron extraer dos componentes con un 74.29 % de variabilidad en 18 tipos de árboles identificados, lo cual confirma una alta biodiversidad en esta especie que puede ser aprovechada en los planes de propagación acelerada a plantas élites (Fase 0), de aquí que se seleccionó la accesión 1 por su mayor pureza genética según el resultado del dendrograma. Para la desinfección los resultados más favorables fueron con el NaOCl al 0.7 % durante 20 minutos.

Palabras claves: *Manilkara zapota*, variabilidad genética, accesión, desinfección del explante, fase 0, fase 1.

Abstract

In the region of Gayol in Vázquez, Las Tunas, several agreements of the medlar were identified (*Manilkara zapota* L. Van Royen) resistant to the drought, which present a great variability in the fruit. For what the objective of the work was to determine the genetic variability of the medlar like fruit-bearing of interest in the north of the county of Las Tunas, and to determine the conditions for the installation of vegetable material under conditions in vitro. The population's of 18 year-old trees genetic variability was evaluated that occupy around 13.42 there is through an analysis multivariate with the help of the statistical package STATISTICA. For the disinfection they took as explants leaves of the youngest parts in the plants. They took explants of plants in hothouse and in field. Different times of exhibition were proven to the hypochlorite of sodium (NaOCl) to 1% in the explants of the hothouse and then different doses of NaOCl (0.4-1%) in the explants coming from the field during 20 minutes. The results allowed to extract two components with a 74.29% of variability in 18 types of identified trees that which confirms a high biodiversity in this species that can be taken advantage of in the plans of quick propagation starting from plants elites (Phase 0), of here that the agreement 1 were selected by their biggest genetic purity according to the result of the dendrogram. For the disinfection the most successful results went with the NaOCl to 0.7% during 20 minutes.

Key word: *Manilkara zapota*, genetic variability, accession, explant disinfection, phase 0, phase 1.

Empleo del cultivo de tejido para la propagación del Té de riñón

Yerina Santiago Bardón, Luis E. Rodríguez de Francisco⁽¹⁾, Janet Igarza Castro, Rayma Cantillo Ardebol

⁽¹⁾Laboratorio de Biotecnología Vegetal.. CISAT. Holguín. Gaveta Postal 41. CP 80 100. Teléf. (53)(24)425343. Email: luis@cbv.holguin.inf.cu
luisenrique95mx@yahoo.com.mx

Resumen

Hoy en día, la conservación de recursos biológicos es aceptada de forma generalizada como una responsabilidad social, dentro del contexto mucho más amplio de preservación de la biodiversidad. Las plantas medicinales constituyen una fuente muy apreciada por los hombres, su uso es muy continuo, lo que ha llevado a que muchas de estas plantas sean amenazadas, el reconocimiento de sus virtudes terapéuticas las ha incorporado ya al cultivo y a una sobreexplotación. Las diferentes comunidades humanas han utilizado y utilizan, sus propios reservorios de plantas medicinales locales para tratar sus enfermedades, de manera que el total de las especies podrían ascender a miles. Se calcula que la atención sanitaria primaria del 80% de la población en los países en desarrollo descansa sobre medicinas tradicionales, en su mayor parte extraídas de las plantas. Con el incremento de las áreas dedicadas al cultivo intensivo de plantas medicinales en nuestro país con el propósito de llevar a la población una opción para el alivio de determinados males y dolencias se ha hecho necesario acometer estudios relacionados con el cultivo de dichas plantas bajo condiciones *In Vitro* para obtener masas elevadas de estas especies que por su empleo y demanda no puedan satisfacerse por la agricultura tradicional. El presente trabajo tiene como objetivo contribuir a la propagación de *Delosiphon stamineus* (B) (Té de riñón) por vía biotecnológica y se exponen los resultados obtenidos en la obtención a gran escala de esta planta de alta demanda en la provincia de Holguín.

Palabras Claves: Té de riñón, cultivo de tejido, micropropagación, plantas Medicinales.

Propagación *in vitro* de *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts.

Rodríguez de Francisco Luis Enrique¹, Daquinta Marcos A⁴, Fonet Hernández Eleña Cantillo Ardeból Rayma¹, Alvarado Gómez Omar³, Rosales Enrique³

⁽¹⁾Laboratorio de Biotecnología Vegetal.. CISAT. Holguín. Gaveta Postal 41. CP 80 100. Teléf. (53)(24)425343. Email: luis@cbv.holguin.inf.cu
luisenrique95mx@yahoo.com.mx

RESUMEN

Escobaria cubensis, comúnmente denominado "cactus cone de Holguín", es un cactus endémico de la provincia de Holguín, que encuentra amenazado por la actividad antrópica. La presente investigación se desarrolla en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT-CITMA), Holguín, con el objeto de establecer la metodología para la propagación *in vitro* de *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts., a través de la inducción de brotes vía organogénesis a partir de plántulas germinadas *in vitro* y de areolas, provenientes de mamilas. Se emplearon semillas colectadas en la localidad de Purnio, en el municipio de Holguín, y se logró una desinfección de las semillas botánicas con hipoclorito de sodio

(2%) en inmersión doble durante cinco minutos, y de las areolas durante cinco minutos en bicloruro de mercurio (0.2%). Así como su posterior siembra en medio de cultivo MS suplementado con sacarosa (30¹g/l). Se obtuvo un 95.64% de germinación en medio de cultivo MS (25%), se logró además un 66.67% de supervivencia en las mamilas. En la multiplicación se evaluó diferentes concentraciones de Benzilaminopurina y se determinó que el mejor resultado, con 5.1 brotes por explante, fue el medio que contenía 13.3 μM Benzilaminopurina + 5.4 μM ácido naftalenacético. A partir del cuarto subcultivo, el número de brotes por explante disminuye. En la fase de enrizamiento se empleó el medio basal MS con 8.1 μM ácido naftalenacético + 2.5 μM ácido indolbutírico, obteniendo como promedio 2.5 raíces por planta de cultivo y en la aclimatización se empleó el sustrato Zeolita + Lecho de Bambú + Suelo y se obtuvo un 93.5% de supervivencia.

Palabras claves: antrópica, mamilas, areolas, cactus enano.

Uso de la biotecnología en la producción de semilla de calidad de papa

Paz Betty Ortega E.; Quintero N.; Montilla M.; Ramírez Y.; 2006. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Mérida) Avenida Urdaneta. Sede MAT. Edif. INIA. Mérida, Venezuela
e-mail: bpaz@inia.gob.ve ortega@inia.gob.ve parra@inia.gob.ve iram@inia.gob.ve

RESÚMEN

Uno de los aspectos más importantes del sector agrícola, en Venezuela, lo constituye la semilla. Es por ello que el Plan Nacional de Semilla para garantizar la seguridad alimentaria esta desarrollando el programa de producción de semilla de calidad de papa, contribuyendo a solucionar los problemas de escasez, ya que permite la reducción de la dependencia de semilla foránea, semilla pasilla e importada y como consecuencia controla el incremento de plagas y enfermedades y mantiene un flujo de semilla de alta calidad fitosanitaria. El esquema de producción de semilla desde el año 2005 haciendo uso de las herramientas de la biotecnología, donde se produce semilla prebásica de papa a partir de vitroplantas y microtubérculos obtenidos por la inducción de vitroplantas. El trabajo se desarrolla en el laboratorio de cultivo de tejidos del INIA ubicado en el Campo Experimental Mucuchies, Municipio Rangel, Estado Mérida a 48° 46' de latitud norte y 70° 54' de latitud oeste y a 3100 msnm. Para la producción de semilla, se emplean varios tipos de técnicas: **Micropropagación In vitro, Sistema autotrófico Hidropónico e inducción a la tuberización.** En la técnica de Micropropagación se emplea el medio de cultivo de Murashige y Skoog de 1962. El pH se ajusta a 5,6. Los cultivos son incubados a 22°C y 16 horas de iluminación con una intensidad de 5000 lux /día durante 4 semanas y se obtienen las plantas de los cultivares y/o variedades de papa en forma masiva. En el método de inducción a la tuberización se cultivan vitroplantas mantenidas por un tiempo de 45 días, en este punto se comienza el proceso de inducción a la tuberización: al medio de propagación original se le adiciona un medio de Murashige y Skoog al cual se le agrega sacarosa en una concentración de 80,0g/l. Inicialmente se incuban los cultivares por un período de 8 días y un fotoperíodo de 8 horas de iluminación. Posteriormente se mantienen bajo el régimen de 0 horas de iluminación durante un período de incubación de 45 días a una temperatura de 22°C. La técnica de producción de plántulas de papa bajo el sistema autotrófico hidropónico es el desarrollado en el INTA Argentina que utiliza contenedores desechables, turba y sustratos hidropónicos, sin agregar sacarosa ni reguladores de crecimiento. Se trabajan cultivares comerciales: Andinita, DIACOL-Capiro, INIAFRIT, FRIPAPA-INIA y Granola de los cuales se han producido 47.869

vitroplantas de variedades comerciales en el año 2005 y 69.165 vitroplantas de cultivares comerciales en el año 2006, y 5.246 microtubérculos de cultivares que han sido trasplantados en las Casas de Cultivo destinadas a la producción de semilla, obteniéndose la categoría prebásica. A partir de este momento se incorporan los productores semilleristas, quienes en sus campos y bajo la supervisión de SENASEM, producen las categorías de semilla: Básica, Registrada, y Certificada.

Palabras claves: Biotecnología, Semilla, Papa, Micropropagación, Inducción.

Sistema autotrófico hidropónico y sus bondades respecto al sistema de micropropagación convencional para la producción de semilla prebásica de papa.

Paz Betty Quintero N.; Parra M.; Montilla M.; Ramírez Y.; 2006. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Mérida) Avenida Urdaneta. SEDMAT. Edif. INIA. Mérida, Venezuela.

e-mail: bpaz@inia.gov.ve ;mparra@inia.gov.ve;
montilla@inia.gov.ve;yramirez@inia.gov.ve

RESUMEN

Con el objetivo de mejorar la eficiencia en el proceso de producción de semilla prebásica de papa, en Mérida, Venezuela, se realizó una investigación donde fueron evaluados dos métodos de multiplicación: técnica de micropropagación convencional y el Sistema autotrófico Hidropónico (SAH), siendo esta última una técnica desarrollada por el INTA-Argentina. Las vitroplantas y/o plántulas de papa se emplearon como material madre en las casas de cultivo para la producción de semilla prebásica del núcleo de producción de semilla de calidad del Plan Nacional de Semilla desarrollado en el Campo Experimental Mucuchies, Municipio Rangel, Estado Mérida a 48° 46' de latitud norte y 70° 54' de latitud oeste y a 3100 msnm. Los materiales empleados son: contenedores plásticos desechables, turba y soluciones hidropónicas, sin agregar sacarosa ni reguladores de crecimiento y vitroplantas obtenidas bajo el sistema de micropropagación convencional de los cultivares comerciales Andinita, D-Capiro, INIAFRIT, FRIPAPA-INIA y Granola. Previo al trasplante en las casas de cultivo se evaluó el vigor de los materiales, notándose mayor vigor y precocidad en alcanzar la edad fisiológica para trasplante a los materiales obtenidos por el método del sistema autotrófico hidropónico. El sustrato empleado para el trasplante estuvo compuesto de: tierra negra: humus de lombriz: arena de río en la proporción de: 2:1:5. La desinfección del mismo se realizó mediante la inyección de vapor de agua generado por una caldera de 20 HP. En el desarrollo del cultivo se realizó el manejo agronómico: fertilización al momento de la siembra, aporques, aplicación de productos biológicos y químicos, cosecha, clasificación, desinfección de semilla y etiquetado de la misma por SENASEM, asignándole la categoría de Semilla Prebásica. Al evaluar el número de tubérculos producidos se obtuvo para el cultivar Andinita por el método SAH 216 minitubérculos y por el método de micropropagación convencional 147 minitubérculos y para el cultivar Granola por el método SAH 216 minitubérculos y por el método de micropropagación convencional se produjo 210 minitubérculos; para los cultivares: D-Capiro, INIAFRIT y FRIPAPA-INIA se obtuvo: 150, 252 y 222 minitubérculos respectivamente por el método SAH mientras que el de micropropagación convencional produjo: 180, 324 y 243 minitubérculos respectivamente. En cuanto al peso total los cultivares D-Capiro, FRIPAPA-INIA y Granola obtuvieron el mayor peso total: 4146, 3020 y 2622 gr/m² por el método SAH con respecto a 1231, 1279 y 2432 gr/m² por la micropropagación convencional y los cultivares Andinita e INIAFRIT tuvieron resultados opuestos: 3078 y 3150 gr/m² por el método SAH y 4148 y 3321 gr/m² por el de micropropagación convencional. Los resultados permiten concluir que no hay diferencias significativas entre

los dos métodos evaluados en cuanto a peso y número de minitubérculos. La principal bondad del método SALE en comparación con el de micropropagación convencional es la precocidad de una semana en el laboratorio para cultivar en estudio y el fácil manejo al trasplante y primeras etapas del desarrollo del cultivo.

Palabras claves: Papa, micropropagación, hidroponía, biotecnología.

Uso De Técnicas Biotecnológicas Para Acelerar La Capacidad Competitiva De La Producción De Semilla De Papa (*Solanum Tuberosum* L.) En El Estado Mérida - Venezuela.

J. Salas, N. Quintero, V. Santiago, M. Montilla y L. Delgado. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Mérida - Venezuela. Apartado 425. E-mail: salasi@inia.gob.ve nquintero@inia.gob.ve vsantiago@inia.gob.ve mmontilla@inia.gob.ve ladelgado@inia.gob.ve

Resumen

El éxito de la producción de papa (*Solanum tuberosum* L.) está estrechamente ligado a la calidad de la semilla que se utilice. Los productores suelen utilizar semilla producida en sus propias fincas, creando problemas sanitarios de zonas afectadas a zonas sanas. Como una solución a este problema se utilizó el método de cultivo de tejidos para la obtención de plantas sanas mediante diferentes técnicas: 1. Producción de vitroplantas, a partir de segmentos nodales de tallo para los cultivares (Andinita, Caribay, Monserrate, Capiro y Granola). Estos fueron incubados a 20°C y 16 horas de iluminación con una intensidad de 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por día durante tres a cuatro semanas, dependiendo del comportamiento de cada cultivar hasta obtener 4 ó 5 nudos, aptos para ser multiplicados nuevamente bajo el mismo sistema. 2. Generación de microtubérculos, luego de la fase anterior, al medio de propagación inicial se le adicionó un medio fresco de Murashige y Skoog con una concentración de sacarosa de 80.0 g/l, las vitroplantas fueron incubadas en las mismas condiciones pero con 8 horas de iluminación durante ocho días para luego pasar a oscuridad total. 3. Obtención de plántulas bajo el sistema autotrófico hidropónico, el cual consistió en colocar explantes seleccionados (apicales, oseoliales), provenientes de vitroplantas madres, en envases plásticos transparentes contentivos de sustratos esterilizados y enriquecido con soluciones nutritivas, posteriormente fueron incubados en ambientes con las mismas condiciones para la producción de vitroplantas por un período de dos a tres semanas para su posterior multiplicación bajo la calidad de hasta tres podas. Las plantas y los microtubérculos fueron multiplicados bajo condiciones de invernadero del INIA y/o de productores organizados (PROINPA, Agropecuaria Bajo Cubierta), en el marco del proyecto RIP de la papa del MCyT de Venezuela (2003), continuándose las multiplicaciones en fincas de productores semilleristas (básica, registrada y certificada). Lo anterior ha permitido generar, validar y adaptar protocolos de producción de vitroplantas y microtubérculos en la búsqueda de alternativas eficientes y de bajo costo para la obtención de semilla genética de alta calidad fitosanitaria, como material inicial para el proceso de inspección y certificación de semilla de papa en la región. Las técnicas evaluadas mostraron diferencias entre sí, en cuanto tipo de explante y comportamiento del genotipo. Además, la incorporación y transferencia de tecnología ha favorecido la capacidad competitiva del sector semillerista brindando mayores posibilidades de permanencia en la actividad y fortaleciendo la seguridad agroalimentaria del país.

Palabras claves: papa, vitroplantas, autotrófico, microtubérculos, semilla.

Influencia de la concentración de 6-BAP, del período y el número de subcultivos en la multiplicación in vitro de Ruta graveolens.

Karen Alvarado, Marcos Daquinta, Loexis Rodríguez, Albaro Blanco, Enidia Téllez.
Centro de Desarrollo de la Montaña.

Resumen

La presente investigación se realizó en Centro de Desarrollo de la Montaña con el objetivo de estudiar la concentración óptima de 6-BAP, así como el período y el número de subcultivos óptimo para la multiplicación in vitro de Ruta graveolens a través de la organogénesis directa. Se emplearon segmentos nodales ya establecidos en condiciones in vitro. Los resultados mostraron que la multiplicación de los nodos de ruda en medio MS suplementado con sacarosa y 0.2 mg/L de 6-BAP era eficiente. Con la realización de 4 subcultivos cada 21 días los explantes mostraban un mayor número de brotes axilares.

Estudio foliar en plantas de Rosmarinus officinalis L. propagadas con agua tratada magnéticamente.

Autores: Yilan Fung Boix, Elizabeth Isaac Alemán, Albys Ferrer Dubois.
Dpto. Bioelectromagnetismo. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado.
Ave. Las Américas s/n, Aptdo 4078, CP 90400, Santiago de Cuba, Cuba.
email: yilan@cnea.uo.edu.cu, yilan26@yahoo.com

Resumen

Este trabajo se desarrolló con el objetivo de realizar un estudio foliar en plantas de Rosmarinus officinalis L. (Romero) regadas con agua tratada magnéticamente para la propagación y conservación ex situ de la especie. Esta especie es muy conocida en la provincia de Santiago de Cuba por sus propiedades medicinales: antirreumático, sedante, diurético, digestivo, tónico, estimulante de la circulación periférica, antibacteriano, y protector del tejido hepático. Su principio activo son los aceites esenciales. En estos momentos no se encuentra en los bancos de germoplasma del Jardín Botánico de dicha provincia, debido a su difícil propagación en condiciones naturales. Por lo que se pretende extender el uso de los campos magnéticos en el agua de riego para incrementar el crecimiento y calidad de vida de las plantas de esta especie.

Palabras claves: área foliar, densidad estomática, inducción magnética

Summary

This work was developed with the objective of carrying out a study to foliate in plants of Rosmarinus officinalis L. (Rosemary) watered with water treated magnetically for the propagation and conservation *ex situ* of the species. This species is very well-known in Santiago de Cuba city for its medicinal properties: antirheumatic, sedative, diuretic, digestive, tonic, stimulant of the outlying circulation, antibacterian and protective of the hepatic tissue. Their active principle is the essential oils. In these moments it is not in the banks of germoplasma *ex situ* of the Botanical Garden of this county, due to their difficult propagation under natural conditions. In the future the technique will be applied and extended the employment of the magnetically treated water, to increase the growth and quality of life of the plants of this species.

Words key: foliar leaves, stomatic density, magnetic induction

Empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal para la multiplicación de segmentos nodales y producción de tubérculos en Dioscorea alata L.

Manuel Cabrera Jován, Rafael Gómez Kosky, Milagros Basail Pérez, Yadenys Torres Núñez, Ania Robaina Jiménez, Arletys Santos Piñón, Víctor Medero Vega, Aymé Rayas

Cabrera, Jorge López Torrès Magaly García García Rolando Romeró y Alberto Espinosa Cuellár

¹Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP. 53000, Villa Clara, Cuba

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

(*Autor para correspondencia: e-mail: mcabrera@inivit.co.cu ; malfredocj@yahoo.es)

Resumen

Con el propósito de desarrollar protocolos de propagación eficientes se emplearon para la multiplicación de segmentos nodales y producción de microtubérculos en el clon de ñame 'Pacala Duclos' sistemas de inmersión temporal conformados por dos frascos de vidrio de 5000 ml de capacidad, se definieron como objetivos de trabajo evaluar el tiempo y frecuencia de inmersión, volumen de medio de cultivo por brotes, densidad de inóculo, tiempo de renovación del medio de cultivo y el coeficiente de multiplicación de los segmentos nodales y la producción de microtubérculos. Los resultados obtenidos permitieron definir para la multiplicación de segmentos nodales y producción de microtubérculos el empleo de 10 minutos de inmersión y frecuencias de inmersión cada tres y seis horas, emplear un volumen de medio de cultivo 60 mL por explante y una densidad de 50 explantes por frasco de cultivo, bajo estas condiciones de cultivo se obtiene el más alto coeficiente de multiplicación superior a cinco en seis semanas de cultivo y la mayor producción de microtubérculos con un peso fresco superior a los 3,0 gMF para lo cual además es necesario realizar al menos renovación del medio de cultivo a las nueve semanas de cultivo.

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

Efecto de la metatopolina en la actividad antioxidante y la multiplicación *in vitro* del plátano CEMSA ¾ (Musa AAB).

Cejas I¹.; Hernández M².; Escalona M¹.; Capote I¹.; Aragón C¹.; González J¹.; Olmos E².

1. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón Km 9. Ciego de Ávila, Cuba

2. CEBAS- CSIC. Campus Universitario. Apto 164 30100. Murcia. España

Resumen.

En plantas varias Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), incluyendo al₂O₂ están involucradas en diferentes vías de señales que incluyen alteraciones en el flujo de iones, cambios en la expresión de genes y activación de proteínas kinasas, las cuales juegan un rol esencial en la progresión del ciclo celular y división celular. Las citoquininas representan una importante clase de fitohormona particularmente conocida por sus propiedades antiscenescentes, la cual puede ser regulada por radicales libres involucrados en procesos del metabolismo oxidativo. En el presente trabajo se midieron algunos indicadores del estrés oxidativo (O₂, malondialdehído, catalasa y peroxidasa) en el proceso de proliferación del plátano CEMSA con la aplicación de dos citoquininas benciladenina y metatopolina 0 y 4.44 µmol/L. La mayor acumulación de O₂ se alcanzó en aquellos brotes que crecieron en ausencia de citoquinina (control) coincidiendo con los brotes que alcanzaron menos desarrollo, la liberación de H₂O₂ por acción de la catalasa en los brotes que crecieron en presencia de metatopolina (4.44 µmol/L) demuestra el fuerte poder antioxidante que ejerce esta citoquinina en la proliferación del plátano CEMSA ¾. .

PALABRAS CLAVE: *Musa*, metatopolina, estrés oxidativo

Micropropagación de malanga *Xanthosoma violaceum*.

Enidia Téllez Fuentes, Loexis Rodríguez Montoya, Karen Alvarado Rufo, Alberto Pérez, Roberto González Valladares, Rey F. Guarat y Esmérida Sánchez Márquez.

Resumen

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Desarrollo de la Montaña y la Biofabrica perteneciente a la Empresa Agroforestal de Montaña Coronel Arturo Lince, localizados en el municipio El Salvador, provincia Guantánamo, en el periodo comprendido entre diciembre/2004 a diciembre/2006. Con el objetivo de establecer el protocolo para la propagación in vitro de *Xanthosoma violaceum*, siendo este cultivo de gran importancia por su alto valor nutritivo, siendo la propagación acelerada por vías biotecnológicas de clones in vitro más comercial, uno de los principales retos en la agricultura, aunque en este caso la recuperación de clones autóctonos de la montaña es de vital importancia por lo deprimida que está la producción actualmente. Los resultados obtenidos permitieron confirmar que la desinfección de las yemas de malanga de campo necesitaron una doble desinfección con hipoclorito de sodio al 5 y 2.5% durante 10 minutos respectivamente. El medio de establecimiento con las sales MS (1962) al 75 % de la concentración causó un efecto positivo en las yemas. La concentración de 4.0 mg.L⁻¹ de BAP es la mejor para la multiplicación in vitro, pues estimuló significativamente la brotación de las yemas apicales y propició un mayor coeficiente de multiplicación, el cual se estabilizó en un rango de 4.0 – 5.1 desde el 4to hasta el 8vo 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. La aclimatización garantizó un 100 % de supervivencia utilizando la pulpa de café 100 %.

Palabras claves: Micropropagación malanga, *Xanthosoma violaceum*.

Comportamiento de líneas celulares durante la embriogénesis somática del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB).

Leyanis García Águila*, Rafael Gómez Kosky, Boris Chong, Maritza Reyes, Marisol Freire y Yelenys Alvarado

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní Km 5.5 Santa Clara, Villa Clara. Cuba, CP 54830. * E-mail leyanis@ibp.co.cu leyanis02@yahoo.es

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el comportamiento de líneas celulares embriogénicas durante el desarrollo de la embriogénesis somática en el cultivar híbrido 'FHIA-21' (*Musa* AAAB). Para este estudio se establecieron líneas celulares a partir de cada callo con estructura embriogénica formado y derivado de flores masculinas inmaduras. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre las líneas durante la fase de multiplicación de la suspensión celular embriogénica. Las diferencias se pusieron de manifiesto en el crecimiento celular; mientras que la vitalidad de los agregados celulares embriogénicos osciló entre 99.7 y 100% sin diferencias estadísticas entre las líneas estudiadas. Se evidenció además, la influencia de las condiciones de iluminación en la capacidad de germinación de los embriones somáticos. Las condiciones de cultivo en cámara de crecimiento con luz artificial y fotoperíodo de 16 horas luz proporcionaron un aumento del número de embriones germinados y la formación de plantas completas. Se observó la influencia de la línea celular en la germinación de los embriones somáticos, siendo la línea número 4 la de mayor número de embriones germinados. Al concluir los experimentos se obtuvieron un total de 8230 plantas de las líneas celulares estudiadas. Las

mismas se adaptaron a condiciones *in vitro* en casa de cultivo con altos porcentajes de supervivencia y porcentajes de variación somaclonal inferiores al 1.0 %.

Palabras clave: germinación de embriones somáticos, línea celular, intensidad luminosa, variación somaclonal

Las poliaminas en la embriogénesis somática de la caña de azúcar (*Saccharum Ssp.*).

Nadina Nieves¹, Carlos Acevedo², Mariela Cid¹, Enrique Villalobo³, José M. Torné³, Danilo Piná¹, Yarianne Lezcario¹, Mireya Santos³

¹ Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Bioplantas, Carr. a Morón km 9, CP 69450, Ciego de Avila, Cuba. E-mail: nadnieves@bioplantascu

² Centro de Investigaciones de Ecosistemas Costeros. Cayo Coco, Ciego de Avila, Cuba. E-mail: carlos@ciec.fica.inf.cu

³ Departamento de Genética Molecular. IBMB. Consorcio CSIC-IRTA. Jordi Girona 18-26. 08034, Barcelona. España. E-mail: mlgmt@ibmb.csic.es

Resumen.

Los cultivos capaces de producir embriones somáticos con alta frecuencia proveen sistemas ideales para estudiar las bases bioquímicas de la regulación de estos procesos en plantas. La caña de azúcar es una monocotiledónea herbácea de interés económico no sólo para la producción de azúcar, sino por los múltiples derivados que de ella se obtienen, todos de alta demanda en el mercado internacional. Este trabajo se desarrolló con el objetivo de profundizar en el papel fisiológico de los compuestos nitrogenados, con énfasis en la poliaminas, en el proceso de la embriogénesis somática en caña de azúcar. Los estudios se realizaron a partir de segmentos de hojas de campo de la variedad CP-5243. En ellos se evaluó la influencia de las aplicaciones exógenas de poliaminas, solas y en combinación y el efecto de la aplicación exógena de MGBG (Metil glioxal bis guanilhidrazona), un inhibidor de la síntesis de las poliaminas. Se determinó la presencia de Transglutaminasa (TGasa, EC 2.3.2.13) enzima que cataliza el enlace de poliaminas a proteínas, en condiciones de luz y oscuridad, bajo la acción de la cicloheximida (CH), un inhibidor de la ruta metabólica de las poliaminas. Se realizó conteo y clasificación de los embriones somáticos a los 14 días en la etapa de histodiferenciación. Se evaluaron la prolina libre, las proteínas solubles totales y las proteínas de almacenaje, así como la actividad de la enzima TGasa. A partir de los resultados obtenidos se pudo determinar que la putrescina sola y en dosis baja (5 mM) tuvo un efecto positivo sobre la embriogénesis somática, mientras que esta dosis duplicada (10 mM) la inhibió. La espermidina y la espermina, tanto solas como combinadas con putrescina, tuvieron efectos negativos sobre el proceso embriogénico. El MGBG (inhibidor de la S-Adenosilmetionina carboxilasa) en dosis baja (1 mM) favoreció el proceso embriogénico, mientras que en dosis altas lo redujo, al parecer por regular los niveles de putrescina cercanos a los logrados por la dosis de 5 mM aplicada en el experimento uno. La prolina libre y las proteínas solubles totales y de almacenaje, en particular las glutelinas, se mostraron importantes en la fase de histodiferenciación. Se detectó una TGasa putative, la cual se informa por primera vez en caña de azúcar y se discute el efecto de la CH y la luz en la actividad de la enzima, así como la implicación de la enzima en el metabolismo de las poliaminas y el proceso embriogénico. Se propone un posible mecanismo de acción de las poliaminas en la embriogénesis somática de la caña de azúcar.

Palabras clave: Espermidina, espermina, prolina, proteínas solubles, proteínas de almacenaje, transglutaminasa.

Efecto del campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja en la callogénesis de Cafeto (*Coffea arabica* L.)

Autores: Albys E. Ferrer, Yilan Fung, Elizabet Issac

Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. GP 4078. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, 99400. Cuba. Tel/fax 53 -22- 643721. E-mail: albys@cnea.uo.edu.cu, albysf@yahoo.com

Resumen

En esta investigación se estudió la influencia de los campos electromagnéticos en la formación de callos en vitroplantas de cafeto (*Coffea arabica* L.) var. Caturra Rojo durante la fase de multiplicación *in vitro*. Se utilizaron varias frecuencias de inducción de campo magnético y diferentes tiempos de exposición. Los resultados fueron procesados estadísticamente por el programa "GwBasic" por un Análisis de Varianza de Clasificación Simple por Rangos (Kruskal - Wallis), además de un Ordenamiento de los Rangos obtenidos para los callos. Se obtuvo la mayor formación de callos para el tratamiento en el que se utilizó 8 Hz de frecuencia y 24 horas de exposición al campo electromagnético. Con este resultado se evidenció el efecto positivo que ejercen los campos electromagnéticos en la formación de callos de cafeto.

Palabras clave: cafeto, callos, campos electromagnéticos, frecuencias.

Summary:

In this investigation the influence of the electromagnetic fields was studied in the formation of callus in coffee vitroplants (*Coffea arabica* L.) var. Red Caturra during the multiplication phase *in vitro*. Several frequencies of induction of field magnetic and different times of exhibition were used. The results were processed statistically by the program "GwBasic" for an Analysis of Variance of Simple Classification for Ranges (Kruskal - Wallis), besides a Classification of the Ranges obtained for the callus. The biggest formation of callus was obtained for the treatment in which was used 8 Hz of frequency and 24 hours of exposition to the electromagnetic field. With this result the positive effect of electromagnetic fields in the formation of coffee callus was evidenced.

Key Words: Coffea, callus, electromagnetic fields, frequency.

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE POLIAMINAS EXOGENA SOBRE LA EMBRIOGENESIS SOMÁTICA DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*Sacharum spp. Híbrido*). RELACIÓN CON ALGUNOS COMPUESTOS NITROGENADOS.

Cid, M.; Lezcano, Y.; Pina, D.; Nieves, N.

Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Bioplantas, UNICA, Carr. Morón km 9, CP 69450, Ciego de Avila, Cuba. E\$-mail: mariela@bioplantas.cu

Resumen.

Los cultivos capaces de producir embriones somáticos con alta frecuencia proveen sistemas ideales para estudiar las bases bioquímicas de la regulación de estos procesos en plantas. La caña de azúcar puede ser un sistema modelado para profundizar en la complejidad del metabolismo de la embriogénesis somática. Esta planta es una monocotiledónea herbácea de alto interés económico, no sólo para la producción de azúcar, sino por los múltiples derivados que de ella se obtienen, todos de alta demanda en el mercado internacional. El trabajo se desarrolló con el objetivo de profundizar en el papel fisiológico de los compuestos nitrogenados, con énfasis en la poliaminas, en el proceso de la embriogénesis somática en caña de azúcar. El experimento se realizó a partir de segmentos de hoja de campo de la variedad AP-5243. En él se estudió la influencia de las aplicaciones exógenas de poliaminas, solas y en combinación. Se realizó el conteo y clasificación de embriones somáticos y las características de las plantas formadas a los 35 días de la germinación de los embriones, además se determinaron las proteínas solubles totales y prolina libre en cada momento evaluado. A partir de los resultados obtenidos se pudo establecer que la putrescina sola y en dosis (5 mM) tuvo un efecto positivo sobre la embriogénesis somática y la regeneración a partir de ella, mientras que esta duplicada (10 mM) la inhibió. La espermidina y la espermina, tanto solas como combinadas con putrescina, tuvieron efectos negativos sobre el proceso embriogénico y la regeneración a plantas.

Palabras clave: Embriogénesis somática, poliaminas, prolina libre, proteínas.

Propagación in vitro de *Dracaena sanderiana* en Sistemas de Inmersión permanente.

Autores: Marcos Daquinta, Danay Pacheco, Yarianne Lezcano.

Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón, km 9, CP 69450. Cuba.

mdaquinta@bioplantas.cu

Resumen

El Bambú chino o Bambú de la suerte (*Dracaena sanderiana*, L.) es una planta de la familia Agavaceae de gran interés como planta ornamental por su alto valor que alcanza en la actualidad en los departamentos especializados. Esta planta se produce en la China, por lo que resulta muy interesante su propagación en otras regiones del mundo. La reproducción de esta planta es por estacas, lo que demanda un gran volumen de plantas para su propagación. Con el objetivo de establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de esta especie, se evaluaron diferentes tiempos de infección de las yemas con bicloruro de mercurio (HgCl₂) a 0.2% (m/v), distintos niveles de BAP (0, 1, 2 y 3 mg/L) para el establecimiento de las yemas, tanto en estado semisólido como líquido, bajo condiciones de luz y oscuridad, así como el manejo de las explantes y diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento (AN y BAP) para la proliferación de los brotes en sistemas de inmersión permanente. Se logró realizar el establecimiento *in vitro* de la *Dracaena*

sanderiana a partir de yemas laterales de estas plantas adultas, en medio cultivo MS (1962) con 1 mg/L de BAP en estado semisólido y bajo condiciones de oscuridad. De las combinaciones de reguladores evaluadas para la proliferación de brotes, el BAP (2 mg/L) combinado con ANA resultó ser la mejor, en los brotes seccionados longitudinalmente. La aclimatización de los brotes de *Dracaena sanderiana* se realizó en un sustrato compuesto de zeolita cachaza (1:1) en condiciones de cultivo, con un sistema de riego por microjet.

Propagación in Vitro de cuatro variedades de Paeonias(JuRo, CoLo, GoBa, Bartzella).

Lezcano, Yarianne, Escalona, Maritza, Daquinta Gradaille.

Laboratorio de cultivo Células y Tejidos, Centro Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila 69450, Cuba.

Autor para correspondencia imalezcano@bioplantas.cu

Resumen

Las Paeonias son ornamentales perennes que se cultivan en los países templados y fríos del hemisferio boreal. Por el interés comercial de estas plantas se desarrollaron diferentes estrategias con vistas a aumentar el coeficiente de multiplicación. Entre ellas, se evaluaron diferentes métodos de cultivo (semi-sólido, líquido e inmersión temporal), tipos (BA y mT) y concentraciones de citoquininas (0, 2.22, 4.44, y 6.66 $\mu\text{mol/L}$), así como el uso de subcultivos en la proliferación de la Paeonia variedad SeSu en los biorreactores de inmersión temporal. Además en las variedades CoLo, Bartzella, GoBa, JuRo se evaluaron diferentes tipos (BA, mT y metoxiMet) y concentraciones de citoquininas (0, 2.22, 4.44 y 6.66 $\mu\text{mol/L}$) así como la influencia de la formulación salina (Lepoivre y MS modificado) con y sin pulso líquido de citoquininas (50 mg/L de BA + 50 mg/L de Kinetina) en la proliferación de estas variedades en medio semi-sólido. Se estableció un procedimiento para la proliferación en biorreactores de inmersión temporal de la Paeonia variedad SeSu el cual incluye el uso de la BA a 6.66 $\mu\text{mol/L}$ y la realización de un cambio de medio a los 15 días de iniciado el cultivo. En las restantes variedades, el mejor comportamiento en la proliferación *in vitro* se logró con 6.66 $\mu\text{mol/L}$ de BA. En las cuatro variedades, la formación de raíces fue genotipo-dependiente y estuvo influenciado por el tipo y concentración de citoquininas a que estuvieron expuestos durante la etapa de proliferación. Los niveles de respuesta de los brotes de Paeonias, CoLo, JuRo y Bartzella a la composición basal del medio Lepoivre y MS modificado así como al pulso líquido de altas concentraciones de citoquininas estuvo influenciado por la variedad.

Propagación in vitro de vriesea en bit.

Iris Capoté, Maritza Escalona, Marcos Daquinta, Diana Pina, Justo Gonzalez, Carlos Aragon.

Centro de Bioplantas, UNICA, Carretera a Morón, Km 9 Ciego de Ávila.

icapote@bioplantas.cu

Resumen.

Las bromelias son plantas ornamentales muy atractivas por la coloración de sus hojas y la belleza de sus inflorescencias. Dentro de ellas *Vriesea* es uno de los géneros de mayor interés comercial. Cuando se desean introducir nuevos híbridos en el mercado, las técnicas de propagación tradicional son insuficientes, por lo que resultan de gran interés las técnicas de propagación *in vitro*. Con el objetivo evaluar diferentes condiciones de cultivo para la propagación *in vitro* de la *Vriesea* con la implementación de la técnica de Inmersión

Temporal se evaluó el efecto del volumen de medio de cultivo/explante en la proliferación y calidad de los brotes de *Vriesea* en el Birreactor de Inmersión Temporal, el efecto del corte de los brotes (manejo del explante) previo a la inoculación en el BIT en la proliferación y calidad de los brotes y la aclimatización de los brotes y el efecto de la aplicación del análogo de Brasinoesteroides (Melfla) en la supervivencia y en los indicadores morfológicos de calidad de las plantas. La integración de los resultados constituyen los procedimientos elementales para un protocolo de propagación *in vitro* con el empleo de la técnica de Inmersión Temporal.

Propagación *in vitro* de tres variedades de callas (*Zantedeschia sp*). En diferentes formas de cultivo

Javier Sánchez, Marcos Daquinta Gradaille, Iris Capote.
Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila.
Email: jsanchez@bioplantas.cu, mdaquinta@bioplantas.cu.

Resumen

Las Callas (*Zantedeschia sp*) son plantas de la familia *Araceae* de gran interés como plantas ornamentales en maceteros y como flor de corte. Resulta de gran interés la propagación *in vitro* de las nuevas variedades obtenidas, por la diversidad de colores de sus flores. La reproducción de esta planta es por sus tubérculos que se obtienen en un número limitado. El objetivo del presente trabajo fue la propagación *in vitro* de tres variedades (Treasure, Magistec Red y Golden Affiar) de esta especie, se evaluaron diferentes tiempos de desinfección de las yemas con dicloruro de mercurio ($HgCl_2$) a 0.2% (m/v), distintos niveles de BAP (0, 1, 2, 3 y 4 mg/L) para el establecimiento de las yemas brotadas de los tubérculos, bajo condiciones de luz y oscuridad, así como el manejo de las explantes y diferentes concentraciones de BAP, para la proliferación de los brotes. También se evaluaron diferentes formas de cultivo en la multiplicación de esta especie. Se logró realizar el establecimiento *in vitro* de las tres variedades de Callas a partir de yemas brotadas de los tubérculos, en medio *MS* (1962) con 2 mg/L de BAP en estado semisólido y bajo condiciones de oscuridad. El BAP a distintas concentraciones, según la variedad, permitió la proliferación de brotes, así como las diferentes formas de cultivo. La aclimatización de los brotes de Callas se realiza en un sustrato compuesto de zeolita cachaza (1:1) en condiciones de casa de cultivo con un sistema de riego por microjet.

Propagation of three varieties of callas (*Zantedeschia sp*). Via *in vitro* in different forms of cultivation

Javier Sánchez, Marcos Daquinta Gradaille, Iris Capote.
Laboratory of Cultivation of Cells and Tissues. Center of Bioplantas. University of Blind of Ávila.
Email: jsanchez@bioplantas.cu, mdaquinta@bioplantas.cu.

Summary

The Callas (*Zantedeschia sp*) they are plants of the family *Araceae* of great interest like ornamental plants in gavel and court flowers. It is of great interest the propagation *in vitro* of the new obtained varieties, for the diversity of colors of their flowers. The reproduction of this plant is for its tubers that are obtained in a limited number. The objective of the present work was the propagation *in vitro* of three varieties (Treasure, Magistec Red and Golden Affiar) of this species, different times of disinfection of the buds were evaluated with bichloride of mercury ($HgCl_2$) to 0.2% (m/v), different levels of BAP (0, 1, 2, 3 and 4

mg/L) for the establishment of the sprouted buds of the tubers, under conditions of light and darkness, as well as the handling of the explantes and different concentrations of BAP, for the proliferation of the buds. Different cultivation forms were also evaluated in the multiplication of this species. You is able to carry out the establishment in vitro of the three varieties of Callas starting from sprouted buds of the tubers, between cultivation MS (1962) with 2 mg/L of BAP in state semisolid and under conditions of darkness. The BAP to different concentrations, according to the variety, allowed the proliferation of shoots, as well as the different cultivation forms. The acclimatization of the shoots of Callas is carried out in a substrate made up of zeolita phlegm (1:1) under conditions of cultivation house, with a watering system for microjet.

Smart Bit. Biorreactor de 4^{ta} generación.

Ing. Alberto Gómez Abreu¹ Ing. Javier Pérez Balmaseda

Est. Yoanny González Rodríguez² MSc. Cosme E. Santiesteban Toca

¹ Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila. cahamez@bioplantass.cu

² Facultad Informática. Universidad de Ciego de Ávila. Cuba.

Resumen

La micropropagación de plantas es el sector de mercado más atractivo para los laboratorios comerciales que aplican las tecnologías del cultivo in vitro de especies vegetales. Ésta, requiere la transferencia periódica del cultivo a medio fresco debido al agotamiento y/o alteración de los nutrientes, así como, al crecimiento o proliferación continuado del tejido. El uso del medio líquido para la propagación in vitro tiene algunas ventajas y se considera una técnica ideal para la propagación masiva de plantas, porque reduce la manipulación y es un requisito indispensable para la automatización del proceso. Algunos sistemas de micropropagación alternativos con el empleo de medio líquido se han desarrollado con el propósito de la automatización del proceso y la consiguiente reducción de los costos como son el RITA[®] y el biorreactor desechable para el cultivo de órganos que actualmente comercializa la firma OSMOTEK. En Cuba, a partir del desarrollo del primer sistema semi-automatizado de inmersión temporal (BIT) en 1997 desarrollado por un equipo de investigadores del Centro de Bioplantass, se han realizado investigaciones sobre la aplicación de esta técnica en la proliferación de sistemas de varias especies de interés agrícola, ornamental y forestal, tales como caña de azúcar, para la producción de microtubérculos de papa, la micropropagación de piña, entre otros. El "Smart BIT" es producto de la evolución de las anteriores generaciones de estos biorreactores. Existen algunas características de este nuevo sistema que lo convierten en la cuarta generación de biorreactores, entre las que se encuentran las más relevantes; controlado en línea, programado totalmente por software, monitoreo y control de todo el proceso, inteligencia distribuida, solución automática de errores y generación de alarmas, registro de variables en bases de datos, así como su flexibilidad, intercambiabilidad y escalabilidad. La principal novedad del sistema está en que la automatización ya deja de estar a nivel de campo (proceso) para llegar a nivel superior (interfaz usuario), su programación es independiente al autómata que se emplee y no necesita de conocimientos previos y contiene preprogramados diferentes frecuencias y tiempos de inmersión para cultivos ya estudiados, lo que lo convierte en un biorreactor totalmente automatizado.

Palabras claves: Biorreactor de Inmersión Temporal, BIT, automatización, BIT 4ta generación, micropropagación, cultivo in Vitro, monitoreo y control automático.

Almacén de bases de datos biológicas de imágenes.

MSc. Cosme E. Santiesteban Toca¹ Est. Yoanny González Rodríguez² Dr. Evelio Báez Pérez¹

¹ Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. vicente@bioplasmas.cu

² Facultad Informática. Universidad de Ciego de Ávila.

Resumen

Muchos de los problemas relacionados con la Biotecnología Vegetal pueden ser resueltos a través del empleo de técnicas de procesamiento digital de imágenes. La clasificación de células y embriones, la identificación de si un embrión germina o no, la determinación de la resistencia o susceptibilidad de una especie ante un patógeno, entre otros, son algunos de ellos. Para ello es necesario contar con una muestra de imágenes que permita realizar el entrenamiento y la comprobación de estas técnicas que reflejen todos los aspectos o aristas del problema y a su vez sean de calidad. Esta muestra debe ser lo suficientemente numerosa para poder ser empleada en las diferentes técnicas. Así mismo deben contener las descripciones necesarias que permitan el empleo posterior de clasificadores supervisados o no supervisados. Teniendo en cuenta la importancia de las bases de datos biológicas como herramienta para asistir a los científicos a entender y explicar el fenómeno biológico desde la estructura de las biomoléculas hasta su función y que este conocimiento es de gran ayuda en el descubrimiento de las relaciones básicas entre las especies en la historia de la vida, el objetivo de este trabajo es crear una base de datos de imágenes de embriones a partir de las imágenes tomadas en diversos experimentos para la realización posterior de trabajos de procesamientos digitales de imágenes. Como resultado se obtuvo un almacén de bases de datos biológicas de imágenes tomadas en el proceso de embriogénesis en el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos del Centro de Bioplasmas. En la actualidad, el acceso a esta base de datos es en línea, cuenta más de 1600 imágenes de embriones, agrupadas en diferentes bases de datos separadas, cada una de ellas con sus archivos metadatos y de descripción. El repositorio de acceso restringido a una membresía gratuita y permite la descarga de las bases de datos, archivos asociados, así como de las herramientas con que cuenta, incluyendo el software de creación de las bases de datos.

