

**Memorias VII Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal (17-21 de abril de 2006)**  
**Memories of the VII International Symposium on Plant Biotechnology ( April 17-21, 2006)**

## **TALLER PLATANOS Y BANANOS**

### **MICROPROPAGACIÓN DE PLÁTANO (*MUSA AAB*) EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL (BIT®)**

Maritza Escalona<sup>1</sup>, Justo González-Olmedo<sup>1</sup>, Inaudis Cejas<sup>1</sup>, Carlos Aragón<sup>1</sup>, Iris Capote<sup>1</sup>, Roberto Rodríguez<sup>2</sup>, María Jesús Cañal<sup>2</sup>, Jorge Sandoval<sup>3</sup>, Sophie Roels<sup>4</sup>, Pierre Debergh<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, CP. 69 450, Cuba e-mail: mescalona@bioplantas.cu

<sup>2</sup>Universidad de Oviedo, España.

<sup>3</sup>CORBANA, Costa Rica.

<sup>4</sup>Universidad de Gent, Bélgica.

#### **RESUMEN**

El efecto positivo y las ventajas de la técnica de inmersión temporal en la propagación *in vitro* ha sido evaluada en diferentes especies de plantas y ahora se implementó como una alternativa para el plátano (*Musa AAB*) clon CEMSA ¾. Algunos parámetros de cultivo que afectan la eficiencia biológica del sistema BIT® fueron investigados para aumentar la tasa de multiplicación y la calidad morfológica de los brotes. De todos ellos, el empleo de tres subcultivos sucesivos (cada 28 días) en medio de cultivo con 4.44 ì mol de Metatopolina y con aumento del volumen de medio de cultivo en función del aumento de la biomasa resultó el de mayor incidencia en la tasa de multiplicación y calidad de los brotes. La estabilidad genética de las plantas fue determinada por AFLP y citometría de flujo y en áreas de CORBANA se evaluó el crecimiento y productividad de de las mismas por tres generaciones. La integración de estos permiten recomendar esta forma de propagación como muy eficiente y segura para la micropropagación de este clon a escala comercial.

Palabras clave: CEMSA ¾, metatopolina, tasa de multiplicación

### **PLANTAIN (*MUSA AAB*) MICROPROPAGATION USING TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR (BIT®)**

#### **ABSTRACT**

The positive and reliable effect of temporary immersion technique on *in vitro* propagation in different plant species has been evaluated and it is now implemented as an alternative for plantain (*Musa AAB*) CEMSA ¾. Some culture parameters affecting the efficiency of the BIT® were investigated to improve multiplication rate and morphological shoot quality. Among them, three successive subculture (28 days per subculture) on medium supplemented with 4.44 ì mol Metatopolina and increasing the volume of culture medium in function of biomass was proved to be the most efficient. Genetic stability was evaluated using AFLP and flow cytometric probes and in CORBANA areas, growing, and yield of the plants were evaluated for three generations. The integration of these results suggested this culture method as very efficient and reliable for plantain micropropagation.

Key words: CEMSA ¾, metatopolina, multiplication rate

### **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CULTURAL Y PATOGENICA DE *DEIGHTONIELLA TORULOSA* (SYD.): AGENTE CAUSAL DEL MANCHADO DE LAS HOJAS DE PLANTAS ACLIMATIZADAS DE *MUSA SPP.***

Michel Leiva-Mora,\* Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Mileidy Cruz-Martín, Berkis Roque. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: michel@ibp.co.cu

#### **RESUMEN**

*Deightoniella torulosa* (Syd.) M. B. Ellis se conoce como un parásito débil de hojas viejas de banano así como en hojas de plantas jóvenes de *Musa*. Los conidios producidos por este patógeno constituyen las principales estructuras causantes del manchado de las hojas en condiciones naturales. El presente trabajo tuvo como objetivo principal el estudio de los caracteres morfológicos, culturales y patogénicos de *Deightoniella torulosa* (cepa CCIBP-Dt1), agente causal del manchado de las hojas de plantas aclimatizadas de *Musa spp.* Para la inducción de la esporulación y la caracterización cultural fueron usados en diferentes medios de cultivo (PDA, agar-agua al 2%, Saboraud,