Palabras claves: embriogénesis, embriones, bases de datos biológica de imágenes, almacén de bases de datos biológicas.

Voting based editing for ALVOT.

Miguel Angel Medina-Pérez¹ Milton García-Borrotó² Yenny Villuendas-Rey¹ José Ruiz-Shulcloper³

¹University of Ciego de Ávila, Cuba

(migue;yennyv)@bioplasmas.cu, <http://www.unica.cu>

²Bioplasmas Center, UNICA, C. de Ávila, Cuba,
mil@bioplasmas.cu, <http://www.bioplasmas.cu>

³Advanced Technologies Applications Center, MINBAS, Cuba.
jshulcloper@cenatav.co.cu <http://www.cenatav.co.cu/>

Abstract. In Center of Bioplasmas the classification of cells, the distinction of germinated embryos from non-germinated ones, and the determination of the resistance or susceptibility of a species against pathogens, are daily tasks. These problems can be solved using the supervised classification. Supervised classifiers need good training matrix and the way to select those objects is a currently research area in Pattern Recognition. In this paper a new object selection method for ALVOT is proposed. This new algorithm is based on the voting power of the objects and was tested on several data bases of the University of California (UCI) where it accomplished desirable results.

Improving training samples for the most similar neighbor rule

Milton García-Borrotó, José Ruiz-Shulcloper

¹ Bioplants Center, UNICA, C. de Ávila, Cuba, mil@bioplantass.cu,
<http://www.bioplantass.cu>

² Advanced Technologies Applications Center, MINBAS, Cuba.
jshulcloper@cenatav.co.cu, <http://www.cenatav.co.cu/>

Abstract.

Many problems related to the Vegetal Biotechnology can be solved through the supervised classification. The classification of cell and embryos, the determination of the susceptibility or resistance of species or varieties against certain pathogens, among others, are examples of problems that can be solved by these tools. On the other hand, the bigger the training sample the lower the classifier. That is why in this paper we propose an object selection method for the nearest neighbor rule. This new method uses compact sets and was tested in several data bases of the University of California (UCI). The proposed method, CSE, is based on a new concept: the consistency respect to the subclasses, and showed favorable results in the tests, achieving important reductions in the training sample without affecting the quality of the classifier

Reducing Features and Objects Selection for the nearest neighbor classifiers

Yenny Villuendas-Rey, Milton García-Borrotó, Miguel A. Medina-Pérez, José Ruiz-Shulcloper

¹ University of Ciego de Ávila, Cuba {miguel;yennyv}@bioplantass.cu <http://www.unica.cu>

² Bioplants Center, UNICA, C. de Ávila, Cuba, mil@bioplantass.cu,
<http://www.bioplantass.cu>

³ Advanced Technologies Applications Center, MINBAS, Cuba.
jshulcloper@cenatav.co.cu, <http://www.cenatav.co.cu/>

Abstract.

The prediction of the germination of an embryo (if it will germinate or not), the determination of the resistance or susceptibility of a species or variety against a pathogen and the classification of somatic cells comprise part of the work of the researchers from the Bioplants Center. These and other similar tasks can be solved using the supervised classification. That is why, it is necessary to select what objects, (embryos, species) will made the training sample, and what features will describe those objects. For a correct process of classification, the elimination of "noisy" as well as redundant objects and irrelevant features is necessary. In this paper a new simultaneous feature and objects selection method is proposed. This allows improving the quality of classification with nearest neighbor classifier (NN). The proposed algorithm was tested with several international data bases of the University of California (UCI). The experimental results show that the proposed method improves the quality of classification most of the data bases.

Estandarización de procesos para la producción biotecnológica de bioplaguicidas con base a hongos entomopatógenos para escalar a nivel semiindustrial en venezuela.

Rosaima García Orietta Fernández, María C. Pérez, y Luís Gutiérrez

¹⁻⁴ Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas (INIA). Mérida, Venezuela. Aparado Postal 25. Teléfono 0251-2630090. rgcrespo@inia.gob.ve.

² Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal, (INISAV- Cuba).
oflarrea@inisav.cu

³ Ministerio de Ciencia y Tecnología-Cuba. (CITAM). mcristina@geprop.cu

Resumen

Con el objeto de producir masivamente Bioplaguicidas agrícolas en base a hongos entomopatógenos y escalar a nivel semiindustrial, se adelanta en Venezuela un proyecto a través del Convenio de Integración Bilateral Cuba-Venezuela; donde se han llevado a cabo investigaciones para estandarizar proceso en desarrollo biotecnológico de bioplaguicidas microbiales con base a hongos entomopatógenos de acuerdo a prioridades de manejo de plagas que afectan cultivos agrícolas del país. Los hongos estudiados fueron *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Metharizium anisopliae*. Los bioplaguicidas fueron incorporados en programas de manejo integrado de plagas y enfermedades de sistemas agrícolas de acuerdo a la plaga a controlar y se validaron los resultados sobre eficacia de los productos en localidades de diferentes estados. Se realizó trámite de propiedad intelectual de cada uno de ellos. Así mismo se desarrolló un proyecto de imagen corporativa. Se diseñó una planta para la producción biotecnológica de los bioplaguicidas, donde además se producirán otras formulaciones con base a hongos antagonistas y bacterias entomopatógenas bajo un sistema integral de gestión de la calidad y, se diseñó un programa de formación de personal y difusión de las tecnologías para garantizar su sustentabilidad y la adopción. Las formulaciones fueron obtenidas a partir de cepas aisladas de los hospederos seleccionadas y caracterizadas por taxonomía, morfología, fisiología y bioquímica según los casos. La cepa *Beauveria bassiana*, fue aislada de adultos de *Hypothenemus hampei*, *Paecilomyces* de adultos *Diospilium tabasi* y *Metharizium anisopliae* de adultos de *Aenolamia vari*. Los productos fueron obtenidos mediante fermentación sólida y formulados en polvo mojable, bajo las siguientes concentraciones: *Beauveria* 1,5X10¹⁰fc, *Paecilinia* y *Metarhinia* 2X10¹⁰fc contenidos en una dosis que asciende a un peso total de 15g suficiente para ser aplicado sobre una hectárea de cultivo, con una pureza de 100% actividad de esporas de 95%. La eficacia de los productos ha sido probada y validada en laboratorio y campo sobre cultivos de papa y otras solanáceas, crucíferas, plátano, caña de azúcar y palma entre otros sobre siembras ubicadas en diferentes pisos altitudinales, que oscilaron entre 5 a 3000 m.s.n.m., todas estas mostraron en laboratorio alta capacidad patogénica (100%) y virulencia contra los hospederos referidos y, en campo mostraron una reducción por regulación de las referidas plagas entre 25 y 50% logrando mantener la capacidad patogénica cuando se incorporan dentro de un programa de manejo integrado. El diseño de la planta de bioplaguicidas garantizará la producción inicial de unas 20.000 dosis de cu/ha/año para satisfacer 30.000 ha y en término de seis años se espera alcanzar 80% de la demanda actual de 90.000 ha para un total mínimo de 240.000 dosis. Se solicitó patente del proceso de producción, formulación y marca del producto obtenido manteniendo el nombre científico e imagen de calidad NIA. El proyecto de imagen corporativa y las actividades de difusión han permitido dar a conocer los bioproductos y actualmente están siendo demandados y distribuido a organizaciones gubernamentales (bajo cartas acuerdo), cooperativas, investigadores y productores locales que manifiesten interés en utilizarlo.

Palabras claves: Producción de entomopatógenos, Bioplaguicidas, *Metharizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Pecilomyces fumosoroseus*.

Desarrollo y uso de la cepa hc1 de nematodos entomopatógenos para el manejo de plagas en Cuba.

Mayra G. Rodríguez¹, Lourdes Sánchez R. Enriquez², Lucila Gómez³, E. González Dayamí Martín¹⁻², Margarita Vidar³, Belkis Peteira⁴, Moraima Suris⁵, María A. Martínez¹, J. Medel⁴, Dulce M. Sole⁴, Ileana Miranda⁴, J. Alemán¹, M. A. Hernández Oriela Pino¹, R. Muñoz², L. González², M. Bertolí⁶, Loima Rodríguez

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Provincia La Habana, Cuba. EMail:mrguez@censa.edu.cu ²Dirección Actual: Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. ³Centro Nacional de Referencia para el Control Biológico. Ministerio del Azúcar, Cuba. ⁴Delegación del Ministerio del Azúcar, Provincia Granma, Cuba. ⁵Productor Finca Referencia Nacional "La Asión", Municipio San José de las Lajas, La Habana, Cuba. ⁶Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas. Habana. Graduado de Ing. Agronómica, Universidad Agraria de La Habana.

Resumen

Los nematodos entomopatógenos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* constituyen eficientes agentes de control biológico de insectos. En Cuba se han estudiado y desarrollado cepas de *Heterorhabditis* spp., y *Steinernema cubana*. El presente trabajo recoge los aspectos relativos a la identificación y caracterización, reproducción *vivo* sobre larvas de *Galleria mellonella* y uso de *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HC1 en el Manejo Integrado de Plagas (MIP) en Cuba en los últimos 10 años. Los resultados de la caracterización de la bacteria, la señalan como *Heterorhabditis luminescens* organismo que continua en estudio para determinar la especie a la que pertenece. Se evidenciaron diferencias en el simbionte bacteriano en sus fases primaria y secundaria desde el punto de vista morfológico, proteínas totales, pigmentación y patogenicidad. Se desarrollaron metodologías para la reproducción *in vitro* (patente OCPI - 882/2006) *in vivo*, así como para la formulación en esponjas (CENDA 09613- 9613, 24-5-02) (éstas últimas introducidas en más del 90% de los CREEMIAZ). La cepa está siendo aplicada desde 1995 en Cuba y Bolivia (PROBIONE®) para el manejo de Chinches harinosas (Pseudoccidae), Tetuán del boniato (*Colletotrichum pommarum* var. *elegantulus*), Palomilla del maíz (*Spodoptera frugiperda*) y Gusano de los melones (*Dihaphania hyalinata*) entre otras plagas. Se ha demostrado la compatibilidad de esta cepa con *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecanii*. Se mostrarán resultados de las aplicaciones de esta cepa para el manejo de plagas en col de repollo, maíz y boniato en una finca en conversión en Provincia Habana, así como del trabajo de capacitación de productores, directivos y estudiantes de agronomía.

Nematodos Entomopatógenos En Venezuela. Situación Actual Y Perspectivas.

Ligia Carolina Rosalés Mayra Rodríguez Zoraida Suárez H. Roberto Enriquez y Liliana Puente. ¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, CENIAP, Laboratorio de Nematología, Maracay, Aragua, Venezuela. ²Centro Nacional de Sanidad (CENSA), San José de las Lajas, Cuba. email: crosales@inia.gob.ve

En Venezuela se hace uso indiscriminado de numerosos productos químicos en la agricultura para el control de plagas, con la consiguiente alteración del ambiente y de la propia salud de los trabajadores del campo y los consumidores de los productos. Este fenómeno, que también se produce en otras partes del mundo, está siendo mitigado con la capacitación de productores y la oferta de diversos productos biológicos. Los nematodos entomopatógenos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* constituyen eficientes agentes de control biológico de insectos de importancia agrícola y son utilizados con este propósito con probada eficacia en otros países. Desde el año 1996 se realizan en el INIA

esfuerzos de investigación en esta área resultados prometedores. De los muestreos realizados en el estado Aragua entre 1999-1997 se obtuvieron seis cepas, pertenecientes al género *Heterorhabditis*. Diversas pruebas de laboratorio confirmaron la eficacia de ellas en el control de Gorgojo Negro del Plátano (*Cosmopolites sordidus*). En el año 2000 se aisló del área del Sur de Lago, estado Zulia, una cepa de heterorhabditis que fue evaluada satisfactoriamente contra polilla de la papa (*Papaia solanivora*). Recientemente en el 2006 la estación INIA Táchira inició selección y aplicación de *Heterorhabditis* en broca del café (*Hypotenemus hampei*). Con la finalidad de consolidar las investigaciones en esta área, se inició el presente año, con la colaboración del CENSA de Cuba, un estudio completo en Venezuela que incluye la búsqueda de nematodos entomopatógenos nativos, de acuerdo a la tendencia en la explotación de estos agentes de control, con el uso de cepas propias de cada territorio. Esto contribuye a preservar la diversidad autóctona y a viabilizar el registro de los productos comerciales. Para tal fin, se efectuaron muestreos en los estados Mérida (32), Zulia (2), Guárico (1), Lara (12), Táchira (14), Aragua (41), Carabobo (24), Barinas (34) y Falcón (22) para un total de 183 muestras de ellas, 26 han resultado positivas a la presencia de *Heterorhabditis* para un 14,20% de recuperación. En pruebas preliminares han resultado eficaces en el control de la Polilla de la papa y broca del café, evidenciando el potencial de uso de estos controladores. Las poblaciones están siendo caracterizadas desde el punto de vista molecular, morfológico, morfofémico, biológico y patogénico acorde a los estándares internacionales establecidos para estos organismos. Además, se efectúan estudios sobre la bacteria simbiote, lo que permitirá en el establecimiento de la cría masiva a gran escala de las cepas de nematodos. Estas evaluaciones permitirán discriminar y seleccionar las cepas más promisorias para ser sometida a un estudio de factibilidad de su reproducción masiva en la Planta de Bioindustria del INIA (Turmero), lo cual contribuirá a diversificar aún más la gama de productos biológicos que dicha institución pondrá a disposición de los agricultores venezolanos en un plazo máximo de tres años.

Aportes Del Pnct Biotecnología Agrícola Al Desarrollo De Los Productos De *Bacillus Thuringiensis* En Cuba

Orietta Fernández Arrea, Bertha Carreras, Ma. Elena Márquez, Elina Massò, Yamilè Barò, Eduardo Laguardia
Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana, Cuba
Email: oflarrea@inisav.cu

Resumen

Desde los años 60 de la pasada década se comenzaron a utilizar en Cuba productos a partir de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Bt), para el control de plagas en cultivo de interés como el tabaco y las hortalizas. Estos productos se importaron de varios países, principalmente de la antigua Unión Soviética. A finales de esta misma década se comenzaron a realizar producciones artesanales mediante cultivos líquidos estáticos, empleando una cepa de Bt aislada en Cuba. Los resultados obtenidos con el uso de productos de Bt, indicaron la necesidad de desarrollar estas producciones y durante algunos años se trabajó en el perfeccionamiento de las tecnologías artesanales y en el aislamiento de algunas cepas. Sin embargo, fue a partir de 1986 con el comienzo del PNCT de Biotecnología Agrícola que se comenzaron a desarrollar investigaciones más integrales que han permitido, a través de seis proyectos de investigación-desarrollo, que Cuba cuente con cientos de cepas de Bt con posibilidades de controlar diversas plagas, y con tecnologías de producción a escala industrial que se desarrollan en cuatro Plantas de Fermentación ubicadas en diferentes provincias del país.

Productos de Bt para el control de lepidópteros, ácaros, coleópteros y más recientemente nematodos, son producidos en Cuba en forma de fluidos acuosos y formulaciones floables. Formulaciones en forma de polvo seco humedecible han sido desarrolladas, así como un patrón nacional de Bt utilizado de referencia para los controles de calidad de las producciones. Los productos *Bacillus thuringiensis* bajo la marca **Thurisav** representan más del 40 % de todos los productos biológicos que se emplean actualmente en la agricultura cubana.

Estandarización de un proceso para la producción biotecnológica del hongo antagonista *trichoderma harzianum* para escalar a nivel semiindustrial en Venezuela.

Rosaima García¹ Orietta Fernández² María C. Pérez³ y Luís Gutiérrez¹

¹⁻⁴ Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas (INIA). Mérida, Venezuela. Aparado Postal 25. Teléfono 0251-2630090. rgcrespo@inia.gob.ve.

² Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal, (INISAV- Cuba). oflarrea@inisav.cu

³ Ministerio de Ciencia y Tecnología-Cuba. (CITAM). mcristina@geprop.cu

Resumen

Con el objeto de producir masivamente el hongo antagonista *Trichoderma harzianum* a nivel semiindustrial, se desarrolla en Venezuela un proyecto a través del Convenio de Integración Bilateral Cuba-Venezuela. Previamente, se llevó a cabo una investigación donde se estandarizó el proceso para el desarrollo biotecnológico de un fungicida biológico a base del antagonista, con capacidad de control de varias enfermedades fungosas del suelo que afectan cultivos agrícolas de Venezuela. A través del proyecto, se incorporó el fungicida biológico en programas de manejo integrado de plagas y enfermedades, validando los resultados sobre eficacia del producto en localidades de diferentes estados del país. Se solicitó patente del proceso de producción, formulación y marca del producto obtenido. Se desarrolló un proyecto de imagen corporativa. Se diseñó una planta para la producción biotecnológica del mismo dentro de una planta donde se producirán otras formulaciones de hongos y bacterias entomopatógenas bajo un sistema integral de gestión de la calidad y se han diseñado programas de formación de personal y difusión de la tecnología para garantizar la adopción del mismo. La formulación fue obtenida a partir de una cepa aislada de un suelo de tradición ajera, proveniente del Municipio Rivas Dávila del estado Mérida, que está ubicado a 2.200 m.s.n.m con temperatura promedio de 18 °C. La cepa mostró en laboratorio y campo alta capacidad antagónica contra los hongos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* sp, *Plasmodiophora brassicae*, *Ustilago Albugo candida*, *Phytohthora* sp *Monilia* sp, y *Colletotrichum* sp, y logró reducciones de la incidencia de las enfermedades superiores a 25%, en dependencia de las mismas y de las condiciones ambientales. El producto se obtuvo mediante fermentación sólida y fue formulada en polvo mojable, bajo concentración de 2×10^8 UFC en una dosis de peso total de 150 g, para una proporción de 25% de este ingrediente activo y 75% de material inerte, suficiente para ser aplicado sobre una hectárea de cultivo, con una pureza de 100% y viabilidad de esporas de 95%. Esta cepa se ha probado con éxito en cultivos de papas solanáceas, ajo, crucíferas, leguminosas, plátano, parchita, café, tabaco entre otros; siembras ubicadas en diferentes pisos altitudinales (en dependencia de su capacidad), que oscilan entre 5 a 3000 msnm, con el mantenimiento de la capacidad antagónica. El diseño de la planta de bioplaguicidas garantiza la producción inicial de unas 30.000 dosis/ha para satisfacer 15.000 ha y en término de seis años se espera satisfacer el 80% de la demanda actual que alcanza 80.000 ha para un total mínimo de 160.000 dosis. La incorporación del producto fue realizado en

diez sistemas agrícolas de cuatro Estados. El proyecto de imagen corporativa y las actividades de difusión han permitido colocar a los productos con base al hongo *Trichoderma* en el segundo más utilizado en Venezuela. *Trichoderma*, está siendo distribuido a organizaciones gubernamentales (bajo cartas acuerdo), cooperativas, investigadores y productores particulares que manifiesten interés en utilizarlo.

Palabras claves: Fungicida biológico *Trichoderma harzianum*, Cepa.

Potencialidades de los nematodos entomopatógenos en el manejo de la broca del café)*. (Póster/Cartel)

Mayra G. Rodríguez¹, M. García², R. Enrique¹, Y. Borrero², Lucila Gómez¹, E. González¹, Yarila Rodríguez, Lourdes Sánchez

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Provincia La Habana, Cuba. EMail: mrguez@censa.edu.cu ²Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria para la Montaña (CNRFM), Provincia Granma, Cuba. EMail: cnrfm@enet.cu

La broca del café (*Hypothenemus hampei*) constituye la principal plaga del café en Cuba y su manejo se basa principalmente en un conjunto de prácticas culturales y biorreguladores. En Cuba, el uso de nematodos entomopatógenos ha cobrado auge en los últimos diez años para el manejo de plagas de suelo y de habitats protegidos, como sucede con la broca. Los resultados que se presentaron obtenidos en dos etapas de trabajo (una fase inicial en los 90s y otra bajo el proyecto que ejecutan conjuntamente CENSA y CNRFM). Se evaluó la efectividad de la cepa C1, aislada y caracterizada con el CENSA, sobre los diferentes estadios de la broca en condiciones de campo y aplicando sobre granos brocados, donde se evaluó la susceptibilidad de los diferentes estadios del insecto y la capacidad de penetración de los nematodos a los granos, tanto los nematodos solos como aplicados de forma conjunta con *B. bassiana*. De igual modo, se estableció un experimento en condiciones de campo para determinar la dosis adecuada aplicar y posteriormente se efectuaron aplicaciones en campos donde se había liberado *Phanoderis* en Buey Arriba, Granma. La tecnología de reproducción de nematodos *Soliera mellonella* fue transferida al CNRFM, con resultados satisfactorios, donde los recobrados de nematodos están en el orden de 187 000 – 190 000 JI/l, manteniéndose las cantidades de juveniles infestivos necesarios para los estudios. Se registró el 100 % de mortalidad de las larvas y pupas en el ensayo *in vitro* y también dentro de los granos de café tratados. Se observó una agregación de juveniles infestivos del nematodo sobre los huevos, los que parasitaron a las larvas en el momento de la emergencia. En condiciones simuladas de campo, se obtuvo mortalidad dentro de granos de café con un incremento progresivo en dependencia del momento de evaluación, registrándose una mortalidad media del 93% a los 17 días. Resultó significativa la diferencia entre tratamientos en el ensayo de nematodos y hongo, con un mayor porcentaje de mortalidad de los adultos *H. hampei* en los que fueron inoculados *B. bassiana* y los nematodos juntos. Se determinó que la dosis a aplicar en el riego de las plantas para tratar las cerezas que caen es de 200000 JI. La supervivencia del nematodo ha sido evaluada a través de la técnica de cebos 60 días después de la aplicación se han recobrado nematodos.

Resultados de tesis doctoral de la última etapa del Proyecto: Producción y utilización de nematodos entomopatógenos en el manejo de la Broca del Café (*Hypothenemus hampei*), financiado por MINAG, Cuba.

Efecto de diferentes cepas de *azotobacter* en el proceso de aclimatación de vitroplantas de piña (*ananas comosus* (L.) merr).(R. González, CB, CUBA).

Autores: Rayza González, José C. Lorenz, Mayda Arzolá, Julia Martínez, Bernardo Dibut².

1. Centro de Bioplasmas, UNICA, Ciego de Avila, Cuba. CP 69450
<mailto:rgonzalez@bioplasmas.cu>

2. Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales en Agricultura tropical.
"Alejandro de Humboldt", INIFAT. Cuba

Resumen

Se evaluó la efectividad de 7 cepas de *Azotobacter chroococcum* provenientes del banco de cepas del INIFAT en el desarrollo de vitroplantas de piña en la fase de adaptación. Todas las cepas, excepto MB5 tuvieron un comportamiento similar en la mayoría de los parámetros evaluados con respecto al control. La cepa MB5 difirió del resto de las cepas en cuanto a la longitud de la raíz y longitud de la planta. Existió un alto porcentaje de supervivencia en todos los tratamientos, excepto la cepa 588 que incrementó la mortalidad de las vitroplantas.

Summary

We evaluated the effects of seven strains of *Azotobacter chroococcum* from the INIFAT Azotobacter bank during ex vitro acclimatization of pineapple vitro-plantlets. Most of strains, excepting MB5, induced similar effects than those caused by the control treatment. Strain MB5 increased root length and plant length. There were high percentages of supervivence in all treatments excepting strain IB 588 that increased plant death.

Influencia del hongo micorrizógeno arbuscular *Glomus mosseae* aislado a partir de suelo canario sobre crecimiento y desarrollo de batata

González García, H. C.; Martín Navarro, C. M.; Montesdeoca Santana, S.; Quijada Fumero, L. J.; Ravelo Armas, M.; Rodríguez Rodríguez, A.E.; Valdés, F.
Departamento de Biología Vegetal. UDI. Fisiología Vegetal (GBVa).

Resumen:

Las micorrizas arbusculares aportan múltiples beneficios a las plantas, pero éstos dependerán de las especies de hongos y planta estén interaccionando. En el presente trabajo, se pretende probar si es viable la micorrización de batata (*Ipomoea batata* (L.) Lam.) mediante inoculación con *Glomus mosseae* (inóculo bruto aislado de suelo canario cedido por el ICIA), si existe un efecto positivo sobre la planta y si la microbiota de un suelo canario donde se cultiva batata, influye en la micorrización. Partimos de plantas micropropagadas de una variedad de batata saneada (variedad seis meses) en un banco de germoplasma, cultivada actualmente en las Islas Canarias. Las plantas tras obtener un tamaño adecuado fueron pasadas a condiciones de invernadero. Las macetas empleadas tenían un diámetro de 12cm; contenían una mezcla esterilizada de tierra y perlita. Los tratamientos realizados fueron: batata cultivada en tierra esterilizada con y sin inóculo, así como batata cultivada en tierra no esterilizada con y sin inóculo. En los tratamientos con inóculo se colocaron 5ml de inóculo micorrizante a 6cm de profundidad a modo de punto en el centro de las macetas. Las plántulas permanecieron dos meses en condiciones de invernadero. Se llevó a cabo un seguimiento de la longitud y del número de hojas a lo largo del experimento. Al final se evaluó la longitud de la parte aérea y raíz, peso fresco de la parte aérea y raíz,

número de hojas, supervivencia y porcentaje de micorrización. Nuestros resultados premilitares nos muestran que tierra no estéril aumentó significativamente la longitud ($F=5,155$, $p<0,05$) y el peso de la parte aérea ($F=10,553$, $p<0,05$), así como el peso de la raíz ($F=9,004$, $p<0,05$) y el número de hojas ($F=9,878$, $p<0,05$). Se obtuvo micorrización tanto en tierra estéril como en tierra no estéril, que fue menor en tierra estéril porque no existía la microbiota edáfica. Se ha probado que la inoculación de batata con *Glomus mosseae* influye positivamente sobre las primeras fases de su crecimiento y desarrollo. Nuestros resultados sugieren que la micorrización podría ser útil en el cultivo de batata ya que aumenta el crecimiento y resistencia a patógenos.

Palabras Clave: Micorrizas arbusculares, *Glomus mosseae*, batata, *Ipomoea batata*, Canarias.

Sesión 2: Miércoles 9 de mayo.

- Conferencias Magistrales.

Plant-pathogen interactions: the role of phytotoxins and phytoprotectors in the infectious process.
Luis M. Peña Rodríguez

Reactive oxygen species and basal resistance in plants.
Paul Bolwell.

Desarrollo, análisis y aplicaciones de SNPs en Vid (Vitis vinifera L.).
Diego Lijavetzky.

- Taller 1: *Metabólica*.

Analysis of resources allocation in response to CO₂ and ammonium nitrate in Arabidopsis leaves.
Yanelis Capedesuñer.

Antraquinonas en plantas ex vitro e in vitro de plantas del género Morinda.....
R. Trujillo.

Estimulación de la producción de glicósidos cardiotónicos en brotes de Digitalis purpurea L mediante elicitors bióticos y abióticos.....
Elio Jiménez.

Changes of phenylpropanoids in Arabidopsis leaves induced by carbon dioxide and ammonium nitrate.
Y. capdesuñer.

Phenolics compounds in MORINDA ROYOC L. plants.
M. Rivas.

Anthraquinones from in vitro root culture of Morinda royoc L.....
J. Borroto.

Obtención de antraquinonas a partir de callos y cultivo de células en medio líquido de Morinda citrifolia L.
M. Teleford.

Efecto de la elicitación sobre el contenido de digoxina y digitoxina en el cultivo de brotes de Digitalis lanata en sistemas de inmersión temporal.
N. Pérez

- Taller 2: *Ciencia de las Plantas*.

Dna ribosomal phylogeny among isolates of colletotrichum spp, agent causal of apple 'gala' leaf spot
Amauri Bogo.

Salt adaptation of broccoli roots to salinity: Phi thickening and aquaporin proteins.....
Micaela Carvajal Alcaraz.

Photosynthesis and carbon metabolism in plantlets growing in vitro and during ex vitro acclimatization.....
Justo L. González,

- Fructan production in transgenic plants.**
Lázaro Hernández.
- Papel de la Glutathion S-transferasa en la resistencia a enfermedades y factores abióticos.**
Ingrid Hernández.
- Inductores de la nodulación ante el estrés hídrico por defecto en soja.**
Ma. C. Nápoles.
- Especies vegetales endémicas metalotolerantes para uso en fitorremediación.**
Claudia Ortiz.
- Evaluación del efecto de la temperatura.**
Ruth Gabriela Ulloa.
- Detección y tipificación de razas de CTV en la colección de aislados del virus en el CENIAP vía IC/RT-PCR asimétrica.**
Ezequiel Rangel.
- El género xanthosoma Spp. en Nicaragua y su relación con el virus de smv.**
Guillermo Reyes.
- In vivo inhibitory activity on photosynthesis of the pungent principle of capsicum fruits, capsaicinoids.**
K.A. Loulakaskis.
- Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la pérdida de peso y longitud del grelo en microtubérculos de papa (Solanum Tuberosum L.) Cv. Granola.**
J. Salas.
- Evaluación de la Mutagenicidad del Bajo Curso del Arroyo Pelotas, en la ciudad de Pelotas, RS/Brasil.**
T. O. C. Santos.
- Evaluación de la actividad mutagénica y antimutagénica del aloe vera contra el paracetamol, en test de allium cepa y teste de micronúcleo en linfocitos binucleados humanos.**
G.R. Oliveira.
- Evaluación de la mutagenicidad de la marcela (achyrocline satureioides) através del teste de allium cepa l.**
F. Almeida.
- Desempeño fisiológico y mutagenicidad de células de soja transgénica e convencional sometidas al herbicida glifosato.....**
M. G. Martino.
- Determinación del nivel de mutagenicidad y antimutagenicidad de Ginkgo biloba in vivo a través del test de Allium cepa.**
A. E. Nunes.
- Evaluación de biosólidos procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en plantas jóvenes de trigo en condiciones de invernadero.**
M. A. Gutiérrez.
- Carbon metabolism in leaves of micropropagated sugarcane during**

- acclimatization phase.**
R. Rodríguez.
- Efectos del ácido jasmónico en la interacción plátano-Fusarium oxysporum f, sp cubense, raza 2 en condiciones de aclimatización....**
A. Moreno.
- Positive effects of temporary immersion on gases rate-exchange (photosynthesis-respiration) of plants submitted to micropropagation.**
C. Aragón.
- Nuevo método para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia al Mal de Panamá en el cultivo del banano.**
L. Díaz.
- Desarrollo de una metodología de inoculación y evaluación de plantas de papaya variedad Maradol Roja, inoculadas con el Virus de la Mancha Anular de la Papaya, en condiciones semicontroladas..**
M. Cruz.
- Regulación hormonal de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión y represión transcripcional del gen ADH 2 por herida.**
M. Díaz.
- Efectos de las condiciones de cultivo in vitro sobre la calidad de las plántulas de caña de azúcar (saccharum sp. Híbrido) propagadas en biorreactores de inmersión temporal y durante la fase de aclimatización.**
L. Peñate.
- Efecto del Ethrel 480 (ácido 2 cloroethyl fosfónico) en el metabolismo poliamina etileno durante el proceso de inducción floral de la piña (Ananas comosus (L.) Merr) cv. Cayena lisa bajo condiciones inductivas no favorables.**
M. Avila.
- Efecto del tipo de luz sobre la calidad de los brotes de piña (Ananas Comosus L Mer) híbrido MD2 en el cultivo in Vitro.**
M.T. González.
- High accumulation of levan in transgenic tobacco alters leaves phenotype, flowering and seed viability.**
A. Banguela.
- Efecto de una mezcla de oligosacáridos pécticos en la inducción de resistencia en plántulas de tabaco contra Phytophthora nicotianae...**
D. Costales.
- Obtención de nuevas variedades de arroz a partir de la mutagénesis in Vitro.**
M., C. González.
- Transient expression in rice embryos by sonication-assisted transformation with Agrobacterium tumefaciens.**
M. Rodríguez.
- La Ingeniería Verde y las plantas transgénicas: ¿existe algún vínculo entre estas ramas de las ciencias?.**

D. Geadá.

Efecto del sobrehumedecimiento del suelo en la profundidad radical y la actividad H⁺-ATPasa en caña de azúcar (*Saccharum spp. Hífb*), variedad C86-456.
S. Rodríguez.

Obtención de análogos androestéridos en variedades de tabaco negro.....
E. Mena.

“San Luis 21” Nueva variedad de tabaco Virginia resistente a las principales enfermedades, de alto rendimiento y buena calidad.....
M. Díaz.

Nuevas líneas de tabaco negro para la producción de capas, resistentes a las principales enfermedades.
V. García.

Use of green fluorescent protein for studying the *Mycosphaerella fijiensis*-banana interaction.
O. Portal.

Reacción frente al carbón (*Sporisorium scitamineum* (Syd) M. Piepenbr., M. Stoll & Oberw.) y la roya (*Puccinia melanocephala* H and P Sydow) de un grupo de 10 nuevas variedades de caña de azúcar (*Sacharum officinarum* L) estudiadas en la EPICA de Camagüey.
J. Montalbán.

Indicadores de desarrollo y su influencia en el rendimiento industrial de tres variedades de caña de azúcar.
I. Torres.

Evaluación temprana de la respuesta de genotipos de *Musa* mediante la inoculación artificial de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.
M. Leyva.

Algunos avances en el comportamiento de vitroplantas de *Teca Tectona grandis* L. F) en condiciones de campo.
L. E. Ramos.

Actividad antifúngica de metabolitos bacterianos frente a *Mycosphaerella fijiensis*.
M. Cruz.

Characterization of a NAC transcription factor expressed during a non compatible interaction *P. melanocephala*-sugarcane.
M: I: Oloriz.

Actividad fitotóxica y proteínas microbianas en filtrados de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1 y raza 2.....
N. Portal

- **Taller 3: Bioproductos.**

Avances de investigación en biofertilizantes bacterianos en Venezuela.

Marisol López.

Influencia de características físico-químicas de derivados de quitosana en la inducción de respuestas defensivas en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y su protección contra *Phytophthora nicotianae*.
Alejandro Falcón.

Control Biológico de *Botrytis cinerea* usando el hipovirus heterólogo CHV1-EP713.
Oscar Jeldres.

Separación y colecta de esporas de *Trichoderma harzianum* cepa A-34 obtenidas sobre substrato sólido mediante dos métodos: lecho fluidizado y ciclón dual y por tamizaje vibratorio.
Orestes Elósegui.

Estandarización de procesos biotecnológicos para la producción sólida de *Bacillus thuringiensis* en Venezuela.
María Alejandra Durán.

Identificación de 6 poblaciones de *Heterorhabditis* sp mediante el uso de marcadores moleculares RAPD.
Erick Marín.

Evaluación de fuentes nutricionales en el proceso de fermentación líquida de *Bacillus thuringiensis* en Venezuela.
M. A. Durán.

Desarrollo de un producto de *Bacillus thuringiensis* con efecto nematocida.
M.E.Márquez.

Selection of *Bacillus* strains and other related genera for biological control of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem canker caused by *Rhizoctonia solani* Kühn.
Y. Reinoso.

Efecto de una mezcla de oligosacáridos pécticos en la inducción de resistencia en plántulas de tabaco contra *Phytophthora nicotianae*...
D. Costales.

Empleo del aceite esencial de *Citronella* (*Cymbopogon nardus*) como alternativa para el control de microorganismos.
C. Sánchez

Plant-pathogen interactions: the role of phytotoxins and phytoprotectors in the infectious process

Luis Manuel Peña Rodríguez

Grupo de Química, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán

Abstract

The interaction between plants and pathogenic microorganisms, although complex, can be very specific. When a fungal spore comes in contact with a plant surface, the microclimate (temperature, humidity, light intensity, etc.) must be right before it can germinate and can begin to break down the initial defensive barrier of the plant; however, before the pathogen reaches its first plant cell it encounters physical and chemical barriers, such as the presence of epicuticular waxes and of chemical components released to inhibit germination of its spores. If these strategies are not enough to stop or limit the attack of the pathogen, the plant attempts to block the invasion by generating reactive oxygen species (ROS) that act as warning signals and catalyze a number of reactions as part of the plant defense mechanisms, including reinforcement of the cell wall, hypersensitive response (HR or programmed cell death), development of systemic acquired resistance (SAR), and the production of phytoprotectors. Similarly, phytopathogenic fungi can produce an array of secondary metabolites to break down the natural barriers of the plant and facilitate colonization; these metabolites, commonly known as phytotoxins, have been classified into host-specific (HST's) and non-host-specific (non-HST's) depending on their role in the infectious process. To date there are more than 20 HST's known and more than 200 non-HST's have been also identified. While certain phytoprotectors, mainly phytoalexins, are of particular interests for their potential applications as antifungal agents to control diseases in economically important crops; phytotoxins are of interest due to their potential application as tools for the *in vitro* development of disease-resistant plant lines. However, studies of the plant-pathogen interactions have shown that the colonization strategies used by some pathogens include the enzymatic degradation of phytoalexins and the production of molecules that suppress the induction of defense mechanisms in the plant. Similarly, it has been reported that certain plants can resist the attack of given pathogen by enzymatic biotransformation of phytotoxins. A number of examples will be mentioned in this presentation.

Reactive oxygen species and basal resistance in plants

Paul Bolwell, School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, UK

Abstract

Production of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide in response to pathogen attack is an integral component of plant disease resistance. A major site of ROS generation during such an oxidative burst is the cell wall at the interface of the pathogen-plant cell interaction. Biochemical studies of model systems using elicited cell cultures of French bean and Arabidopsis supports a common component system involving peroxidases, ion fluxes and delivery of substrate. Comparative genetic studies using knock outs of either peroxidase or the alternative superoxide generator NADPH oxidase favours peroxidase involvement in basal resistance in Arabidopsis. Down regulation of two particular cell wall peroxidases compromises resistance to a range of pathogens while knock outs of NADPH oxidase, although showing reduced ROS production exhibit no increases in susceptibility to pathogens. Recent work on dissecting the oxidative burst will be presented.

Bindschedler LV, Dewdney J, Blee KA, Stone JM, Asai T, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish C, Davies DR, Ausubel FM, Bolwell GP. 2006. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *Plant J.* 47, 851-863. Davies DR, Bindschedler LV, Strickland TS, Bolwell GP. 2006. Production of reactive oxygen species in Arabidopsis thaliana cell suspension cultures in response to an elicitor from Fusarium oxysporum: implications for basal resistance. *J. Exptl Bot.* 57, 1817-1827

Antraquinonas en plantas *ex vitro* e *in vitro* del genero morinda (*Morinda royoc* L. y *Morinda citrifolia* L.)

Laboratorio de Ingeniería Metálica, Centro de Bioplantas,
UNICA. rtrujillo@bioplantas.cu

Resumen

Las antraquinonas son un importante grupo de productos naturales que se han aislado a partir de bacterias, hongos, líquenes y plantas superiores. Estos compuestos presentan diversas actividades biológicas: antimicrobiana, antifúngica, antimalarial, antitumoral y antimutagénica. El objetivo principal del grupo de productos naturales del Centro de Bioplantas es la obtención de metabolitos secundarios a partir de las técnicas de cultivo *in vitro* de las plantas *Morinda royoc* L y *Morinda citrifolia* L. Se trabajó con plantas de campo y raíces *in vitro* de *Morinda royoc* L. para la producción de antraquinonas. Se evaluó el contenido de antraquinonas en extractos de diferentes órganos de la planta. Se demostró que el metabolito mayoritario (de los evaluados) son las antraquinonas y el órgano en el que se acumula en mayores cantidades son las raíces de plantas adultas. Se establecieron las condiciones de cultivo *in vitro* de raíces para incrementar la producción del metabolito. De los estudios realizados se encontró que el contenido de antraquinonas/g de masa fresca intra y extracelular se favoreció en presencia de 5.0M de ácido indolacético y tres subcultivos. Se aislaron y identificaron las antraquinonas presentes en las raíces *in vitro* e *in vitro* de esta planta. Se identificaron tres antraquinonas nuevas: Rubiadina, Lucidina -1- metiléter y Lucidina -1,3- dimetiléter. Además se aislaron e identificaron el Nordamnacantal, Damnacantal, Morindona, Rubiadina -1 - metiléter, Soranjidiol y Lucidina. Se identificó el nordamnacantal como antraquinona mayoritaria en los extractos. Para la planta *Morinda Citrifolia* se determinó el efecto de la kinetina en la producción de antraquinonas durante la formación de callos y suspensiones celulares a partir de explantes de hojas de vitroplantas. El uso de diferentes concentraciones de kinetina no favoreció el incremento de la masa fresca de los callos y se obtuvieron valores similares de los contenidos de antraquinonas intra y extracelulares/g de masa fresca. En las suspensiones celulares la masa fresca se favoreció con el incremento de la concentración de kinetina. Los mayores valores (5.9 y 7.0 g de masa fresca) se obtuvieron con 1.2 y 1.6 mg/L de kinetina, respectivamente. La comparación con patrones comerciales y con metabolitos similares, obtenidos a partir de otras especies, permitió identificar tres antraquinonas (Rubiadina, Morindona y Damnacantal) que se forman por primera vez a partir de callos de *Morinda citrifolia* L.

Abstract

Anthraquinones (AQs) are an important group of secondary metabolism compounds found in bacteria, fungi, lichens and higher plants. They are produced in different plant families, such as: the Rubiaceae, Rhamnaceae, Polygonaceae and Leguminosaceae. AQs from Rubiaceae family members show different biological activities such as antibacterial, antifungal, antituberculosis, antimalarial and antioxidant. Moreover, it was recently informed by the Institute of Cancer Research (Surrey, UK) that AQs are able to affect the growth of

cancerous cells by inhibiting of some functions of Telomerasa enzyme. The primary target of the natural product group of the Bioplant Centre is the production of secondary metabolites from *Morinda royoc* L and *Morinda citrifolia* in vitro cultures. AQs are the main interest. We work with wild plants and in vitro cultured roots. The contents of AQs from different plant organs were evaluated. The adult plant root is the best source of AQs. Different conditions of in vitro culture were established to increase the production of secondary metabolites. In our studies, the content of anthraquinones/g of fresh mass (intra and extracellular) was favoured in the presence of 5,7 µM indolacetic acid and three subcultures. Isolation, purification and chemical structure elucidation of anthraquinones from in vitro and ex vitro roots of *Morinda royoc* L were made. Four new AQs were found: 1) Rubiadina, 2) Lucidina -1 - metiléter or Lucidina -1,3 - dimetiléter, 3) alizarina and 4) rubiadina. On the other hand, six known anthraquinones were also found: 1) nordamnacanthal, 2) damnacanthal, morindone, 4) rubiadin -1 or 3- methylether, 5) lucidina, and 6) soranjilol. Nordamnacantal was identified as the most important anthraquinones. In *Morinda citrifolia*, it was determined the effect of kinetin in the production of anthraquinones during the formation of calluses and suspensions from leaf explants. The use of different concentrations of kinetin did not increase the fresh mass of calluses and the contents of anthraquinones in cell suspensions, the fresh mass was favoured with the increase of the kinetin concentration. The highest values (5,9 and 7,0 g of fresh mass) were obtained with 1,2 and 1,6 mg/L of kinetin, respectively. The comparison with commercial patterns and similar metabolites, obtained from other species, allowed to identify three anthraquinones (Rubiadina, Morinda and Damnacantal) that constitute the first report of their occurrence from calluses of *Morinda citrifolia* L.

Changes of differential expression of genes, carbohydrates content, sucrose phosphate synthase and soluble acid invertase activities in *Saccharum sp.* var. CP52-43 induced by Ethrel-480.

*Janet Quiñones¹, Yanelis Capdesuñer¹, Janetys Borroto¹, Orlando Borrás², María A. Blanco¹, Yanet Tamba², Maribel Rivas¹, Hipólito Peraltá¹, Mayra Rodríguez¹, Eduardo Canales¹, Maylin Rodríguez¹, Liudmila Chave², Justo González³

¹Bioplant Center, Carretera a Morón Km 9 CP 69450. University of Ciego de Ávila, Ciego de Ávila. Cuba. Teléf: (53-33) 224016/225768. Fax: (53-33)266340.

e-mail: jquinones@bioplantas.cu

²Genetic Engineering and Biotechnology Center, La Habana, Cuba

³University of Ciego de Ávila, Cuba

ABSTRACT

The search of improved varieties of sugar cane with high sugar content is a objective prioritized in Cuba. A form to contribute to obtain this is manipulating genes related to the maturation processes. In the present work we evaluated the chemical effects, biochemical and molecular of the application of the Ethrel-480 in sugar cane var. CP52-43. Experiments under controlled conditions in areas of the Bioplant Center were developed. The Ethrel-480 at the rate of 1 g of i.a. was used to evaluate chemical (polysaccharides, glucose, fructose, sucrose) and biochemical changes (sucrose phosphate sintase (SPS) and soluble acid invertase (SAI)). In order to evaluate the differential expression of genes by means of AFLP-cDNA it was applied to Ethrel-480 at the same concentration. The Ethrel-480 stimulated metabolic changes in plants treated with respect to the plants nontreated: an increase of sucrose with decrease of the fructose one in leaves to the 7 days after the application: an increase of the activity of the SFS, and the contents of polysaccharides and sucrose, and a reduction of the activity of the IA and the contents of glucose, fructose and proteins to the 14 days in stems indicating that the metabolism of carbon was stimulated.

In AFLP-cDNA, 18 differential bands associated with expression of genes up-regulated and down-regulated were obtained.

Keywords: AFLP-cDNA, Ethylene, Ethrel, Sucrose, Sugarcane.

Changes of phenylpropanoids in Arabidopsis leaves induced by carbon dioxide and ammonium nitrate.

Yanelis Capdesuñer¹, Andrea Matroś², Silke Peterer², Miriam Eisbrenner², Martha Hernández¹, Hans Peter Mock²

¹Lab. de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplasmas, Carr. A Morón km 9 CP 69450 Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), Ciego de Ávila, Cuba. E-mail: ycapdesuner@bioplasmas.cu.

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

Abstract:

The effect of elevated CO₂ concentrations and nitrogen supply on the levels of phenylpropanoids was investigated in leaves of Arabidopsis plants grown in MS-medium. Arabidopsis thaliana has become an important model species for the study of biological aspects. The phenylpropanoids are known to be implicated in important physiological functions in plants. The resources allocation in response to nutrients conditions were analyzed in plants grown in different concentrations of ammonium nitrate (0.25, 5, 20 mM) in MS-medium under two conditions of CO₂ (350 and 1000 ppm). High CO₂ and low concentration of nitrogen (0.25 mM) resulted in a dramatic increase of phenylpropanoids accompanied by morphological changes. Six peaks were altered under the two conditions of CO₂ and five peaks under the three conditions of ammonium nitrate. Four of these peaks were classified as flavonol, anthocyanine and sinapic acid. We can conclude that elevated CO₂ leads to a shift in secondary metabolite synthesis that is dependent on the availability of nitrogen.

Key words: ammonium nitrate, carbon dioxide, phenylpropanoid.

Determinación de compuestos fenólicos en plantas de Morinda royoc L.

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

¹Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro de Bioplasmas. UNICA. Carretera a Morón Km. 9. CP 69450. Ciego de Ávila. Cuba e-mail mrivas@bioplasmas.cu

Resumen

Las plantas son una fuente de extraordinario valor para el aislamiento de metabolitos secundarios, La especie humana depende de estos compuestos para desarrollar medicina saborizantes y alimentos, etc. Los componentes químicos de Morinda royoc L han sido muy poco estudiados y su actividad biológica no se ha fundamentado hasta la fecha. Es por ello que los objetivos de esta investigación se encaminaron al análisis fitoquímico de esta especie. Se realizó un estudio fitoquímico de algunos de los componentes de Morinda royoc L. Se determinaron los contenidos de compuestos fenólicos (expresados como equivalentes de ácido clorogénico) y el contenido de antraquinonas en extractos de diferentes órganos de la planta y se hicieron los análisis de regresión entre estos contenidos y la actividad antioxidante, mediante ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (ATB). Los resultados obtenidos mostraron que el contenido de compuestos fenólicos fue mayor en las hojas con diferencias significativas con el resto de los órganos analizados. Las antraquinonas se encuentran en mayor contenido en las raíces difiriendo

significativamente con el resto de los órganos, le siguió en orden decreciente los tallos y no hubo diferencias entre las ramas y las hojas. Los coeficientes de correlación de los compuestos fenólicos (carácter antioxidante) resultaron entre (0.60-0.74) para el malondialdehído (MDA). Y otros aldehídos (OAD) se ajustaron perfectamente al modelo de regresión cuadrática con coeficientes de correlación (r^2) entre 0.80-0.98.. Todos estos estudios se informan por primera vez para esta especie.

Abstract

Plants are extraordinary sources of secondary metabolites. The human being depends on such metabolites to produce drugs, flavors and food. *Morinda royoc* L. chemical composition has been poorly explored to date, and consequently its biological activity is not totally understood. This is the reason why this research was focused on the chemical analysis of this plant specie. Contents of phenolics and anthraquinones were measured in different plant organs. Regression analyses between levels of phenolics and antioxidant activity were performed. Regressions were also carried out to determine the relationship between anthraquinone levels and antioxidant activity. The thiobarbituric acid assay was done. The highest phenolic levels were measured in leaves. On the contrary, the highest anthraquinone contents were recorded in roots. The correlation coefficients of phenolic compounds (antioxidant character) were between 0.60 and 0.74 for malondialdehyde. The other aldehydes perfectly correlated to quadratic model with correlation coefficients between 0.80 and 0.98. To our knowledge, this kind of studies has not been reported to date.

Anthraquinones from *in vitro* root culture of *Morinda royoc* L.

Janetsy Borroto*, Josep Coñ, Maribel Rivas, Maria Blancó, Oscar Concepción Yudelsy Tandrón, Martha Hernández Reinaldo Trujillo.

¹Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplasmas, Ciego de Ávila, Cuba and ²Departamento de Química Orgánica Biológica, Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona, "Josep Pascual Vila", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain. *e-mail: jborroto@bioplasmas.cu

Abstract

Medicinal plants are the most exclusive source of life saving drugs for the majority of the world population. Bioactive compounds, currently extracted from plants, are used as food additives, pigments, dyes, insecticides, cosmetics, perfumes and fine chemicals. These compounds belong to a group collectively known as secondary metabolites. Anthraquinones (AQs) are an important group of natural products occurring in bacteria, fungi, lichens and higher plants. AQs have been reported to exhibit some interesting biological activities: antimicrobial, antifungal, antimalarial, antitumour and antimutagenic. In higher plants, they are found in a large number of plant families. Plants belonging to the family *Rubiaceae* are known to contain substantial amounts of anthraquinones, especially in the roots. *Morinda royoc* L. (*Rubiaceae*) known in Cuba as Garañón, is used to make a product with stimulating, revitalizing and antidepressant activity that also increases the libido. This product is produced from roots and used in Cuba as a diet supplement. However, field growth of such a plant is very limited because of seed germination is sporadic and the growth of the plants is slow. Therefore, the development of alternative methods to produce anthraquinones *in vitro* is essential. *Morinda royoc* L. (*Rubiaceae*) root cultures were established for the production of anthraquinones. Three independent experiments were performed to evaluate the effect of different levels of indolacetic acid (0-22.8 μ M), culture

duration (0-75 days) and subculture number (0-4). The following indicators were recorded: fresh root mass per Erlenmeyer and intracellular and extracellular anthraquinone production. The production of anthraquinone was not favored with the increase of fresh root mass. The highest intracellular and extracellular anthraquinone contents were produced with 5.7 μ M IAA, and three subcultures. Using these conditions, seven anthraquinones were isolated and identified. One of them, namely rubiadin constitutes the first report of their occurrence from *Morinda royoc* L. and six known anthraquinones: nordamnacanthal, damnacanthal, morindone, rojidiol, lucidin and rubiadin -1- methylether. Nordamnacanthal was identified as a new anthraquinone in the extract.

Obtención de antraquinonas a partir de callos y cultivo de células en medio líquido de *Morinda citrifolia* L.
Monifah Telesford; Oscar Concepción; Martha Hernández; Reinaldo Trujillo
Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila. Cuba.

Resumen

Morinda citrifolia L., como el resto de las plantas de la familia Rubiaceae, constituye una fuente importante para el aislamiento de metabolitos secundarios entre los que se destacan las antraquinonas. El uso de las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas constituye una alternativa novedosa para la producción de estas biomoléculas con probada actividad biológica en la industria y la medicina. El presente trabajo se realizó con el objetivo de obtener antraquinonas a partir de callos y suspensiones celulares de *Morinda citrifolia* L. Las plantas del mejor tratamiento de germinación de semillas *ex vitro*, se usaron para la implantación de ápices caulinares. Los callos formados se utilizaron para establecer las suspensiones celulares. Se determinó el efecto de la kinetina en la producción de antraquinonas durante la formación de callos (0, 1.5, 3, 4.5 y 6 mg/L) y suspensiones celulares (0, 0.4, 0.8, 1.2, y 1.6 mg/L) a partir de explantes de hojas de vitroplántulas de *Morinda citrifolia* L. El uso de diferentes concentraciones de kinetina no favoreció el incremento de la masa fresca de los callos y se obtuvieron valores similares de los contenidos de antraquinonas intracelulares/g de masa fresca. En las suspensiones celulares de *Morinda citrifolia* la masa fresca se favoreció con el aumento de la concentración de kinetinas mayores valores (5.9 y 7.0 g de masa fresca) se obtuvieron con 1.2 y 1.6 mg/L de kinetina, respectivamente. Además la citoquinina influye manifiestamente positiva en el incremento del contenido de antraquinonas intracelulares y extracelulares/g de masa fresca, los mejores resultados se obtuvieron al utilizar 1.0 mg/L de kinetina. El número de subcultivos influyó en la excreción de los metabolitos al medio, cuyo valor máximo (18 μ mol/g de masa fresca) se obtuvo con en el ségundo subcultivo. La comparación con patrones comerciales y con metabolitos similares, obtenidos a partir de otras especies, permitió identificar tres antraquinonas (Rubiadina, Morindona y Damnacantal) que se informan por primera vez a partir de callos de *Morinda citrifolia*. Además se detectaron cinco compuestos no identificados que deben analizarse por otros métodos de purificación para establecer sus estructuras e identificación.

Abstract

Morinda citrifolia L., as the rest of the plants of the Rubiaceae family, constitutes an important source for the isolation of secondary metabolites and anthraquinones are among them. The use of the techniques of culture *in vitro* of plants constitutes a novel alternative for the production of these biomolecules with proven biological activity in the industry and the medicine. The present work was made with the objective to obtain anthraquinones from calluses and cellular suspensions of *Morinda citrifolia* L. The plants of the best treatment of germination of seeds *ex vitro*, were used for the implantation of buds of young trees. The formed calluses were used to establish cellular suspensions. The effect of kinetin on

anthraquinones production was evaluate during the formation of calluses (0, 1,5, 3, 4,5 and 6 mg/L) and suspensions (0, 0,4, 0,8, 1,2, and 1,6 mg/L) from leaf explants. The use of different concentrations of kinetin did not increase the fresh mass of calluses and the contents of anthraquinones. The fresh mass was increased by high kinetin concentration in the cellular suspensions. The greater values (5,9 and 7,0 g of fresh mass) were obtained with 1,2 and 1,6 mg/L kinetin, respectively. The content of anthraquinones increased when high cytokinin concentrations were used, as much intracellular as extracellular/g of fresh mass. The best result was obtained when using 0.4mg/L kinetin. The maximum value in the metabolite excretion (18 $\mu\text{mol/g}$ of the mass) was reached with in the second subculture. The comparison with commercial patterns and similar metabolites, obtained from other species, allowed to identify three antraquinones (Rubiadina, Morindona and Damnacantal) that constitute the first report of their occurrence from calluses of *Morinda citrifolia* L. Five compounds were not identified, and therefore other analytical methods are required.

Efecto de la elicitación sobre el contenido de digoxina y digitoxina en el cultivo de brotes de *Digitalis lanata* en sistemas de inmersión temporal.

Naivy Pérez, Elio Jiménez, Alina Capoté, Dirk Wilken^b, André Gert, Annett Jäh, Horst-Michael Nitzsch, Gerhard Kerr

^aInstituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Villas. Carretera a Camajuaní Km5,5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

^bBioPlanta GmbH. Deutscher Platz 5. 04103 Leipzig, Alemania.

^cInstituto de Química No Clásica. Universidad de Leipzig. Perlosestraße 5, Leipzig, Alemania.

^dInstituto de Biotecnología Aplicada. Universidad de Leipzig. Perlosestraße 5, Leipzig, Alemania.

Email: naivy@ibp.co.cu

Resumen

Los compuestos activos obtenidos de plantas son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y cada día es mayor el número de plantas y metabolitos de interés, los cardenólidos de *Digitalis lanata* son un ejemplo de ellos. La calidad y cantidad de compuestos obtenidos a partir de plantas colectadas en ambientes naturales son muy variables y están influenciados por condiciones ambientales. El cultivo de plantas puede ayudar a solucionar estos problemas. Sin embargo los rendimientos de los cardenólidos obtenidos mediante el cultivo *in vitro* son muy bajos y se hace necesario contar con estrategias de producción que favorezcan su obtención. El presente trabajo se realizó con el objetivo de estudiar el efecto de elicitors bióticos y abióticos durante la multiplicación *in vitro* de brotes de *D. lanata* en sistemas de inmersión temporal así como el contenido de los glicósidos cardiotónicos. Los elicitors evaluados fueron chitoPlant (0.001; 0.01; 0.1 μg); siliioPlant (0.01; 0.1; 1.0 μg) y metil jasmonato (0.014; 0.018; 0.022 $\mu\text{g l}^{-1}$). En la fase de multiplicación, a medida que se incrementó la concentración del chitoplant se observó un aumento en las variables morfológicas evaluadas, los mayores valores fueron alcanzados con 0.01 μg aunque sólo la masa fresca y la masa seca mostraron diferencias significativas respecto al control. Con el aumento de la concentración de silioplant se observa un aumento gradual número de brotes, existiendo sólo diferencias significativas entre la menor concentración empleada (0.01 μg) y el control. Para el resto de las variables no hubo un efecto positivo de las concentraciones evaluadas del silioplant. En relación a la acumulación de metabolitos secundarios se observó que en ningún tratamiento se produjo digitoxina, el lanatocito C es el metabolito que se encontró en mayor cuantía, superior a los rendimientos de digoxina obtenidos. El chitoplant y el metil jasmonato incrementaron los rendimientos obtenidos de lanatocito C a medida que se

incrementó las concentraciones de ambos, ~~control~~ ~~control~~ que ocurrió con el silioplant que disminuyó el rendimiento con el aumento de la concentración. Los mejores resultados se observaron con la mayor concentración de chitoplant (0.1 g/l) y la menor de silioplant (0.01 g/l). En los tratamientos con SilioPlant los niveles de digoxina se incrementan con la concentración intermedia (0.1 g/l) y se inhibe completamente al emplear 1.0 g/l. La adición de metil jasmonato en las concentraciones ensayadas (0.014, 0.018 y 0.022 g/l) tuvo un efecto marcado sobre el contenido de digoxina, alcanzándose el mayor rendimiento de este compuesto en el tratamiento con 0.1 g/l de silioplant con diferencias estadísticas respecto al resto de los tratamientos. Se obtuvieron resultados preliminares en los niveles de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno y el malonildialdehído. Estas especies reactivas de oxígeno muestran que el aumento de las concentraciones de chitoplant y la disminución de las concentraciones evaluadas de silioplant, provocaron en los brotes mayor destrucción de la membrana, mayor daño que pudiera relacionarse con el estrés sufrido ante estos elicitores y provocar un incremento en los rendimientos de los metabolitos de interés.

Palabras Clave: elicitores; glicósidos cardiotónicos; medios líquidos; organogénesis

Dna ribossomal phylogeny among isolates of *colletotrichum* spp, agent causal of apple 'gala' leaf spot

Ribeiro, D C⁽¹⁾, Bogo, A⁽²⁾, Dantas, A C M⁽³⁾, Coelho, C M M⁽²⁾, Duarte, C R A⁽⁴⁾, Katsurayama, Y⁽⁶⁾, Guidolin, A F⁽²⁾.

(1) Pos graduation student of CAV/UDESC, Brazil; (2) Professor of CAV/UDESC, Brazil, (3) Professor of UFSC, Brazil; (4) Graduation student of UNIPLAC, Brazil; (5) Researcher of EPAGRI, Brazil
*sponsor: CNPq and UDESC.

Abstract

The apple (*Malus domestica* Borkh) is one of the most important fruit commercialized in Brazil. The Brazilian apples production is concentrated in the States of Santa Catarina, Rio Grande do Sul and Paraná, being responsible for about 90% of the national production, covering approximately 35 thousand hectares. Ribossomal DNA variation was used to study evolutionary relationship among fifty one isolates of *Colletotrichum* spp including thirty nine isolates from apples, ten isolates from native guava and two from citrus. Total genomic DNA were isolated from 50 mg of mycelium from each isolates and ground to a fine powder in liquid nitrogen and the DNA was extracted using a method from Schäfer & Wöstemeyer (1992) adapted by Junghans (1998), adding β -mercaptoetanol 1% to the extractor buffer with protein precipitation by fenol:cloroform (1:1) and cloroform:alcohol (24:1) (9,13). The total DNA concentrations were estimated by comparison with know standars in 0.8% (w/v) agarose gel 0.8% dilluted to 20 μ L stained with ethidium bromide. The amplification of all *Colletotrichum* isolates rDNA were analyzed using polymerase chain reaction (PCR) using the iniciator ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). All isolates were examined by sequence analysis of the 5.8S-ITS region which showed a high level of genetic divergence within isolates. From the phylogenetic tree of *Colletotrichum* spp isolates it was possible to organize it in species independent of its host. The *Colletotrichum* spp isolates grups from apples and native guava were genetic divergent. Some of isolates from apples are present in the bootstrap of the citrus isolates, giving evidence of the theory that isolates from apples have the same origin of isolates from citrus.

However, the idea which isolates *Colletotrichum* from apples has a phylogenetic correlation with isolates from citrus e native *guava* is necessary to carry a comparison in silico of the DNA sequence of *Colletotrichum* spp isolates from others host together with the fifty one isolates evaluated. The isolates groups of *Colletotrichum* from apple and native guava are genetic divergent. The isolates identified as *acutatum* were divided in two small groups. In one of these small groups *acutatum* isolates from citrus were grouped together with isolates from apple suggesting a close relationship among these isolates sharing a common ancestor.

Keywords: apple, *Colletotrichum* spp, phylogeny, ITS, rDNA.

Salt adaptation of broccoli roots to salinity: Phi thickening and aquaporin proteins.

Luis López-Pérez, M. Carmen Martínez-Bata, Nieves Fernández-García, Enrique Olmos, Micaela Carvajal¹

Departamento de Nutrición Vegetal, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, 30100, Espinardo, Murcia, Spain

¹ Author for correspondence; fax +34-968-39-62-13; e-mail mcarvaja@cebas.csic.es

Abstract

Although broccoli is moderately tolerant to salt stress, the tolerance mechanism is still unknown. Therefore, in this work, the uptake and transport of water in relation to the changes in root anatomy (phi thickening appearance) and aquaporin expression caused by salinity stress have been studied. The effect of phi thickening in the response of these plants to salinity was studied by comparing two methods of measuring root hydraulic conductance, pressurizing roots and natural exudation. The permeability properties of phi thickening were tested by a tracer that only moves via the apoplastic pathway in *Brassica oleracea* L. var. *Italica* plants, grown under different levels of NaCl (0, 40, and 80 mM), showed modifications in the cell wall of the cortical layer bordering the endodermis, such as phi thickenings. The expression of PIP1 and PIP2 decreased after salt treatments during time of experiment. The results also showed a decrease of the L₀ of plants under salinity stress. The fact that the proportion of apoplastic movement, which was higher when plants were measured with the Scholander chamber than with natural exudation, was lower for NaCl-treated plants, suggests that the phi thickenings could be a physical barrier only to apoplastic water transport. Also, the fact that aquaporin proteins were reduced after salinity treatments lead us to think that broccoli plants can regulate their water uptake under salinity conditions

Keywords: aquaporins, broccoli, phi thickenings, root anatomy, root hydraulic conductance, salinity

Photosynthesis and carbon metabolism in plantlets growing *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization.

Justo L. González-Olmedo

C. Aragón, R. Rodríguez, L. Molina Cejas, L. Peñate, I. Capote, M. Cid, D. Pina, M. Escalona. Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Bioplasmas, UNICA, Cuba. justo@bioplasmas.cu

Abstract

The photosynthetic capacity and the main enzymatic systems related to carbon metabolism were investigated during the *in vitro* culture of plantlets of species, with different forms to fix CO₂: plantain (C3), sugarcane (C4) and pineapple (CAM), always in temporary immersion bioreactors (TIB) and their subsequent acclimatization. In the case of plantain (Musa AAB cv. CEMSA 3/4), shoots maximal rate of photosynthesis (Pn), transpiration, and the activity of the carbon metabolism enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), acid invertase (AI), pyruvate kinase (PK) and sucrose phosphate synthase (SPS) were measured every 7d during the 21d of elongation in TIB, and the following 42d of acclimatization. Sucrose content in the liquid medium and in the leaves was also determined. The most significant changes in plant growth were observed during acclimatization. During *in vitro* stage Pn was limited; however Pn increased rapidly and significantly as soon as *in vitro* culture is over during acclimatization. PEPC activity increased during the whole evaluation period. The highest levels were achieved around days 42 and 56. PK and SPS activities were optimal during the first weeks in acclimatization. (28-35d), while AI increased at the beginning of elongation phase (7d), and later at the end of acclimatization (49-63d). When starch concentration and ADP-glucopyrophosphorilase (ADP-GPPase) activity were determined in the leaves and rhizome during acclimatization, it was proved that first 7d are crucial for plant adaptation, due to they survive thanks to the energy that was stored in the rhizome as starch during culture. The relationships between morphological parameters, Pn and enzymes during both phases of micro-propagation are discussed. In relation with sugarcane (*Saccharum* hybrid cv. C91-301), shoots when they were transferred to acclimatization, Pn increased only slightly during the first 7d. After this period, the increase was constant with only a small decline after transfer to uncontrolled external conditions. From day 14 on sugarcane plantlets exhibited low but positive Pn. The increase in light intensity and gradual reduction of relative humidity did not constitute inhibitory factors, as can be interpreted from the increased Pn until 21d. PEPC, AI, PK and SPS activities in both one and the other phase varied according to the culture conditions. By other hand pineapple (*Ananas comosus* L. Merr cv. Smooth Cayenne) shoots propagated in TIB by supplementing with CO₂ enriched air (2000 μmol. mol⁻¹), increasing light and maintaining the sucrose concentration of the medium (30 g L⁻¹) can be achieved micro-environmental conditions that increased Pn and plant quality. However when the same sucrose concentration was combined with two concentrations of CO₂ (350 and 1200 μmol. mol⁻¹) and two levels of light supply (80 and 250 μmol m⁻²s⁻¹), treatments under high light intensity increased the height of the plantlets, taking the quality as the principal indicator. Also, the highest light level tested increased the number of leaves and the fresh weight. When combined with the lesser concentration of CO₂, light also increased the number of roots. These *in vitro*-observed effects continued after transferring the plantlets to *in vitro* acclimatization. In both groups of plantlets (intense light with the two levels of CO₂) survival was higher than 90% and the growth rate was increased, reaching about 4 cm plantlet height, favoring their commercial quality. Higher than 6 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ did not require neither to reach more of 50% of competent plants nor to increase survival during acclimatization.

Photosynthesis and carbon metabolism in plantlets growing *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization.

Justo L. González-Olmedo

C. Aragón, R. Rodríguez, L. Molina Cejas, L. Peñate, I. Capote, M. Cid, D. Pina, M. Escalona. Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Bioplantitas, UNICA, Cuba. justo@bioplantitas.cu

Abstract

The photosynthetic capacity and the main enzymatic systems related to carbon metabolism were investigated during the *in vitro* culture of plantlets of species, with different forms to fix CO₂: plantain (C3), sugarcane (C4) and pineapple (CAM), always in temporary immersion bioreactors (TIB) and their subsequent acclimatization. In the case of plantain (Musa AAB cv. CEMSA 3/4), shoots maximal rate of photosynthesis (Pn), transpiration, and the activity of the carbon metabolism enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), acid invertase (AI), pyruvate kinase (PK) and sucrose phosphate synthase (SPS) were measured every 7d during the 21d of elongation in TIB, and the following 42d of acclimatization. Sucrose content in the liquid medium and in the leaves was also determined. The most significant changes in plant growth were observed during acclimatization. During *in vitro* stage Pn was limited; however Pn increased rapidly and significantly as soon as *in vitro* culture is over during acclimatization. PEPC activity increased during the whole evaluation period. The highest levels were achieved around days 42 and 56. PK and SPS activities were optimal during the first weeks in acclimatization. (28-35d), while AI increased at the beginning of elongation phase (7d), and later at the end of acclimatization (49-63d). When starch concentration and ADP-glucopyrophosphorilase (ADP-GPPase) activity were determined in the leaves and rhizome during acclimatization, it was proved that first 7d are crucial for plant adaptation, due to they survive thanks to the energy that was stored in the rhizome as starch during culture. The relationships between morphological parameters, Pn and enzymes during both phases of micro-propagation are discussed. In relation with sugarcane (*Saccharum* hybrid cv. C91-301), shoots when they were transferred to acclimatization, Pn increased only slightly during the first 7d. After this period, the increase was constant with only a small decline after transfer to uncontrolled external conditions. From day 14 on sugarcane plantlets exhibited low but positive Pn. The increase in light intensity and gradual reduction of relative humidity did not constitute inhibitory factors, as can be interpreted from the increased Pn until 21d. PEPC, AI, PK and SPS activities in both one and the other phase varied according to the culture conditions. By other hand pineapple (*Ananas comosus* L. Merr cv. Smooth Cayenne) shoots propagated in TIB by supplementing with CO₂ enriched air (2000 μmol. mol⁻¹), increasing light and maintaining the sucrose concentration of the medium (30 g L⁻¹) can be achieved micro-environmental conditions that increased Pn and plant quality. However when the same sucrose concentration was combined with two concentrations of CO₂ (350 and 1200 μmol. mol⁻¹) and two levels of light supply (80 and 250 μmol m⁻²s⁻¹), treatments under high light intensity increased the height of the plantlets, taking the quality as the principal indicator. Also, the highest light level tested increased the number of leaves and the fresh weight. When combined with the lesser concentration of CO₂, light also increased the number of roots. These *in vitro*-observed effects continued after transferring the plantlets to *in vitro* acclimatization. In both groups of plantlets (intense light with the two levels of CO₂) survival was higher than 90% and the growth rate was increased, reaching about 4 cm plantlet height, favoring their commercial quality. Higher than 6 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ did not require neither to reach more of 50% of competent plants nor to increase survival during acclimatization.

Fructan metabolism in transgenic plants

Lázaro Hernández and Alexander Banguela

Laboratorio de Interacciones Planta-Microorganismo, División de Plantas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Ciudad Habana, Cuba.

email: lazaro.hernandez@cigb.edu.cu

Abstract

In nature, fructans are synthesized from sucrose by a wide range of bacteria, a limited number of fungi, and about 15% of flowering plants including monocot and dicot species. Depending on the source, fructans contain from two until more than a hundred thousand fructose units linked by β -(2→1) (inulin-type) or β -(2→6) (levan-type) glycosidic bonds. Bacteria synthesize levan and inulin with a degree of polymerization ranging from 10 via a one-enzyme process aimed mostly to confer competitiveness in the interaction with the host plant or animal. Plants produce fructans as reserve carbohydrates of shorter sizes and more diverse structures by the concerted action of at least two enzymes with distinct substrate specificities. In contrast to starch, fructans are synthesized, stored and hydrolyzed in the cell vacuoles. The enzymes responsible for fructan synthesis and degradation evolved from invertases, in a process likely connected with the independent adaptation of unrelated families to cold and arid environments. Several groups motivated by academic and biotechnological reasons have transferred bacterial and plant fructosyltransferase genes into different plant species, most of which do not naturally produce fructans. The synthesis of the transgenic fructan as an additional sucrose sink in leaves and reserve organs has offered the opportunity for accomplishing novel carbon partitioning studies. In the applied sense, transgenesis has been approached to improve crop resistance to environmental stress, as well as for creating novel sources for cost-effective production of fructans. Levansucrase genes of different bacteria have been placed under the control of constitutive or organ-specific promoters and engineered for protein targeting to cytoplasm, apoplast, vacuole, and plastid. Relative low rates of levan accumulation even in the vacuoles can cause cell toxicity. Unlike the levan-producing transgenics, the plants transformed with plant-derived fructosyltransferase genes show neither phenotypic aberrations nor a reduction of agronomic yield. Highest accumulation of transgenic plant fructan was achieved in sugar beet, a host that naturally stores high concentrations of the substrate sucrose. Over 80% of stored sucrose was channeled into fructan synthesis without the loss of overall storage carbohydrates.

Keywords: Fructan, levan, inulin, FOS, fructosyltransferase, transgenic plant

Papel de la Glutathion S-transferasa en la resistencia a enfermedades y factores abióticos.

Ingrid Hernández y Orlando Borrás

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

Autor por correspondencia: orlando.borras@cigb.edu.cu

Resumen

Durante la infección de hongos patógenos, células de plantas responden con la expresión de una batería de genes de resistencia a enfermedades, los cuales pueden resultar en la producción de varios productos tóxicos de plantas, incluyendo especies de oxígeno activo y fitoalexinas. En adición, un hongo invasor puede producir estrés inducido por químicos, como las fitotoxinas, resultando en un estrés significativo y un daño en las células hospedadoras. Una respuesta en plantas es el aumento en la expresión de Glutathion S-transferasa (GST) seguido de la infección por hongos. En el presente trabajo se hizo el aislamiento, caracterización y análisis de la glutathion S transferase de *Megalosiphon*. Se obtuvo la GST por RT-PCR con cebadores degenerados. Se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias de GST reportadas en bases de datos internacionales. Para conocer la función del gen se realizó la construcción de un RNAi para provocar silenciamiento génico.

Inductores de la nodulación ante el estrés hídrico por defecto en soja.

María C. Nápoles¹, E. Guevara², F. Montero³, A. Rossi³, A. Ferreira³ y F. Incerti³

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

2. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Pergamino. Argentina.

3. Rizobacter Argentina S.A., Pergamino. Argentina.

Correo del autor principal: incerti@inca.edu.cu

Resumen

La deficiencia de agua constituye la principal limitante en la producción de semillas de soja, de ahí que sea objeto de numerosos estudios para disminuir el efecto de este estrés sobre el cultivo. En la simbiosis se reconoce el papel de los lipoquitinolípidos o factores Nod como señales moleculares de la bacteria fijadora en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, que inducen diversos cambios fisiológicos en la planta y que se han relacionado incluso con el estrés por bajas temperaturas. En este estudio investigamos sobre el posible papel de estas moléculas frente al estrés producido por el déficit de agua en el cultivo de soja. Los tratamientos se sometieron a tres condiciones de humedad, evaluándose el contenido relativo de agua en las hojas y los diferentes parámetros de la nodulación y el desarrollo del cultivo. Diferentes respuestas a la nodulación, crecimiento y desarrollo vegetal, así como al contenido de nitrógeno en la planta, se obtuvieron ante las diferentes condiciones de riego y los inoculantes empleados. Una mejor respuesta a la sequía se obtuvo cuando los inóculos fueron producidos en presencia de inductores de los genes *nif* de la nodulación. Resulta interesante contar con inoculantes que hayan sido obtenidos en medios con inductores de los genes *nif* no sólo incrementa la nodulación y su eficiencia sino que también la mejora cuando existen condiciones adversas como el estrés por sequía.

Palabras clave: Inductores, nodulación, estrés, sequía, soja.

Especies Vegetales Endémicas Metalotolerantes Para Uso En Fitorremediación

(Metallo-tolerant-endemic plant species to be used in phytoremediation) Ortiz-C., Barindelli, E. y Li Kao, J. Departamento de Biología, Universidad de Santiago de Chile y Departamento de Química y Biología, Universidad de Atacama.

Resumen

La Minería del Cobre produce diversos impactos ambientales en las zonas donde se emplazan tranques. Una posible solución al problema es tratar estos sistemas mediante fitorremediación, que consiste en el uso de plantas pseudometalófitas o acumuladoras de metales para fitoestabilizar o fitoextraer metales del suelo. Ambas tecnologías hacen uso de plantas tolerantes o acumuladoras de metales que los absorben y acumulan en las raíces u hojas, reduciendo su biodisponibilidad. Es importante por lo tanto, contar con especies que presenten las características necesarias para ser utilizadas en fitorremediación. Individuos de nueve especies vegetales que crecen en un tranque de relaves en la Tercera Región de Chile, fueron analizados para evaluar su potencial de uso en programas de fitorremediación. Se colectaron hojas y raíces y se analizó el contenido de cobre, el elemento más abundante en el sitio. Los resultados mostraron que la distribución del metal en hojas y raíces, expresada como la razón hoja:raíz (H:R), varió según la especie desde 0,2 a 9,4. Plantas de las especies *Cleistanthus polygamus* y *Atriplex deserticola* acumularon sobre 1 g kg⁻¹ p. s. de Cu en hojas, que fue el mayor contenido del metal encontrado en tejido foliar. Las gramíneas *Scirpus asper*, *Cynodon dactylon* y *Polypogon australis*, presentaron las mayores (H:R). Todas las especies evaluadas presentaron características deseables para uso

en fitorremediación de cobre, aunque sólo *polygamus* y *A. deserticola* fueron consideradas como metalófitas para cobalto. Algunas de las especies evaluadas fueron utilizadas para la implementación de un proyecto Piloto de Fitorremediación de un tranque de relaves en la II Región en Norte de Chile. Los resultados mostraron que la aplicación biotecnológica mejoró la estabilidad del sustrato de relaves y el paisaje del sector. Se observó que tres de las especies toleraron el sustrato como las condiciones ambientales presentes; la cuarta especie fue altamente tolerante a las condiciones ambientales, aunque presentó una tolerancia menor al relave como sustrato puro. Esta condición podrá ser mejorada a partir del germoplasma vegetal colectado en el sitio experimental y/o incluyendo mejoras (enmiendas) al sustrato. Los análisis de metales indicaron que la especie más tolerante acumula cobre, azufre y en menor proporción hierro, arsénico y zinc.

Evaluación del efecto de la temperatura en la fisiología postcosecha del huitlacoche

Fuentes U. C., Castro E. L., Gutiérrez C. M. A. y R. G. Ulloa M.

Profesora- investigadora del Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, Av. Antorcha s/n, Fracc. Villa ITSON, Cd. Obregón, Sonora, México. C.P. 85137 ulloa@itson.mx

Resumen

El huitlacoche o cuitlacoche, que significa "suciedad prieta de hervor", es un alimento muypreciado desde la época prehispánica en México la actualidad en algunos otros países en donde han llegado a denominarlo "trufexicana" "caviar azteca" por la exquisitez de su sabor, se obtiene a partir de un maíz que es infectado por el hongo *Ustilago maydis*, el cual causa tumores en las partes aéreas de la planta de maíz (siendo comestibles las agallas que se desarrollan en la mazorca). El interés económico ha ido en aumento en los últimos años, con lo que también ha aumentado el interés en su producción utilizando la inoculación artificial de este hongo. El huitlacoche debe presentar agallas de color blanco-plateado con la membrana que la recubre intacta, sin exposición de teliosporas en un estado óptimo de madurez. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la presencia y ausencia de totomoxtle en la mazorca con agalla en 4 diferentes temperaturas (5, 15, 25 y 35°C), mediante un diseño factorial completamente al azar 2x4x5, evaluando grados Brix, humedad y resistencia a la penetración por un periodo de 6 días. Los mejores resultados se obtuvieron en el factor A2 de huitlacoche en la mazorca con totomoxtle presentando las mejores características para el consumo y conservación. En el factor B, el mejor tratamiento fue a 5°C, seguido por el tratamiento a 15°C, después el de 35°C y el que presentó resultados menos deseables fue el de 25°C. En conclusión el tratamiento de agalla con totomoxtle a 5°C fue el que reportó los mejores resultados.

Palabras claves: agalla, *Ustilago maydis*, totomoxtle.

Detección y tipificación de razas de CTV en la colección de aislados del virus en el CENIAP vía IC/RT-PCR asimétrica.

Rangel, E*, Pantoja A., Rangel, J., Ruíz, J., y Centeno, F. 2007.

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Zona Universitaria, Av. Universidad Vía El Limón, Edificio 2 Unidad de Protección Vegetal, Laboratorio de Virología Vegetal Maracay 2101, Aragua. Venezuela.

*erangel@inia.gob.ve

Resumen

El closterovirus de la Tristeza de los Cítricos (CTV), es considerado el virus más importante en el cultivo de los cítricos. En Venezuela ocasionó la pérdida de aproximadamente 6 millones de árboles injertados sobre naranjo agrio en la década de los ochenta, y sigue ocasionando pérdidas a la agricultura venezolana, a pesar de haber diversificado los portainjertos para tolerar la enfermedad. En el país se ha señalado la ocurrencia de grupos de razas con base en los síntomas que producen sobre plantas indicadoras. El genoma del virus, de ARN de polaridad positiva, es de aproximadamente 20.000 nucleótidos, y de cuyo estudio se ha avanzado en el conocimiento de su estructura, organización y función. Este avance ha derivado en el desarrollo de métodos de tipificación sensibles y específicos, que pueden usarse como complemento a bioensayos en la etapa de preselección de aislados candidatos para uso en protección cruzada.

Para caracterizar la diversidad del CTV en la colección de aislados de virus y viroides de cítricos del INIA-CENIAP, se seleccionaron 63 muestras, que fueron procesadas para la inmunocaptura del virus, sometidas a RT-PCR asimétrica utilizando nucleótidos marcados (Dig-11UTP), y con iniciadores que amplifican el gen de la cubierta protéica. El mismo fue detectado por hibridación-ELISA en placas sensibilizadas con estreptavidina, y utilizando una sonda biotinilada de captura y anticuerpos anti-Digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina. La lectura se hizo en un espectrofotómetro a 405 nm y el punto de corte se obtuvo de manera similar al utilizado en ELISA. Para la tipificación, se reamplificó el amplicón obtenido vía PCR asimétrica con iniciadores internos al gen de la CP, cuyos productos fueron sometidos a hibridación-ELISA con sondas específicas de la forma descrita anteriormente. La reacción fue detectada con espectrofotómetro efectuando lecturas a 405 nm e intervalos de 9 min. Los datos fueron introducidos en una hoja de cálculo con controles basados en la reacción de las sondas frente a segmentos clonados del gen de la CP de aislados caracterizados del virus.

Los resultados indicaron la presencia de todos los grupos de razas detectados hasta el presente, infecciones múltiples y que las razas severas y débiles están presentes en más del 90 % de las muestras. El grupo de razas dominante consiste en razas severas que ocasionan decaimiento súbito y canaladuras en el tallo en naranjo agrio y naranjo dulce. Sólo en 7 de las 63 plantas evaluadas, las razas débiles predominan en la composición porcentual de la infección.

Estas plantas que hospedan razas débiles, serán objeto de estudios adicionales para evaluar su potencial para uso en protección cruzada.

Palabras clave: CTV, RT-PCR, hibridación, detección, tipificación, protección cruzada.

In vivo inhibitory activity on photosynthesis of the pungent principle of capsicum fruits, capsaicinoids

E. Navakoudis², N.I. Primikiriou¹, K.A. Loulakis¹ and K. Kotzabasis²

¹Department of Floriculture and Greenhouses, School of Agricultural Technology, Technological Education Institute of Crete, P.O. Box 140, 710 04 Heraklion, Crete, GREECE, e-mail: loulakak@steg.teiher.gr

²Department of Biology, University of Crete, P.O. Box 2208, 71 409 Heraklion, Crete, GREECE

Abstract

Capsaicinoids are a group of at least 12 terpenoid alkaloids responsible for the pungent sensation in fruits of the genus *Capsicum*. Capsaicin and dihydrocapsaicin are responsible for more than 90% of the pungency. As previously was reported, capsaicin acts as a

competitive inhibitor in both plant PSII and bacterial RC from *Rhodobacter sphaeroides*, by blocking photosynthetic electron transport at the PSII (Spyridaki et al., 2000). In this work, fluorescence induction kinetic measurements on cultures of the eukaryotic algae *Scenedesmus obliquus*, in the presence of increasing concentrations of capsaicin, showed a reduction of photosynthetic efficiency (Fv/Fm) indicating that capsaicin exhibits in vivo activity. Moreover, fluorescence induction data were further processed by JIP-test which provided details of the structure and function of the photosynthetic apparatus. The results from this in vivo study confirm that the capsaicin inhibitory action is a common trait among photosynthetic species and also prove that it is the binding site for capsaicin in vivo. In addition, the action of capsaicin and total capsaicinoid extracts from *Fraxinus* fruits were tested on intact lettuce plants. It was shown that the application of capsaicinoids caused only a minor negative effect on photosynthetic efficiency (Fv/Fm). Further work is needed in order to resolve the possible phytotoxic action of capsaicinoids on intact higher plants.

Keywords: Capsaicinoids, Capsaicin, Herbicide, Photosynthesis, *Scenedesmus obliquus*, *Lactuca sativa*

Efecto De La Temperatura De Almacenamiento Sobre La Pérdida De Peso Y Longitud Del Grelo En Microtubérculos De Papa (*Solanum Tuberosum* L.) Cv. Granola.

J. Salas* y N. Mogollón**. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Mérida. Apartado 425. **Posgrado de Horticultura. Decanado Agronomía. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apartado 400. Barquisimeto. Venezuela. E-mails: salasj@inia.gob.ve nmogollon@ula.edu.ve

Resumen

El propósito del presente trabajo fue establecer el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre microtubérculos de papa cv Granola, los tubérculos obtenidos a partir de inductores de tuberización in-vitro (Cinetina, Benzilaminopurina - BAP y 2-Cloroetil-trimetil-cloruro de amoníaco - CCC) y diferentes fotoperíodos (0, 8 y 16 h/día). Luego grupos de 10 microtubérculos fueron sometidos bajo tres regímenes de temperatura de almacenamiento (24 ± 2 , 10 ± 2 y $5 \text{ }^\circ\text{C}$). Se utilizó un diseño completamente al azar en arreglo factorial con cuatro replicas. Las variables analizadas fueron: pérdida de peso (%) a los 15, 30, 45, y 60 días partiendo de un peso inicial entre 0,8 y 1,00 g y longitud del grelo (mm). Las observaciones generadas fueron estudiadas a través de un análisis de varianza y se les aplicó la prueba de Duncan para la separación de las medias. Los resultados señalaron que la temperatura de almacenamiento tuvo un efecto marcado sobre la pérdida de peso, registrándose los mayores valores a $24 \text{ }^\circ\text{C}$ y los significativamente menores a $5 \text{ }^\circ\text{C}$. La combinación de inductores de tuberización y fotoperíodo, afectó la pérdida de peso, registrándose los menores valores en los microtubérculos inducidos en oscuridad y formados en presencia de CCC. El efecto de la combinación de los inductores de tuberización, fotoperíodo y temperatura afectó diferencias significativas entre los tratamientos en todas las evaluaciones realizadas. Las menores pérdidas de peso se registraron en los tratamientos de $5 \text{ }^\circ\text{C}$ independientemente del inductor y el fotoperíodo, lo que indica que la temperatura constituye el factor determinante en el proceso. Asimismo, se detectó diferencias significativas al evaluar el efecto de la combinación del inductor y temperatura sobre la longitud del grelo. El inicio de la brotación ocurrió a los 105 días en los microtubérculos almacenados a $24 \text{ }^\circ\text{C}$, manifestándose dominancia apical. Sólo a partir de los 180 días de almacenamiento pudo apreciarse la formación incipiente de brotes múltiples. La temperatura de almacenamiento afectó el

crecimiento del grelo, observándose un incremento a medida que se aumentó de 50 a 24 en esta última, se aceleró el proceso de crecimiento y ruptura de la dormancia.

Palabras claves: papa, inductores, microtubérculos, almacenamiento.

Evaluación De La Mutagenicidad Del Bajo Curso Del Arroyo Pelotas, En La Ciudad De Pelotas, Rs/Brasil

taisbio@gmail.com

Taís, C.O. Santos¹; Liana, F. Maciel¹; Thais, S. Paiva¹; Marília, C. Alvarengó¹; Adriana, S. Galhó²; Loraine, A. Isoldi³; Gilberto, L. Garcia⁴; Maria, G. Martino-Roth⁴

1. Estudiante del curso de licenciatura Plena en Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Pelotas;
2. Profesora Mestre en Fisiología Vegetal de la Universidad Católica de Pelotas;
3. Profesora Doctora en Biotecnología de la Universidad Católica de Pelotas;
4. Profesor (a) Doctor (a) en Genética de la Universidad Católica de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil.

* Becaria BIC - UCPel

Resumen

El uso de bioensayos con plantas para la evaluación de la genotoxicidad y para la monitorización *in situ*, es muy utilizado en todo el mundo. A través del método que analiza las anomalías del ciclo mitótico es posible detectar anafases aberrantes, que juntamente con el índice mitótico, ponen en evidencia el potencial mutagénico de las aguas evaluadas. Objetivando analizar la mutagenicidad del agua del Arroyo Pelotas, se investigó en células meristemáticas de macrófitas acuáticas índice mitótico (IM), las anomalías del ciclo mitótico (AM), anomalías interfásicas (AI), total de anomalías generales (TA) y se realizaron análisis físico-químicas. Fueron delimitados cinco puntos (Po) a lo largo del bajo curso del Arroyo Pelotas, en los cuales se colectaron muestras de plantas. Fue elaborado un banco de datos utilizando el programa estadístico SPSS, para "Windows", versión 10.0, con una probabilidad en nivel de 0,05 o menor, utilizándose el testé de Chi en la evaluación de los puntos en general, no se encontró diferencias estadísticamente significativas. Se destacaron las medias en relación a las siguientes variables: IM donde el punto 2 presentó el mayor (8,58%) y el punto 5, el menor (5,39%), las demás obtuvieron la mayor y menor media, respectivamente: AM en el punto 1 (13,31) y punto 5 (6,50); AI en el punto 5 (90,16) y el punto 3 (6,60); en el TA del punto 5 (96,66) y el punto 3 (15,33). Los datos obtenidos a través del análisis físico-químico demostraron que el pH presentó variaciones entre (6,8) y (7,6); siendo considerado dentro de los criterios de protección de la vida acuática donde queda el pH entre 6 y 9 (Cetesb, 2004). La acidez, dependiente del pH varió entre valores de (3,89) a (81,04). Los límites para análisis de alcalinidad a carbonatos, debido a la presencia de los iones CO_3^{2-} y HCO_3^- , están entre 10 a 500 mg/L (Baumgarten & Pozza, 2001), estando todos los puntos dentro de la normalidad, variando de (24,73) a (37,85). Según la resolución nº20 del CONAMA de 1986, donde se establece el límite máximo de cloruros en 250 mg/L, apenas el punto 1 (248,31) resultó estar dentro del padrón establecido, todos los demás presentan medias superior al indicado. En aguas dulces naturales, la dureza varía de 10 a 200 mg CaCO₃/L (Baumgarten e Pozza, 2001). En este estudio apenas el punto 1 (92,66) está de acuerdo con el valor establecido para este parámetro. La conductividad varió de (1.137,00) a (8.485,33). En general, niveles superiores a 100 $\mu\text{S/cm}$ pueden indicar ambientes impactados (Cetesb, 2004). En el análisis anual hubo apenas diferencias relevantes en cuanto a las AM ($p = 0,001$) y TA ($p = 0,003$). De 2003 a 2006 se verificó en el Arroyo Pelotas, un aumento creciente del IM (1,23% y 8,55%) y de las AM (0,77 y 53,30). En cuanto a las AI hubo un decrecimiento en el período de 2003 (51,00) a 2005 (7,20), aumentando la media en 2006 para (14,00); lo

mismo ocurrió con las TA, en 2003 (81,77), 2005 (17,20) y 2006 (67,30). No fueron realizadas colectas para análisis físico-químicos en los años de 2003 y 2004. En 2005 y 2006, obtuvimos los siguientes datos: el pH (6,90) y (7,21); acidez (69,82) a (6,49); alcalinidad (25,60) y (3,49); cloruros (221,12) y (1.987); dureza (31,80) y (623,10); conductividad (274,84) y (8.063,40).

Evaluación de la actividad mutagénica y antimutagénica del *aloe vera* contra el paracetamol, en teste de *allium cepa* y teste de micronúcleo en linfocitos binucleados humanos

regissturbelle@gmail.com

Régis, T. Sturbelle Liana, F. Maciel¹; Natália, S. Corrêa²; Dominique. S.Delias; Gisele , R. Oliveira¹; Taís, C.O. Santos¹; Gilberto, L. Garcia²; Maria G. Martino-Roth¹

1. Estudiante del curso de licenciatura Plena en Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Pelotas;

2. Profesor(a) Doctor(a) de Genética en la Universidad Católica de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil.

* Becaria BIC - UCPel

Resumen

Algunas de las sustancias presentes en los vegetales puede tener efectos mutagénicos, no obstante, otras pueden atenuar o anular estos efectos. El objetivo de este trabajo fue determinar el nivel de mutagenicidad y antimutagenicidad de *Aloe vera*, contra el paracetamol, en teste de *Allium cepa* y teste de micronúcleos en linfocitos binucleados humanos. El teste de *Allium cepa* fue constituido por 8 tratamientos, con 4 repeticiones cada: T1 Control negativo (H₂O); T2- babosa (40 ml/L); T3 – babosa (400 ml/L); T4 – paracetamol (800 mg/L); T5 – babosa (40 ml/L) y paracetamol (800 mg/L); T6 – babosa (400 ml/L) y paracetamol (800 mg/L); T7 – paracetamol (800 mg/L) durante 24h y, después sometidas a babosa (40 ml/L); T8 – paracetamol (800 mg/L) durante 24h y después babosa (400 ml/L). Se evaluó el índice mitótico (IM), las anomalías del ciclo mitótico (ACM), anomalías interfásicas (AI) y, total de anomalías (TA). El teste de micronúcleos en linfocitos binucleados fue constituido de 5 tratamientos con 4 repeticiones cada: T1 – control negativo (H₂O); T2 – 0,1 ml de babosa (40 ml/L); T3 – (control positivo) 0,1 ml de paracetamol (800 mg/L); T4 – 0,1 ml de paracetamol (800 mg/L) y 0,1 ml de babosa (40 ml/L); T5 – 0,1 ml de paracetamol (800 mg/L) con posterior lavado y substitución del medio de cultivo, 0,1 de babosa (40 ml/L). Fue analizado el índice de división celular (IDC), total de células binucleadas con micronúcleos (TCBMN), total de células binucleadas con otras anomalías (TCBOA) y, total de células binucleadas con anomalías (TCBA). En ambos testes se utilizó microscopio óptico, analizando 1000 células por repetición y utilizando el teste de Mann-Witney U con significancia de p<0,05. En teste de *Allium cepa*, el IM se mantuvo elevado en T1, T2 y T5 siendo en este el mayor índice de ACM. La media de AI y TA, fue menor en T1 y mayor en T4 y T5. Mostrando que el *aloe vera* en la dosis de 40 ml/L no es mutagénico, pero cuando adicionada al paracetamol, aumenta el IM y después del paracetamol, disminuye las AI y TA. En la dosis de 400 ml/L, presentó un efecto citotóxico, disminuyendo las CD y cuando adicionada junto al paracetamol, aumento el TA y después del paracetamol, disminuyó las AI y TA. En el teste de micronúcleos en linfocitos, la comparación entre T2 y T1 no presentó significancia en TCBMN (p= 0,078), TCBOA (p = 0,46) y TACB (p = 0,11). En T2 y T3 verificamos una diferencia significativa en relación a TCBMN (p = 0,020), no defiriendo en TCBOA (p = 0,077) y TACB (p = 0,19). Entre T4 y T1 hubo una diferencia significativa en TCBMN (p = 0,037), en el T4 y T3 hay diferencia significativa en TCBMN (p = 0,020) y TACB (p = 0,043). T5 y T1 no defirieron en relación a TCBMN (p = 0,24), pero hubo una significancia de TCBOA (p = 0,021) y TACB (p = 0,021). Por lo tanto *aloe vera* no mostró actividad

mutagénica cuando adicionada junto al paracetamol y, cuando adicionada 24h después, inhibe su efecto en relación a TCBM. No aumenta el número de TCBOA y TACB, evidenciando un efecto sinérgico.

Evaluación de la mutagenicidad de la marcela (*Achyrocline Satureioides*) a través del teste de *Allium Cepa* L.

nandag@ucpel.tcche.br

Fernanda, O. Gonçalves¹; Franciele, A. Almeida¹; Gisele, R. Oliveira¹; Dominique, S. Delias¹; Michele, G. Fersulha¹; Leticia, N. Riques¹; Gilberto, L. Garcia¹; Maria, G. Martino-Roth².

1. Estudiante del curso de licenciatura Plena Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Pelotas;

2. Profesor(a) Doctor(a) de Genética en la Universidad Católica de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil.

*Becaria CNPQ

Resumen

Las plantas han sido utilizadas como una forma común de medicamento, tanto en remedios tradicionales, como en productos industrializados. En Brasil, la mayoría de la población utiliza preparados naturales, derivado de las plantas para el tratamiento de una variedad de enfermedades. Debido a este hecho, es de gran importancia que sean realizados testes de genotoxicidad sobre el efecto de los extractos activos de esas preparaciones con la finalidad de evaluar su potencial mutagénico. La planta analizada según el potencial citotóxico es la Marcela (*Achyrocline satuireioides*) perteneciente a la familia *Compositae* también conocida (en Brasil) como Marcela do campo, Marcelinha, Marcela-amarela, camomila-nacional, carrapichinho-de-agulha, losna-do-mato, Marcela-do-sertão, chá-de-lagoa. Es una planta nativa de América del Sur, siendo muy encontrada no Brasil, principalmente desde el estado de Minas Gerais hasta Rio Grande do Sul. Sus propiedades terapéuticas actúan como antiinflamatoria, calmante, bactericida, antidiarreico, antiespasmódica, digestiva, antiviral, antituberculosa, analgésica y sedativa. Para uso externo es indicado como protector solar y agente de la circulación capilar contra la caída del cabello, piel y cabellos delicados siendo popularmente utilizada para clarear cabellos. Tiene como propiedades químicas flavonóides: quercetina (4,3%), luteolina, galangina, isognafalina; ésteres de cafeína, ácido cafeico y ácido protocatéquico; aceite esencial, saponinas triterpénicas; pigmentos amarillos (bioflavonóides); taninos. Este trabajo tiene como objetivo testar el efecto del té de Marcela colectado en 3 puntos diferentes, en el campo y en dos rutas diferentes de la zona sur de Rio Grande do Sul, y determinar: el nivel de mutagenicidad de la Marcela (*Achyrocline satuireioides*) *in vivo* a través del teste de *Allium cepa*.; investigar las anomalías interfásicas (micronúcleos, células binucleadas, células con núcleos ligados y brotes nucleares) en células de punta de raíz de *Allium cepa* L.; investigar el índice mitótico; las anomalías del ciclo mitótico; cromosomas perdidos y puentes anafásicos. Los resultados muestran que la Marcela (*Achyrocline satuireioides*), si bien fue comparada a 3 puntos de colecta y dos dosis diferentes mas el control negativo (CN), no presentó diferencias significativas, defiriendo apenas respecto al número de células erdiviy, consecuentemente, en cuanto a as anomalías interfásicas, sugiriendo que la planta es citotóxica y mutagénica, independiente del punto de colecta o dosis utilizada. Las diferencias de tornan expresivas cuando los tratamientos son agrupados, tanto en las dosis como en los puntos.

Desempeño fisiológico y mutagenicidad de células de soja transgénica e convencional sometidas al herbicida glifosato

fabixtimm@pop.com.br

Fabiana, C. Timm¹, Franciele, A. Almeida¹, Ricardo, E. Rodrigues¹, Ana, E. N. Bendér², Rodrigo F. Eichholz³, Dominique, S. Delia¹, Gilberto, L. Garcia², Maria, G. Martino-Roth³

1. Estudiante del curso de licenciatura Plena en Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Pelotas;
2. Laboratorista del laboratorio de genética;
3. Profesor(a) Doctor(a) de Genética en la Universidad Católica de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil.

RESUMEN

El estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto fisiológico e la mutagenicidad de células meristemáticas de soja transgénica cultivada (cv) CD 212 RR y convencional cv. CD 216 cuando sometidas a diferentes dosis del herbicida glifosato. Las semillas fueron embebidas por media hora en soluciones cero; 1,8; 3,6; 5,2 y 7,0 g/L de herbicida. Después sometidas a los siguientes tests: germinación (TG), primer conteo de la germinación (PCG), conductividad eléctrica (CE), células en división (CD), anomalías del ciclo mitótico (ACM), anomalías interfásicas totales de anomalías (TA). El TG y la PCG de la cv. CD 212 RR fueron afectados en dosis encima de 3,6 g/L de herbicida. En el teste de CE, las semillas de la cv. CD 216 sometidas a la dosis de 7,0 g/L y las semillas de la cv. CD 212 RR sometidas a dosis por encima de 1,8 g/L presentaron la mayor cantidad de lixiviados. Para CD y ACM, la soja transgénica presentó significativamente un mayor número de células en división y mayor número de ACM en los tratamientos 3,6 y 5,2 g/L cuando comparada a la soja convencional. La soja transgénica presentó una media mayor de AI que la soja convencional en el control y en la concentración de 1,8 g/L. Los resultados indican que la cv. CD 212 RR fue más sensible a los efectos de las diferentes dosis del herbicida cuando comparada a la cv. CD 216 RR, entre otros estudios serán necesarios para obtener resultados más conclusivos.

Palabras clave: *Glycine max*, glifosato, fisiología, mutagenicidad.

Determinación Del Nivel De Mutagenicidad Y Antimutagenicidad De Ginkgo (*Ginkgo Biloba*), In Vivo A Través Del Teste De *Allium Cepa*

Marcelo, O. Souza¹, Ana, E. N. Bendér², Franciele, A. Almeida¹, Gisele, R. Oliveir¹, Paula, S. Bachettini³, Iraci, L. Pacholski¹, Gilberto, L. Garcia², Maria, G. Martino-Roth³

1. Estudiante del curso de licenciatura Plena en Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Pelotas;
2. Laboratorista del laboratorio de genética;
3. Profesora Doctora en Histología Vegetal;
4. Profesora doctora en Química;
5. Profesor(a) Doctor(a) de Genética en la Universidad Católica de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil.

Resumen

El desarrollo de metodologías en el ramo de la química orgánica contribuyó consistentemente para aumentar el interés por el estudio de extractos vegetales. Por otro lado, hubo una preocupación con el uso indiscriminado por la población de lo que se refiere a las dosis y contraindicaciones de las plantas, habiendo necesidad de profundizar los estudios en ese campo. El extracto de las hojas de *Ginkgo biloba* es mundialmente utilizado por presentar efectos benéficos sobre algunas funciones cerebrales. Su extracto padronizado (EGb761) ha sido mencionado como posibilidad terapéutica para muchas secuelas o daños causados por enfermedades neurodegenerativas. Este trabajo visó evaluar el nivel de mutagenicidad y antimutagenicidad del *Ginkgo biloba* *in vivo* a través del teste de *Allium cepa*; en el sentido de orientar sobre el uso de esa planta medicinal. Las investigaciones focalizaron en las anomalías metafásicas (AI), células binucleadas, con núcleos ligados, micronúcleos y brotes nucleares, anomalías mitóticas (AM), como cromosomas perdidos y puentes anafásicos, total de anomalías (TA) y el número de células en división (CD). Después de la infusión de la planta se formó una solución utilizada directamente sobre las raíces de *Allium cepa*. Cuando las raíces alcanzaron 0,5 cm fueron colocadas en las soluciones de tratamiento por 24 h, consistiendo en 8 tratamientos diferentes, incluyendo los controles positivo y negativo. Después ese período las puntas de raíces fueron removidas, fijadas y analizadas en el microscopio óptico. Las muestras constaron de 1000 células meristemáticas por repetición, 4000 por tratamiento, totalizando 16.000 células. Para el análisis estadístico, los datos fueron almacenados en el banco de datos del programa SPSS, versión 11.0 "fontview" y analizado por el teste de Mann-Witney-U, con un nivel de significancia de $p < 0,05$. El tratamiento en la dosis usual (T2) no influyó cuanto al número de anomalías metafásicas, se comportó de forma semejante al control negativo (T1), pero disminuyó drásticamente el número de células en división, teniendo resultados similares a los del control positivo (T4), demostrando un efecto dosis-respuesta. Los tratamientos que testaron la antimutagenesis (T5, T6 y T7) mostraron un efecto al control positivo no presentando acción antimutagénica, siendo que en T8 se verificó un aumento del efecto mutagénico del paracetamol.

"Evaluación de biosólidos procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en cultivo de plantas jóvenes de trigo bajo condiciones de invernadero"

Arvayo, E. H., A. Torres¹ y M. A. Gutierrez¹. ¹Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora. E-mail: tono@itson.mx ²Tecnología en Sistemas Ambientales, S.A. de C.V., E-mail: tores@grupodomos.com.mx

Resumen

Los lodos generados en las plantas residuales representan un gran beneficio a los cultivos agrícolas, gracias a su alto contenido de materia orgánica que mejora la calidad de suelo, es por ello el gran interés en evaluar el efecto que generan distintas concentraciones de estos en los suelos agrícolas, provenientes de la planta tratadora de aguas residuales de Cd. Obregón, Sonora. La siembra se efectuó el 19 de diciembre de 2006 en vasos de unicel de 10 onzas, utilizando dos variedades de trigo; Átil C2000 y Kronstad F2004, bajo condiciones de invernadero, los tratamientos aplicados fueron: T1, testigo, T2, 2,500 kg ha⁻¹ biosólidos, T3, 5,000 kg ha⁻¹ biosólidos, T4, 7,500 kg ha⁻¹ biosólidos y T5, 10,000 kg ha⁻¹ biosólidos bajo un diseño experimental simple completamente al azar con 10 repeticiones. El manejo agronómico del cultivo fue acorde a sus necesidades. Las variables evaluadas fueron tasa relativa de crecimiento, área foliar, longitud de tallo, peso seco parte aérea, longitud de raíz,

peso volumétrico de raíz, peso seco de raíz y peso de raíz. Los resultados obtenidos para Átil C2000, se presentaron diferencias estadísticas significativas en el área foliar, peso seco de hojas, peso volumétrico de raíz y peso de raíz, donde el tratamiento 4 fue el mejor y sin respuesta en la longitud de raíz y altura de planta. Al igual se pudo determinar la tasa relativa de crecimiento que corresponde con un promedio de crecimiento por día de 0.27 cm. Para la variedad Kronstad F2004 presentó diferencia estadística en área foliar, longitud, peso seco y peso volumétrico de raíz, donde el tratamiento 5 fue el mejor. Los valores de clorofila total anduvieron de 44 a 49 unidades de clorofila.

Palabras clave: Productividad, residuos sólidos, semisólidos, cultivos agrícolas.

Carbon Metabolism In Leaves Of Micropropagated Sugarcane During Acclimatization Phase.

Romelio Rodriguez^{1*}, Carlos E. Aragon¹, Maritza Escalona¹, Justo L. Gonzalez-Olmedo¹, Yves Desjardins².

¹Centro de Bioplantas. Universidad Ciego de Avila, CP.69450. Cuba.

²Centre de Recherche en Horticulture. Pavillon de l'Environnement. Université Laval, GIK 7p4, Canada.

* Author to whom correspondence should be addressed. Fax(53-33) 266340, Email: romelio@bioplantas.cu

Summary

The activity of the main enzymes related to the sucrose metabolism, photosynthesis and sucrose concentration were studied in sugarcane (*Saccharum spp hybrid*) plantlets. Acclimatization was developed in two steps. 1) Light intensity of $1,000 \text{ l. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and 90% relative humidity during the first 21 d; followed by $2,000 \text{ l. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and approximately 80% of relative humidity. All measurements were carried out at the end of rooting phase concomitant with day 0 of acclimatization, and at 7 d intervals thereafter (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 d). As the *in vitro* plantlets were transferred to the acclimatization phase, photosynthesis increased significantly during the first 7 d. After this period, the increase was constant with only a small but non significant decline after being transferred to the uncontrolled external conditions. The activity of the sucrose synthase began to show a decrease, starting from the 7 d, and was related to the changes that began to happen in these plants from its adaptation to new *in vitro* conditions. Due to the increase of fresh weight favored by the high light intensity and lower relative humidity, an increase of the sucrose phosphate synthase activity was observed. The maximum activity of the acid and neutral invertases was reached at 14 and 21 d respectively after 21 d of acclimatization, The was a marked tendency for the activity of both enzymes to decrease. The sucrose content was decreased only in the first 7 d. The metabolism of sugarcane plantlets seemed to be susceptible to the environmental changes during the acclimatization phase but did not contribute to inhibitory factors for normal development.

Keywords: Acclimatization; Photosynthesis; Sucrose Phosphate Synthase; Sucrose Synthase; Invertases.

Efectos del ácido jasmónico en la interacción plátano-*Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 en condiciones de aclimatización.

Alexander Morenó Mayda Arbolá, Barbarita Companioñi Maria Teresá Yaima Pinó, Carlos E. Aragón Danilo Piná, Justo L. González-Olmedo

Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila, Cuba.

e-mail: alexander@bioplantas.cu

Resumen

El ácido jasmónico es uno de los reguladores de crecimiento en plantas de última generación, actúa principalmente como molécula señalizadora de respuesta a numerosas situaciones de estrés tanto bióticos como abióticos, siendo esta característica la que ha motivado su estudio de forma acelerada, evidencia esta acerca su efecto y favorece su estudio mediante aplicaciones exógenas, intervenir en los procesos fisiológicos, morfológicos así como en respuesta a insecto patógeno. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de profundizar en las respuestas de las plantas de plátano var. CEMSA 3/4 tratadas con ácido jasmónico durante el período de aclimatización y ante la infección con *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 durante el período de aclimatización. En diferentes estudios se realizaron con plantas procedentes de la fase de crecimiento en Biorreactores de Inmersión Temporal, estas previamente se seleccionaron como competentes para pasar a la fase de aclimatación, donde se plantaron en sustrato compuesto por cachaza y suelo rojo (1:1 env) bandejas de 40 pocillos con una capacidad de 95 cm³ cada uno. Los ambientes de las casas de aclimatización se caracterizarán por temperaturas máximas promedio de 28-30 °C, una humedad relativa de 80-90%, concentración de CO₂ de 375-400 μmol.mol⁻¹ y fotoperíodo correspondiente a los ciclos naturales, con 100 μmol m⁻²s⁻¹ de intensidad lumínica, estas mediciones ambientales se realizaron a las 12:00pm horas. Las concentraciones de ácido jasmónico empleadas para las diferentes aplicaciones fueron 0,0 y 1,0 mg/L. Estas se aplicaron por aspersión antes de la inoculación, en cuanto al hongo se utilizó una concentración de 5 x 10⁵ esporas/ml aplicadas mediante la inmersión de las raíces de las plantas por 30 minutos, se aplicó al sustrato la solución de esporas dejando restos de las plantas en él. Las evaluaciones se realizaron cada 7 días e inclusive de 28 días de aclimatización, donde se evaluaron variables morfológicas y fisiológicas esta última con ayuda del equipo CIRAS-2 (Sistema Portátil de Fotosíntesis, Europa, PP Systems, UK) acoplado a una cubeta universal (PLC6 de 2.5 l) con estas evaluaciones se pudo caracterizar el efecto del ácido jasmónico en la interacción plátano-*Fusarium*, donde se pudo demostrar la interacción en la expresión de los resultados. A partir de los resultados obtenidos se pudo determinar que el ácido jasmónico influyó de forma significativa en el desarrollo morfológico de las plantas, así como en el número de hojas enfermas que a los 21 días manifestó los primeros síntomas de la enfermedad y con ello las primeras diferencias significativas, demostrando los mejores resultados cuando el ácido jasmónico estuvo presente en la interacción plátano-*Fusarium* que en plantas expuestas a *Fusarium* sin presencia de ácido jasmónico. En los resultados fisiológicos se puede reafirmar el efecto inhibitorio del ácido jasmónico en la actividad fotosintética, esta mostró correspondencia con los resultados morfológicos obtenidos, también permitió el cierre estomático así como limitando la evapotranspiración en plantas asperjadas.

Palabras claves: ácido jasmónico, *Fusarium*, aclimatización, estrés.

Positive effects of Temporary Immersion Techniques on the gases rate-exchange (Photosynthesis-Respiration) of plants submitted to the micropropagation process.

Carlos E. Aragón¹, Maritza Escalona¹, Lelurlys Napoleón¹, Iris Capoté¹, Danilo Piná¹, Inaudis Ceja¹, Roberto Rodríguez¹, Jorge Sandovál¹, Sophie Roefs², Pierre Debergh³ & Justo Gonzalez-Olmedo⁴
¹Laboratory for Plant Cell and Tissue Culture, Bioplant Centre, University of Ciego de Ávila, 69450, Cuba. ²Dept. Biología y Organismos de Sistemas, University of Oviedo, Spain, ³CORBANA, Costa Rica, ⁴Dept. of Plant Production University Gent, Belgium.

E-mail: eduardo@bioplantas.cu

Abstract:

The present work contains the physiological and metabolic behaviour analyzed in plantain plantlets micropropagated by two different techniques, either Temporary Immersion Bioreactor (TIB) or gelled medium (GM). The influence of both techniques on plant quality was also evaluated at the end of acclimatization phase. Pyruvate kinase (PK) and phosphoenol pyruvate carboxylase (PEPC) were used as indicators for catabolic or anabolic carbon pathways respectively, during the growth of the shoot before acclimatization. We also determined the starch concentrations in the leaves and in the base of the pseudostems. TIB techniques produced longer shoots, with a larger diameter of the pseudostem base and higher dry weight; moreover this technique improved rooting. Photosynthesis in TIB was 4.6 times higher than on GM, and with a lower PK-activity. At the beginning of the elongation phase existed a respiratory activity ($-1.250 \text{ CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) but later the TIB environment conditions stimulated the photosynthetic activity at 14-21 d ($6.04 \text{ CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). Starch accumulation was approximately 2 times higher in the base of the pseudostems than in the leaves, and was always higher in TIB. The physiological quality achieved in TIB permits a better metabolic development and starch accumulation in plantain leaves. These reserves can be utilized during the first days of acclimatization phase with a high plant quality and survival percentage (99.2%).

Keywords: carbon metabolism, in vitro physiology, Musa, semi-solid medium, starch, temporary immersion system.

Nuevo método para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia al Mal de Panamá en el cultivo del banano.

Leyanes Díaz², Barbarita Companion¹, Néstor Mora¹, Aurora Pérez¹, Mayda Arzola¹, Patricia Espinosa³, Martha Hernández Jorge Venturá, María Cristina Pérez, Ramón Santos, José Carlos Lorenzo¹.

1 Laboratorio de Mejoramiento Genético, Centro Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.

2 Instituto Nacional de Investigaciones en Viveros Tropicales, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

3 GEPROP, Centro de Gerencia de Programas y Proyectos Priorizados, Ciudad de La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia (Fax: 53 33 266365,

E-mail: leyanes@bioplantas.cu)

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de establecer un nuevo método para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia al mal de Panamá en el cultivo del banano. Se evaluaron indicadores bioquímicos como: actividad peroxidasa, niveles de pigmentos clorofílicos totales, contenido de Fenoles (libres y ligados a paredes celulares), proteínas totales, malondialdehído y otros aldehídos. Los metabolitos del hongo causaron variaciones en el área de la lesión, los contenidos de fenoles libres y ligados a las paredes celulares, aldehídos (excepto malondialdehído) y proteínas. El uso del análisis discriminante para diferenciar cultivares de bananos susceptibles y resistentes como herramienta para programas de mejoramiento genético es el aspecto novedoso de la presente investigación. Tal estimación fue realizada a partir de una matriz de datos que incluyó el efecto de los metabolitos del hongo sobre hojas de dieciocho cultivares de bananos.

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

Desarrollo de una metodología de inoculación y evaluación de plantas de papaya variedad Maradol Roja, inoculadas con el Virus de la Mancha Anular de la Papaya, en condiciones semicontroladas.

Maylin Cruz², Ana L. Darías¹, Dariel Cabrera², Mileidy Cruz¹, Amado Pérez¹, Tatiana Pichardo¹, Rafael Gómez y Orelvis Portal^{1*}.

¹ Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Carretera a Camajuaní Km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

² Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Carretera a Maleza Km 2.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

³ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

*Autor para Correspondencia. Tel.: +53 42 281257; +53 42 281329. E-mail: orelvis@ibp.co.cu

Resumen

La papaya (*Carica papaya* L.) es la única especie del género *Carica* con importancia económica. En la actualidad, las principales variedades comerciales son susceptibles a numerosas enfermedades virales entre ellas el Virus de la Mancha Anular de la Papaya, que produce una de las enfermedades más destructivas en este cultivo. La sintomatología que causa la enfermedad es conocida pero existen diversos criterios de la evolución de los síntomas según las condiciones en que se produce la infección. El objetivo de nuestro trabajo fue elaborar una metodología de inoculación y de evaluación de plantas de papaya variedad Maradol Roja inoculadas con el PRSV en condiciones de casas verdes, para llegar a una escala de síntomas y establecer una gradología de la enfermedad. El inóculo empleado se obtuvo de plantas infectadas con el Virus de la Mancha Anular de la Papaya. La inoculación fue realizada mediante el método de abrasión con Carborundum, inoculando en la tercera y cuarta hojas. Se usó un gramo del tejido infectado con Tampón Sodio Potasio 0.01 M (pH 7.0) y Sulfito de Sodio 0.1%. Se emplearon plantas de papaya Maradol Roja de uno, dos y tres meses de edad para evaluar la influencia de la edad de las plantas en el desarrollo de los síntomas y se incubaron a 25 y 32°C para determinar el efecto de la temperatura. Obtenidas las mejores condiciones para el desarrollo de la enfermedad, se evaluó la manifestación de los síntomas para elaborar una escala para cada fase del desarrollo de la infección que permitió establecer una gradología para la enfermedad. Se estableció la utilización de plantas de tres meses de edad mantenidas a 25°C y 80% de HR para evaluar el desarrollo de los síntomas. A partir de las observaciones, se desarrolló una escala de síntomas. La infección se iniciaba con el aclarado de las nervaduras. Un mosaico ligero caracterizado por pequeñas zonas claras distribuidas de forma uniforme en todo el limbo de la hoja se manifestó de forma secundaria. El tercer síntoma observado fue mosaico con pequeñas zonas abultadas de color verde oscuro variando en tamaño desde 2.0 mm hasta 5.0 mm o moteado en forma de parches verdes oscuros. A los 27 días de la inoculación, comenzó la aparición de un mosaico severo donde las zonas abultadas se hicieron más numerosas. Posteriormente, las hojas jóvenes aparecieron deformadas y como manifestación más avanzada en la enfermedad, la filiformidad. Estos resultados permitieron establecer una gradología para cada fase del desarrollo de la infección. Se estableció el Grado 0 para las plantas sin síntomas visibles, Grado 1 para las plantas que mostraban aclarado de las nervaduras, manifestación más frecuente del inicio de la infección; Grado 2 para el mosaico ligero, Grado 3 cuando el síntoma se caracterizaba por mosaico con zonas abultadas de color verde oscuro; Grado 4 para el mosaico severo; Grado 5 cuando se presentaba deformación de los folíolos y Grado 6 cuando era evidente la filiformidad.

Palabras clave: *Carica papaya*, inoculación mecánica, grafología, PRSV.

Regulación hormonal de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión y represión transcripcional del gen *ADH2* por herida.

Maykelis Díaz* y M. Carmen Martínez

*Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”
Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, España.

maykelis.diaz@indio.atenas.inf.cu

Resumen

La formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) (EC 1.2.1.1), conocida también como ADH clase III, es una enzima ubicua, presente en reino vegetal y animal. La eliminación del formaldehído dentro de la célula se realiza principalmente mediante la FALDH, que utiliza NAD⁺ como cofactor. El formaldehído es un intermediario del metabolismo celular normal, aunque puede tener también un origen exógeno, siendo un polucionante atmosférico y de aguas residuales. Por otra parte, el formaldehído se forma intracelularmente durante la peroxidación lipídica en situaciones de estrés oxidativo. La eliminación de este formaldehído, que es tóxico para la célula, es necesaria para su supervivencia.

En este trabajo hemos utilizado dos tipos de sistemas biológicos: suspensiones celulares de tabaco (línea BY2), y plantas de *Arabidopsis thaliana* y demostrado que el gen *ADH2* es regulado negativamente por herida, siendo la respuesta transitoria y sistémica. Los experimentos realizados en el mutante de *Arabidopsis* (insensible a JA) nos permite afirmar que la represión del gen *ADH2* por herida es dependiente de JA. La adición exógena de ácido jasmónico a células de tabaco provocó una disminución de 3 veces en la cantidad de FALDH y en su actividad específica. Sin embargo, los tratamientos de plantas de *A. thaliana* con diferentes concentraciones, no dieron lugar a variaciones en los niveles de FALDH. Proponemos que es necesaria la acción coordinada de varios señalizadores moleculares o fitohormonas para observar una disminución de la FALDH por JA en *Arabidopsis*. La aplicación exógena de ácido salicílico a células de tabaco BY2 provocó un marcado incremento tanto de la actividad específica como de la acumulación de proteína FALDH. En plantas de *A. thaliana* el SA provocó una acumulación de la proteína FALDH y un aumento de los niveles de mRNA. Estos resultados sugieren que existe una fuerte activación transcripcional del gen *ADH2* por ácido salicílico. El ácido abscísico no produjo variaciones significativas en FALDH intracelular por lo que no sería un señalizador en la respuesta a herida para esta enzima. Por tanto, podemos concluir que la expresión de la FALDH está regulada por herida y por diferentes hormonas vegetales, tales como el ácido jasmónico y el ácido salicílico.

Palabras claves: formaldehído deshidrogenasa, herida, hormonas vegetales.

Efectos de las condiciones de cultivo *in vitro* sobre la calidad de las plántulas de caña de azúcar (*saccharum* sp. Híbrido) propagadas en biorreactores de inmersión temporal y durante la fase de aclimatización.

Liuba Peñate¹ O. Concepción¹ R. Rodríguez¹ J.L. González¹ M. Escalón¹; M. Cid¹; D. Pina¹.

¹LABORATORIO DE CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS, CENTRO DE BIOPANTAS, CARRETERA A MORÓN KM. 9, UNICA, CIEGO DE ÁVILA, CP 69450. CUBA. FAX 53-33-266340.

e-mail: lya@bioplantas.cu

Resumen

La caña de azúcar (*saccharum* sp. híbrido) es un cultivo que por su importancia económica se encuentra entre los de mayor extensión a escala mundial. En Cuba es el principal renglón de producción agrícola. Sin embargo las condiciones desfavorables en que se ha desarrollado la agricultura cañera cubana en los últimos años han provocado que su producción se haya visto extremadamente afectada. Teniendo en cuenta que la forma de propagación de esta planta en la naturaleza satisface totalmente las necesidades de la producción, se ha acudido a las técnicas de micropropagación. En este sentido, una de las más utilizadas son los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de tres condiciones de cultivo (autotrófica, mixotrófica y de mixotrofismo moderado) sobre el comportamiento morfo-fisiológico y bioquímico de plántulas de caña de azúcar propagadas en BIT y durante su posterior aclimatización. Se evaluaron indicadores morfológicos: altura de las plantas, masas fresca y seca, número de hojas por plantas; fisiológicos: fotosíntesis neta, transpiración, conductancia estomática; y enzimas claves del metabolismo del carbono: piruvato quinasa (PQ), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), sacarosa sintasa (SS), invertasa neutra (IN). Las plántulas que fueron sometidas a condiciones autotróficas no lograron sobrevivir debido al estrés propiciado por la ausencia de sacarosa en el medio de cultivo. Por esta razón no pudieron ser evaluadas. Los mejores resultados se obtuvieron para la condición de mixotrofismo moderado. Así como con la altura, los mayores valores de masas fresca y seca se alcanzaron en plántulas que crecieron bajo estas condiciones. El número de hojas por plantas no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos. En este caso sólo se observaron nuevas emisiones foliares a partir de la segunda semana durante el período evaluado. Los menores valores de fotosíntesis neta se mostraron bajo condiciones *in vitro* y aumentaron notablemente a partir de la segunda semana de aclimatización. Durante esta fase la respuesta de esta variable fue significativamente superior para las plántulas que crecieron bajo condiciones de mixotrofismo moderado. Para las plántulas con un desarrollo mixotrófico se alcanzaron niveles de transpiración y conductancia estomática muy elevados al inicio de la fase de elongación y durante la primera semana de aclimatización. Este grupo de plántulas se tardó más que el resto en lograr el control de la pérdida de agua y en alcanzar una estabilidad funcional. Las plantas que mostraron una mayor actividad de la PQ fueron las provenientes de condiciones mixotróficas. Por el contrario, la actividad de la PEPC se identifica con sus mayores niveles en plantas que estuvieron sometidas a condiciones de mixotrofismo moderado. Esto indica que los procesos de fijación del CO₂ a través de la PEPC fueron más eficientes en estas plantas que en las primeras. Las actividades de la SS y la IN fueron superiores para las condiciones mixotróficas.

Palabras claves: *mixotrofismo, autotrofismo, fotosíntesis, enzimas.*

Abstract.

The sugarcane is a C4 plant. It is one of the most widely spread cultivations at world scale due to their economic importance. In Cuba existed 1 100.000 ha of sugarcane with a yield of 33 TM/ha in the year 2002. However, the adverse conditions currently in Cuba for sugarcane development have caused that its production has been reduced. Its propagation is generally in a vegetative way. Nevertheless, It doesn't satisfy the necessities of the production totally. For this reason the techniques of micropropagation have been used, mainly the Temporary Immersion Bioreactors. The present study was initiated to determine the effect of three cultures conditions (autotrophic, mixotrophic and moderate mixotrophic) about the morph-physiological and biochemical behavior of plantlets of sugar cane propagated in Temporary Immersion Bioreactors and during their subsequent acclimatization. Morphological physiological indicators and key enzymes of the metabolism of the carbon were evaluated. The plantlets that were subjected to autotrophic conditions didn't survive due to the stress propitiated by the sucrose absence in the culture medium. For this reason it could not be evaluated. The best results were obtained for the condition of moderate mixotrofical. In this case, the morphological variables height of the plants, fresh weight and dry weight responded positively. Was minimum the answer of the net photosynthesis *in vitro* and increased it notably from the second week of acclimatization. The plants in a growth mixotrophic showed very high values of transpiration and estomaticoconductance to the beginning of the elongation phase and during the first week of acclimatization. This plants group took a long time more than the rest in achieving the control of the loss of water and in reaching a functional stability. The plants that showed a bigger activity of the pyruvate kinase were those coming from conditions mixotrophic. An inverse behavior was that of the phosphoenolpyruvate carboxylase. The activities of the sucrose syntase and the neutral invertase were superior for the mixotrofic conditions.

Keywords: *mixotrophic, autotrophic, photosynthesis, enzymes.*

Efecto del Ethrel 480 (ácido 2 cloroethyl fosfónico) en el metabolismo poliamina etileno durante el proceso de inducción floral de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) cv. Cayena lisa bajo condiciones inductivas no favorables.

Maita Ávila^{1*}, Juan Valdez², Yermay Esquivel³, María A. Blancó², Nadina Nieves², Persaram Ramdat¹, Justo L. González

1 Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 9 CP. 69450. Cuba. pfa_maita@agronomia.unica.cu*

2 Centro de Bioplantás. UNICA Carretera a Morón Km 9 CP. 69450. Cuba.

3 Universidad Nacional Escuela de Química Costa Rica.

Resumen:

El estudio del control de la floración en la piña tiene un marcado interés económico a nivel mundial, pues no se concibe una plantación piñera rentable si en ella no se logran obtener altos porcentajes de floración y de forma homogénea, esto permite programar la producción de acuerdo a las necesidades del mercado. Este trabajo se desarrolló con el objetivo de caracterizar el comportamiento del metabolismo poliamina etileno en el proceso de inducción floral de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) cv. Cayena lisa obtenidas por cultivo *in Vitro* bajo la acción del Ethrel 480 (ácido 2 cloroethyl fosfónico) en condiciones inductivas no favorables de verano. La investigación se realizó en dos fases

una de campo y de laboratorio. La primera se consistió en la aplicación de Ethrel 480 (ácido 2- cloroetil fosfónico) en el verano (condiciones inductivas no favorables) a razón de 350 mg L⁻¹ con doble aplicación, comparándolas con el testigo. En cada caso se tomaron tres plantas por tratamiento con una frecuencia de 0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas donde se evaluó el comportamiento de las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) y el etileno. Bajo condiciones inductivas desfavorables del verano y con doble aplicación la putrescina mostró dos momentos de máxima acumulación, a las 12 y 48 horas, mientras que los niveles de espermidina en plantas tratadas son inferiores a las plantas no tratadas. La espermina no fue detectada en plantas tratadas. La concentración fue muy baja en las no tratadas. La liberación de etileno después de realizado el tratamiento de inducción floral mostró incrementos a las 24 y 60 horas.

Palabras clave: *Ananas comosus*, ethrel, poliaminas y etileno.

Efecto del tipo de luz sobre la calidad de los brotes de piña (*Ananas Comosus* L Mer) híbrido MD₂ en el cultivo *in vitro*

María T. González, Alexander Moreno, César E. Aragón, Justo L. González-Olmedo, Centro de Bioplant. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 9. CP 69450. Cuba . Email:mariate@bioplants.cu

Resumen.

La piña es un cultivo agrícola de gran interés para muchos países tropicales puesto que es parte de las exportaciones para sus economías y también son parte de su dieta diaria. Las plantas durante el cultivo *in vitro* crecen bajo un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad lumínica, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos especialmente sacarosa. El efecto de la calidad de las semillas para la propagación masiva de estas plantas provocó el establecimiento de protocolos de micropropagación. El manejo de la luz es factor importante en todas las actividades diarias y sobre todo en aquellos organismos autótrofos que sintetizan su propio alimento. En Cuba es notable la utilización de la luz natural en las Biofábricas como fuentes de iluminación, lo que no es característico en los laboratorios comerciales que emplean la luz artificial. Es necesario comparar y determinar las peculiaridades de los efectos del tipo de luz, natural y artificial, sobre el intercambio gaseoso implicado en la fotosíntesis de las tres especies estudiadas con distintas formas de asimilación del CO₂. Se emplean las cámaras de crecimiento de la Biofábrica de Ciego de Ávila para el uso de la luz natural con una intensidad de 120 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$, mientras las del Centro de Bioplant. se usaron para los tratamientos bajo luz artificial de 145 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$. Concluido la fase final en el cultivo *in vitro* se evaluó las variables morfofisiológicas estudiadas; en la mayoría de las variables la luz natural superó la artificial y provocó mayores porcentajes de supervivencia durante las primeras dos semanas en la fase de aclimatización. La relación $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ que se evapora creció en valores absolutos en las plantas cultivadas bajo luz natural. Estos resultados constituyen la primera evidencia biológica de la micropropagación convencional de piña con el empleo de la luz natural que mejora indicadores de calidad en las plántulas, estimula la capacidad fotosintética de éstas y garantiza mayores porcentajes de supervivencia durante la aclimatización.

Palabras claves: luz, fotosíntesis, calidad.

High accumulation of levan in transgenic tobacco alters leaves phenotype, flowering and seed viability

Alexander Banguela, Juan Orieta, Raísa Rodríguez and Lázaro Hernández
Laboratorio de Interacciones Planta-Microorganismo, División de Plantas, Centro de Ingeniería
Genética y Biotecnología (CIGB), Ciudad Habana, Cuba.
email: lazaro.hernandez@cigb.edu.cu

Abstract

Fructans are sucrose-derived sugars consisting of two up to more than a hundred thousand fructose units. In nature, fructan synthesis occurs in a broad range of microorganisms and a limited number of plant species mostly adapted to temperate and arid climates. In these plants, fructans are synthesized and stored in the vacuole by the concerted action of at least two fructosyltransferases. Plant fructans have different structures and rarely exceed a polymerization degree (DP) of 100 fructose units. Levansucrase (LsdA) from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* synthesizes levan (β -2,6 linked polyfructan; DP > 10000) directly from sucrose. Our previous recombinant experiments in yeast confirmed that eukaryotic posttranslational modifications, such as glycosylation, do not alter the catalytic performance of LsdA. Here, we investigate the effect of the constitutive expression of the *lsdA* gene in transgenic tobacco, a plant that naturally does not produce fructans and lacks enzymes capable to degrade levan. LsdA was fused to the N-terminal pre-propeptide of the onion sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase to achieve targeting to the cell vacuole. The physiological effect of levan synthesis was assayed in ten plants expressing different levels of the transgene. In all cases, the levan content in leaves increased gradually with age causing a mottled texture and a bleaching phenotype. In plants of highest LsdA activity, the non-metabolizing polymer reached to represent 70% of dry biomass; flowering was delayed and seeds were unable to germinate. Transgenic plants accumulating levan to level below 20% showed leaves of normal size with a slightly bleaching phenotype, fertile flowers and viable seeds. Such a behavior remained stable in F2 plants.

Keywords: fructan, levan, levansucrase, LsdA, tobacco

Efecto de una mezcla de oligosacáridos pécticos en la inducción de resistencia en plántulas de tabaco contra *Phytophthora nicotianae*.

Autores: Daimy Costalés, Alejandro Falcóhy, Juan C. Cabreña

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), La Habana, Cuba.

²Universidad Notre Damm de la Paix, Namur, Bélgica.

E-mail: daimy@inca.edu.cu

Resumen

Los oligosacáridos pécticos u oligogalacturónidos han sido informados como señales primarias en la activación de un amplio rango de respuestas defensivas en plantas. Sin embargo, aunque se conocen un gran número de estas respuestas activadas por dichas macromoléculas, existen muy pocos reportes de protección de plantas contra patógenos con estos oligosacáridos. En este trabajo se estudió la protección de plantas de tabaco contra el patógeno de suelo *Phytophthora nicotianae* mediante aspersión foliar de una mezcla definida de oligosacáridos pécticos en un bioensayo de infección *in vivo*. Los resultados de protección demostraron diferencias estadísticas entre la concentración más baja de oligopectatos (0,05 g/L). La asperjada, equivalente a un 46% de protección de las plantas respecto al control asperjado con agua; mientras que la concentración mayor de oligopectatos (0,5 g/L) protegió en un 25% las plantas, pero sin diferencias estadísticas con el control. El análisis de frecuencia de diferentes grados de infección alcanzados por

las plantas, muestra la presencia de plantas sanas sólo con el tratamiento de menor concentración de la mezcla de oligopectatos. Se determinaron las actividades enzimáticas defensivas en hojas y en raíces de las plantas justo antes de ponerse en contacto con el patógeno (35 DDS). Se demostró incrementos significativos de actividad peroxidasa tanto en hojas como en raíces a 0.5 g.L⁻¹. Siendo significativo los incrementos de actividad PAL a 0.05 g.L⁻¹ para las hojas y, ambas concentraciones, para las raíces de las plántulas de tabaco.

Palabras clave: Oligogalacturonidas, *Phytophthora nicotianae*, resistencia, tabaco.
Abreviaturas: DDS (Días después de la siembra).

Obtención de nuevas variedades de arroz a partir de la mutagenesis *in vitro*.

María C. González (1), Noraida Pérez (1), Elizabeth Cristo (1), Regla M. Cárdenas (1), Mayra Rodríguez (2), Armando Calles (2) y Orlando Borrás (2).

(1) Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)

(2) Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

Resumen

Semillas de la variedad de arroz Amistad 82 fueron irradiadas en un FHASOTRON de 160 mev y una potencia de dosis de 4.8 Gy/hr. Se emplearon dosis de entre 0 y 210 Gy. Se evaluó en todos los casos el porcentaje de formación de callos así como de regeneración de plantas. Los regenerantes obtenidos fueron multiplicados en condiciones controladas y en la generación M2V1 fueron llevados a condiciones de campo en la Estación de Arroz de Los Palacios. Después de cinco ciclos de selección se logró identificar un grupo de genotipos a los que se evaluó el rendimiento y sus componentes. Se replicados así como la tolerancia a la salinidad y P. gas. Se realizaron evaluaciones moleculares mediante la técnica de AFLP. Se detectó efecto estimulante en la regeneración de plantas al emplear dosis de 20 Gy y se detectaron diferencias morfoagronómicas y moleculares que ponen de manifiesto la efectividad de la metodología empleada para generar variabilidad genética y obtener nuevos genotipos de alto potencial productivo, resistencia al acame así como a la salinidad.

Transient expression in rice embryos by sonication-assisted transformation with *Agrobacterium tumefaciens*.

Meilyn Rodríguez *✉, Ana V. Pérez**, Kenia Tiel*, Ailin Sánchez*, Marlene Pérez*, Osmani Ramos*, Cecilia Sánchez* and Merardo Pujol*

* Center for Genetic Engineering and Biotechnology. P.O. Box 6162, Havana 10600, Cuba.

** Rice Research Institute, Bauta, Cuba.

✉ meilyn.rodriguez@cigb.edu.cu

Abstract.

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most versatile and important cereal crops. Currently this crop supports more than 50 % of World population. Recent advances in molecular biology and genetic engineering have provided that increase the efficiency of existing breeding methods and allow unconventional approaches for rice improvement. Results obtained from transient expression systems rapidly and efficiently provide important information and reflect *in vivo* situation *in planta*. Microprojectile bombardment is commonly used to assay transient gene expression, but the main difficulty in its use is the variability in the number of individual bombardment events between independent

experiments. Sonication-assisted *Agrobacterium* mediated transformation tremendously improves the efficiency of *Agrobacterium* infection by introducing large numbers of microwounds into the target plant tissue. Using immature embryos of rice as explants, we evaluated the transient expression of glucuronidase (GUS) activity. The highest GUS expression was obtained when immature embryos were sonicated for 2 s in the presence of *Agrobacterium*, followed by co-cultivation with the explants in contact with the culture medium for 3, 5 and 7 days at 25 °C. The addition of acetosyringone to the co-culture medium enhanced transient expression.

Key words: transient expression, glucuronidase gene, sonication, rice embryos, *Agrobacterium tumefaciens*.

La ingeniería verde y las plantas transgénicas: ¿existe algún vínculo entre estas ramas de la ciencia?

Déborah Geada^A, Dulce M Ares^A, Sigifredo Fla^B, Otto Mendoza^B, Martín Cuervo^A, Humberto García^A, Leonardo Gómez^B, William Ferro^B, Tatiana Álvarez^B, Alberto Leyva^B, Julio C Sánchez^B, Rodolfo Valdés^B.

A. Instituto de Investigaciones del Tabaco. Km 1/2 Carretera al tumbadero. San Antonio de los Baños. La Habana. Cuba. 3500. : dgeadal@iitabaco.com.mx , deborah@iitabaco.co.cu 5347-38-3442 Ext. 149.

B Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave. 31 e/158 y 190. Habana 10600, Cuba. P.O.Box 6162.

Resumen

La ingeniería verde es una nueva área de la ciencia que se ocupa del diseño de procesos sostenibles y seguros. Involucra la integración de rutas “amigables ambientalmente” e innovaciones técnicas para alcanzar el desarrollo de procesos verdes. Adicionalmente, la bioingeniería en plantas para la producción de biofármacos para uso humano se ha expandido en los años recientes. Esto se debe a avances en la tecnología de los nuevos métodos de producción y la necesidad de grandes cantidades de proteínas terapéuticas. El proceso de purificación de proteínas transgénicas es un desafío difícil considerando la poca información relacionada con este tipo de productos. También la aceptación pública de este tipo de producto es pobre debido al desconocimiento y la no implementación en algunos casos de procesos más limpios que aprovechen los desechos de manera que estos no sean liberados al medio ambiente sin una eficaz activación y procesamiento. La relación entre estas áreas de la ciencia propiciará que los productos transgénicos gocen de una aceptación pública no vista hasta ahora y a la vez contribuya al reciclaje de productos en un marco de desarrollo sostenible no visto hasta el momento en la ciencia cubana. En el presente trabajo se exponen los resultados de lo que podría ser esta interrelación, con el aprovechamiento de los desechos generados en el proceso de producción del planticuerpo HB-01 a partir de plantas de tabaco, lo cual permitirá un abaratamiento de los costos de producción de las moléculas expresadas en plantas. En este trabajo un anticuerpo recombinante específico para el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B fue purificado a partir de tabaco con un rendimiento máximo de 25 mg de planticuerpo/kg de hojas y un recobrado de 60%. La pureza de este planticuerpo fue superior al 90% tanto por SDS-PAGE como HPLC-GF, lo cual coincide con los parámetros exigidos para anticuerpos empleados en la inmunopurificación de antígenos vacunales por agencias reguladoras de medicamentos. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de este antígeno reconocida por el planticuerpo HB-01 fue similar a la reconocida por su contraparte murina verificando la potencialidad de las plantas para reemplazar animales y biorreactores para la producción a gran escala de anticuerpos. En paralelo, se evaluó la elaboración de tableros

multipartículas obtenidos a partir de los ~~cellos~~ del procesamiento del tabaco para la fabricación de muebles y la ~~decoi~~ a un costo inferior a la industria tradicional. Debido a que en durante el procesamiento de tabaco para el aislamiento del planticuerpo HB-01 se generan grandes cantidades de tallos de tabaco y restos de hojas, se propone la combinación de ambos procesos para lograr una producción más limpia y eficiente. Asimismo se propone la utilización de otros desechos ~~parakul~~ es necesaria la realización de otros experimentos con el propósito de obtener nicotina, solanesol y otros antioxidantes. Estos resultados son pioneros en Cuba en ~~laci~~h de estas dos ramas científicas y permite avizorar un futuro promisorio, sostenible y verde para la producción de fármacos a partir de plantas.

Efecto del sobrehumedecimiento del suelo en la profundidad radical y la actividad H^+ -ATPasa en caña de azúcar (*Saccharum spp.* Híb), variedad C86-456.

Sergio Rodríguez Rodríguez¹, Susana Carletti², Hipólito Peralta³, Maribel Rivas Paneça⁴, Edgar Martínez Mesa⁵ y Adelaida Balbá⁶

¹Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Carretera a Manzanillo, km 17,5. Peralejo. Bayamo. 85100. Granma. Cuba. serguez@udg.co.cu²Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Nacional de Luján. Buenos Aires. Argentina³Centro de Bioplantillas. Universidad de Ciego de Ávila⁴Ciego de Ávila. Cuba⁵Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Resumen

Debido al cambio climático global está aumentando la ocurrencia de períodos de escasas y abundantes precipitaciones, estas últimas cuando se asocian a problemas edáficos de tipo físico causan excesos de agua en zonas ~~ter~~ agrícola, con disímiles afectaciones en la morfofisiología de las plantas. Con la presente investigación, se muestran los resultados del efecto del sobrehumedecimiento de un suelo Vertisol del Valle del Cauto, provincia Granma, Cuba, en vitroplantas de caña de azúcar, plantadas en campo, variedad C86-456 en ciclo de caña planta y primer retoño en las variables desarrollo del sistema radical en profundidad y la actividad de la enzima ~~A~~-ATPasa. El muestreo y estudio del sistema radical se realizó a los 10 meses de edad ~~en~~ los ciclos de cosecha seleccionando 20 plantones de ambas parcelas, tomando en ~~en~~ consideración la técnica del monolito, asumiendo las profundidades de muestreo recomendadas ~~en~~ la caña de azúcar por Krautman (1959). La actividad de la enzima ~~A~~-ATPasa se determinó según lo descrito por Canellas (2002), en las vesículas de membrana plasmática del sistema radical del genotipo evaluado en las dos condiciones de humedad del suelo y ciclos ~~de~~ cosecha a la edad de 10 meses. Se encontró que el déficit de oxígeno provocado por el sobrehumedecimiento del suelo redujo significativamente el desarrollo en profundidad de las raíces, con una marcada disminución de la actividad enzimática de la ~~A~~-ATPasa, la cuál está muy relacionada con la elongación celular y la absorción de nutrientes por las raíces.

Palabras claves: caña de azúcar, sobrehumedecimiento, sistema radical, ~~A~~-ATPasa

Obtención de análogos androestéridos en variedades de tabaco negro.

Emis C. Mena, Vivaldo García¹ Morejón y Vivian Rivero.

Resumen

En la Estación Experimental del Tabaco de San Juan y Martínez, Pinar del Río, se realizó un cruzamiento entre las variedades de tabaco negro 'Criollo 98' y 'Corojo 99' con el androestéril de la variedad 'Habana 92' obtenido con dos fuentes de citoplasmas N. suaveolens y N. bigelovii. Como resultado de este cruzamiento se obtuvo ya F₁ y posteriormente se realizaron los retrocruzamientos. Después de cinco generaciones de retrocruzamientos y selección genealógica se obtuvieron los análogos androestériles de las variedades 'Criollo 98' y 'Corojo 99', a los que se les evaluaron las características morfológicas: longitud y anchura de la hoja mayor, número de hojas útiles y altura total de la planta según metodología descrita por Torrecilla *et al.* (2001). Cuando se utiliza el citoplasma de N. suaveolens el estigma sobresale por encima de la corola de 0.5 a 1 cm de longitud, lo cual es muy importante que esto facilita la polinización, mientras que cuando se utiliza la fuente de N. bigelovii el estigma queda de 1.5 a 2 cm por debajo de la corola. En este caso hay que abrir la corola y llegar al estigma para efectuar el cruzamiento, lo que se hace difícil y es costoso. Como resultado de este trabajo concluimos que se debe utilizar como fuente de citoplasma la de N. suaveolens y continuar el programa de retrocruzamientos para la obtención de los análogos androestériles de la 'Criollo 98' con citoplasma de N. bigelovii y para la variedad 'Corojo 99' con las dos fuentes de citoplasmas hasta uniformar las características morfológicas de la variedad. Las nuevas variedades androestériles se están en la comercialización y podrán ser utilizadas como fuente de mejoramiento en los nuevos cruces que se realizarán.

“San Luis 21” Nueva variedad de tabaco Virginia resistente a las principales enfermedades, de alto rendimiento y buena calidad.

Miguel Díaz, M. Gil, Emis C. Mena, V. García, V. García y Daniel Licourt.

Resumen

Con el objetivo de obtener variedades de tabaco Virginia resistentes a las principales enfermedades que atacan al cultivo en Cuba, de alto potencial productivo y buena calidad, se realizó un cruzamiento entre las variedades Virginia 'San Luis 20' y 'Virginia Isogénica' en la Estación Experimental del Tabaco Virginia de San Luis, Pinar del Río, durante la campaña tabacalera 1992/1993. Después del proceso de selección genealógica se obtuvieron tres líneas que agrupaban en sus características la resistencia al "moho azul" (*Peronospora tabacina* Adam), a la "pata prieta" (*Phytophthora parasítica* var. *nicotianae*) y a los nemátodos especie (*Meoidogyne Incógnita*), y de alto rendimiento, las que se compararon con la comercial 'Speight G-28'. Como resultado de este estudio se obtuvieron nuevas variedades de tabaco, con excelente maduración, poco desarrollo de yemas axilares, potencial de rendimientos superiores a los 2000 kg/ha y un 80 % de calidad exportable.

Nuevas líneas de tabaco negro para la producción de capas, resistentes a las principales enfermedades.

Vivaldo García Morejón, Nancy Santana Ferrer, Humberto García Cruz, Emis Mena Padrón
Colaboradores: José A. Ivizate Torres, Rodolfo Maestre Morejón, Rita M. Carballó.

Resumen

En la Estación Experimental del Tabaco de San Juan y Martínez, Pinar del Río durante la campaña tabacalera 2001-2002, se realizó el cruce de 'Criollo 98' / 'Habana 2000' // 'Corojo 99' / 'L 17', con el objetivo de obtener una variedad de tabaco negro, con mayor rendimiento en capas que la comercial 'Criollo 98', resistente al moho azul (*Blastomyces tabacina* Adam), a la pata prieta (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*), al virus del mosaico del tabaco (VMT) y a la necrosis ambiental. Después de cinco generaciones de autofecundación y selección por el método genealógico se obtuvieron 19 líneas resistentes, entre las que se destacaron las 'L 8', 'L 9' y 'L 13' por producir mayores rendimientos en capas para torcidos de exportación.

Use of green fluorescent protein for studying the *Mycosphaerella fijiensis*-banana interaction.

Orelvis Portal³, Mayra Acosta¹, Aminaél Sánchez Mileidy Cruz¹, Frank J. Mai², Wilhelm Schäfer², Monica Höft² and Elio Jiménez¹

¹ Institute of Plant Biotechnology. Central University 'Marta Abreu' of Las Villas, Santa Clara, Cuba.

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

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

E-mail: orelvis@ibp.co.cu

Abstract

Mycosphaerella fijiensis Morelet (anamorph *Pseudocercospora fijiensis*) is the causal agent of the most destructive foliar disease of banana and plantain worldwide, well-known as Black Sigatoka. *M. fijiensis* induces foliar leaf streaks which, in highly susceptible cultivars, lead to the total collapse of the plant. Since the knowledge of the host colonization process of this fungus is still insufficient, we have attempted to characterize *Mycosphaerella fijiensis* GFP mutants that can be used as an alternative tool for histological studies of the pathogenic process in banana. The highly aggressive isolate CCIBP-Pf-83 and the plasmid pIG-PAPA, carrying the gene that encodes for the green fluorescent protein (GFP), were used for the transformation procedure by using an own PEG based methodology. The pathogenicity of four selected mutants showing the prospective phenotype of GFP expression was evaluated on artificial inoculation experiments with plants from the susceptible banana cultivar 'Grande naine'. Mutant CCIBP-Pf-GFP-40 showed the same infection pattern similar as the wild type after infection assays with other banana and plantain cultivars i.e. 'Yamgambi km5', 'FHIA 21' and 'Calcutta 4'. Monitoring of the GFP expression was performed in all the stages of the infection process in susceptible and resistant cultivars.

Keywords: GFP, fungal interaction, banana and plantain, transformation, *M. fijiensis*.

Reacción frente al carbón (*Sporisorium scitamineum* (Syd) M. Piepenbr., M. Stoll & Oberw.) y la roya (*Puccinia melanocephala* H and P Sydow) de un grupo de 10 nuevas variedades de caña de azúcar (*Sacharum officinarum* L) estudiadas en la EPICA de Camagüey.

M.Sc. Montalvan, J; F. Valladares; M.Sc. Isabel torres; J. Vallina; Y. Fernandez e Ivía Pouza.

Estacion Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Camagüey.

E-mail: montalval_cmga@inica.edu.cu

Resumen

Las investigaciones se realizaron en área de la Estación Provincial de Investigaciones de la caña de azúcar de Camagüey sobre un suelo pardo con carbonatos en el periodo comprendido por los años 2000-2002. Se comprobó la resistencia frente a las enfermedades del carbón y la roya de un grupo de nuevas variedades de caña de azúcar (C88-356, C89-372, C89-381, C90-390, C90-388, C91-254, C91-356, C91-362, My5778 y My5776) utilizando para ello patrones de reacción conocidos en área las dos enfermedades. Se evaluaron parámetros relacionados con cada una de las enfermedades así como se analizaron las variables climáticas durante el periodo. Se utilizaron técnicas de regresión y análisis multivariado para definir comportamiento varietal e influencia de las condiciones ambientales en la manifestación de las dolencias. Casi la totalidad de los individuos tuvieron comportamiento aceptable ante las enfermedades estudiadas a excepción de la C91-362 que se comportó como susceptible al carbón. Las variables climáticas, fundamentalmente las temperaturas presentadas, tuvieron poca influencia en la manifestación de las enfermedades estudiadas.

Palabras claves: Enfermedades, caña de azúcar, carbón, variedades.

Indicadores de desarrollo y su influencia en el rendimiento industrial de tres variedades de caña de azúcar.

Isabel Torres¹, F. Valladares¹, E. Ortega², J. Vallina¹, J. Montalbán¹, Y. Fernández

1. Estación Provincial de Investigaciones de la caña de azúcar.

2. Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Laboratorio de Fisiología Vegetal.

Email: itorres_cm@inica.edu.cu

Resumen

Tomando como base experimental dos ensayos de campo ubicados en la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Camagüey (INICA-MINAZ), se realizó con muestreos periódicos el análisis de crecimiento en las variedades comerciales de caña de azúcar: C1051-73, My5514 y C86-12, para ello se calcularon once indicadores de desarrollo, Área Foliar, Tasa de Crecimiento del Cultivo, Índice de Área Foliar, Duración del Área Foliar, en edades que oscilaron según la fecha de plantación entre los 279 y los 480 días, además de determinar a las mismas edades los indicadores del rendimiento industrial el brix y el porcentaje de pol en caña. La evolución temporal de estos indicadores, muestra características similares a cada cultivar, expresadas según el desarrollo de índices foliares, de asimilación de nitrógeno y de persistencia de la vitalidad así como otras características relacionadas con la edad y los ciclos de plantación.

Palabras claves: Caña de azúcar, análisis de crecimiento, rendimiento industrial.

Evaluación temprana de la respuesta de genotipos de *Musa* mediante la inoculación artificial de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

Michel Leiva Morá¹, Yelenys Alvarado Capó¹, Mayra Acosta Suárez¹, Mileidy Cruz Martí¹, Berkis Roque Morales¹ y Cynthia Sánchez

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Cuba. Carretera a Camajuaní Km 5.5. CP 54 830.

e-mail: michel@ibp.co.cu

Resumen

El área dedicada al cultivo de bananos y plátanos en Cuba, es cercana a las 123 030 ha con una producción de 284 800 (bananos) y 610 010 (plátanos) toneladas. La presencia de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, causante de la enfermedad conocida como rayado negro

de la hoja ha ocasionado grandes pérdidas. En el presente trabajo se evaluó tempranamente la respuesta de diferentes genotipos de *Musa* mediante la inoculación artificial de *M. fijiensis*. Como estructuras infectivas se utilizaron suspensiones conidiales con una concentración aproximada de $5 \times 10^6 \text{ con. ml}^{-1}$. Como material vegetal se utilizaron seis líneas genéticamente modificadas del cultivar Grande naine (GE 58-26 GE 59-6 GE 59-7 GE 59-20 GE 59-25 GE 91-17), además se utilizaron plantas de los cultivares Grande naine (AAA) control, Yangambi km5 (AAA), FHIA-18 (AAAB), Calcutta (AA), Pisang lilin (AA). Una suspensión de conidios con una concentración de $5 \times 10^6 \text{ con. ml}^{-1}$ se utilizó para el proceso de inoculación artificial. La inoculación fue realizada con un pincel sobre el envés de las tres hojas más jóvenes totalmente extendidas. Las variables: periodo de incubación, evolución de la enfermedad en el tiempo, período de latencia asexual, número de lesiones necróticas, área de lesiones necróticas, porcentaje del área con síntomas en estadios 3 y 4 a los 49 días y porcentaje del área necrosada a los 63 días fueron utilizadas para evaluar la respuesta de los diferentes genotipos. Los cultivares Calcutta y Pisang lilin solo lograron formar manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el envés de las hojas, sin observarse síntomas por el haz. En los cultivares Yangambi Km 5 y FHIA se observaron los mismo síntomas pero claramente visibles por el haz de las hojas inoculadas, con la particularidad de observarse senescencia pronunciada en las hojas inoculadas del cv Yangambi Km 5. Las líneas genéticamente modificadas mostraron manchas de color pardo-rojizas y manchas negras (elípticas o redondeadas) con bordes cloróticos y halo acuoso. Finalmente en el control Grande naine se observaron manchas negras con centros secos grises, las cuales en ocasiones ocuparon toda la superficie de las hojas. En el análisis de la evolución de la enfermedad en el tiempo se logró observar la respuesta diferencial de los cultivares referenciados respecto a las líneas transgénicas y estas a su vez en comparación con el control Grande naine. A los 49 se observaron diferencias entre los genotipos evaluados respecto al porcentaje del área con síntomas correspondiente al estadio 3 y 4 de modo similar sucedió con el porcentaje del área necrosada a los 63 días. Respecto al tiempo de germinación de estructuras asexuales, en los genotipos que las desarrollaron, se observaron diferencias significativas al igual que el número de lesiones necróticas y en el área de las lesiones. En el presente trabajo se demostró la utilidad de diferentes variables epidemiológicas y cuantitativas que permitieron evaluar y diferenciar tempranamente la respuesta de genotipos de *Musa* mediante la inoculación artificial de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

Palabras claves: evaluación temprana, inoculación artificial, variables epidemiológicas, variables cuantitativas, genotipos de *Musa*.

Algunos avances en el comportamiento de vitroplantas de teca (*Tectona grandis* L. F) en condiciones de campo

Ramos L., N. Cruz, M. Daquinta., J. Gonzalez Olmedo., N. Rodriguez., J. Morante. Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), Ecuador y Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Avila (UNICA), Cuba. Biocnologia@uteq.edu.ec miqluisramos@yahoo.es justo@bioplantas.cu cumdaquinta@bioplantas.cu

Resumen

La teca (*Tectona grandis* L. F), árbol natural del sureste asiático que se cultiva en todas las áreas tropicales del mundo. Su madera es resistente a plagas, muy usada en la construcción naval, mobiliario de jardinerías, carpintería, decorados interiores y exteriores. El establecimiento de áreas experimentales para evaluar el comportamiento de las plantas que se obtienen por medio del cultivo de clones, es necesario para conocer ciertas características fenotípicas y genotípicas que las plantas muestran en condiciones de campo.

El objetivo general fue determinar el comportamiento silvícola de las vitroplantas de *Tectona grandis* L. F., en condiciones de campo. Además se tomaron plantas provenientes de la reproducción por semillas (tocones) para utilizarla como punto de referencia con respecto a las vitroplantas y así poder comparar el comportamiento en altura, diámetro, área basal y volumen. Las parcelas de campo se establecieron en la finca experimental "La Represa", perteneciente a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. Las vitroplantas utilizadas fueron propagadas en el Laboratorio de biotecnología de la UTEQ. Tanto las vitroplantas como los tocones (plantas a raíz desnuda) tenían una edad de ocho meses ante del establecimiento. Se distribuyeron en dos parcelas, con un distanciamiento entre planta de 4 x 4 m. Se utilizó un diseño completamente al azar con dos tratamientos y con 48 repeticiones por tratamiento, cada repetición es una unidad experimental. En los ocho semestres evaluados las vitroplantas se obtuvieron el mayor incremento en diámetro, altura, área basal y volumen respecto a las plantas obtenidas por tocones.

Palabras Claves. Vitroplantas, establecimiento en campo, tocones, diámetro, altura

Actividad antifúngica de metabolitos bacterianos frente a *Mycosphaerella fijiensis*.

Mileidy Cruz ^{1*}, Cynthia Sánchez Yelenys Alvarado, Mayra Acosta, Michel Leiva, Berkys Roque.¹

1. Instituto de Biotecnología de las Plantas PIRE Carretera a Camamjuaní, Km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

Resumen

El control biológico de Sigatoka negra ha recibido poca atención propiciado quizás por la efectividad de los fungicidas químicos así como por el poco interés en financiar proyectos para buscar métodos alternativos de control. Sin embargo, la aparición de cepas de *Mycosphaerella fijiensis* menos sensibles o resistentes a los fungicidas químicos tradicionalmente usados así como el incremento mundial de las demandas por las medidas de bioseguridad ha propiciado un aumento en el interés de encontrar alternativas biológicas para el control. El presente trabajo tuvo como objetivo: aislar e identificar bacterias con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* mediante la secreción de metabolitos, extraerlos, purificarlos y caracterizarlos así como evaluar su actividad *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*. Los aislamientos se realizaron de la filosfera de hojas de bananos y plátanos mediante el método de dilución seriada. Los ensayos de actividad antifúngica fueron llevados a cabo según el método de cultivo. Las cepas bacterianas sin actividad fueron eliminadas, aquella con la que se obtuvo mayor halo de inhibición en el crecimiento fúngico fue caracterizada morfológica y bioquímica y se seleccionó para los restantes ensayos. Se estandarizaron dos métodos para determinar actividad antifúngica de metabolitos bacterianos frente a *M. fijiensis*. Para la caracterización de la actividad antifúngica se determinó la producción de compuestos difusibles. Los metabolitos excretados al medio de cultivo fueron sometidos a precipitación con sulfato de amonio y posteriormente dializados. Se determinó la concentración total de proteínas y se seleccionó el porcentaje de saturación con sulfato de amonio al que precipitó la mayor concentración de proteínas para los experimentos siguientes. Se comprobó la actividad antifúngica en todas las etapas de purificación de los metabolitos mediante el método de Dilución en Agar. Se le realizó además, el ensayo de hemaglutinación, como el efecto de la temperatura en la actividad antifúngica. De los aislados bacterianos obtenidos fue seleccionado el aislado CCIBP-B.1, ya que exhibió un marcado efecto inhibitorio del crecimiento del aislado de *M. fijiensis* y se identificó como perteneciente al género *Brevibacterium*. Los compuestos exudados al medio de cultivo por CCIBP1 mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *M. fijiensis*. La mayor concentración de proteínas se alcanzó con un 70 % de

saturación con sulfato de amonio. Se determinó que la solución resultante de esta precipitación mantenía su actividad antifúngica y no se observó hemaglutinación de la muestra frente a ninguno de los dos tipos de eritrocitos humanos y mantuvo su efecto inhibitorio cuando se le aplicó calor a los metabolitos. Estos resultados sugieren una excreción por parte de CCIBP-B.1 de metabolitos antifúngicos y su posible naturaleza protéica. Estos compuestos pudieran emplearse para la obtención de un bioproducto para el control de Sigatoka negra. Además esta cepa, pudieran ser utilizadas para la obtención de genes para la transformación genética de plantas para la resistencia a Sigatoka negra así como para la inducción de resistencia.

Palabras claves: Metabolitos antifúngicos, Sigatoka negra, *Fusicoccum*

Characterization of a NAC transcription factor expressed during a non compatible interaction *P. melanocephala*-sugarcane.

María I. Oloriz¹, Luis Roja¹, Víctor Gil², Aminael Sánchez¹, Elio Jiménez¹ and Orelvis Portal

¹ Institute of Plant Biotechnology. Central University 'Marta Abreu' of Las Villas, Santa Clara, Cuba. Street to Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830

² Agriculture Research Center. Central University 'Marta Abreu' of Las Villas, Santa Clara, Cuba. Street to Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830

Abstract

NAC proteins constitute one of the largest families of plant-specific transcription factors. The NAC family has been implicated in diverse processes, including defence and abiotic stress responses. However, only a proportion of the NAC proteins have been studied to date. In an effort for a better understanding of sugarcane defence mechanisms in response to *P. melanocephala* infection, a subtractive library (SSH) was constructed from sugarcane rust resistant mutant IBP8518. A NAC partial sequence of 479 pb was identified and annotated according to BLAST nucleotide and protein alignments available at www.ncbi.nlm.nih.gov. This sequence was orthologous to *Zea mays* (AY103586). The putative peptide contains a NAC domain similar to the consensus NAC domain with an E-value equal to 10⁻¹⁰, typically of conserved N-terminal region of this family. Expression analysis survey was performed by means of RT-PCR in sugarcane mutant leaves infected and not infected with *P. melanocephala*. This gene was found to be differentially expressed in the resistant mutant at early stage of the infection with *P. melanocephala*. This result helps to gain knowledge about the physiological and molecular functions of NAC proteins and its role in the complexities of transcription factor networks during plant defence mechanism of sugarcane.

Key words: NAC transcripts, mutant, up-regulated, defence

Actividad fitotóxica y proteínas microbianas en filtrados de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1 y raza 2.

Nayanci Portal González¹), Bárbara Companio², Christelle Achade¹, Beaufray Mvilá¹, Mayda Arzolá¹, Mayra Acosta Suárez², Cinthia², Michel Leiva Morá², Belkis Roque², Yelenys Alvarado Capó², Ramón Santos Bermúdez (*) Autor para correspondencia.

¹ Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 1/2. Ciego de Ávila nayanci@agronomia.unica.cu, nayansi@bioplantas.cu

² Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 1/2. Ciego de Ávila.

³ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Carretera a Camajuani km 51/2. Santa Clara. Villa Clara.

Resumen

El marchitamiento de plátano o enfermedad de Panamá causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* es una de las enfermedades de mayor importancia económica y dañina del género *Musa* (Pérez, 2004). El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar la actividad fitotóxica y las proteínas totales de filtrados de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 y raza 2 que permita el empleo de moléculas señales producidas por el patógeno para la selección precoz de cultivares resistentes en el marco de programas de mejoramiento genético del cultivo, así como para el diseño de nuevas estrategias de mejoramiento basadas en la ingeniería genética y la biotecnología. Se evidenció que *oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (GCV 01210) y raza 2 (GOM24) producen los mayores niveles de actividad fitotóxica extracelular en la fase logarítmica de su crecimiento. Se observaron cuatro momentos fundamentales de excreción al medio de metabolitos con actividad fitotóxica durante el cultivo de *oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1, cuyos momentos centrales coinciden con los 7, 14 y 28 días, mientras que la evaluación de la actividad fitotóxica de los filtrados de cultivos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2 sugiere la excreción al medio de metabolitos fitotóxicos desde momentos tempranos del cultivo del microorganismo en Caldo Czapek bajo las condiciones establecidas y durante todo su crecimiento, aunque el screening diferencial frente a cultivares resistentes y susceptibles evidencia seis momentos de síntesis, en tres de ellos se evidencia una actividad biológica diferencial entre cultivares resistentes y susceptibles, lo cual requiere del análisis químico de estas fracciones por HPLC. A partir de los 11 días Foc raza 1 es capaz de excretar al medio de cultivo moléculas de naturaleza proteica con varios patrones de excreción y máximos en los 13, 16, 19, 21, 24 y 28 días. Aunque los mayores niveles se alcanzaron a los 13 días con valores de 1.698 mg mL⁻¹ la excreción de proteínas al medio de cultivo por el aislado de Foc raza 2 comenzó a partir del día 5 manteniendo valores por encima de 0.448 mg mL⁻¹ y alcanzando la mayor concentración el día 21 con valor de 0.826 mg mL⁻¹.

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

Avances De Investigación En Biofertilizantes Bacterianos En Venezuela.

López Marisol, M. Navaš, M. Padrinó, E. Rivaš, L. Velásquez A. Millani¹, N. Alfonso¹, R. Colmenarez¹, A. Alva¹, G. Medina, R. Martínez-Viera, M. Brossar, H. Pereira, R. M. Hernández². ¹= Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) MAT-Convenio Cuba Venezuela. ²=UESR-DECIT. Venezuela. email: mlopez@inia.gob.ve

Resumen.

Las prácticas, tecnologías, modelos desarrollados e implementados para incrementar la producción de alimentos y satisfacer las necesidades humanas, han generado impactos negativos sobre los recursos naturales y el ser humano, generándose degradación a diferentes niveles y entidades (suelo, agua, flora, fauna, aire, ser humano) afectando la calidad de vida de la población y la biodiversidad. Además, la producción industrial de fertilizantes nitrogenados tiene un alto impacto económico, generado por el consumo elevado de energía (1,3 Tn de combustible para producir 1 Tn de nitrógeno). Venezuela

posee gran potencialidad agrícola, diversidad de agroecosistemas y condiciones agro ecológicas que permiten desarrollar sistemas agrícolas diversificados. Sin embargo, el 70 % de los suelos poseen como primera o segunda limitación fertilidad y acidez, lo que hace necesario dirigir esfuerzos a mejorar la capacidad productiva de los suelos y la sustentabilidad de los agro sistemas. Entre las prácticas que promueven la calidad del suelo, se visualiza el uso combinado de abonos orgánicos, inorgánicos y biológicos, variando la proporción de cada uno de acuerdo al sistema de producción y las condiciones edafoclimáticas. Los biofertilizantes constituyen una tecnología “apropiable” por ser técnicamente viable dentro del nivel técnico-científico, ambientalmente seguro, socioeconómico y culturalmente aceptable, cumpliendo con las dimensiones de la sustentabilidad. En el INIA, a través del proyecto: ID-ARA-05-710 y en cooperación con el MAT- convenio Cuba-Venezuela se han adelantado investigaciones con la finalidad de evaluar el potencial de simbiontes y organismos asociativos nativos para ser usados como insumos biológicos o biofertilizantes en agro sistemas venezolanos, a través de prácticas de manejo conservacionistas e inoculaciones directas al suelo. Este trabajo se inició sobre la base de proyectos previos conducidos por diferentes equipos de investigación en el INIA, partiendo de un banco de 47 cepas de rizobios (*Phaseolus vulgaris*, *Vina unguiculata* y *Glycine max*, vulgaris, *Glycine max*, *Centrocema*, *Desmodium* y *Stylosantes*) y 16 cepas de *Azolla anabaena*. En los últimos 2 años, han ingresado al banco, 18 cepas de rizobios y 50 cepas de microorganismos asociativos provenientes de diferentes condiciones agroecológicas del país. Hasta el momento se dispone de un banco de 132 cepas, las cuales se encuentran en diferentes fases de evaluación y caracterización. Las cepas de vida libre colectadas están conformadas por hongos bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo y estimuladoras del crecimiento. Las cuales han sido evaluadas en leguminosas de grano comestible (*Vina unguiculata* y *Phaseolus vulgaris*), maíz, tomate, pimentón y papa en condiciones de invernadero y campo. Se han seleccionado las mejores cepas de *Azotobacter* sp, *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* con alto potencial para fijar nitrógeno y solubilizar fosforo. Se avanza en la evaluación de sustratos (cascarilla de arroz, cachaza, turba y gallinaza), así como la evaluación de medios de cultivo. Se tiene una gran potencialidad para ser utilizados como biofertilizantes en el país. Se partió de 47 cepas de *Rizobium* (para especies de *Centrocema*, *Desmodium* y *Stylosantes*, *Phaseolus*, *Vina unguiculata* y *Glycine max*) y una colecta de *Azolla anabaena*, colectadas a nivel nacional por investigadores del INIA- CENIAP. Las cepas aisladas y evaluadas en el marco del subproyecto enriquecen el banco de cepas de simbiontes y organismos asociativos provenientes de diversos agroecosistemas del país.

Palabras claves: biofertilizantes, rizobios, solubilizadoras de fósforo, fijación biológica de nitrógeno.

Influencia de características físico-químicas de derivados de quitosana en la inducción de respuestas defensivas en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y su protección contra *Phytophthora nicotianae*.

Alejandro Falcón¹, Juan C. Cabreza², Daimy Costales¹, Miguel A. Ramírez¹, Miguel A. Martínez², Irasema Vargás³, Socorro Vallejo³, Olivia Briceño³

¹ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), La Habana, Cuba

² Universidad Notre Dame de la Paix, Namur, Bélgica.

³ Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Hermosillo, Sonora, México

Resumen

Derivados de quitosana (polímeros homogéneos de glucosamina unidos por enlaces β 1-4) obtenidos a partir de quitina de exoesqueleto de langosta cubana confieren protección en plántulas de tabaco contra la Pata prieta causada por *Phytophthora nicotianae*, el principal patógeno del tabaco comercial cubano en este semillero. Por primera vez se estudia el efecto que ejercen las características de quitosana, grado de acetilación (GA) y masa molecular (MM) en el desarrollo *in vitro* de un representante del género *Phytophthora*. En experimentos *in vitro*, se demostró el efecto del GA y la MM de diferentes derivados de quitosana sobre la inhibición directa del crecimiento micelial y la germinación de zoosporas del patógeno. Los resultados demostraron que la reducción del GA en el polímero de quitosana beneficia la inhibición del crecimiento micelial y la germinación de esporas de *nicotianae*, mientras que la reducción de MM del polímero hasta una mezcla de oligosacáridos con grado de polimerización entre 5 y 9 mantiene la inhibición del crecimiento micelial en relación con el polímero de origen. En este trabajo se estudió también por primera vez el efecto de ambos parámetros de la quitosana sobre la activación de indicadores defensivos y la inducción de resistencia sistémica en plantas de tabaco. En bioensayo, donde los derivados se aplicaron en diferentes formas y momentos a las plantas, se demostró el efecto de ambos parámetros en la inducción de proteínas defensivas (Glucanasas, PAL y POD) en hojas de plántulas de tabaco. Sin embargo, los resultados de activación variaron con la concentración y forma de aplicación de los derivados, observándose un efecto de las propiedades físico-químicas de la quitosana cuando se entregaron por aspersión foliar a las plántulas. La protección de las plantas contra la infección por *P. nicotianae* varió también con la forma de aplicación de los derivados, pero estuvo en correspondencia con los mayores incrementos de actividad PAL y glucanasa en las hojas de las plantas. Los resultados justifican la posibilidad de incluir derivados de quitosana, con las características químicas descritas, como compuestos activos en productos para la protección de cultivos contra sus principales patógenos a escala de semilleros.

Palabras clave: quitosana, tabaco, *Phytophthora nicotianae*, resistencia.

Control Biológico de *Botrytis cinerea* usando el hipovirus heterólogo CHV1-EP713

Jeldres, O. y Castillo, A.

Laboratorio de Virología de Hongos, Departamento de Biología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. Casilla 40, Correo 33, Santiago, Chile. E-mail: ojeldres@lauca.usach, acastill@lauca.usach

Financiado por DICYT-USACH

Resumen

Los micovirus de RNA de doble hebra (dsRNA) del género *Hypovirus* están asociados a la atenuación de la virulencia del hongo hospedador, proporcionando las bases moleculares para el control biológico de enfermedades fúngicas en plantas. El genoma del hipovirus CHV1-EP713, que infecta a *Aryphonectria parasitica*, corresponde a una molécula de dsRNA lineal de 12.7 kilopares de bases (kpb). Evidencia experimental reveló que es posible transfectar con transcritos sintéticos y transformar con un vector de expresión que contiene el cDNA de CHV1-EP713, hongos filogenéticamente relacionados con *A. parasitica* estableciéndose la infección en ellos con una drástica disminución de la virulencia de las cepas fúngicas transfectadas y transformadas. Estos resultados demuestran que es posible ampliar el rango de hospederos para hipovirus y proporcionan alternativas para la elaboración de estrategias para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Botrytis cinerea* es un hongo fitopatógeno que infecta un amplio rango de

hospedadores vegetales provocando la enfermedad conocida como pudrición gris. Usando transcritos sintéticos heterólogos obtenidos a partir del cDNA del hipovirus CHV1-EP713, se transfectaron esferoplastos de *B. cinerea*, logrando una infección estable y permanente. La presencia del micovirus se determinó purificando el dsRNA, correspondiente a su genoma, por cromatografía en celulosa CF11. El grado de virulencia de la cepa transfectada se determinó midiendo la actividad de la enzima, mediante la oxidación de 2,6-dimetoxifenol y ácido gálico. Estos resultados revelaron que la presencia del micovirus provoca una disminución en la actividad de la enzima. También se midió la tasa de esporulación y se realizaron bioensayos de virulencia en hojas de plantas de poroto. Ambos ensayos revelaron que no existirían diferencias significativas en la tasa de esporulación y el daño producido sobre el tejido vegetal. Estos resultados establecen antecedentes importantes para el empleo de micovirus heterólogos para el control biológico de *B. cinerea*. La caracterización de nuevos hipovirus endógenos de *B. cinerea* podría proporcionar mejores herramientas y formas de control biológico de este importante hongo fitopatógeno que afecta económicamente la producción agrícola de nuestro país.

Palabras claves: Control Biológico, hipovirus, *Botrytis cinerea*.

Separación y colecta de esporas de *Trichoderma harzianum* cepa A-34 obtenidas sobre sustrato sólido mediante dos métodos: lecho fluidizado y ciclón dual y por tamizaje vibratorio.

Autores: Orestes Elósegui Clari, Orietta Fernandez-Larrea, Enrique Poncé Grijuela, Giovanni Borges Mariñ, Luciano Rovesti, Jesús Jiménez Ramos

1- Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Gaveta Postal 2734, CP 11600, La Habana. Cuba. CP 11600. E-mail: elosegui@inisav.cu

2- E.mail: lrovesti@libero.it

Resumen

Trichoderma harzianum cepa A-34 se usa ampliamente en Cuba como antagonista contra diferentes hongos fitopatógenos como *Monosporium solani*, *Sclerotium rolfsii*, especies de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* en papa, tomate, tabaco y otros cultivos como resultado de estudios exitosos en condiciones de laboratorio y campo. En la actualidad, se realizan investigaciones en Cuba con esta cepa para obtener nuevos formulados con una vida en estante de 18 meses que a la vez sean compatibles con las técnicas convencionales de aplicación. Uno de los aspectos críticos es contar con los métodos adecuados para separar las esporas del sustrato en que son desarrolladas. En este trabajo se describe la separación de esporas de *T. harzianum* cepa A-34 desarrolladas sobre un sustrato compuesto por arroz y cáscara de arroz mediante dos métodos: lecho fluidizado y ciclón dual y por tamizaje vibratorio. Con el primer método, después de 20 minutos de cosecha, solo se obtuvieron el 2.2 % de las esporas totales, debido a la destrucción de los filtros con la cáscara de arroz, a una concentración de 3.6×10^8 spores/g. En contraste, por tamizaje vibratorio, el 29.7% de las esporas totales se colectaron después de 20 minutos de cosecha, a una concentración final de 4.5×10^9 spores/g, cuando se realizó el tamizaje con un único tamiz de 209 μ m. En todos los ensayos, las esporas concentradas tuvieron una viabilidad mayor del 85% y un nivel de contaminantes menor que 1 UFC/g, los que están dentro del rango permisible establecido en nuestro laboratorio y en laboratorios líderes a nivel internacional para productos a base de hongos para uso agrícola.

Estandarización De Procesos Biotecnológicos Para La Producción Sólida De *Bacillus Thuringiensis* En Venezuela.

R. García*, M. Durán* y M. Márquez**. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Avenida Urdaneta. Sede del MAT. Edif. INIA. Mérida, Venezuela. Email: rgrespo@inia.gov.ve. **Instituto Nacional de Investigaciones Sanidad Vegetal. La Habana, Cuba. Email: mmarquez@inisav.cu

Resumen

Debido a las nuevas políticas de estado, en Venezuela actualmente existe un marcado interés por aplicar estrategias de manejo no contaminantes que incluya el empleo de bioplaguicidas para el control de insectos plagas, con énfasis en el Orden Lepidóptero; el cual ha venido desarrollando resistencias a bioplaguicidas sintéticos usados como única medida de control del mismo. Con el objeto de desarrollar un insecticida biológico con base a la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis*, se realizó un trabajo de investigación para estandarizar el proceso de producción. El anterior, se inició partiendo de una cepa a la que le fue evaluada su actividad patogénica y virulenta contra *Plutella xylostella* y *Spodoptera frugiperda* (100% de eficacia), luego se desarrollo el protocolo de producción por fermentación sólida artesanal. Se evaluaron diferentes tipos de sustancias enriquecedoras del arroz al 3% granos partidos como sustrato alimenticio: harina de soya, extracto de levadura y levadura panadera y, se estandarizó los parámetros de pH, humedad y tiempo de esterilización del sustrato; así como varios tipos de fermentadores. Los resultados indicaron que todos los sustratos usados produjeron una alta concentración de esporas y cristales que ascendió a 10^{10} esporas/ml; pero el extracto de levadura mantuvo alta estabilidad en los mismos. De esta manera el proceso de producción masiva se realizó con el uso de la combinación alimenticia arroz + extracto de levadura dentro de bolsas de polipropileno. En el proceso de producción, se estableció un sistema de control de calidad, desde la selección de la cepa, hasta el producto final; donde la cepa presentó una concentración promedio de 1.92×10^9 esporas/ml y una viabilidad de 3.35×10^9 ufc/ml; el inóculo tuvo una concentración promedio de 1×10^9 esporas/ml, con una viabilidad de 7.9×10^8 ufc/ml y, la concentración del producto final fue de 2.3×10^{10} esporas/ml promedio. Estos valores se encuentran dentro del rango óptimo para la producción de la bacteria, bajo este sistema de producción. Para corroborar la calidad del biopreparado, se realizaron pruebas de pureza, concentración, viabilidad y de eficacia con el establecimiento de bioensayos en laboratorio demostrando una pureza de 100%, concentración 2.3×10^{10} esporas/ml, alta efectividad contra *Plutella xylostella* y *Spodoptera* logrando una mortalidad de larvas de 100% entre 24 horas para la primera y entre 72 horas a cinco días para las segundas, después de haber sido inoculadas. En campo se ha probado contra *P. xylostella* en crucíferas y *Neolocinodes elegantalis* en pimentón y tomate, mostrando alta eficacia con una reducción de la incidencia de la plaga en más de un 25% con respecto al testigo. Actualmente el producto con base a Bt, se encuentra en proceso de registro bajo el nombre de Bactinia envasado en bolsas aluminizadas en cantidad de 500 g bajo una concentración de 5×10^{10} esporas.

Palabras claves: Producción de bioplaguicidas *Bacillus thuringiensis*, Estandarización de procesos de producción sólida.

Identificación de 6 poblaciones de *heterorhabditis* sp mediante el uso de marcadores moleculares rapid.

Efraín Salazar¹, Erick Marín¹, Ligia Carolina Rosalés², Mayra Rodríguez², Roberto Enrique², Zoraida Suárez H., Liliana Puente¹. ¹ INIA - Centro Nacional de investigaciones Agropecuarias. Zona universitaria vía El Limón. Edificio 09 Maracay 2101. Venezuela. ² Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La Habana, Cuba. e-mail: esalazar@inia.gov.ve

Resumen

Los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* incluyen una gran cantidad de especies entomopatógenas y han sido detectados en numerosas regiones de todo el mundo. Son patógenos de insectos con un amplio rango de hospedantes presentando la ventaja de poder ser reproducidos masivamente en medios sólidos o líquidos. Así mismo han controlado numerosos insectos plaga, siendo inocuos para otros animales y el ambiente. En Venezuela han sido aisladas poblaciones de *Heterorhabditis* en distintas zonas del país, las cuales han sido clasificadas morfológicamente. A fin de establecer la variabilidad genética de las poblaciones, se han utilizado los patrones RAPD para caracterizar seis poblaciones de nematodos aisladas en diferentes regiones de Venezuela. Para tal fin, se aisló el ADN genómico de seis poblaciones de *Heterorhabditis spp* en estado juvenil, siguiendo la metodología de Extracción con fenol/cloroformo/mercurio y col., sin el uso de fenol de la solución extractora. Los ADN aislados se amplificaron espectrofotométricamente y la calidad se visualizó mediante separación electroforética en geles de agarosa 0.8%, comparados contra un patrón de calidad conformado por ADN del fago Lambda. Las reacciones RAPD se realizaron en tubos de paredes delgadas, conteniendo 10ng del ADN genómico, 1unidad de Taq Polimerasa, 3mM del iniciador, 1,5µl de buffer de reacción (10X), MgCl₂(1.33mM) BSA (400 µg), dNTPs (0,11mM) en un volumen final de 15µl. Se utilizaron 20 iniciadores de la serie OPA y 20 iniciadores de la serie OPB (Operon technologies). Las amplificaciones se realizaron con un paso inicial de 94°C por 5 min, seguido de 45 ciclos con 93°C por 1', 36°C por 30s' y 72°C por 2', y una extensión final a 72°C por 7'. Las reacciones se mantuvieron a 4°C hasta el momento de la separación electroforética de los productos de amplificación, en geles de Agarosa 1,5%. Las electroforesis se realizaron a 90V (25W) durante 2 h. Los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV previa tinción con bromuro de etidio. Los fragmentos de amplificación se analizaron utilizando el programa Quantity One versión 4.2 en un digitalizador de imágenes Chemidoc de Biorad. Los resultados permitieron obtener un perfil de patrones RAPD característicos para cada población estudiada. Se observó un alto grado de polimorfismo entre las 6 poblaciones, evidenciando un alto grado de variabilidad genética. En conclusión, los patrones RAPD permiten identificar poblaciones de *Heterorhabditis* estableciendo diferencias intraespecíficas entre las poblaciones estudiadas

Palabras claves: Marcadores moleculares, RAPD, *Heterorhabditis*, diversidad genética, nematodos entomopatógenos

Evaluación de fuentes nutricionales en el proceso de fermentación líquida de *Bacillus thuringiensis* en Venezuela.

R. García* M. Durán* y M. Márquez**.

*Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Instituto Nacional de Investigaciones en Sanidad Vegetal, rgcrespo@inia.gob.ve, mduran@inia.gob.ve, enmarquez@inisav.cu

Resumen

La producción de un bioplaguicida a partir de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Bt) requiere de un medio de cultivo que permita obtener una elevada concentración de esporas y cristales proteicos, además que sus componentes resulten económicos y de fácil adquisición para lograr una producción eficiente a gran escala. *Bacillus thuringiensis* requiere para su crecimiento óptimo medios definidos, que contengan fuentes de nitrógeno tales como fosfato de amonio, fuentes de carbohidratos, productoras de energía, tales como dextrosa, una variedad de fuentes inorgánicas que funcionen fisiológicamente como proteínas, ácidos nucleicos y coenzimas. El problema fundamental en la utilización de estos ingredientes radica en que resultan muy caros para

después ser empleados durante el proceso del escalado; por lo que un aspecto a tener en cuenta para disminuir los costos puede ser la sustitución de los componentes del medio por residuos agro-industriales. Una etapa clave para el proceso de escalado es el diseño adecuado de un medio de cultivo apto para el crecimiento, esporulación y formación de cristales. Con el objeto de determinar el uso de diferentes materias primas para la producción por fermentación sumergida de *B. thuringiensis* se evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno económicas, abundantes y de fácil adquisición en el estado Mérida de Venezuela. La metodología empleada fue un diseño de rectángulos ortogonales latinos con una matriz de (3x3), establecida por Biurikov en 1968. Los tratamientos aplicados fueron 9 variantes con diferentes combinaciones de las fuentes de nitrógeno: Harina de soya, levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y harina de maíz. En las corridas se añadieron como fuente de carbono, harina de yuca (5 g/l) y una sal (CaCO₃). Cada variante fue replicada tres veces. Las evaluaciones se realizaron a las 24, 48 y 52 horas, mediante observaciones al microscopio óptico (100X), con tinciones simples de cristal violeta al 0.5%, registrando datos de concentración por conteos en cámara de Neubauer. Al comprobar el efecto de las fuentes de nitrógeno de acuerdo a la determinación de las concentraciones realizadas se puede demostrar que al añadir la harina de soya, implica un efecto positivo, lo cual indica que no es necesario incluirla como fuente de nitrógeno bajo las condiciones de este diseño. Lo contrario de lo anterior sucedió con el nivel 0 de las otras fuentes de nitrógeno empleadas. La concentración de 5 g/l de *Saccharomyces cerevisiae* y 5g/l de la harina de maíz provocaron un efecto positivo en los cultivos de *thuringiensis*, encontrándose una concentración de esporas de 7,35 x 10⁸ esporas/ml y una patogenicidad de 100% en larvas de primera y segunda instar de *Stenotaphrum xylostella* a las 24 horas después de haber sido inoculadas.

Palabras Claves: Producción de bioplaguicidas, *Bacillus thuringiensis*, fermentación líquida, fuentes nutricionales.

Desarrollo De Un Producto De *Bacillus Thuringiensis* Con Efecto Nematicida.

María Elena Márquez, Emilio Fernández*, Eduardo Laguardia*, Rubén Rodríguez Orietta Fernández-Larrea*.

*Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Cuba.

** Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Matanzas (LAPROSAV), Cuba

Resumen.

Entre las plagas que afectan el sector agrícola y ganadero, los nematodos son responsable de pérdidas considerables, valoradas en 100 mil millones de USD anuales. Existe una gran demanda de productos nematicidas tanto a nivel nacional como en el mercado internacional, conociéndose que mayormente son de origen fúngico. Se demuestra la eficiencia de un producto de *thuringiensis* en forma de suspensión concentrada con amplias posibilidades para disminuir poblaciones de *Meroidogyne incognita*. El trabajo llevó una primera etapa en condiciones *in vitro*, que permitió seleccionar cepas que provocaron deformación y detención del proceso embrionario de los huevos. Los juveniles (J2), bajo tratamiento no reaccionaron ante los nematodos luminosos, mostraron vacuolizaciones así como deformaciones en el sistema digestivo. Los criterios de selección fueron la reducción por encima del 80% de la eclosión de las masas de huevos, en comparación al testigo, y la irreversibilidad de este efecto. Solamente una cepa resultó altamente estable, independientemente del origen de la población de nematodos y mostró similar control con todas las fracciones tóxicas ensayadas. Los estudios de caracterización molecular refieren un patrón de proteínas y plásmidos diferentes con relación a las cepas que se emplean en nuestro país para el control de lepidópteros y ácaros. Igualmente se observó una morfología

de cristal poco común, al detectarse un cristal amorfo con inclusiones en forma de barra. El tratamiento bajo condiciones semicontroladas por el método de planta indicadora mostró una disminución significativa de la formación de nódulos con respecto al testigo no tratado. Se sugiere que la actividad nematicida está dada por toxinas intracelulares y extracelulares, aunque las betas exotoxinas termoestables tienen el papel más importante. La efectividad del bionematicida se comprobó en cuatro casas de cultivo con índices de infestación inicial entre 3 y 3.5, donde se evaluó el momento de aplicación sobre suelo ferralítico rojo en el cultivo de tomate. Los resultados alcanzados en condiciones de producción muestran que la aplicación del producto es económicamente rentable y disminuye el costo unitario de producción, lo que hace considerarlo como una alternativa promisorio de uso para la agricultura cubana.

Selection of *Bacillus* strains and other related genera for biological control of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem canker caused by *Rhizoctonia solani* Kühn.

Yaritza Reinoso Pozo¹, Daymara Vaillant Flores², Victoria Pazos Álvarez-Rivera¹, Luis Casadesús Romero¹, Ernesto García Pérez

¹ Facultad de Biología, Departamento de Microbiología y Virología, Universidad de La Habana, Cuba. Calle 25 No. 455 e/ I y J, Plaza de la Reunión, Ciudad de La Habana, CP 10400, email: yreinoso@fbio.uh.cu

² Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Laboratorio de Micología, Cuba. Calle 110 No. 514 e/ 5^a B y 5^a F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600.

Abstract

Damage caused by the fungus *Rhizoctonia solani* Kühn is common in potato (*Solanum tuberosum* L.) crops world wide resulting in reduced yields and poor quality tubers. *S. solani* affects the underground parts of potato plants, damage to sprouts, stems and stolons appear as reddish brown to grey depressed lesions or cankers and sprouts, stems and stolons may be pruned. Soil fumigation with some chemicals can reduce the severity of stem canker and black scurf but is only of benefit if disease free seed or chemically treated seed is planted in the treated soil. The control of *R. solani* is difficult because of the ability to survive as sclerotia under adverse soil environmental conditions for many years in soil, its ability of saprophytic activity, and its extremely wide host range. Particularly in horticulture, no fungicides are registered, and in organic farming, no control methods are currently available. That is why new alternative strategies to control the pathogen are urgently necessary. An environmental friendly alternative to protect plants against soil-borne pathogens as *R. solani* is bacteria-mediated biological control. *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus* species are characterized by their ability to produce a wide range of antibiotics. Many of these *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus* species and their antibiotics have antifungal activity against phytopathogenic fungi and are generally soil-inhabiting microorganisms or exist as epiphytes and endophytes in the spermosphere and rizhosphere. These microorganisms are therefore ideal candidates for use as biological control agents in seed treatment programs against soil-borne pathogens. The aims of this study were to isolate *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus* species from soil, screen these isolates *in vitro* for antagonism against *R. solani* and identify isolates showing promising antagonism. *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus* strains were isolated by dilution and heat treatment of potato soil samples. Bacterial isolates were tested in a dual culture assay against *R. solani*. *In vitro* tests were performed to determine the antifungal effects of metabolites produced by antagonists. Promising bacteria were identified by physiological and API test. Using the technique for the isolation 108 distinct colonies were obtained and 85 of these isolates proved to be Gram-positive, endospore forming, motile, catalase-positive and mostly oxidase-negative rods and 17 isolates inhibited *R. solani*.

mycelia growth. Antifungal metabolites produced by G10 strain produce 100 % of inhibition on *R. solani* growth. All strains, except Q4 and Q5, inhibit over 55 % *R. solani* growth. In this experimental conditions G10, Q15 and Q18 strains produce the best inhibitory effects and were identified as *Brevibacillus laterosporus* G10, *Bacillus subtilis* Q15 and *Brevibacillus laterosporus* Q18. *Brevibacillus laterosporus* have never been used as biological control agent of phytopathogenic microorganisms. Further investigations will be necessary to study the possible use of *Brevibacillus laterosporus* G10 and *Brevibacillus laterosporus* Q18 as biological control agents of plant diseases.

Key words: Biological control, potato, *Rhizoctonia solani*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*.

Efecto de una mezcla de oligosacáridos pécticos en la inducción de resistencia en plántulas de tabaco contra *Phytophthora nicotianae*.

Autores: Daimy Costalés¹ Alejandro Falcóhy Juan C. Cabreña

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), La Habana, Cuba.

²Universidad Notre Damm de la Paix, Namur, Bélgica.

E-mail: daimy@inca.edu.cu

Resumen

Los oligosacáridos pécticos u oligogalacturónidos han sido informados como señales primarias en la activación de un amplio rango de respuestas defensivas en plantas. Sin embargo, aunque se conocen un gran número de estas respuestas activadas por dichas macromoléculas, existen muy pocos reportes de protección de plantas contra patógenos con estos oligosacáridos. En este trabajo se estudió la protección de plantas de tabaco contra el patógeno de suelo *Phytophthora nicotianae* mediante aspersión foliar de una mezcla definida de oligosacáridos pécticos en un bioensayo de infección in vivo. Los resultados de protección demostraron diferencias estadísticas entre la concentración más baja de oligopectatos (0,05 g/L) asperjada, equivalente a un 46% de protección de las plantas respecto al control asperjado con agua; mientras que la concentración mayor de oligopectatos (0,5 g/L) protegió en un 25% las plantas, pero sin diferencias estadísticas con el control. El análisis de frecuencia de diferentes grados de infección alcanzados por las plantas, muestra la presencia de plantas sanas sólo con el tratamiento de menor concentración de la mezcla de oligopectatos. Se determinaron las actividades enzimáticas defensivas en hojas y en raíces de las plantas justo antes de ponerse en contacto con el patógeno (35 DDS). Se demostró incrementos significativos de actividad peroxidasa tanto en hojas como en raíces a 0,5 g/L. Siendo significativo los incrementos de actividad PAL a 0,05 g/L¹ para las hojas y, ambas concentraciones, para las raíces de las plántulas de tabaco.

Palabras clave: Oligogalacturónidos, *Phytophthora nicotianae*, resistencia, tabaco.

Abreviaturas: DDS (Días después de la siembra).

Empleo del aceite esencial de Citronella (*Cymbopogon nardus*) como alternativa para el control de microorganismos.

Cynthia Sánchez Mileidy Cruz¹, Yelenys Alvarado¹ Mayra Acosta¹ Michel Leiva¹, Berkys Roqué¹, Misleidy Pérez y Mildrey Medivilla².

1. Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km.5.5. Santa Clara. Cuba.

2. Laboratorio de Plantas Medicinales, Hotel Escambray. Sancti Spiritus. Cuba.

e.mail: cynthia@ibp.co.cu

Resumen:

Múltiples son las investigaciones que se realizan con el fin de encontrar nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales. Dentro de ellos un considerable número de estudios han sido encaminados hacia la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Para ello generalmente se han empleado técnicas dadas su sencillez y reproducibilidad. Se cree que la producción de aceites esenciales es justificado fundamentalmente como un mecanismo de defensa de las plantas contra patógenos y plagas. Aceites esenciales de varias plantas aromáticas han mostrado amplio espectro de actividad contra microorganismos patógenos de plantas y humanos. El aceite de Citronella es un aceite esencial extraído de las hojas y el tallo de la planta *Cymbopogon nardus*. Está compuesto por Geraniol, Citronellol en un 85% y Citronellal en un 35%. Es un aceite volátil con propiedades antisépticas, desodorantes, insecticidas, parasiticida, tónicas y estimulantes. Se ha demostrado que aceites esenciales de plantas del género *Cymbopogon*, incluyendo a *Cymbopogon nardus* poseen propiedades antimicrobianas por esta razón que este trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cymbopogon nardus* para el control de microorganismos, donde se incluyen contaminantes frecuentes del cultivo *in vitro* de plantas. En este trabajo se utilizaron microorganismos procedentes de la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) Hongos: *Penicillium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Helminthosporium* sp., *Rhizopus* sp. Bacterias *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus aureus*. Se empleó el aceite esencial de Citronella puro, suministrado por el Laboratorio de Plantas Medicinales, Sancti Spiritus, Cuba. Se evaluó la actividad antimicrobiana por los métodos de Difusión en Agar y de Dilución en Agar (MCI) empleando el método de las diluciones seriadas dobles, partiendo de una concentración del 100 % hasta el 0.03%, las diluciones se realizaron en alcohol al 75 %. siguió el esquema de dilución que incluye una dilución final del aceite esencial en el agar a una concentración de 1:10. El aceite esencial de Citronella mostró actividad antimicrobiana frente a los hongos y bacterias seleccionadas expresada en la capacidad de inhibir el crecimiento del 100% de las cepas a las concentraciones ensayadas. Se observó la presencia de una zona o halo de inhibición en todas las cepas analizadas mediante el ensayo de Difusión en Agar. El 75% de las cepas bacterianas fue controlado con una concentración del 0.03 % de aceite de Citronella. El aceite esencial de Citronella es muy explotado comercialmente, es multifuncional, biodegradable, su forma de obtención es relativamente fácil y barata y su composición química bien conocida; por lo que estos resultados pueden constituir un punto de partida para el desarrollo de estrategias para el control de microorganismos a partir de formulados de este producto. Ya sea para su uso en el cultivo de tejidos de plantas así como para el control de microorganismos en general, realizando todas las evaluaciones previas que avalen su uso.

Palabras clave: Citronella, compuestos antimicrobianos, concentración mínima inhibitoria

Sesión 3: Jueves 10 de mayo.

- **Conferencias Magistrales.**

Programa de Mejoramiento Genético en el Centro de Bioplantas.....
J. C. Lorenzo.

La proteómica como herramienta biotecnológica.
Nardi Diez

- **Taller 1: *Proteómica.***

Plant cysteine proteinases, from physiology to applications.....
Carlos Salas.

**Utilización de herramientas proteómicas para la identificación de
proteínas blanco asociadas a la resistencia a plagas en *Phaseolus
vulgaris.***
Carolina Bernal.

**Cistein proteinase from bromeliaceas plants. Similarity and
divergence.**
Martha Hernández.

**Immobilized derivatives from Affinity chromatography and
enzymatic bioconversion. rational design.**
Alberto del Monte.

**Proteasas obtenidas de latex y de extractos de plantas endémicas de
Ecuador.**
Patricio Castillo.

**Penduliflorain I: A new papain-like cysteine peptidase isolated from
Hohenbergia penduliflora stems.**
A. Pérez.

**Biochemical and functional characterization of partially purified
proteolytic obtained from Hohenbergia penduliflora Mez. Stems.....**
C. Carvajal.

**Proteolitic preparation isolated from different species of
bromeliaceas family.....**
M. Mora.

**Development of plants cysteine proteases affinity matrices for
proteinase inhibitors purification.**
E. Salas.

**Biacore-based methodology for the screening of cysteine protease
inhibitory activity in natural sources using papain as model
enzyme.....**
E. Salas et al. A. del Monte.

**Desarrollo de un método para detectar la presencia de cisteín
proteasas en extractos vegetales por medio del análisis de mapas
peptídicos por MALDI-TOF.**
D. Obregón.

Detección automatizada de puntos en geles de 2D-PAGE.
E. Baez.

Changes of protein expression, aminoacids and sugars levels in Arabidopsis leaves induced by ammonium nitrate and elevated CO₂.
Y. Capdesuñer

- **Taller 2: *Mejoramiento.***

Cryopreservation of potato: New Results from the IPK Gatersleben, Germany.
Anja Kaczmarczyk.

Establecimiento de un procedimiento de crioconservación para embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum spp.*).
Marcos Martínez.

Avances en la conservación in vitro de diferentes especies de plantas en el IBP.
Leyanis García.

Germinación de semillas crioconservadas de diferentes especies vegetales.
Luciana Bicca Dodde.

Actualización en el mejoramiento genético del aguacatero (*Persea americana* Mill.) para la resistencia a la pudrición de la raíz y la salinidad en Cuba.
Orlando Coto.

Effect of salinity on the germination and in vitro growth of immature embryos of maize (*Zea mays L.*).
Amelia Capote.

Uso de marcadores moleculares en la caracterización genética de musáceas.
Efrain Salazar.

Estandarización de la técnica RAPD para evaluación de la estabilidad genética de plantas de Piña (*Ananas comosus (L.) Merril*) variedad Española Roja.
Iselén Trujillo.

Asexual propagation and genetics impruvement......
Diógenes Infante.

Identificación molecular de clones de vid de la variedad Syrah......
Liliana Martínez.

Variabilidad de *Agave tequilana* Weber variedad azul encontrada en micropropagación y su exploración a nivel molecular......
Martha I. Torres.

High expression levels of Cry3A toxin in transgenic sweet potato plants confer resistance to sweet potato weevil attack under field conditions.
Rolando Moran.

Biochemical side effects of genetic transformation of pineapple......
Lourdes Yabor.

Enfoque metodológico de los ensayos ambientales de cultivos transgénicos. Estudio del banano y plátano con genes de resistencia a la *Sigatoka negra*.

José Machado.

Aplicación de un sistema de Gestión de Seguridad Biológica en el Centro Bioplantas.

B. valle.

AFLP Characterization of the Mexican and Cuban Pineapple

Germplasm Collections.

E. Yanes.

¿Son las metodologías tradicionales de generación de variedades de tabaco factibles para lograr la resistencia a moho azul desde estadios tempranos de semillero?

H. García.

Use of regression analysis in plant cell, tissue and organ culture experiments.

J.C. Lorenzo.

Research method to perform sequential experiments in plant in vitro culture.....

J.C. Lorenzo.

Statistical tests used in plant biotechnology experiments.....

J.C. Lorenzo.

Establishment of a cryopreservation procedure for somatic embryos of sugarcane.....

M. Martínez.

Protocolo de vitrificación para el establecimiento de un banco de germoplasma de piña (Ananas comosus (L) Merr) criopreservado....

R. Mendez.

Uso de PCR para la detección de Liberobacter sp. en Diaphorina citri colectadas en Venezuela.....

P. Morales.

Obtención de análogos androestéres en variedades de tabaco negro.

E. C. Mena.....

Experimentos de campo en condiciones confinadas con plantas transgénicas de boniato. Resultados de la actividad insecticida.....

B. Usatorres.

Evaluación del efecto del estrés salino sobre el proceso de germinación de Phaseolus vulgaris L. BAT-58.....

Amalia Domínguez

Estudio histológico del proceso de organogénesis in vitro, en Stylosanthes guianensis cv. CIAT-184, bajo condiciones de estrés

salino.....

Maryla Sosa del Castillo.

Evaluación de la actividad enzimática antioxidante en Stylosanthes guianensis cv. CIAT-184, durante el proceso de organogénesis en

condiciones de estrés salino.....

Leticia Fuentes Alfonso.

Estimación de la diversidad genética con marcadores AFLP en el complejo Capsicum (Ajíes y pimientos) conservados in situ en

Cuba.....

Odalys Barrios

Marcadores moleculares empleados en la especie *Vitis vinifera* L. en Argentina.....

Liliana Martínez

Caracterización Molecular De Aislados Venezolanos De Patógenos De Cacao. Estudio Preliminar.....

D. Sosa

Determinación de la técnica de análisis de punta de raíz de plantas nativas de Rio Grande do Sul

criopreservadas.....

Izani B. Acosta

Efecto de temperaturas ultra bajas sobre la actividad bioquímica y fisiológica de semillas de angico-rojo [*Parapiptadenia rigida* (Benth.)]

Brenan.....

Luciana Bicca Dodde.

Evaluación preliminar de la estabilidad genética de plantas in vivo de *Lepidium virginicum*

L.....

Brucato, MG

Caracterización molecular de una colección nucleo de *Xanthosoma* spp. a través de la técnica de

ISTR.....

M. Milian

Utilización de herramientas proteómicas para la identificación de proteínas blanco asociadas a resistencia a plagas en *Phaseolus vulgaris*

Carolina Bernal, Iván Galindo, Delis Perezy Nardy Diez[†]

1 Unidad de Genómica y Polimorfismo genético, Instituto de Biotecnología, Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Carretera Nacional Baruta-Huay, P.O. Box 1081 Sector Monte Elena 1081 Caracas Venezuela.

E-mail: cbernal@idea.gob.ve, igalindo@idea.gob.ve, ndiez@idea.gob.ve

2 Avenida Universidad vía el Limón Apartado 2103 INIA-CENIAP Maracay Estado Aragua Venezuela

Resumen

Los coleópteros de la familia bruchidae representa uno de los mas importantes riesgos que enfrentan los agricultores de *Phaseolus vulgaris*, la infección por esta plaga disminuye el rendimiento de los cultivos y la calidad del grano afectando así la producción y costos de este rubro alimentario que forma parte importante de la dieta tradicional de muchos países. Varios autores han descrito un posible efecto insecticida asociado a la presencia de proteínas de almacenamiento de la familia de las lectinas (Fitohemagglutininas, PHA; Arcelina, Arc; e inhibidor de α -amilasa (α AI), pudiendo ser la presencia de estas una forma muy efectiva para colaborar con el control de plagas que atacan a muchas variedades de *vulgaris* durante su almacenaje. Algunos investigadores han centrado su atención en el análisis de estas proteínas, abordándolas de forma individual, sin tener en cuenta las posibles interrelaciones funcionales que pueden existir entre ellas. El presente trabajo utiliza la proteómica para identificar la presencia de proteínas en diferentes variedades cultivables de *P. vulgaris*, y con el uso de las electroforesis bidimensionales, la inmunodetección de proteínas insecticidas específicas y el estudio comparativo de geles con programas de análisis de imágenes planteamos una estrategia interesante para simplificar un proceso inicial de correlación entre la expresión de ciertas lectinas y los fenotipos observados con resistencia a los bruquidios.

Palabras claves: *Phaseolus vulgaris*, proteómica, lectinas, arcelinas, resistencia a plagas.

immobilized derivatives from Affinity chromatography and enzymatic bioconversion. rational design.

a. del monte¹, Y. Fernandez-Marreño¹, H. Gomez, M. Chappé a. alexander, J. gonzález L. romero, E. salaś i. pascual, M.A. Chavez, G. Sandová, h. nolasco j. diaz

¹ Centro de Estudio de Proteínas (CEP), Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba. E-mail: adelmonte@fbio.uh.cu (Phones: Lab. 8324830, Home 8356673), (Fax 8321321).

² Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Guadalajara, Jalisco, México.

³ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz Baja California Sur, México.

Abstract

Currently the use of proteins, being natural, recombinant, modified or chimeric, goes from the analysis, therapeutic, chemical-pharmaceutical and agrochemical industries even in separation methods, which is fundamental component in chromatographic processes of the current biotechnological industry. The construction of immobilized derivatives starting from solid porous supports has constituted the most explored route in the synthesis of affinity matrices and biocatalysts for enzymatic bioconversion processes. Due to the high cost of the proteins, supports and the fact that they do not modify the immobilized intrinsic activity of these derivatives, it is attractive and interesting to approach the construction of these

immobilized derivatives by means of their rational design in function of the protein characteristics and their intended process application. The problem was approached considering four factors: a) Structural and functional characteristics of the ligand to immobilize and the effector (molecular weight, isoelectric point, subunit number, stability to pH, temperature, salts and organic solvents, glycosylation sites, functional residues and the availability of three-dimensional (3D) structure, experimentally obtained or by molecular modeling approaches). b) Knowledge of support properties: (physical, chemical and antimicrobial stability, functional groups, possible derivatization, total surface area and 3D structure). c) Use of the molecular visor software PyMOL as a tool for structure visualization. d) Theoretical-practical development for immobilized derivatives synthesis optimization. The study of this factor involves: i) Density calculation of the reactive groups that interact with 10% of the protein area on a support surface (which allow us to estimate the number of possible bonds between the protein and the support, which in most cases lead to higher stability); ii) Steric impediment minimization using shade area calculations projected by the ligand or the effector according to their Stoke radius; iii) Estimation of the maximum theoretical protein quantity per milliliter of support, using the immobilization load process. This procedure allows us to choose an appropriate route to synthesize the immobilized derivative with greater possibilities for its use in an affinity chromatography or for a given enzymatic bioconversion.

Acknowledgements

Thanks to Havana University, Cuba and CONACyT, México for scientific grants and BITaly S.r.l., Bergamo, Italy for financial assistance to the first author.

Penduliflorain i: a new papain-like cysteine peptidase isolated from *Hohenbergia penduliflora* stems.

Pendulifloraina i: una nueva cisteino peptidasa aislada a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora*.

Aurora Pérez, Carol Carvajal, Sebastián Trejo, M. José Torres, M. Inés Martí, Claudia Natulic³, Jesús Jorrián, Martha Hernández

¹ Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro Biotecnológico de Plantas, Universidad Diego de Avila, Ciego de Avila, CP 69450, Cuba. TEL: 053-332 224016, Fax: 053-33 266340. E-mail: ccarvajal@bioplantas.cu

² Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB) Universidad Autònoma de Barcelona. Barcelona. España.

³ LIPROVE, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata. La Plata. Argentina.

⁴ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.

Abstract

Plants are equipped with large proteolytic machinery that irreversibly regulates the fate of proteins. Proteinases also participate in the recognition of pathogens and pest and the induction of effective defense response. These enzymes are extensively used in many industrial processes and their pharmaceutical applications have been described for ages (2 y 3). Several plant cysteine proteases from Bromeliaceae family have been reported. Nowadays, considerable attention has been focused on the possibility to find new sources to obtain similar proteasas. In the present study cysteine proteases were isolated from *Hohenbergia penduliflora* Mez stems. A new acid papain-like cysteine peptidase was purified by ethanol fractionation followed by anion exchange chromatography (Q-Sepharose HP) using FPLC system. Purification factor was 3.55-fold and yield was high (60.1%). Homogeneity was confirmed by SDS-PAGE and mass spectroscopy (MS).

Molecular mass of the enzyme was 23 412.00 Da (MALDI-TOF), its isoelectric point was $\cong 4.5$. Endopeptidase activity was measured using *N*-carboxibenzoil-L-aminoácido-*p*-nitrophenil ester as substrate. The alanine derivate was strongly preferred by enzyme. Kinetic parameters were determined for *N*- α -carboxibenzoil-L-alá-*p*-nitrophenil ($K_m=0,0721$ mM and $k_{cat}=11.063$ s⁻¹). The N-terminal sequence of isolated proteases showed considerable similarity to other cysteine proteases obtained from different Bromeliaceae species.

Keywords: proteomic studies, cysteine peptidase

Acknowledgments:

This work was supported by Cuba Ministry of Science, Technology and Environment (CITMA) and Iberoamerican Program of Science and Technology for Development (CYTED), Project IV.22 "Aplicación industrial de Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores", coordinated by Dr. Néstor Oscar Caffini. We thank SCAI (Córdoba University, Spain) for proteomic studies and analysis.

Resumen

Las plantas están equipadas de una gran maquinaria proteolítica que regulan, irreversiblemente, la expresión de las proteínas. Las proteasas, también participan en el reconocimiento de patógenos e insectos y en la inducción de la respuesta defensiva efectiva (1). Estas enzimas tienen amplias aplicaciones en los procesos industriales y sus aplicaciones farmacéuticas han sido descritas por años (2 y 3). Varias cisteino proteasas de plantas de la familia Bromeliaceae han sido identificadas, actualmente considerable atención ha sido prestada a la posibilidad de encontrar nuevas fuentes para la obtención de proteasas similares. En el presente trabajo cisteino proteasas fueron aisladas a partir de tallos de *Hohenbergia penduliflora* Mez. Una nueva cisteino proteasa similar a la papaina se purificó mediante un fraccionamiento con etanol 95% seguida de una cromatografía por intercambio aniónico (Q-Sepharose HP) usando un sistema FPLC. El factor de purificación fue de 3.55-veces y un alto rendimiento (60.1%). La homogenidad se confirmó por SDS-PAGE y espectroscopia de masa (MS). La masa molecular de la enzima fue de 23 412.00 Da (MALDI-TOF), el punto isoelectrico aproximadamente 4.5. La actividad endopeptidasa se midió usando el sustrato *N*-carboxibenzoil-*p*-nitrofenil ésteres de L-aminoácidos. El derivado de alanina fue de mayor preferencia por la enzima. Se determinaron los parámetros cinéticos para el sustrato *N*-carboxibenzoil-L-alá-*p*-nitrofenil ester ($K_m=0,0721$ mM y $k_{cat}=11.063$ s⁻¹). La secuencia amino terminal de la proteasas aislada mostró considerable similitud con otras cisteino proteasas obtenidas a partir de diferentes especies de la familia de las Bromeliaceae.

Palabras Claves: estudios proteómicos, cisteino peptidasas

Referencias

1. Van der Hoorn, R.A.L., Jones, J.D.C. (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 400–407.
2. Engwerda, C., Andrew, D., Ladhams, A., Mynott, T. (2001). *Cellular Immunology* 210 (1): 66-75.
3. Hale, L., Greer, P., Trinh, C., James, C. (2005). *International Immunopharmacology* 5: 783-793.

Biochemical and functional characterization of partially purified proteolytic preparation obtained from *hohenbergia penduliflora* mez. Stems.

Caracterización bioquímica y funcional de extractos proteolíticos parcialmente purificados de tallos de *hohenbergia penduliflora* mez.

Carol Carvajal¹, Aurora Pérez Mayelín Morá¹, Sebastián Trejo M. Inés Martiñ², María José Torres³, Claudia Natalucci³, Martha Hernández

¹ Laboratorio de Ingeniería Metabólica. Centro Biotecnológico de Plantas, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila, CP 69450, Cuba. TEL: 053-332 224016, Fax: 053-33 266340. E-mail: mhernandez@bioplantas.cu

² Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB) Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. España.

³ LIPROVE, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata. La Plata. Argentina.

Abstract

Plant genome encodes hundreds of proteases, but only a few plant proteinases have been totally purified and characterized. Bromeliaceae family plants usually contain high concentration of thiol proteases. Plant proteolytic enzymes have been found to be useful in different industries. Nowadays peptidases of plant origin are of special interest in medicine and industry because they are active at a wide range of temperature and pH (1). Bromelain, in particular, exhibits therapeutic effects: anti-inflammatory, digestive, anti-metastasis and anti-tumoral activities (2,3). Recent years, it is including in the drug group modifiers of the biological answer (4). Therefore, is important to find new sources to obtain similar proteasas.

In the present study, partially purified preparation obtained from crude extract of *Hohenbergia penduliflora* Mez stems was characterized biochemically and functionally. The stable and active enzymatic product was recovered by ethanol precipitation. Maximum proteolytic activity was achieved at pH 8. Sodium chloride increased up to 3 M reduced proteolytic activity of partially purified preparation. Enzymatic preparation was stable at ionic strength values evaluated (no appreciable decrease in proteolytic activity could be detected after 2 h in 0.4 M sodium chloride solution at 37 °C for casein hydrolysis during 10 min), and exhibited high thermal stability (inactivation required heating for 20 min at 75 °C). Carboxipeptidasa activity was not detected in this preparation. Inhibition and activation assays indicated the cysteine nature of the enzymatic preparation. It was completely inhibited by E64 and activated by addition of cysteine. SDS-PAGE showed one protein band between 20 and 31 KDa. Isoelectric focusing and zymogram evidenced the acid characteristic of proteases that present in this preparation.

Palabras clave: plant cysteine peptidases, Bromeliaceae.

Resumen

El genoma de plantas codifica cientos de proteasas, pero solo unas pocas proteasas de plantas han sido totalmente caracterizadas y purificadas. Plantas de la familia Bromeliaceae usualmente contienen altas concentraciones de proteasas tipo tiol. Las enzimas proteolíticas de estas plantas tienen un amplio espectro de uso en diferentes industrias. Actualmente peptidasas de origen vegetal son de especial interés en la medicina y en la industria porque son activas en un amplio rango de temperatura y pH. (1). La bromelina, en particular, tiene varios efectos terapéuticos: se emplea como digestivo, tiene actividad anti-inflamatoria, anti-metastastizante y anti-tumoral (2,3). En años recientes, esta incluida en el grupo de modificadores de la respuesta biológica (4). Por lo tanto es importante encontrar nuevas fuentes de obtención de proteasas similares.

En el presente estudio preparaciones parcialmente purificadas obtenidas a partir de extracto crudo de tallos de *Hohenbergia penduliflora* Mez fueron caracterizadas bioquímica y funcionalmente. El producto enzimático estable y activo fue recuperado mediante la precipitación con etanol al 95 %. La máxima actividad proteolítica se alcanzó a pH 8. El cloruro de sodio incrementado hasta 3 M redujo la actividad proteolítica del preparado parcialmente purificado. La preparación enzimática fue estable en los valores de fuerza iónica evaluado (ningún decremento apreciado pudo ser detectado después de las 2 h en un solución de 0.4 M de cloruro de sodio a 37 °C para una hidrólisis de caseína durante 10 min), y exhibió una alta estabilidad térmica (la inactivación requirió un calentamiento de 20 min a 75 °C). La actividad carboxipeptidasa no fue detectada en esta preparación. Los ensayos de inhibición y activación indicaron la naturaleza cisteínica de la preparación enzimática, esta fue completamente inhibida por E64 y fue activada con la adición de cisterna. Los estudios electroforéticos mostraron una banda de proteína entre los 20 y 31 KDa. La focalización isoelectrica y el zimograma evidenció las características acidas de las proteasas que están presentes en esta preparación.

Palabras clave: peptidasas cisteínicas de plantas, Bromeliaceae.

Referencias

- (1) Uhlig, H. 1998. *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley & Sons, Inc. New York, pp 146-151, USA.
- (2) Tynes, B., Maurer, H., Porwol, T., Pöschel, B., Bjerkvig, R., Hoover, F. (2001). *Neoplasia* 3(6): 469-479.
- (3) Engwerda, C., Andrew, D., Ladhams, A., Mynott, T. (2001). *Cellular Immunology* 210 (1): 66-75.
- (4) Hale, L., Greer, P., Trinh, C., James, C. (2005). *International Immunopharmacology* 5: 783-793.
- (5) Chávez, MA., Hernández, Márquez, M., Rodríguez, G., Santos, R., González, J., Carvajal, C. (1997). *Patente Cubana* 12N 9/50, Dic 23.

Aislamiento de preparaciones proteolíticas a partir de diferentes especies de la familia bromeliaceae.

Proteolytic preparations isolated from different species of bromeliaceae family

Mayelin Morán¹, Aurora Pérez², Carol Carvajal¹, María José Torres¹, María Inés Martí¹, Danilo Piná¹, Reinaldo Trujillo¹, José Carlos Lorenz², Claudia L. Natalucci² y Martha Hernández¹

¹ *Centro de Bioplantas. UNICA. Ciego de Ávila. Cuba. TEL: 053-33 224016, Fax: 053-33 266340 mavelin@bioplantas.cu*

² *LIPROVE, Dpto. Cs. Biológicas, Fac. de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata. La Plata. Argentina.*

Resumen

Las plantas de la familia Bromeliaceae son una fuente natural de cisteino proteasas. Estas enzimas son frecuentemente utilizadas en la industria alimentaria, biotecnológica y medicofarmacéutica. Estudios recientes informan que demuestran que las cisteino proteasas obtenidas de plantas de la familia Bromeliaceae poseen propiedades antiinflamatoria, antimetastizante, antitrombótica y antitumoral de las cisteino proteasas. El número de proteasas vegetales que se han aislado y caracterizadas aún muy bajo, hasta la fecha solo se han estudiado menos del 1% de las especies vegetales conocidas. De ahí el marcado interés en la búsqueda de nuevas fuentes naturales y vías alternativas para la obtención de fitoproteasas. En el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad proteolítica de extractos enzimáticos obtenidos a partir de diferentes órganos de plantas de la familia Bromeliaceae. Se colectaron y clasificaron cinco grupos de plantas. Las plantas que se colectaron pertenecen a tres géneros de la familia Bromeliaceae: tres grupos son del género

Tillandsia, uno es del género *Guzmania* y otro del género *Hohenbergia*. Los mayores índices de actividad específica (1,33 U/mg de proteínas) se obtuvieron en los preparados obtenidos de tallos de *Hohenbergia penduliflora* Mez al realizar la extracción a pH 3.

Palabras clave: Bromeliaceae, pH de extracción, proteasas.

Abstract

Plants of Bromeliaceae family are a natural source of cysteine proteases. These enzymes are frequently used in pharmaceutical, biotechnological and food industries. In recent years, their effect as anti-inflammatory, antimetastatic, antithrombotic and anti-tumoral has been reported. However, the number of plant proteases isolated and characterized is still very low. To date, proteases have been studied in less than 1% of the already known plant species. Therefore, considerable attention has been focused on the possibility to find new source and alternative way to obtain simple proteases. In the present study, we hoped to evaluate proteolytic activity of crude extracts obtained from different Bromeliaceae plants source and to establish adequate enzymes extraction pH. We identified six plants group of Bromeliaceae family: Four groups are *Tillandsia* genera, one group *Guzmania* genera and another is of *Hohenbergia* genera. Specific protease activity was highest (1.33 U/mg of protein) with *Hohenbergia penduliflora* Mez. stems and pH 3 for extraction.

Key words: Bromeliaceae, extraction pH, proteases.

Development of plants cysteine proteases affinity matrices for proteinase Inhibitors Purification.

E. Salas¹, Y. Corbó¹, Y. Fernández-Marrefo¹, Pascual C. Aragón², C. Carvajal¹, M. Hernández², J. Díaz¹, M.A. Chávez¹ and A. del Monte¹

¹ Centro de Estudio de Proteasas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba. E-mail: esalas@fbio.uh.cu and adelmonte@fbio.uh.cu (Phones: Lab. 8324830, Home 8356673), (Fax 8321321).

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

The study of the role of the Cysteine proteases in pathological processes and other parasitic illnesses has become a field of active research in the last years. The use of specific inhibitors and gene knockout models for this class of enzymes has demonstrated the potential of these proteases as therapeutic targets. The use of enzymes in industrial applications has been widely used by immobilization procedures. Immobilized enzymes can be reused, the processes can be operated continuously and in some cases, enzyme properties can be properly enhanced by immobilization. A primary requirement for the study of these protease inhibitors relies in its purification from complex biological mixtures. The most usual strategies to accomplish this task combine chromatographic methods and salt precipitation. Among these procedures, affinity chromatography constitutes an attractive variant due to its moderate capacity, versatility, biospecificity and high grade of purity in a single step of purification. In the present work we have shown the results of matrix synthesis for affinity chromatography with papain and pineapple stem bromelain in Glyoxyl-Sepharose CL 4B supports. Different immobilization parameters were determined such as protein differential Immobilization grade (mg/mL support) (IG-P), enzyme differential Immobilization grade (U/mL support) (IG-E), protein immobilization percentage (% I Prot) and enzyme immobilization percentage (% I Enz). A papain-ethylxy-Sepharose CL 4B matrix was characterized and used for chicken egg white cystatin purification. This molecule is a reversible tight binding inhibitor (10⁻⁹ mol/L) with high specificity for papain-like cysteine proteases. The proposed method ensures that

the activated matrix constitutes a suitable tool for purifying proteinase inhibitors of this family. A pineapple stem bromelain-ethyl-Sepharose CL 4B matrix was characterized and, this been focused on the possibility to be used for industrial applications.

Acknowledgements

Thanks to IFS, CONACyT (Mexico) and CITMA (Cuba) for scientific grants.

Biacore-based methodology for the screening of cysteine protease inhibitory activity in natural sources using papain as model enzyme.

E. Salas¹, E. Horjales², A. Del Monte¹ And M.A. Chávez¹.

¹Centro de Estudio de Proteas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba. E-mail: esalas@fbio.uh.cu

²Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca (MOR), México.

Abstract

The implication of Papain-like cysteine proteases (CP) and their inhibitors in human physio/pathological processes and parasitic infections has become a field of active research in recent years. The use of specific inhibitors and gene knockout models for these enzymes has demonstrated the enormous potential of papain-like CP as therapeutic targets for several illnesses. Considering the enormous potential of natural products as leading compounds for drug development, a preliminary screening of Cysteine protease inhibitors in natural sources is presented in this work. Using Biacore technology, 25 aqueous extracts of Cuban marine invertebrates belonging to different phyla were studied for inhibition of Papain (EC 3.4.22.2) as model enzyme. Papain was covalently immobilized via amine-coupling on a sensor chip CM5 and Chicken egg white cystatin was used as model protease inhibitor for chip validation. Components of two extracts proved its specific interaction with the immobilized enzyme. A preliminary value for kinetic and equilibrium constants for each enzyme-inhibitor interaction were established. Finally, the most promising extract was submitted for partial purification of the components responsible for inhibitory activity. For this, an affinity support was developed by covalent immobilization of Papain in Glyoxyl-Sepharose CL 4B through its amino groups. Preliminary kinetic characterization of the affinity fraction was performed and further purification refinement of active molecules is currently underway.

Acknowledgements

Thanks to IFS and CONACyT (Mexico) for scientific grants.

Desarrollo de un método para detectar la presencia de cisteín proteasas en extractos vegetales por medio del análisis de mapas peptídicos por MALDI-TOF

Obregón, W.D.¹; Trejo, S.A.²; Liggieri, C.L.¹; Morcelle, S.R.¹; Hernández, M.; Priolo, N.S.¹

¹Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), Depto. de Ciencias Biológicas, Fac. Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

²Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB), Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España

³Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Biotecnología, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila, Cuba.

e-mail: davidobregon@biol.unlp.edu.ar

Resumen

Con el objeto de confirmar que las enzimas proteolíticas contenidas en el látex de las especies *Araujia angustifolia* Decaisne (Hooker Arn.)¹ y *Araujia hortorum* Fourn.^{2,3} (ya caracterizadas por métodos convencionales) son isoenzimas, se procedió a realizar una digestión triptica de las mismas en geles de poliacrilamida para obtener los mapas peptídicos mediante la técnica de MALDI-TOF. En este trabajo, se propone emplear a futuro esta herramienta fundamental de la proteómica para detectar isoformas de proteasas en extractos vegetales. Para ello se trabajó con extractos enzimáticos y con las fracciones puras correspondientes a cada una de las especies vegetales nombradas precedentemente (*araujiaína* al, all y alll, y *araujiaína* hl, hlllll respectivamente). Para obtener la huella peptídica (*peptide mass fingerprint*, PMF) por MALDI-TOF MS (PMF MALDI-TOF MS) se hizo una digestión triptica *in situ* de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE y coloreadas por la técnica de Coomassie. Las bandas seleccionadas fueron recortadas con bisturí y almacenadas en tubos eppendorf para su procesamiento, luego se lavaron con agua MilliQ y ACN varias veces alternativamente hasta su decoloración y finalmente fueron secadas al vacío. Se agregaron ditiotereftalato de dimetilammonio (DTT) en NH_4HCO_3 para reducir y bloquear el sitio activo. La digestión se realizó con buffer HClO₄ conteniendo tripsina durante 12 horas a 37 °C, los productos finales se disolvieron en TFA 0,1% (v/v) y se analizaron por MALDI-TOF MS utilizando una matriz de HCCA. Los espectros obtenidos correspondientes a cada una de las enzimas tratadas demuestran que existen picos conservados en ambas especies y picos que las diferencian, lo que permitirá identificar posibles secuencias comunes como secuencias propias de enzimas de especies distintas. De la misma manera cuando se compararon las tres enzimas *araujiaína* al, all y alll de la especie *A. angustifolia* se demostró que poseen picos equivalentes entre sí y picos distintos, lo que demuestra que son diferentes pero con un alto grado de homología entre ellas. Este resultado, junto con los obtenidos mediante la metodología convencional sugieren con mayor certeza que se trata de isoenzimas. Con dichos mapas tripticos y empleando la herramienta MASCOT que utiliza datos de espectrometría de masas para identificar proteínas en las bases de datos de secuencias primarias, se realizaron las búsquedas a fin de identificar las proteínas originales.

Palabras claves: fitoproteasas cisteínicas, digestión triptica, huella peptídico

Detección automatizada de puntos en geles de 2D-PAGE.

Dr. Evelio Luis Báez Pérez ebaez@bioplantas.cu, eevelio@yahoo.com

MSc. Cosme Santiesteban Toca: Cosme@bioplantas.cu

Centro de Bioplantas. Carretera a Morón Km 9 Universidad de Ciego de Avila. Ciego de Avila, Cuba.

Resumen

Las investigaciones en Proteómica están relacionadas con el análisis sistemático de perfiles de proteínas expresadas en un momento dado en células, tejidos o sistemas biológicos. En este campo, el análisis de electroforesis en geles de poliacrilamina en dos dimensiones (2D-PAGE) es una técnica bien establecida ampliamente usada para analizar grandes colecciones y complejas mezclas de proteínas. Las imágenes producidas por la digitalización de geles de 2D-PAGE contienen puntos de tamaño e intensidades, que corresponden a las proteínas presentes en el gel. La detección y cuantificación de los puntos de proteínas pueden revelar alteraciones en la expresión de las proteínas en un

sistema biológico dado. Sin embargo, este no es un proceso trivial y puede complicarse debido a la presencia de ruidos, fondo no homogéneo y el solapamiento entre los puntos. El algoritmo de segmentación por "watershed" es una popular opción para la segmentación de imágenes de 2D-PAGE. Por este método se obtienen mejores resultados que por los métodos de detección de bordes, sin embargo éste tiende a una sobre segmentación de la imagen. Para evitar este efecto negativo se emplean marcadores de los puntos y el fondo. La selección de los marcadores es una tarea compleja y los resultados de la segmentación dependen directamente de la buena selección de los mismos. En este trabajo se desarrolló un nuevo método, para la detección de los marcadores de forma automática, basado en los perfiles horizontales y verticales de la imagen. Se detectan los máximos locales de los perfiles horizontales y verticales de la imagen y las regiones de cruces de estos máximos en el plano se seleccionan como los marcadores de los puntos. Los marcadores del fondo se obtienen calculando el esqueleto del complemento de los marcadores de los puntos. La segmentación por "watershed", con estos marcadores, es capaz de detectar puntos con un alto nivel de solapamiento y las variaciones en niveles de grises del fondo no alteran los resultados. Los resultados obtenidos al detectar los puntos en geles de 2D-PAGE por este método muestran una efectividad superior al 95 %.

Changes of protein expression, aminoacids and sugars levels in Arabidopsis leaves induced by ammonium nitrate and elevated CO₂.

Yanelis Capdesuñer¹, Andrea Matroš², Katja Witzel², Annegret Wölf², Martha Hernández¹, Hans Peter Mock²

¹Lab. de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplasmas, Carr. A Morón km 9 CP 69450 Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), Ciego de Ávila, Cuba. E-mail: ycapdesuner@bioplasmas.cu.

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

Summary:

The effect of elevated CO₂ concentrations and nitrogen supply on the levels of primary metabolites and protein expression was investigated in leaves of Arabidopsis plants grown in MS-medium. The resources allocation in response to nutrients conditions were analysed in plants grown in different concentrations of ammonium nitrate (0.25, 5, 20 mM) in MS-medium under two conditions of CO₂ (350 and 1000 ppm). An accumulation of carbohydrates, especially starch, under elevated CO₂ and low N (0.25 mM) was also observed accompanied by morphological changes. The synthesis of aminoacids was more dependent of nitrogen supply, the majority decreased in low N. The synthesis of proteins showed a similar behaviour of aminoacids, the total soluble proteins decreased in low N. A proteomic analysis of the CO₂ influence in rosettes of Arabidopsis revealed 8 spots altered with CO₂ treatment, four spots identified were related with Photosynthesis, Glycolysis, stress response and signal transduction. Rubisco activase was highly upregulated under high CO₂. The influence of NH₄NO₃ was more significant on protein expression, 34 spots were altered with the treatments and 10 spots were identified. Proteins related with nitrogen and sulphur metabolism were downregulated, under low N conditions, as NIR1 ferredoxin-nitrate reductase, GGT1 (Alanine-2-oxoglutarate aminotransferase, disulfide oxidoreductase and others in correspondence with the decrease of the aminoacids related as glutamine, alanine, and serine. The large subunit of Rubisco decreased in low concentration of N (0.25 mM). Proteins identified and related with stress response were upregulated in low N concentration than in high N, for example the heat shock protein 70. We can conclude that elevated CO₂ leads to a shift in primary metabolite synthesis that is dependent on the availability of nitrogen and the availability of nitrogen has more influence on the protein expression than CO₂ treatment, but this influence affect nitrogen and carbon metabolisms, therefore the pathways related with CO₂ fixation.

Keywords: aminoacids, ammonium nitrate, carbon dioxide, protein expression, starch.

Cryopreservation of potato: New Results from the IPK Gatersleben, Germany

A. Kaczmarczyk^{*}, M. Grübé¹ and E.R.J. Kellér

¹Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK),

Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben, Germany

^{*}Corresponding author. Tel.: +49 39482 5362; fax: +49 39482 5741; e-mail address: kaczmar@ipk-gatersleben.de

Abstract

Cryopreservation is the most suitable long-term storage method for genetic resources, especially for vegetatively maintained crops like potato. In the Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) the DMSO droplet method is applied, and so far nearly 1000 accessions are cryopreserved with an average regeneration rate of 40%. New experiments with five potato accessions through a cold preculture (7 d 22/8 °C, 8 h photoperiod) showed improved results after cryopreservation. The influence of this alternating preculture on the shoot tips was studied for the wild, frost resistant and well cryopreservable *Solanum acaule* and for the cultivated, frost sensitive and average good cryopreservable potato *tuberosum* 'Desiree'. In comparative analyses biochemical factors like soluble sugars, starch, osmolality and amino acid concentrations were measured. Control shoot tips (from plants grown at constantly 22 °C, 4 weeks, 16 h photoperiod) and cold precultured shoot tips (from plants grown for 3 weeks like control plus 1 week at 22/8 °C day/night temperature, 8 h photoperiod) were analyzed. Osmolality and total concentrations of soluble sugars (glucose, fructose, and sucrose) were higher for *S. acaule* than for *S. tuberosum* 'Desiree', independent of whether cold-precultured or not. These results could explain the better regeneration of this wild potato in comparison with the cultivated species. The increase in sugar concentration in the shoot tips for both accessions after cold preculture could be the reason for the better regeneration after cryopreservation. Proline, one of the amino acids analysed, showed a significant increase after the cold preculture. Because proline is usually accumulated under stressful conditions, this result could imply that for in vitro plants alternating temperatures are more favourable.

Keywords: cryopreservation, droplet method, potato, *Solanum tuberosum* 'Desiree', *Solanum acaule*

Establecimiento de un procedimiento de crioconservación para embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.).

Marcos Edel Martínez-Montero; Julia Martínez Rodríguez

Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. Email:

marcosem@bioplantass.cu

Resumen:

En Cuba se ha investigado la embriogénesis somática por diferentes métodos para la producción masiva de plantas en la caña de azúcar. En el Centro de Bioplantass de Ciego de Ávila se han logrado resultados importantes durante la semilla artificial vía embriones somáticos en medio semi-sólido a partir de callos con estructuras embriogénicas, la que constituye una alternativa para el incremento de la eficiencia y proliferación de la especie. Sin embargo, este protocolo tiene limitantes importantes relacionadas con la pérdida progresiva en el tiempo del potencial embriogénico regenerativo de los callos, así como la necesidad de contar con un almacenamiento de embriones somáticos en un estado

adecuado de quiescencia, con tolerancia de desecación y en condiciones seguras. Esta problemática pudiera resolverse mediante la utilización de las estrategias de crioconservación (almacenamiento en nitrógeno líquido a -196°C) para los callos con estructuras embriogénicas y los embriones somáticos. Se conoce que las ultra-bajas temperaturas teóricamente detienen todos los procesos metabólicos y la división celular por lo que el material crioconservado se preserva en espacios reducidos, condiciones seguras y sin grandes costos por manejo o mantenimiento durante un largo período de tiempo. En el caso de los embriones somáticos de caña de azúcar es difícil la aplicación de la crioconservación porque no se conocen hasta ahora publicaciones relacionadas con ésta. Sin embargo, en la actualidad existen protocolos exitosos para este tipo de material en otros cultivos basados en los procedimientos de vitrificación, los que se consideran precedentes importantes para el desarrollo de una estrategia de crioconservación. Por otra parte, en años recientes se han revelado considerables avances en el uso de diferentes técnicas analíticas (biofísicas, bioquímicas, histo-citológicas y moleculares) como herramientas para mejorar los conocimientos sobre los efectos de la crioconservación en el material biológico en general. Estas técnicas permiten la detección de aquellos factores dentro de una estrategia de crioconservación que causan los daños más perjudiciales y de esta manera contribuir al aumento de la supervivencia del material crioconservado. Sin embargo, la aplicación de estas herramientas para los estudios del efecto de la crioconservación en el material vegetal es aún limitada, y en la mayoría de los casos se emplean técnicas costosas y complejas. Teniendo en consideración todo lo anterior se llevó a cabo la siguiente investigación con el objetivo de establecer un procedimiento de vitrificación para la crioconservación de embriones somáticos mediante el uso de una técnica conductimétrica. La misma ayudó a comprender las causas de los daños que provocan las ultra-bajas temperaturas en las metodologías de crioconservación mejoradas. Los resultados obtenidos representan un elemento importante como herramienta de apoyo a la propagación de la caña de azúcar.

Palabras clave: vitrificación, ultra-bajas temperaturas, pérdida de electrolitos.

Establishment of a cryopreservation procedure for somatic embryos of sugarcane (*Saccharum spp.*).

Marcos Edel Martínez-Montero; Julia Martínez Rodríguez

Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. Email: marcosem@bioplantass.cu

Abstract:

In Cuba has been researched the somatic embryogenesis by different methods for plant mass propagation in sugarcane. At Bioplantass Centre of Ciego de Avila an important results has been achieved throughout artificial seed technology via somatic embryos obtained in semi-solid medium from embryogenic calluses, which constitute an alternative to increase the efficiency and proliferation of the specie. However, the protocol have important drawbacks related with the progressive lost of embryogenic potential and its regenerative characteristics by time, moreover the need of secure storage of somatic embryos in adequate stage of quiescence with tolerance of desiccation and safe conditions is essential. The problem could be solved using cryopreservation strategies (storage in liquid nitrogen at -196°C) for sugarcane embryogenic calluses and somatic embryos, respectively. It is known that ultra-low temperatures theoretically stop all metabolic processes and cell division, and hence the plant material is preserved in reduced spaces, safe conditions and relative low cost for maintenance and management during indefinite periods. In the case of sugarcane somatic embryos, is very difficult the application of cryopreservation because there is not available literature for the moment related with it. However, recently there are many successfully protocols for this kind of plant material in other crops based in

vitrification procedures, and these are the main background for the establishment of cryopreservation procedure for sugarcane somatic embryos. In the other hands, in the last years considerable advance has been carry out with the use of different analytical techniques (biophysics, biochemical, histo-cytological and molecular) as tool to better understand the knowledge on the effects of cryopreservation in the biological material in general. These techniques permit the detection of factors that caused strong damages and contribute in this way to increase the survival rate of cryopreserved material. However, the application of these tools to study the effects of plant cryopreservation is still very scarce, and in the majority of cases, costly and complex techniques are used. For this reason, our research was carried out with the aim to establish a vitrification procedure for cryopreservation of sugarcane somatic embryos by means of conductimetric technique. This investigation helps us to understand the damages that caused the ultra-low temperatures when improving cryopreservation procedures. The obtained results represent important criteria as tool for in vitro propagation of sugarcane.

Keywords: Vitrification, ultra-low temperatures, leakage of electrolytes.

Avances en la conservación *in vitro* de diferentes especies de plantas en el Instituto de Biotecnología de las Plantas.

¹ Leyanis García, Karen Acosta y ³ Mayra Jiménez

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní Km 5,5 Santa Clara, Villa Clara. Cuba, CP 54830. * E-mail. leyanis@ibp.cu culeyanis02@yahoo.es

² Facultad de Ciencias Agropecuarias. Centro Universitario Vladimir I Lenin. Las Tunas. Cuba.

³ Estación Territorial de Investigaciones de Caña de Azúcar (ETICA). Biofábrica. Autopista nacional km 246. Ranchuelo. Villa Clara. Cuba.

Resumen

El trabajo se realizó con el objetivo de mostrar algunos de los principales resultados obtenidos en el Instituto de biotecnología de las Plantas en la conservación de tejidos, órganos y células embriogénicas de diferentes especies. Plantas cultivadas de caña de azúcar y papaya se conservaron por el método de crecimiento mínimo. Para ello, se realizaron modificaciones de las condiciones óptimas de cultivo *in vitro* y se evaluó la influencia de la temperatura de cultivo y la concentración salina y de manitol en el medio de cultivo. Meristemos de plantas cultivadas *in vitro* de papaya y agregados celulares en suspensión de plátano fueron conservados a través de la congelación en nitrógeno líquido. Se utilizó el método de vitrificación, el cual se estandarizó para la crioconservación de ambas especies. La conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar fue posible durante 12 meses consecutivos a una temperatura de -151°C . Porcentaje de supervivencia de las plantas conservadas fue de 86.6% cuando la concentración salina del medio de cultivo se redujo al 25% de su concentración original y se complementó con 10^{-1}g/L de manitol. Mientras que la conservación de plantas *in vitro* de papaya se efectuó a corto plazo, durante 170 días. La crioconservación de los ápices meristémicos de papaya fue posible efectuando un precultivo de las plantas donantes en 50^{-1}g/L de sacarosa durante 14 días. Los ápices meristematicos de 2.0 mm longitud y con 2-3 primordios foliares presentaron los mejores porcentajes de regeneración. Los mismos fueron deshidratados durante 40 minutos en la solución de vitrificación PVS2. Durante la crioconservación de agregados celulares embriogénicos del cultivar de plátano CEMSA 3/4 se comprobó que el precultivo con $180\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa afectó la vitalidad. Sin embargo, el precultivo a 4°C de las mismas y la crioprotección con 10% y 15% de DMSO propició la crioconservación y la posterior recuperación de los agregados celulares embriogénicos en medio de cultivo de formación de embriones. Los resultados obtenidos en la aplicación de los métodos de conservación

in vitro han permitido dotar al Instituto de Biotecnología de las Plantas de material vegetal con fines de investigación, propagación masiva de plantas e intercambio de germoplasma.

Palabras clave: crecimiento mínimo, crioconservación, ápices mesistematicos, agregados celulares embriogénicos.

Efecto de temperaturas ultra bajas sobre la actividad bioquímica y fisiológica de semillas de angico-rojo [*Parapiptadenia rigida* (Benth.)] Brenan.

Rosiane K. Brandão. Escola de Ciências Ambientais/ Universidade Católica de Pelotas. PIBIC-CNPq; Luciana B. Dode,; Escola de Ciências Ambientais/ Universidade Católica de Pelotas, Felix da Cunha 412, Pelotas, RS, Brasil.
lucianabicca@terra.com.br

Resumen

El riesgo de una creciente pérdida de especies vegetales en los ecosistemas del Sur de Rio Grande do Sul por la ampliación de áreas de monocultivo con explotación perenne y/o invasiva, torna el desarrollo de tecnologías que amplíen la capacidad de preservación del germoplasma vegetal a medio y largo plazo indispensable para la protección de la biodiversidad. El Angico-rojo [*Parapiptadenia rigida* (Benth.)] Brenan, es una leguminosa perteneciente a la subfamilia Mimosoideae que aparece frecuentemente en la región sur de Brasil. Esta especie se destaca por ser una excelente planta para reforestamientos mixtos en áreas degradadas. Este estudio tuvo como objetivos caracterizar el efecto bioquímico y fisiológico del tratamiento criogénico en semillas de angico-rojo. Fue desarrollado en los Laboratorios de Bioquímica y Química Ambiental de la Universidade Católica de Pelotas durante el segundo semestre de 2006. Las semillas obtenidas en la Feria de Semillas Criollas fueron divididas en dos lotes: control y crio. Las semillas del lote crio fueron inmersas en nitrógeno líquido durante una hora e descongeladas en estufa a 37°C por cinco minutos. Seguidamente, semillas crio y control fueron distribuidas sobre papel humedecido con agua destilada e incubadas a 28°C en ambiente oscuro durante siete días. Después del período de incubación, las plántulas fueron caracterizadas cuanto a su germinación (%), largo total, largo de la parte aérea y del sistema radicular (cm) y, peso fresco de plántulas (g). A partir de las plántulas normales fue preparado extracto en tampón pH 7 y utilizada la fracción soluble de las proteínas para análisis enzimáticos: amilasa, deshidrogenasa e transaminasas a través de dos POP de los kits Labtest® y Katal®. Las semillas de control exhibieron un porcentaje satisfactorio de germinación en ambos tratamientos: 96,5% para el control y 73,5% en el crio. Los parámetros morfométricos observados en el control también fueron superiores a los obtenidos en el tratamiento criogénico. Extractos de plántulas obtenidas en el tratamiento control exhibían 260 UA/dL de actividad amilásica, en cuanto que, cuando submetidas al tratamiento criogénico presentaban 205,45 UA/dL; la actividad de la DHL en las plántulas control e en las sometidas a temperaturas ultrabajas fue 34,5 U/L y 260 U/L, respectivamente. La actividad de transaminasas también fue superior en el tratamiento crio. Además de alterar el proceso germinativo fisiológicamente, las temperaturas ultrabajas causaron alteraciones en los parámetros morfométricos analizados y en la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo y de compuestos nitrogenados llevando a que deban ser desarrollados estudios más detallados.

Palabras claves: conservación, biodiversidad, árboles, semillas.

Actualización en el mejoramiento genético del aguacatero (*Persea americana* Mill.) para la resistencia a la pudrición de la raíz y la salinidad en Cuba

Coto O.¹, M. Machado,² A. Alvarez,² L. Santiago,² Fuentes J.É.,³ C. Collazo,⁴ Greg Boland,⁵ Audra Stechshyn-Nagasawa,⁶ Michel-Antoine Renaud,⁷ M. Ramos Leal,⁸ S. Altanez⁹ y A. Martínez⁹
1.- Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT) P. 7/ 30 y 32, Miramar, Playa, C. Habana, Cuba, Código Postal 11300. landocoto@inica.edu.cu, mejoramiento@iift.cu
2.- Departamento de Radiobiología, Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear, CEADEN.
3.- Departamento de Biología Ambiental, Universidad de Guelph, Canadá
4.- División de Laboratorios de Servicios de la Universidad de Guelph, Canadá
5.- Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 25 y J, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.
* Dirección actual: Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, A.A. 678, Ciudad Universitaria, Carrera 27-Calle 9, Bucaramanga, Colombia

Resumen

El presente trabajo constituye una actualización acerca de los avances más recientes obtenidos mediante el empleo de técnicas tecnológicas en apoyo al mejoramiento genético del aguacatero en Cuba para la resistencia a la pudrición de la raíz y la salinidad. Se reporta la construcción de un banco de cepas de hongos de suelo colectados en plantaciones comerciales de aguacatero, entre los que se incluyen especies de *Phytophthora* y *Phytium*. Se utilizan caracteres morfológicos, fisiológicos y moleculares para la identificación taxonómica de las especies de hongos aisladas, evidenciándose la amplia variabilidad de los mismos. Se ejecutan bioensayos conductimétricos empleando discos de hojas con el objetivo de conocer las cepas más efectivas de *Phytophthora* spp. para el empleo de filtrados tóxicos en la selección *in vitro* de embriones cigóticos del cultivar "Duke 7", de respuesta intermedia ante la enfermedad y único cultivar del germoplasma cubano recomendado como portainjerto. Se reporta la puesta a punto de marcadores moleculares basados en secuencias ribosomales para la identificación taxonómica de especies de *Phytophthora* y *Phytium*. Se trabaja en el desarrollo de métodos de inoculación para la selección *in vitro* de embriones cigóticos. Se reportan las curvas de supervivencia a condiciones de salinidad simuladas *in vitro* en dos cultivares que permitieron obtener líneas M₁, posibles mutantes, plantadas en vivero para el futuro análisis de segregación de la población M₂ en condiciones de campo.

Efecto de la salinidad sobre la germinación y crecimiento *in vitro* de embriones inmaduros de maíz (*Zea mays*).

Effect of salinity on the germination and *in vitro* growth of immature embryos of maize (*Zea mays* L.).

Amelia Capote, Melba Cabrera, Heidy Penichet, Alfredo Socorro, Odalys Pérez, María Julia Mendoza y Zoila Palacios.

Instituto de Investigaciones Fundamentales Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). acapote@inifat.co.cu

Resumen.

Con la finalidad de establecer una metodología *in vitro* que permita diferenciar los genotipos de maíz por su respuesta al estrés salino, se determinó el efecto de cinco concentraciones (0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%) de cloruro de sodio (NaCl) sobre la germinación y crecimiento de embriones inmaduros de cinco accesiones (P435, P30, P208 y P216) provenientes del Banco de Germoplasma INIFAT. Los embriones se cultivaron en el medio MS (1962) sin reguladores del crecimiento. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de germinación, la altura de las plántulas (cm), la longitud de las radículas (cm), el número de hojas, así como los contenidos de prolina y la conductividad eléctrica específica en hojas de las plántulas obtenidas como indicadores fisiológicos de la respuesta

bajo condiciones salinas. Los resultados mostraron que las variables evaluadas fueron inhibidas con el incremento de la concentración salina hasta alcanzar una supresión total del crecimiento al 2% de NaCl. Las variables longitud de la radícula, los niveles de prolina y la conductividad eléctrica específica mostraron un comportamiento diferenciado según los genotipos y permitieron identificar a los genotipos P 433 y P 530 como los más susceptibles y al genotipo P 208 como el más tolerante, por lo que pueden ser valoradas como posibles indicadores para la selección de materiales tolerantes al estrés salino.

Palabras claves: Cultivo *in vitro*, maíz, salinidad

Abstract.

In order to establish an *in vitro* methodology to characterize maize genotypes for their resistance to salinity stress, the effect of doses (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%) of sodium chloride (NaCl) on germination and growth of immature embryos were determined in differences genotypes (P433, P530, P208 and P216) from Gene Bank of INIFAT. The embryos were culture on MS (1962) media without growth regulators. Germination, plant height, root length and number of leaves and proline content and electrical conductivity in leaves were determined. Results showed that variables evaluated were inhibited when saline concentrations increased and were observed a total suppression of growth at 2% NaCl. Root length, levels of proline and electrical conductivity showed a different behaviour among genotypes and allowed to identify the genotypes P 433 and P 530 as the most susceptible and the genotype P 208 as the most tolerant, so that they can be use as possible markers for selection of salinity tolerant genotypes.

Key words: *in vitro* culture, maize, salinity.

Uso de marcadores moleculares en la caracterización genética de musáceas

Efraín G. Salazar¹, Gustavo Saldaña, José Sureda, Selen Trujillo², Morela Fuchs y José G. Albarrán
¹ Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Zona Universitaria, El Limón, Edif. 09.
Maracay 2101, Venezuela. Laboratorio de Biotecnología Agrícola. IDECYT-UNESR. Altos de la Mariposa, Sector el Cují, Caracas, Venezuela. E-mail: esalazar@inia.gob.ve

Resumen

Las musáceas conforman el principal rubro dentro del ámbito mundial y en Venezuela. Además de la importancia económica, tiene importancia social y cultural en casi todas las regiones del país. El género *Musa* está formada por una serie de grupos, y la taxonomía, basada en características morfológicas, fisiológicas y agronómicas, ha encontrado dificultad para clasificar los individuos. Es por eso que se hace uso de técnicas moleculares para intentar realizar una clasificación más específica de los individuos, para una identificación más precisa de los cultivares así como punto de partida para estudios moleculares más avanzados. En el estudio de caracterización se han utilizado conjuntamente basados en proteínas e isoenzimas, al igual que marcadores basados en el ADN. En el primero de los casos, las isoenzimas se aislaron de tejidos de plantas creciendo en condiciones de campo (tolerantes a sigatoka negra) o de materiales regenerados (altas concentraciones de citonininas). El tejido se sacó en buffer Tris-Glicina pH 8.3, y las isoenzimas se separaron electroforéticamente en geles discontinuos de poliacrilamida 5-10% a 100N por 4 horas. Este análisis probó ser útil en la identificación de cinco clones pertenecientes a la colección de germoplasma de materiales tolerantes a Sigatoka negra del CENIAP, y en la caracterización de variabilidad genética en materiales regenerados con

altas concentraciones de citocininas. Los marcadores moleculares tipo RAPD se estudiaron a partir de ADN genómico aislado de tejido foliar, tanto de plantas creciendo en condiciones de campo, como en materiales regenerados. La calidad del ADN se analizó visualmente mediante separación electroforética en geles de Agarosa 0.8% comparándose con un patrón de concentración con ADN del bacteriófago Lambda (100ng/μl). Las amplificaciones se realizaron con aproximadamente 10 ng de ADN por tubo de reacción, 0.3mM de cada iniciador, 200μM de cada dNTP, 1 u de ADN polimerasa y 250ng/μl de BSA. Las reacciones se colocaron a 94°C durante 5', seguido de 35 ciclos de 93° por 30s, 37° por 30s y 72° por 1 min. Finalmente se realizó un paso a 72°C por 7 min. Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa 1,5% a 80V durante dos horas. Las bandas RAPD se observaron bajo LUZ UV previa tinción con Bromuro de Etidio 0,00002%. Los geles se digitalizaron en un sistema de digitalización de imágenes marca Biorad, modelo Chemidoc, mediante el programa Quantity one, v 4.2. Los análisis han permitido identificar clones musáceas pertenecientes a la colección de germoplasma del CENIAP, estudiar la variabilidad genética de materiales regenerados *in vitro* de los tres grandes grupos de musáceas comerciales y de materiales diploides. Así mismo se pudo identificar molecularmente mutantes observados en campo de materiales AAA regenerados *in vitro*.

Palabras claves: Marcadores moleculares, Musa, Variabilidad genética, isoenzimas, RAPD

Estandarización de la técnica RAPD para evaluación de la estabilidad genética de plantas de Piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) variedad Española Roja

Silva, A¹; I. Trujillo¹; M. Rivas¹; G. Albarrán² y E. Salazar²

¹Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Centro de Estudios de Agroecología Tropical (CEDAT). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez". Apartado 47925. Caracas 1010. Venezuela. Email: trujillo234@telcel.net.ve

²Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. CENIAP. Av. Apdo 4653. Maracay Venezuela. E-mail: esalazar@inia.gov.ve

Resumen

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) es una especie comercial con gran demanda debido a sus características organolépticas además de propiedades medicinales. En Venezuela, la producción de piña se fundamenta en el cultivar Española Roja destinado para el consumo fresco y uso industrial, por lo que su estudio en el ámbito molecular tiene gran importancia, para ello se probó el método de extracción de ADN propuesto por Doyle and Doyle (1990) con algunas modificaciones, entre las cuales se encuentran el uso de 0.5, 0.7 y 1 g de material vegetal, obteniendo suficiente cantidad y calidad de material genómico al utilizar 500 mg de tejido, ya que emplear 700 y 1000 mg se observa un proceso de extracción más deficiente. En este trabajo se obtuvo ADN de alto peso molecular que no presentaba degradación bajo estas condiciones de extracción. Se empleó el protocolo de Cecchetti y col., (2002) con algunas modificaciones para la reacción de amplificación del ADN aislado, y las condiciones de ciclado establecidas ligadas por Cecchetti y col. (2002), con lo cual se logró obtener patrones de amplificación para cada una de las muestras empleadas al utilizar los iniciadores de la serie OPA 7,9,13,17 y 18 y de la serie OPB 1,5,7,10 11,12 y 18. Se plantea utilizar este método de extracción de material genómico para esta variedad y a través de técnicas moleculares evaluar la estabilidad genética de plantas desarrolladas *in vivo* e *in vitro*.

Asexual propagation and genetic improvement

Diogenes Infante¹, Mayra Osorio¹, Sandy Moliná and Gerardo González
Unidad de Biotecnología de Plantas

¹Instituto de Estudios Avanzados (IDEA)
Apdo. 17606, Caracas 1015-A, Venezuela

²Universidad de Matanzas
Matanzas, Cuba

Abstract

Agaves are succulent monocot plants rich in fibers, sugars and other important compounds. They are also valued as ornamental plants and for their ability to grow in poor soils. Molecular markers (AFLP and ISTR) were used to study genetic diversity in different *Agavaceae* plant samples. The comparison of banding pattern between the mother plant and rhizomes and bulbils derived daughter plants showed that genetic variability is introduced during asexual reproduction in these species. This asexual variability was used to genetically improve henequen (*Agave fourcroydes*), a cultivated agave that it is multiplied only through vegetative propagation using rhizomes. A selection was performed among individuals in a clonally propagated population and used for an improvement program via micropropagation through somatic embryogenesis. After micropropagation of three elite lines and three years under field conditions, we demonstrated using morphological analysis that plants originating from the same mother plant formed a group in Principal Component Analysis (PCA). AFLP and cluster analysis using Unweighted Pair-Group Method Arithmetic-Average (UPGMA) showed that each mother plant and its somatic embryogenesis-derived daughter plants clustered, indicating the conservation of molecular marker patterns in the micropropagated daughter plants.

“Identificación molecular de clones de vid de la variedad syrah”

Flores Cáceres María Laura¹, Guñazú Mónica¹, Cecilia Agüero^{1,2} y Martínez, Lilianá

¹Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Almirante Brown 500, Chacras de Coria, M 5528 AHB, Mendoza, Argentina. E.mail: lmartinez@fca.uncu.edu.ar. ²Cátedra de Viticultura, FCA, UNCuyo.

Resumen

A partir del año 1990, la viticultura argentina ha sido protagonista de un importante crecimiento del área cultivada con variedades finas de vinificación, entre ellas se mencionan a Malbec, Cabernet Sauvignon, Bonarda, Merlot, Tempranillo, Syrah, Chardonnay y Pinot Negro. Actualmente la variedad Syrah está en expansión en todo el mundo ya que produce vinos de buena calidad, opulentos, de color rojo intenso y aroma profundo. Al igual que el Malbec este cepaje en Argentina ofrecen futuro prometedor para elaborar vinos finos alta de calidad. Tal intercambio varietal como el uso material injertado ha generado un activo comercio de plantas de vid, lo cual repercute en un marcado interés por la identificación varietal. En la Estación Experimental INTA Luján de Cuyo, Mendoza, conjuntamente con la Cátedra de Viticultura de la Facultad de Ciencias Agrarias, han realizado una selección genética y sanitaria de clones Syrah, con el objeto de obtener un conjunto de clones que superen a los cepajes-población difundidos en el medio. Este trabajo ha llevado a la obtención de diferentes clones que presentan una importante variabilidad desde el punto de vista morfológico y de calidad de vinos elaborados. La identificación y designación correcta de clones es de gran relevancia para la industria del vino y su legislación. La identificación de variedades de vid es muy difícil

cuando se basa exclusivamente en caracteres morfológicos y botánicos. Las técnicas actuales de biología molecular basadas en el empleo del ADN, representan una herramienta objetiva para la caracterización varietal. Entre los marcadores moleculares disponibles, los microsatélites presentan un alto nivel de polimorfismo, independencia con el ambiente, herencia Mendeliana codominante, alta repetibilidad de los resultados y han sido exitosamente desarrollados in vitro. En este trabajo se propuso el empleo de microsatélites para identificar y discriminar una colección de clones de la variedad Syrah. El ADN se extrajo a partir de hojas jóvenes empleando el kit de DNeasy Plant Mini de la firma Qiagen. Se ensayaron 5 pares de primers microsatélites previamente descritos in vitro. Los productos de la reacción de PCR fueron separados por electroforesis capilar empleando un Secuenciador- Analizador Genético ABI-PRISM 3130 (Applied Biosystems). El uso de estos marcadores permitió distinguir 9 de los 12 clones empleados. El polimorfismo encontrado sugiere un origen policlonal o bien ser el resultado de mutaciones somáticas sufridas a lo largo de los años de propagación vegetativa de esta variedad. Se propone emplear un mayor número de pares de primers microsatélites o usar otras técnicas más discriminantes como AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) o SSAP (Specific Sequence Amplified Polymorphism) con las que se aumenta la posibilidad de encontrar polimorfismos entre genotipos muy cercanos. Esto permitirá ofrecer a los productores materiales con garantía, certeza y seguridad de su procedencia.

Palabras claves: vid, *Vitis vinifera*, microsatélites, identificación clones, PCR.

Variabilidad De *Agave Tequilana* Weber Variedad Azul Encontrada En Micropropagación Y Su Exploración A Nivel Molecular

Martha Isabel Torres-Morán*, Moisés Martín Montes-Rivera, Ricardo Nuño-Romero, Fernando Santacruz-Ruvalcaba y Andrés Rodríguez García

Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos. Departamento de Producción Agrícola. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Km 15.5 Carretera a Nogales. C.P. 45110 Las Aguas, Zapopan, Jalisco. Correo electrónico tmm08531@cucba.udg.mx

*Autor responsable

Resumen

Los marcadores moleculares se han constituido como un apoyo fundamental en el monitoreo de fidelidad genética entre plantas, se ha incrementado considerablemente su uso en la actualidad y más aún cuando las plantas provienen de métodos de propagación en los cuales teóricamente se conserva la identidad de la planta donadora. En el caso de la micropropagación, es necesario documentar la variación que se promueve entre los individuos propagados, en el cual se utilizan materiales y un ambiente que incide drásticamente en la morfogénesis celular.

En el presente trabajo, se realizó una prueba para verificar las diferencias a nivel molecular entre muestras de *Agave tequilana* micropropagado, los hijuelos que sirvieron como explante para su micropropagación y un embrión somático de la misma especie, incluyendo además una muestra de *A. coahuilensis* de Venezuela. Para tal fin se utilizaron los marcadores moleculares llamados ISTR (Inverse Sequence-Tagged Repeat), que son marcadores basados en secuencias de retrotransposones y que han sido usados anteriormente en plantas del género *Agave* para detectar variación a nivel molecular. Se encontró que el marcador utilizado discriminó entre especies del género *Agave* y establecieron similitudes entre las muestras utilizadas.

Palabras clave: *agave tequilana*, variabilidad, micropropagación

Abstract

Molecular Markers has been used for assess genetic fidelity among plants, and its use is increased in present days mostly in micropropagation derived plants, in which donor plant characteristics must be conserved at least theoretically. Genetic variation must be identified in micropropagated individuals because this method uses materials and environment with strong effects in cellular morphogenesis. In the present work, it is been searched differences at molecular level among *Agave tequilana* micropropagated derived samples, the donor offshoots for its *in vitro* establishment and a somatic embryo, a sample of *A. cocui* was included. We used ISTR (Inverse Sequence Tagged Repeat) marker to verify the differences, in which primers are complementary sequences *sopia-like* derived from retrotransposons and has been used previously for detect variation in *Agave* genus. We found the utility of ISTR marker for discriminating among samples of *Agave* genus, and similitude among samples was established.

Key words: *Agave tequilana*, variability, micropropagation

High expression levels of Cry3A toxin in transgenic sweet potato plants confer resistance to sweet potato weevil attack under field conditions

R. Morán¹, I. Alvarez¹, B. Usatorés¹, D. Somonté¹, S. Casas¹, Y. Verde¹, M. Lima², A. Morales², M. Castellón²

rolando.moran@gb.edu.cu

1-Center for Genetic Engineering and Biotechnology. P.O.Box 387, Camagüey 70100, Cuba.

2-Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

Abstract

Trough *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation, more than one hundred transgenic sweet potato clones were obtained. As plant transformation vector, a pCambia3301 carrying a plant-like version of the *cry3A* gene under the regulation of 35S CaMV promoter was used. Putative transgenic plants were first selected in a medium containing phosphinotricin. Among the molecular tests carried out to characterize the selected plants, PCR was used to identify either *bar* and/or *cry* transgenes presence. Cry3A toxin production in sweet potato leaves was detected by a commercial DAS-EISA system. The average expression levels were about 100 ng of toxin/mg of fresh tissue. A few group of clones considered higher expresses rendered more than 200 ng of Cry3A/mg of tissue. The insecticide activity of all transgenic clones against sweet potato weevil was evaluated under confined field conditions. Several experiments were performed following a completely randomized design. In all cases, requirements established by an Environmental Release License were fulfilled. Tuber damages were analyzed around 120 days after planting by means of the indicator Infestation Percent. Resistance to weevil attack was established by statistical comparison of damages, considering untransformed sweet potato plants as control. It was observed that clones exhibiting higher resistance levels also showed higher Cry3A toxin expression levels. Genomic Southern blot using a *cry3A* probe was carried out to confirm the transgene integration pattern in the selected resistant clones.

Biochemical side effects of genetic transformation of pineapple

Lourdes Yabór, Mayda Arzola, Carlos Aragón, Martha Hernández, Ariel Arencibia & José Carlos Lorenzo

Abstract

Pineapple is one of the most important tropical fruit and therefore intensive genetic improvement programs are being carried out in many countries, including Cuba. Our research team has previously introduced the gene, along with *chitinase* and *ap24* genes, into the pineapple genome. Evaluations were made during 30 days of pro-plantlet hardening. Transformed (*odr*, *chitinase*, *ap24* transgenes) and non-transformed plantlets were compared. Both groups of plantlets were similar in regard with plant height and weight and peroxidase activity. However, statistical significant changes, caused by transformation, were recorded in levels of malondialdehyde, other aldehydes, chlorophyll (a, b, total), phenolics (free and cell wall-linked) and proteins.

Keywords: *Ananas comosus* (L.) Merr., aldehydes, chlorophyll, phenolics, proteins, peroxidases

Enfoque metodológico de los ensayos ambientales de cultivos transgénicos. Estudio del banano y plátano con genes de resistencia a la Sigatoka negra.

José M. Machado¹, Reinaldo Quiñones², Bárbara Ocaña³, Horacio Grilló², Carlos Pérez Norma Suárez² y Rafael Gómez Kosky

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

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

³ Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

E-mail: machado@ibp.co.cu

Resumen

La selección de una planta transgénica que estará destinada al consumo animal, humano, o ambos, pasa por una serie de manipulaciones en laboratorio y adaptación en casas verdes acondicionadas con un adecuado nivel de contención para evitar escapes accidentales, antes de ser liberadas para los ensayos de campo controlados. En esa etapa se evalúa el impacto de los organismos vivos modificados (OVM) en el ambiente y su interacción con éste con el fin de evitar un desbalance ecológico con el nuevo organismo introducido. El objetivo de este trabajo es desarrollar una metodología para la aplicación de los ensayos ambientales al plátano y banano transgénicos que poseen genes de resistencia a la Sigatoka negra. Para realizar el estudio se consultaron expedientes de liberación de cultivos transgénicos al medio ambiente en diferentes países y los métodos de análisis de la microflora del suelo. También se analizaron las plagas y enfermedades que con más frecuencia afectan al plátano y banano en la granja de experimentación con el fin de seleccionar un elemento indicador de interacción directa con la planta. De igual forma se hizo un inventario de aquellos insectos que se encontraban en el área de las plantas seleccionadas. Además, se estudiaron previamente las nuevas formas de expresar con herramientas de bioinformática. La metodología propuesta comenzó a aplicarse en el primer ensayo de liberación para evaluar su factibilidad. Los resultados previos obtenidos indican que el *Tetranichus tumidus* Banks, es una plaga natural del cultivo estudiado que sirve como índice biológico entre ésta y la planta transgénica de plátano y banano. El análisis de la microflora de la rizosfera es también un indicador de valor que señala variaciones a tener en

cuenta para posteriores análisis moleculares modos de transferencia génica horizontal. La metodología propuesta permite organizar las investigaciones ambientales en los campos experimentales de plátanos y bananos transgénicos.

Palabras clave: plátano transgénico, evaluación ambiental, bioseguridad.

Aplicación De Un Sistema De Gestión De Seguridad Biológica En El Centro Bioplantas

1 Barbara Valle Yanes, 2 Herberto Fernández Buchillón.

1. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 9. Ciego de Ávila. Cuba. CP 69450. bvalle@bioplantas.cu.

2. Unidad de Medio Ambiente, Delegación Provincial del CITMA. Joaquín Agüero 116 entre Maceo y Simón Reyes. Ciego de Ávila. Cuba. heberto@citma.fica.inf.cu

Resumen.

El desarrollo creciente de la Biotecnología el mundo trae consigo el surgimiento de tratados internacionales y a su vez el de un cuerpo legislativo que regula la Seguridad Biológica. La aplicación práctica de los principios de la Seguridad Biológica, contempla la voluntad y la necesidad de proteger al trabajador expuesto al riesgo de manera directa o indirecta, así como a la comunidad y el medio ambiente, siendo de especial importancia las prácticas de trabajo, responsables en buena medida de la ocurrencia de eventos indeseables, y se ha previsto también la probabilidad de liberaciones accidentales al medio ambiente asociadas fundamentalmente a fallos técnicos en las barreras de contención y a fallos organizativos en el plano de la supervisión, control y aseguramiento de los sistemas que las componen. En el centro de Bioplantas se realizan investigaciones que involucran la manipulación de agentes biológicos, plantas transformadas genéticamente y exóticas por lo que se hace necesario la aplicación de un sistema de gestión de la Seguridad Biológica con el objetivo fundamental de el cumplimiento de la legislación vigente en el país y mitigar los riesgos a los cuales están expuestos los trabajadores, la comunidad y el medio ambiente. Para dar cumplimiento al objetivo de este trabajo se realizó un diagnóstico del centro. Se emplearon un grupo de herramientas como técnicas para la obtención y captación de información como la inspección, la entrevista, las listas de chequeo todas descritas en el Manual de Inspección de Seguridad Biológica, encaminadas a detectar los principales problemas que existían en este centro. Con la aplicación del sistema de gestión de la Seguridad Biológica se logró que en el centro se ejecutaran un grupo de acciones obteniendo los siguientes resultados: establecimiento de la Política Ambiental del centro, la creación de estructuras de Seguridad Biológica, el financiamiento para construcción y remodelaciones de algunas áreas así como para la adquisición de equipos y medios de protección, requisitos fundamentales para obtener las Autorizaciones de Seguridad Biológica; la capacitación a técnicos y profesionales y el establecimiento de una cultura de la Bioseguridad en todos los niveles existentes.

AFLP Characterization of the Mexican and Cuban Pineapple Germplasm Collections.

Ermis Yanes Páez, Katia Gif, Laureano Rebolledo, Andrés Rebolledo, Daniel Urizá, Octavio Martínez, Miriam Isidró, June Simpson
eyanes@bioplantas.cu

¹ Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Avila, Carretera a Morón Km. 9, CP 069450, Ciego de Ávila, Cuba.

² Department of Genetic Engineering, CINVESTAV, Unidad Irapuato, Apdo. Postal 629, Irapuato, Guanajuato, Mexico.

³ Campo Experimental Papaloapan, INIFAP, Veracruz, Mexico.

The aim of the present work was to characterize the Mean and Cuban pineapple germplasm collections through AFLP markers. To reach this objective, forty seven genotypes (forty of *A. comosus*, two of *A. bracteatus*, one each of *A. ananassoides* and *A. nanus* and three from the related genus *Bromelia*) from the Mexican collection and fifty seven (fifty five of *A. comosus* and one each of *Ananas bracteatus* and *Bromelia pinguin*) from the Cuban collection were analyzed with a total of 169 and 191 AFLP markers, respectively. For selective amplification the Eco RI primer was kept constant with the selective nucleotides AA whereas the Mse I primer varied with addition of an extra AG, TG, GT or CC. The autoradiograms were read visually and scored as 1= presence of band, 0= absence of a band. Genetic distances were calculated using the Simple Matching method in the NTSYS-pc Software. Cluster analysis was based on distance matrices using the unweighted pair group method arithmetic average. The dendrograms representing the genetic relationships between these samples based on the AFLP results showed a low level of diversity in both collections and that in general the molecular classification of the materials agreed well with the morphological classification. Several groups of genotypes showed distances of < 0.03 whereas others thought to be similar based on morphological criteria were found to be distant. These results will allow more efficient use of the materials in the germplasm collections for breeding purposes and support the acquisition of genotypes which are scarce or lacking in the collections. The enrichment of both collections with cultivated and non cultivated varieties as well as the creation of core collections is recommended.

¿Son las metodologías tradicionales de generación de variedades de tabaco factibles para lograr la resistencia a moho azul desde estadios tempranos de semillero?

Caso estudio de nueva estrategia.

Humberto García y María del Carmen Castro

Instituto de Investigaciones del Tabaco. Km 8 ½ Carretera al tumbadero. San Antonio de los Baños. La

Habana. Cuba. 3500humberto@iitabaco.co.cu 5347-38-3442 Ext. 153.

Resumen

Cuba es uno de los mayores productores de tabaco de alta calidad en el mundo. Sin embargo esto ha sido posible con la aplicación de un continuo programa de mejoramiento genético que tiene por objetivo crear variedades de tabaco más resistente a patógenos, virus, enfermedades ambientales, plantas parásitas, etc; siempre con el empleo de metodologías tradicionales de obtención de variedades de tabaco que fundamentalmente se basan en la aplicación del método genealógico. Hasta el presente la selección de los individuos más resistentes se realiza en plantas adultas e incluso este proceder conlleva la desventaja de que las plantas pudieran ser muy susceptibles en semillero lo que da al traste con la productividad deseada a gran escala. *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina* o moho azul constituye uno de los mayores azotes a este cultivo en Cuba. Las afectaciones en las variedades obtenidas en Cuba tienen el mismo patrón, con diferentes grados, se pueden afectar levemente las hojas inferiores y se observan deformaciones benignas en nervios principales y secundarios. En dependencia del uso que se le pretenda dar a las hojas, estas deformaciones pueden inutilizarlas, por lo que es deseable un tipo de resistencia que evite cualquier respuesta negativa. Es por ello que en nuestro trabajo desarrolló una nueva estrategia basada en la selección desde estadios tempranos de semillero que supera la calidad de la selección para la generación de nuevas variedades de tabaco y permite contar

con una elevada protección, reduciendo la aplicación de productos controladores de plagas y la pérdida de posturas en semillero. La estrategia fue diseñada a partir de un cruzamiento sexual entre las variedades Habana 2.1.1. y Burley Habana 13 con la posterior selección generacional por resistencia al moho azul, primero en semillero y posteriormente en plantas adultas en el campo hasta la generación F₆. Se obtuvo una variedad de tabaco altamente resistente en plantación y una aceptable resistencia en semillero. Por otra parte con la aplicación del método haploide-diploide combinado con la nueva estrategia propuesta, se obtuvo una línea di-haploide con características de resistencia similares a la obtenida por el método genético.

Palabras claves: moho azul, resistencia genética, selección, tabaco

Use Of Regression Analysis In Plant Cell, Tissue And Organ Culture Experiments

J.C. LORENZO, m. GARCIA-boroto

Bioplant Center, University of Ciego de Avila, 69450, Cuba.

E-mail: jclorenzo@bioplantacuba.cu Fax: 53-33 266340, www.bioplantacuba.cu

Summary

Several authors have suggested plant biotechnologists to perform regression or trend analysis to compare means of related treatments (e.g. doses of inositol). The present paper compares two statistical strategies to determine the effect of inositol (0 - 400 mg l⁻¹) on proteolytic activity in the culture medium during pineapple growth in temporary immersion bioreactors. Strategy 1 involved One-Way ANOVA followed by Tukey HSD. Strategy 2 consisted in the development of different regression analyses to determine the best fitted equations to describe the experimental results. Curvefit software (version 210-0, May 15 1987, Thomas S. Cox) was used. Cauchy, Normal, Parabola and Hoerl equations were the best fitted according to their determination coefficients (R²). Optimal inositol concentrations to increase proteolytic activity were determined from the equations. Quite different results were obtained following strategy 2: 126.76 mg l⁻¹ inositol from Cauchy, 131.29 mg l⁻¹ from Normal, 145.06 mg l⁻¹ from Parabola and 14.05 mg l⁻¹ from Hoerl equations. In contrast, experimental data identified 200 mg l⁻¹ inositol as the most adequate concentration to increase proteolytic activity in the culture medium. The statistical strategy 1, One-Way ANOVA followed by Tukey HSD, clearly supported this biological observation. In this paper, regression analysis was not useful to describe our experimental results.

Research method to perform sequential experiments in plant *in vitro* culture

José Carlos Lorenzo

Bioplant Center, University of Ciego de Avila, 69450, Cuba (*requests for offprint; Fax: 53 33 266340, E-mail: jclorenzo@bioplantacuba.cu)

Abstract

Research projects are normally constituted by several sequential experiments. Therefore, it has been recommended that each new design be built on the information obtained from the researcher's previous work. Unfortunately, this important advice is not totally understood by many students. This paper is intended to contribute to its clarification. A hypothetical literature search about pineapple callus formation was used to build a sequential experimental program. Four experimental factors were analyzed: levels of sucrose; 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; benzyladenine and malt extract. From the hypothetical information, the relative significance of each experimental factor was determined. Factors

were then ordered, in the sequential program, from the most to the least important. Four monofactorial experiments with more than two levels each were designed. The research method described in this paper allows plant biotechnology researchers to have a solid experimental result easy to explain others and publish.

Statistical tests used in plant BIOTECHNOLOGY experiments

J.C. Lorenzo

Bioplant Center, University of Ciego de Avila, 69450, Cuba.

E-mail: jclorenzo@bioplantas.cu, Fax: 53-33 266340 www.bioplantas.cu

Summary

One of the most frequent problems faced by plant biotechnology researchers is the statistical management of their experimental results. Many tests are available in the statistical packages developed to date, such as the Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc). However, we only use quite a few tests that are generally accepted in our scientific community. Developing these generally accepted tests with the use of SPSS is not an easy process. Four types of experiments are usually carried out in plant biotechnology research and they should be processed statistically in different ways. Monofactorial experiments with two levels can be evaluated with parametric OR non-parametric tests: T-test and Mann-Whitney respectively. Monofactorial experiments with more than two levels can be also processed with parametric OR non-parametric tests: One-Way ANOVA followed by Tukey HSD, and Kruskal-Wallis followed by Dunnett's C, respectively. Bifactorial and trifactorial experiments can only be processed with parametric tests: ANOVA followed by Tukey HSD. Before carrying out a parametric test, fit of each treatment data to the normal distribution should be confirmed with One-Sample Kolmogorov-Smirnov tests. Additionally, equality of variances should be confirmed with Levene test. The present paper is intended to provide information about how to classify the four types of experiments mentioned above and how to perform the corresponding tests with the use of SPSS. As most of statistical packages are developed by statisticians, we hope this paper will also help them to understand our needs.

Establecimiento de un procedimiento de crioconservación para embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.).

Marcos Edel Martínez-Montero; Julia Martínez Rodríguez

Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. Email: marcosem@bioplantas.cu

Resumen:

En Cuba se ha investigado la embriogénesis somática por diferentes métodos para la producción masiva de plantas en la caña de azúcar. En el Centro de Bioplantas de Ciego de Ávila se han logrado resultados importantes durante la semilla artificial vía embriones somáticos en medio semi-sólido a partir de callos con estructuras embriogénicas, la que constituye una alternativa para el incremento de la eficiencia y proliferación de la especie. Sin embargo, este protocolo tiene limitantes importantes relacionadas con la pérdida progresiva en el tiempo del potencial embriogénico y regenerativo de los callos, así como la necesidad de contar con un almacenamiento de embriones somáticos en un estado adecuado de quiescencia, con tolerancia de la desecación y en condiciones seguras. Esta problemática pudiera resolverse mediante la utilización de las estrategias de crioconservación (almacenamiento en nitrógeno líquido a -196°C) para los callos con estructuras embriogénicas y los embriones somáticos. Se conoce que las ultra-bajas

temperaturas teóricamente detienen todos los procesos metabólicos y la división celular por lo que el material crioconservado se preserva en espacios reducidos, condiciones seguras y sin grandes costos por manejo o mantenimiento durante un largo período de tiempo. En el caso de los embriones somáticos de caña de azúcar es difícil la aplicación de la crioconservación porque no se conocen hasta ahora publicaciones relacionadas con ésta. Sin embargo, en la actualidad existen protocolos exitosos para este tipo de material en otros cultivos basados en los procedimientos de vitrificación, los que se consideran precedentes importantes para el desarrollo de una estrategia de crioconservación. Por otra parte, en años recientes se han revelado considerables avances en el uso de diferentes técnicas analíticas (biofísicas, bioquímicas, histo-citológicas y moleculares) como herramientas para mejorar los conocimientos sobre los efectos de la crioconservación en el material biológico en general. Estas técnicas permiten la detección de aquellos factores dentro de una estrategia de crioconservación que causan los daños más perjudiciales y de esta manera contribuir al aumento de la supervivencia del material conservado. Sin embargo, la aplicación de estas herramientas para los estudios del efecto de la crioconservación en el material vegetal es aún limitada, y en la mayoría de los casos se emplean técnicas costosas y complejas. Teniendo en consideración todo lo anterior se llevó a cabo la siguiente investigación con el objetivo de establecer un protocolo de vitrificación para la crioconservación de embriones somáticos mediante el uso de una técnica conductimétrica. La misma ayudó a comprender las causas de los daños que provocan las ultra-bajas temperaturas en las metodologías de crioconservación mejoradas. Los resultados obtenidos representan un elemento importante como herramienta de apoyo a la propagación de la caña de azúcar.

Palabras clave: vitrificación, ultra-bajas temperaturas, pérdida de electrolitos.

Establishment of a cryopreservation procedure for somatic embryos of sugarcane (*Saccharum spp.*).

Marcos Edel Martínez-Montero; Julia Martínez Rodríguez
Centro de Bioplantas, Universidad Ciego de Ávila, Cuba. Email: marcosem@bioplantassca.edu.cu

Abstract:

In Cuba has been researched the somatic embryogenesis by different methods for plant mass propagation in sugarcane. At Bioplantassca Centre of Ciego de Avila an important results has been achieved throughout artificial seed technology via somatic embryos obtained in semi-solid medium from embryogenic calluses, which constitute an alternative to increase the efficiency and proliferation of the specie. However, the protocol have important drawbacks related with the progressive lost of embryogenic potential and its regenerative characteristics by time, moreover the need secure storage of somatic embryos in adequate stage of quiescence with tolerance of desiccation and safe conditions is essential. The problem could be solved using cryopreservation strategies (storage in liquid nitrogen at -196°C) for sugarcane embryogenic callused somatic embryos, respectively. It is known that ultra-low temperatures theoretically stop all metabolic processes and cell division, and hence the plant material is preserved in reduced spaces, safe conditions and relative low cost for maintenance and management during indefinite periods. In the case of sugarcane somatic embryos, is very difficult the application of cryopreservation because there is not available literature for the moment related with. However, recently there are many successfully protocols for this kind of plant material in other crops based in vitrification procedures, and these are the main background for the establishment of cryopreservation procedure for sugarcane somatic embryos. In the other hands, in the last

years considerable advance has been carry out with the use of different analytical techniques (biophysics, biochemical, histo-cytological and molecular) as tool to better understand the knowledge on the effects of cryopreservation in the biological material in general. These techniques permit the detection of factors that caused strong damages and contribute in this way to increase the survival rate of cryopreserved material. However, the application of these tools to study the ~~safte~~ effects of plant cryopreservation is still very scarce, and in the majority of cases, ~~costly~~ complex techniques are used. For this reason, our research was ~~carried~~ out with the aim to establish a vitrification procedure for cryopreservation of sugarcane somatic embryos by means of conductimetric technique. This investigation helps us to understand the damages that caused the ultra-low temperatures when improving cryopreservation procedures. The obtained results represent important criteria as tool for in vitro propagation of sugarcane.

Keywords: Vitrification, ultra-low temperatures, leakage of electrolytes.

Protocolo De Vitrificación Para El Establecimiento De Un Banco De Germoplasma De Piña Crioconservado.

Roberto Méndez Pelegrín; Julia Ma~~ez~~n Marcos Edel Martínez Montero.
Centro de Bioplasmas Universidad de Ciego de Ávila
robertom@agronomia.unica.cu

Resumen:

En la actualidad en Cuba la Colección Nacional *in vitro* de germoplasma de piña cubano se encuentra en el Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila. Sin embargo, esta tiene como limitante que su almacenamiento es a mediano plazo y requiere de subcultivos continuos. Por lo que, se necesita la implementación de las técnicas de crioconservación de manera exitosa. El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Mejoramiento Genético del Centro de Bioplasmas con el objetivo de poner a punto un protocolo de vitrificación que permitiera ~~gar~~ la supervivencia, proliferación y regeneración plantas a partir de ápices congelados en nitrógeno líquido para establecer un banco de germoplasma de piña crioconservado en un futuro cercano. Se utilizaron ápices de 3 mm de longitud, que contenían el domo apical y dos o tres hojas del primordio, extraídos de vitroplantas de las variedades Cayena lisa Serrana, Española roja y Cabezona provenientes del Banco de Germoplasma *in vitro*. Los ápices fueron subcultivados primero en una solución amortiguadora (sacarosaligerol), la cual fue reemplazada por una solución vitrificadora PVS3 (50% m/v glicerol y 50% m/v sacarosa). Se probaron diferentes tiempos de exposición del material vegetal en la PVS3 donde el mejor resultado se obtuvo a las 7 h y la variedad que más respondió al tratamiento fue la Cayena lisa Serrana.

Palabras claves: *Ananas comosus*, ápices, vitroplantas.

Abstract:

In Cuba nowadays, the National *in vitro* Collection of pineapple germplasm is situated at the Bioplasmas Centre from University of Ciego de Avila. However, it has as limiting factor related with the storage in medium-term with continue subcultures. Therefore, it is necessary the implementation and use of ~~ess~~ successful cryopreservation techniques. The present work was achieved in the Laboratory of Plant Breeding at Bioplasmas Centre with the aim to put in order a vitrification ~~unto~~ protocol for survival, proliferation and plant regeneration of apexes after liquid nitrogen ~~erfiri~~ng to establish a cryopreserved pineapple germplasm bank in the near future. For this purpose apex of 3 mm length fully covered by

two or three leaf primordia from pineapple plants of the Cuban Collection named Smooth Cayenne "Serrana", Red Spanish and Cabezona were dissected and used as explants. The apices were subcultured first in loading solution containing sucrose + glycerol and after then it was drained and replaced with plantification solution PVS3 (50% m/v glycerol + 50% m/v sucrose). Different times of exposure of apices to PVS3 were tested and the most appropriate time was seven hours and the best response for variety was Smooth Cayenne "Serrana".

Keywords: *Ananas comosus*, apex, vitroplants.

Uso de PCR para la detección de *Liberobacter* sp. en *Diaphorina citri* colectadas en Venezuela.

Efraín Salazar, Erick Marín, Pedro Morales, Ligia C. Rosales. Centro Nacional de investigaciones Agropecuarias. Zona universitaria vía El Molón. Edificio 09 Maracay 2101. Venezuela. e-mail: esalazar@inia.gob.ve, pepmorales@inia.gob.ve

Resumen

Entre las enfermedades más graves que afectan a la citricultura mundial se encuentra el Huanglongbing (HLB) anteriormente conocido como greening, Esta enfermedad ataca a todos los cítricos, y es producida por bacterias restringidas al floema perteneciente al género *Liberobacter*, las cuales son transmitidas a la planta por el psílido *Diaphorina citri*. En Venezuela se detectó la presencia de este vector en 1999. Con el fin de evaluar la presencia de las bacterias en Venezuela se ha utilizado la técnica del PCR en 8 muestras de ADN aisladas de *Diaphorina citri* colectadas en Venezuela. Para ello se aisló el ADN de 8 muestras de *Diaphorina citri* siguiendo la metodología de Extracción con fenol/cloroformo de Harris y col., sin el uso de fenol de la solución extractora. Los ADN aislados se cuantificaron espectrofotométricamente y la calidad se visualizó mediante separación electroforética en geles de agarosa 0.8%. Las reacciones de PCR se realizaron en tubos de 0,2ml de paredes delgadas, conteniendo 10ng del ADN genómico, 1 unidad de Taq Polimerasa, 0,3mM del iniciador, 1,5µl de buffer de reacción (10X), MgCl₂ (1.33mM) BSA (400 µg), dNTPs (0.1mM) en un volumen final de 15µl. Se utilizaron dos pares de iniciadores específicos para cada especie bacteriana. Las amplificaciones se realizaron con 35 ciclos de 94°C por 30s, 37°C por 30s y 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Al no tener control positivo para las reacciones de PCR se realizaron RAPD con los iniciadores OPP 03 y OPA 17 para confirmar la ausencia de las bacterias. Estas amplificaciones se realizaron con un paso inicial a 94°C por 5 min, seguido de 45 ciclos con 93°C por 1', 36°C por 30s' y 72°C por 2', y una extensión final a 72°C por 7'. Las reacciones se mantuvieron a 4°C hasta el momento de la separación electroforética de los productos de amplificación, en geles de Agarosa 1,5%. Visualizados bajo luz UV previa tinción con bromuro de etidio. No se observó amplificación con las PCR ni de las bandas específicas con los RAPD, entonces podemos concluir que las bacterias no están presentes en las muestras evaluadas.

Obtención de análogos androestéres en variedades de tabaco negro.

Emis C. Mena, Vivaldo García Morejón y Vivian Rivero .
Instituto de Investigaciones del Tabaco. Estación Experimental del Tabaco. San Juan y Martínez, Pinar del Río. Cuba.

Resumen

En la Estación Experimental del Tabaco de San Juan y Martínez, Pinar del Río, se realizó un cruzamiento entre las variedades de tabaco negro 'Criollo 98' y 'Corojo 99' con el androestéril de la variedad 'Havana 92' obtenido con dos fuentes de citoplasmas N. suaveolens y N. bigelovii. Como resultado de este cruzamiento se obtuvo la F₁ y posteriormente se realizaron los retrocruzamientos. Después de cinco generaciones de retrocruzamientos y selección genealógica se obtuvieron los análogos androestériles de las variedades 'Criollo 98' y 'Corojo 99', a los que se les evaluaron las características morfológicas: longitud y anchura de la hoja mayor, número de hojas útiles y altura total de la planta según metodología descrita por Torrecilla *et al.* (2001). Cuando se utiliza el citoplasma de N. suaveolens el estigma sobresale por encima de la corola de 0.5 a 1 cm de longitud, lo cual es muy importante que esto facilita la polinización, mientras que cuando se utiliza la fuente de N. bigelovii el estigma queda de 1.5 a 2 cm por debajo de la corola. En este caso hay que abrir la corola y llegar al estigma para efectuar el cruzamiento, lo que se hace difícil y es costoso. Como resultado de este trabajo concluimos que se debe utilizar como fuente de citoplasma la de N. suaveolens y continuar el programa de retrocruzamientos para la obtención de los análogos androestériles de la 'Criollo 98' con citoplasma de N. bigelovii y para la variedad 'Corojo 99' con las dos fuentes de citoplasmas hasta uniformar las características morfológicas de la variedad. Las nuevas variedades androestériles se emplearán en la comercialización y podrán ser utilizadas como fuente de mejoramiento en los nuevos cruces que se realizarán.

Título: Evaluación del efecto del estrés salino sobre el proceso de germinación de *Phaseolus vulgaris* L. BAT-58.

Autores: Dra. Amalia Domínguez Lic. Yunel Pérez Hernández Lic. Rodolfo Darías, MSc. Leticia Fuentes¹.

¹ Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". CP: 44740, email: amalia.dominguez@umcc.cu, yunel.perez@umcc.cu, rodolfo.darias@umcc.cu, leticia.fuentes@umcc.cu

Resumen:

Los frijoles constituyen una de las principales fuentes de alimentación por su gran hábito de consumo y por su valor nutritivo. Sin embargo, y a pesar de su importancia son varios los factores que afectan negativamente su cultivo. En el presente trabajo se evaluó la germinación de *Phaseolus vulgaris* L. *in vitro* en condiciones de salinidad (0-100 mM) y se determinó el % de semillas germinadas, el porcentaje de raíces por plántula, la longitud de los hipocótilos y los niveles de actividad enzimática de enzimas antioxidantes como la catalasa y la peroxidasa en plántulas de 4 días de germinadas. El porcentaje de germinación más alto se alcanzó a la concentración de 20 mM, lo que evidencia un favorecimiento de este proceso; disminuyó progresivamente para concentraciones mayores de cloruro de sodio. Se detectó un incremento en la actividad enzimática tanto de la catalasa como de las peroxidasa, incluso en el primer día, en la medida que aumentó la concentración salina en el medio, lo cual indica un posible mecanismo fisiológico en respuesta al estrés producido. Se corroboró la mayor cantidad de raíces y la mayor longitud del hipocótilo lo alcanzaron las plántulas cultivadas en concentración de NaCl 20 mM. En algunos casos se detectaron síntomas de deshidratación o necrosis del tejido para las mayores concentraciones salinas,

Palabras claves: *Phaseolus vulgaris*, BAT-58, salinidad, actividad enzimática.

Título: Estudio histológico del proceso de organogénesis *in vitro*, en *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, bajo condiciones de estrés salino.

Autores: Maryla Sosa del Castillo Leticia Fuentes Alfonso Yunel Pérez Hernández Silvia Alemán García Sergio González Suárez

¹ Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". CP: 44740, email: maryla.sosa@umcc.cu, leticia.fuentes@umcc.cu, yunel.perez@umcc.cu

² Facultad de Biología, Universidad de La Habana. CP10400 srgonz@fbio.uh.cu

Resumen:

La lentitud de los trabajos de mejora genética por métodos convencionales, poco aplicables al género *Stylosanthes*, y la posibilidad de obtener plantas con mayores niveles de tolerancia a la salinidad mediante el cultivo reiterado en estas condiciones dada la posibilidad de existencia de genes de tolerancia en todas las plantas; apuntan hacia la utilización combinada de métodos biotecnológicos y selectivos, como el cultivo *in vitro* ampliamente utilizado en este grupo de leguminosas forrajeras. En el presente trabajo se realizaron estudios del proceso calogénico en diferentes explantes de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, tanto bajo la influencia de medios de cultivo suplementados con diferentes combinaciones hormonales como bajo la influencia de diferentes concentraciones de cloruro de sodio en una combinación hormonal específica. Se utilizaron semillas donadas por la EEPF "Indio Hatuey" infectadas con etanol 70 %, NaClO al 5% y al 1% durante 15 y 20 min respectivamente, las cuales fueron sembradas en medio MS (Murashige and Skoog, 1956) carente de hormonas. En un primer ensayo se utilizaron fragmentos de hipocótilos, hojas cotiledonales y hojas verdaderas que fueron cultivados en medio MS suplementado con 2,4-D (1, 2 y 3 mg/L) y 6-BAP (2y 4 mg/L). En el segundo estudio se cultivaron los mismos explantes descritos anteriormente, en medio MS suplementado con 1 mg/L de 2,4 D y 2 mg/L de 6-BAP, así como 5 concentraciones de NaCl (0, 25, 50, 75 y 100 mM). Se realizó estudio histológico en ambos ensayos, mediante fijación en formol al 10 %, cortes en microtomo de parafina y tinción con diferentes combinaciones de colorantes. Los callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, obtenidos a partir de diferentes explantes manifestaron diferencias en cuanto al nivel de dediferenciación de los tejidos durante la calogénesis, así como variabilidad en la textura de los callos una vez formados, dependiendo de la concentración hormonal utilizada, aunque fue posible obtener callos en todas las combinaciones. Una vez sometidos a cultivo de tejidos, los explantes utilizados mostraron formaciones calogénicas en las zonas de corte, a la semana de montado el ensayo. Entre 15-21 días de siembra toda la superficie vegetal se había dediferenciado en masas calogénicas, que continuaron un proceso de rediferenciación en plántulas completas al día 30-35 días, lo que sugiere un proceso de organogénesis directa en estas condiciones. El mayor número de plántulas se obtuvo en los tratamientos de 25 y 50 mM/L. En algunos casos se detectaron síntomas de deshidratación o necrosis del tejido para las mayores concentraciones salinas. Para los mayores niveles de salinidad, aunque se obtuvieron masas tejido indiferenciado, la velocidad de transformación fue más lenta y tonalidades diferentes en la coloración. El desarrollo de tejido meristemático y la yema adventicia a partir de un grupo de células que mantiene comunicación con el resto del tejido, entre otras características apunta hacia callos con respuesta organogénica en ambos ensayos.

Palabras claves: *Stylosanthes guianensis* CIAT 184, salinidad, actividad enzimática, organogénesis.

Título: Evaluación de la actividad enzimática antioxidante en *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, durante el proceso de organogénesis en condiciones de estrés salino

Autores: Leticia Fuentes Alfonso Yunel Pérez Hernández Amalia Domínguez Suárez, Anesio Mesa Sardiñas Sergio González Suárez

¹ Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". CP: 44740, email: leticia.fuentes@umcc.cu, yunel.perez@umcc.cu, camalia.dominguez@umcc.cu

² Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Perico, Matanzas. Email: anesio.mesa@indio.atenas.inf.cu

³ Facultad de Biología, Universidad de La Habana. CP10400 email: ajilez@fbio.uh.cu

Resumen:

Stylosanthes guianensis cv. CIAT-184 es una leguminosa forrajera promisoriosa para la explotación ganadera en suelos ácidos y afectados por acidez, catalogada con diferentes niveles de tolerancia a salinidad. El presente trabajo tiene como objetivos, determinar los niveles de tolerancia a salinidad durante la germinación *in vitro*, así como evaluar la respuesta organogénica y enzimática de diferentes explantes sometidos a calogénesis en condiciones de salinidad. Semillas de *Stylosanthes* fueron sembradas en diferentes concentraciones de NaCl (0-100 mM) sobre algodón estéril. Se evaluó porcentaje de germinación a los 15 y 30 días, así como longitud de raíces, de tallos y número de hojas. Para la inducción de callus se utilizaron fragmentos de hipocótilos, hojas cotiledonales y hojas verdaderas de plántulas germinadas en el grupo control que fueron subcultivados a frascos de cristal que contenían 30 mL de medio suplementado con sales MS, vitaminas B5, y varias concentraciones de Na Cl (0, 25, 50, 75, 100 mM/L). En ambos ensayos se realizó determinación de actividad enzimática de catalasas y peroxidasas, así como contenido de carbohidratos totales y de proteínas. El porcentaje de germinación más alto se alcanzó en el rango de concentración entre 10-20 mM/L, lo que evidencia un favorecimiento de este proceso; disminuyendo progresivamente para concentraciones mayores de cloruro de sodio. Se detectó incremento en la actividad enzimática tanto de la catalasa como de las peroxidasas a medida que aumentó la concentración salina en el medio de germinación, lo cual indica un posible mecanismo fisiológico en respuesta al estrés producido. Sin embargo, durante el proceso de calogénesis tanto con catalasas como en peroxidasas hubo incrementos en la actividad hasta 50 mM y luego un decremento aunque no por debajo del control. Asimismo de montado el ensayo para inducir calogénesis en condiciones salinas, todos los explantes utilizados mostraron formaciones calogénicas en las zonas de corte, proceso que continuó progresando para todas las salinidades pero con diferencias en cuanto a masa fresca, coloración y respuesta organogénica. El contenido de carbohidratos totales mostró un incremento en la medida que aumentó la concentración de la sal.

Palabras claves: *Stylosanthes guianensis* CIAT 184, salinidad, actividad enzimática, organogénesis.

Estimación De La Diversidad Genética Con Marcadores Aflp En El Complejo *Capsicum* (Ajíes Y Pimientos) Conservados *In Situ* En Cuba

Odalys Barrios¹, Félix A. Guzmán², Víctor Fuentes⁴, Myriam C. Duquè³, Zoila Fundora¹, Leonor Castiñeira¹, Tomás Shagarosky¹, Raúl Cristóbal¹ Y M. Carmen De Vicentè²

¹instituto De Investigaciones Fundamentales En Agricultura Tropical (Inifat), C. Habana

²internacional Plant Genetic Resources Institute (Ipgr) Ciat, Cali, Colombia

³centro Internacional De Agricultura Tropical (Ciat), Cali, Colombia

⁴instituto De Investigaciones En Fruticultura Tropical (Ift), C. Habana

E-mail panque@infomed.sld.cu, obarrios@inifat.co.cu

El estudio de conservación *in situ* de la diversidad de *Capsicum* spp. en áreas rurales se desarrolló durante tres años, se colectaron 85 plantas en 39 huertos de occidente (Sierra de Rosario), centro (Macizo Guamuhaya) y oriente (Macizo Nipe-Sagua-Baracoa). Se seleccionaron 21 accesiones de la colección *in situ* para comprobar la complementación de ambas estrategias de conservación. Se estudió diversidad morfológica utilizando el Listado de Descriptores del IPGRI y la diversidad genética empleando marcadores AFLP. Fue calculada la distancia genética a partir de la similaridad genética $S_{dij} = 1 - S_{ij}$. Se empleó el Análisis de Correspondencia Múltiple para el procesamiento de datos. De las 65 bandas polimórficas, siete fueron únicas, la presencia de bandas únicas evidenció que existe variabilidad valiosa en los sitios de colecta. El análisis de conglomerados aplicado sobre las coordenadas generadas por el ACM sugirió que con 5 grupos se retiene el 95% de la variabilidad total. El índice de diversidad genética total fue $H_t = 0.344$. Al comparar la diversidad molecular de las accesiones de los huertos ($H_i = 0.336$) con la colección *ex situ* ($H_i = 0.333$), se observó que era semejante, lo que implica que la selección de los huertos fue adecuada para conservar la diversidad del germoplasma. La diversidad entre estos dos grupos (G_{st}) presentó el 3% de la diversidad total, lo que sugirió que en los huertos hay variantes genéticas que no están en la colección *in situ*, y evidenció que algunos huertos pueden ser sitios potenciales de colecta lo que enriquecería la representatividad de la colección *ex situ*. Se detectaron 11 bandas únicas en los huertos y ninguna en la colección *in situ*. El análisis de diversidad para comparar accesiones de los huertos, basados en su procedencia geográfica, indicó que los valores de diversidad dentro de las regiones fueron equivalentes ($H_i = 0.341/0.299/0.304$). Las bandas únicas de occidente (6) y centro (1) identificaron a *C. chinense* y *C. frutescens* semicultivado, lo que infirió que existe una diversidad particular del acervo de genes de las especies en estas regiones, no se detectaron bandas únicas en oriente, debido al flujo de genes en la región. Al comparar la diversidad de las accesiones cultivadas y semicultivadas, se constató que la cantidad de diversidad en las accesiones semicultivadas es ligeramente mayor ($H_i = 0.308$) que en cultivadas ($H_i = 0.274$), lo que corroboró que la diversidad genética contenida en cultivares primitivos es mayor, por tanto *C. annum* considerada la especie más cultivada, exhibió a su vez el valor más bajo de $H_i = 0.184$. El dendrograma generado a partir del cálculo de la distancia genética entre poblaciones de *Capsicum* visualizó cinco clases atendiendo a un nivel de distancia de 0.47, las cuales mantienen una distribución similar al Análisis de Correspondencia Múltiple realizado. El estudio de ajíes y pimientos a través de la vinculación de análisis morfológicos y moleculares demostró que, los huertos familiares son agroecosistemas que se deben considerar en el diseño de estrategias de conservación complementaria *in situ*, como elemento fundamental para definir criterios que permitan el uso y manejo adecuado de los recursos genéticos del género *Capsicum* en Cuba.

Marcadores moleculares empleados en la especie *Vitis vinifera* L. en Argentina

Liliana Martínez. Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Alte. Brown 500, M 5528 AHB, Chacabuco Coria, Mendoza, Argentina. E-mail: lmartinez@fca.uncu.edu.ar

Resumen

La vid europea *Vitis vinifera* L. es originaria de la región transcaucásica, donde existe una gran diversidad genética. Esta especie fue introducida en el nuevo mundo durante la conquista española en el siglo XVI y llegó a Argentina en el año 1562. Actualmente el número de cultivares que existen a nivel mundial oscilan entre 5000 y 8000. Estos cepajes necesitan ser identificados de manera inequívoca. El primer método que se usó para clasificar variedades de *Vitis vinifera* fue la ampelografía. Esta metodología es rápida, simple, poco onerosa, pero su principal desventaja radica en que está fuertemente afectada por el ambiente, con lo cual la identificación de variedades se hace imprecisa y poco certera. Los marcadores moleculares, basados en el polimorfismo encontrado a nivel de ADN, superan esta desventaja. Entre los marcadores moleculares más exitosamente empleados en vid se encuentran los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y microsatélites. En la Cátedra de Fisiología Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo se han empleado marcadores microsatélites para el fingerprinting de variedades finas de vinificación; variedades criollas argentinas y peruanas, clones de las variedades Malbec y Syrah. También han sido empleados para resolver numerosos casos de sinonimia y homonimia en viñedos comerciales y para estudios de diversidad genética. Por otra parte el empleo de marcadores AFLP ha permitido la caracterización y diferenciación de las variedades criollas argentinas en relación a variedades francesas y españolas. Finalmente se emplean marcadores ITS (Internal Transcribed Spacer) con el fin de caracterizar molecularmente aislamientos de *Botryosphaeria* spp, hongo de madera que causa una de las enfermedades actuales más importantes de la vid en Argentina y que es conocida como "hoja de malvón".

Caracterización Molecular De Aislados Venezolanos De Patógenos De Cacao. Estudio Preliminar.

Sosa D¹, Monsalve L², García M³, Rumbos R⁴, Parra D⁵ e Infante D⁶.

1. Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Fundación Instituto de estudios Avanzados (IDEA). Caracas, Venezuela. daynetsosa@yahoo.es

2. Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Fundación Instituto de estudios Avanzados (IDEA). Caracas, Venezuela. luzsmg@yahoo.es

3. Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Fundación Instituto de estudios Avanzados (IDEA). Caracas, Venezuela. lina_gabri@yahoo.com

4. Estación Local Caucahua, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Miranda, Venezuela. arumbos@inia.gov.ve

5. Estación Local Chama, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Mérida, Venezuela. dparra@inia.gov.ve

6. Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Fundación Instituto de estudios Avanzados (IDEA). Caracas, Venezuela. dinfante@idea.gov.ve

Resumen

Theobroma cacao L. es atacado por numerosos patógenos fúngicos dentro de los que se encuentran *Phytophthora* sp., *Moniliophthoralaroreri*, *Crinipellis pernicioso*, *Fusarium* sp., *Ceratocystis fimbriata*, *Lasiodiplodia theobromae*, etc. En Venezuela se reconocen tres regiones productoras de cacao: Occidental, Central y Oriental, en cada una de ellas se

registra la existencia de materiales con características asociadas a una calidad intrínseca deseable así como de diferentes patógenos fúngicos que afectan la calidad y la producción de las plantaciones. Existen diferencias en cuanto a la distribución y severidad con que estas enfermedades afectan a las diferentes cacaoteras. Estas diferencias pueden ser debidas a la existencia de patotipos de cada especie de patógeno. Sin embargo, existe un gran desconocimiento de la diversidad genética presente en los patógenos fúngicos del cacao y su interacción con el hospedero en las diferentes regiones de la geografía venezolana. La identificación adecuada de los patógenos de las plantas cultivadas es importante en la implementación de estrategias para el manejo y control de enfermedades (Weiland y Sundsbak, 2000). Para ello se requiere la caracterización fenotípica y genética de los patógenos de plantas persistentes en un área determinada. Esta información es de gran valor puesto que permitirá conocer la diversidad genética dentro y entre los hongos patógenos, así como nos proveerá la base para la selección de aislados que serán utilizados en la identificación de genes de resistencia a estas enfermedades para ser utilizados en programas de mejora. Además, el estudio de la variación genética tiene implicaciones taxonómicas, además de constituir una gran ayuda en programas de mejora genética en el desarrollo de cultivares resistentes a estas enfermedades. Los análisis moleculares se utilizan en la identificación de hongos especialmente para géneros dentro de los cuales las especies tienen características morfológicas coincidentes entre ellas (Martin *et al.*, 2000). El objetivo de este proyecto es evaluar las relaciones genéticas y el nivel de diversidad genética dentro y entre diferentes aislados de los patógenos fúngicos más importantes del cacao, así como establecer el nivel de diferenciación geográfica para cada aislado. Como etapa final estaría el establecimiento de un cepario de patógenos fúngicos como parte muy importante dentro de las investigaciones y perspectivas para el buen funcionamiento de las actividades de control biológico. A tal fin se realizan colectas para identificar y aislar hongos patógenos en las principales zonas cacaoteras del país, la identificación preliminar de los agentes causantes de los síntomas se realiza en base a las características de las colonias y de los conidióforos y conidios en medios de cultivo utilizando claves micológicas. En este trabajo están evaluando una serie de métodos de caracterización molecular que incluyen la utilización de cebadores específicos para amplificar varios segmentos del rDNA mitocondrial y nucleico, el empleo de cebadores derivados de la secuencia consensórica repetitiva (ERIC), y la utilización de marcadores intermicrosatélites (ISSR) para los estudios de diversidad genética.

Palabras clave: hongos, patógenos *Theobroma*, rDNA, ISSR, ERIC.

Determinación de la técnica de análisis de punta de raíz de plantas nativas de Rio Grande do Sul criopreservadas

Izani B. Acosta¹, Maria L. L. Balbinoti¹; Cibele M. Galló; Tatiane M. Souza; Ana E. N. Bendef⁴; Gilberto de Lima Garcia²; Luciana B. Dodé³; Maria da Graça Martino-Róth

1. Estudiante del curso de licenciatura en Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Pelotas-RS, Brasil.
2. Profesor(a) Doctor(a) de Genética en la Universidad Católica de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil.
3. Profesor(a) Doctor(a) de Biotecnología en la Universidad Católica de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil.
4. Laboratorista en Genética en la Universidad Católica de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil.

Laboratorio de Genética, UCPel: Calle Félix da Cunha, 412 – 96010-000 Pelotas, RS, Brasil.

RESUMEN

La criopreservación ha sido utilizada para las semillas de innumerables especies como forma de conservación. Esta técnica permite mantener el germoplasma por varios años sobre temperatura ultra reducida, en N líquido de -50°C a -196°C en la fase de vapor, conservando así el material biológico y asando la criopreservación, ya que en esas temperaturas muy bajas el metabolismo celular queda tan reducido que la deterioración biológica es paralizada. En el proceso las semillas son acondicionadas en tubos "Falcon" y mantenidas inmersas en nitrógeno líquido por una hora, y después descongeladas en baño maría a 37°C . Todas las semillas fueron lavadas en agua corriente y distribuidas en papel "germitest", siendo cultivadas a 28°C , por un período suficiente para la germinación. Después de germinadas, los meristemas pasan por un proceso de lavado en agua destilada y hidrólisis con HCl 5N, lavadas e inmersas en agua destilada a temperatura ambiente. Las láminas fueron obtenidas por maceración de plantas de las raíces, y coloreadas con orceína acética. Para testar el efecto de tratamiento pueden ser analizados varios indicadores como: índice mitótico, presencia de células con micronúcleos, células binucleadas y la estabilidad cromosómica que es la habilidad del genoma de mantener su estructura y función. El objetivo de este trabajo es determinar las técnicas de preparación de las láminas de los cultivares *Psidium guajava* (membrillo), *Luffa cylindrica* (esponja vegetal), *Pithecoctenium squalus* (peine de mono), *Helianthus annuus* (girasol), *Lagenaria vulgaris* (zapallo), *Euchlaena mexicana* (teocinte) y *Avena fatua* (avena). Como resultados de obtuvo la coloración adecuada para cada cultivo: *Psidium guajava* (membrillo) y *Pithecoctenium squalus* (peine de mono): 10 minutos de hidrólisis, 5 minutos de agua destilada y trituración/coloración con orceína pura; *Luffa cylindrica* (esponja vegetal) y *Lagenaria vulgaris* (zapallo): 12 minutos de hidrólisis, 10 minutos de agua destilada y trituración/coloración con 2 minutos de orceína pura; *Helianthus annuus* (girasol), *Euchlaena mexicana* (teocinte) y *Avena fatua* (avena): 10 minutos de hidrólisis, 8 minutos de agua destilada y trituración/coloración con orceína pura. A partir de estos resultados se iniciará la evaluación microscópica de las anomalías del ciclo mitótico, anomalías interfásicas y del índice mitótico de las plantas criopreservadas.

PALABRAS CLAVES: Criopreservación, Anomalías del ciclo mitótico, Índice mitótico.

Efecto de temperaturas ultra bajas sobre la actividad bioquímica y fisiológica de semillas de angico-rojo [*Parapiptadenia rigida* (Benth.)] Brenan.

Rosiane K. Brandão. Escola de Ciências Ambientais/ Universidade Católica de Pelotas. PIBIC-CNPq; Luciana B. Dode,; Escola de Ciências Ambientais/ Universidade Católica de Pelotas, Felix da Cunha 412, Pelotas, RS, Brasil.
lucianabicca@terra.com.br

Resumen

El riesgo de una creciente pérdida de especies en los ecosistemas del Sur de Rio Grande do Sul por la ampliación de áreas de monocultivo con explotación perenne y/o invasiva, torna el desarrollo de tecnologías que amplíen la capacidad de preservación del germoplasma vegetal a medio y largo plazo indispensable para la protección de la biodiversidad. El Angico-rojo [*Parapiptadenia rigida* (Benth.)] Brenan, es una leguminosa perteneciente a la subfamilia Mimosoideae presente frecuentemente en la región sur de Brasil. Esta especie se destaca por ser una excelente planta para reforestamientos mixtos en áreas degradadas. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar el efecto bioquímico y fisiológico del tratamiento criogénico en semillas de angico-rojo. Fue desarrollado en los Laboratorios de Bioquímica y Química Ambiental de la Universidade Católica de Pelotas

durante el segundo semestre de 2006. Las semillas obtenidas en la Feria de Semillas Criollas fueron divididas en dos lotes: control y crio. Las semillas del lote crio fueron inmersas en nitrógeno líquido durante una hora e descongeladas en estufa a 37°C por cinco minutos. Seguidamente, semillas crio y control fueron distribuidas sobre papel humedecido con agua destilada e incubadas a 28°C en ambiente oscuro durante siete días. Después de período de incubación, las plántulas fueron caracterizadas cuanto a su germinación (%), largo total, largo de la parte aérea y del sistema radicular (cm) y, peso fresco de plántulas (g). A partir de las plántulas normales fue preparado extracto en tampón pH 7 y utilizada la fracción soluble de las proteínas para análisis enzimáticos: amilasa, deshidrogenasa e transaminasas a través de dos POP de los kits Labtest® y Katal®. Las semillas de exhibieron un porcentaje satisfactorio de germinación en ambos tratamientos: 96,5% para el control y 73,5% en el crio. Los parámetros morfométricos observados en el control también fueron superiores a los obtenidos en el tratamiento criogénico. Extractos de plántulas obtenidas en el tratamiento control exhibían 260 UA/dL de actividad amilásica, en cuanto que, cuando submetidas al tratamiento criogénico presentaban 205,45 UA/dL; la actividad de la DHL en las plántulas control e en las semillas a temperaturas ultrabajas fue 34,5 U/L y 260 U/L, respectivamente. La actividad de transaminasas también fue superior en el tratamiento crio. Además de alterar proceso germinativo fisiológicamente, las temperaturas ultrabajas causaron alteraciones en los parámetros morfométricos analizados y en la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo y de compuestos nitrogenados llevando a que deban ser desarrollados estudios más detallados.

Palabras claves: conservación, biodiversidad, árboles, semillas.

Evaluación preliminar de la estabilidad genética de plantas in vivo de *Lepidium virginicum* L.

Brucato, MG^{1,2}, Trujillo, I¹, Oropeza, M².

¹Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Centro de Estudios de Agroecología Tropical (CEDAT). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR). San Antonio de los Altos Apartado 47925. Caracas 1010A. Venezuela. e-mail: iselen03@yahoo.com

²Laboratorio de Mejoramiento Vegetal. Centro Botánica Tropical. Instituto de Biología Experimental IBE. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. UCV. Apartado 47114. Los Chaguaramos Caracas 1041A. Venezuela.

RESUMEN

Lepidium virginicum L. es una planta usada popularmente debido a sus múltiples propiedades farmacológicas, medicinales y por presentar acción contra ciertos parásitos. Se utilizaron 100, 200, 300, 400 y 500 mg de tejido foliar de plantas de *Lepidium virginicum* L. mantenidas en condiciones de vivero. Se procedió a efectuar la metodología propuesta por Doyle and Doyle (1990) con modificaciones para la extracción del ADN. Posteriormente se realizaron mediciones para verificar calidad y cantidad de ADN obtenido, empleando un gel de agarosa a 0,8% y mediciones con el espectrofotómetro para determinar relación 260/280. Los resultados indican que al utilizar 400 mg y 500 mg del tejido foliar, y empleando ciertas modificaciones al protocolo propuesto por Doyle and Doyle (1990) se puede obtener ADN de alta calidad y cantidad, presentando una relación de absorbancia 260/280 entre 1,7-1,96. El ADN extraído fue utilizado para la caracterización genética de las plantas desarrolladas in vivo a través de la técnica RAPD. Para la amplificación se probaron 6 iniciadores de secuencia arbitrada la serie OPA 3, 4, 9,11,

15 y 18 (Operon Technologies) en un volumen de reacción de 25 µl. Los resultados obtenidos mostraron que 4 de los iniciadores probados generaron amplificaciones de bandas reproducibles originando fragmentos de ADN comprendidos entre 750 pb hasta 9000 pb y los patrones de bandeado evidenciaron una alta estabilidad genética de las plantas de *Lepidium virginicum* L. in vivo.

Caracterización molecular de una colección núcleo de *xanthosoma* spp. A través de la técnica de ISTR

Marilys D. Milian¹, Luis Rojas², Yoel Beovides¹, W. Rohde³, Maria I. Roman¹.

¹**Instituto Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT).**

²**Instituto de Biotecnología de las plantas (IBP).**

³**Instituto MAZPLANT, Alemania.**

Las colecciones núcleo se crean con el propósito de incrementar la eficiencia de la descripción del germoplasma y su explotación garantizando la máxima diversidad genética mientras que se reduce el tamaño de la colección. En el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) de Santo Domingo, Villa Clara, cuenta con una amplia colección (71 clones) de *Xanthosoma* spp. que requiere de la creación de un núcleo que facilite su manejo y accesibilidad. En estos términos, la información sobre la caracterización es una actividad importante para la creación de dicho núcleo, por tanto en el presente trabajo se realiza el estudio molecular a través de Técnica de Secuencias Invertidas Repetidas (ISTR) descrito por Rohde (1996), de un grupo de clones para evaluar su representatividad de la variabilidad presente en la colección completa. Al analizar las diferentes combinaciones de los cebadores empleados en la técnica de ISTR basada en la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se obtuvo un alto porcentaje de polimorfismo en las tres combinaciones de cebadores ensayados. Se encontraron bandas de 2000, 1200, 800, 400, 200 y 100 pb, lo cual indica que estas combinaciones son correctas para el estudio. Los resultados corroboran las variaciones observadas en la caracterización morfológica e isoenzimática de los clones estudiados (Milián, 2000). De esta forma se recomienda el empleo de estas técnicas para la identificación de genotipos de *Xanthosoma* y de otros géneros de interés en el país.