Mycophil, V-8) los mismos fueron incubados 20°C durante 20 días con luz fluorescente constante. La prueba de patogenicidad se efectuó en plantas de los cultivares 'Grande naine' (AAA), 'Yangambi km 5' (AAA) y 'FHIA-18' (AAAB) de tres meses de aclimatizadas y 'Pisang jaribuaya' (AAB). Los conidióforos midieron 35-70 µm de largo x 13-25 µm de ancho, los mismos fueron rectos o ligeramente curvados, subhialinos u oliváceos. Algunos con con hasta 13 pseudoseptos. Los conidios fueron obpiriformes a elipsoidales. Las colonias fueron de color pardo o negro en la superficie y reversos negros estromáticos. Numerosos conidios se obtuvieron a los 20 días en el medio de cultivo PDA. En la inoculación artificial los primeros síntomas se observaron como pequeñas lesiones necróticas (1 a 2 mm) acompañadas de un halo amarillo, estas aumentaron de tamaño hasta alcanzar formas ovales con un borde negro necrótico. Los cultivares 'Grande naine' y 'Yangambi km 5' fueron afectados en mayor medida que el cultivar 'FHIA-18'. La caracterización morfológica, cultural y patogénica de este patógeno puede ser útil para garantizar métodos reproducibles de inoculación artificial y servir de modelo para el estudio de la interacción *Musa* hongo en condiciones controladas.

Palabras clave: caracteres morfológicos, enfermedades de bananos, esporulación, hongos fitopatógenos

#### **MORPHOLOGICAL, CULTURAL AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF *DEIGHTONIELLA TORULOSA* (SYD.): CAUSAL AGENT OF LEAF SPOTTING IN ACCLIMATIZED *MUSA* SPP. PLANTS**

##### **ABSTRACT**

*Deightoniella torulosa* (Syd.) M. B. Ellis is known a weak parasite of older foliages of banana and has been reported on young leaves of *Musa* seedlings. Conidia produced by this pathogen are the main structures for causing *Musa* leaf spotting in natural condition. *In vitro* conidia production is an important task for identifying and characterize it. In the present work were studied aspects related with cultural, morphological and pathogenic characterization of *Deightoniella torulosa* (strain CCIBP-Dt1), causal agent of leaf spotting in acclimatized *Musa* spp. plants. For sporulation induction and cultural characterization were used different culture media (PDA, Water-agar 2%, agar poor synthetic nutrient medium, Saboroud, Mycophil-Agar, V-8). They were incubated with continuous fluorescent light and temperature was maintained at 20°C during 20 days. Pathogenicity test was performed on three-month-acclimatized banana plants ('Grande naine' (AAA), 'Yangambi km 5' (AAA), 'FHIA-18' (AAAB) and 'Pisang Jaribuaya' (AAB)). Cultural colonies characteristics were dark stromatic at mycelia reverse, brown dark colors were predominant on superficial mycelia. Conidiophores were 35-70 µm in large x 13-25 µm in width, straight or slightly curved, obpyriform to obclavate, subhyaline to olive in colour with three to 13 pseudosepta. Obpyriform to ellipsoid conidia were produced on all culture media. Potato Carrot Agar and V-8 were the best culture media for conidia production. By artificial inoculation first symptoms appeared as black necrotic spots between 1 and 2 mm in diameter, they increase in size, becoming oval in shape with a black border. 'Grande naine' and 'Yangambi km 5' were the most affected cultivars. Cultural, morphological and pathogenic characterization of this pathogen could be important for artificial inoculation and dissection of host-pathogen interaction between this pathogen on different banana cultivars in controlled condition.

Key words: banana diseases, morphological characts, phytopathogen fungi, sporulation

#### **TRANSFORMACIÓN GENÉTICA MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* EN EL CULTIVAR DE PLÁTANO CEMSA ¾ (*MUSA* AAB)**

Borys Chong<sup>1</sup>, Rafael G. Kosky<sup>1</sup>, Idalmis Bermúdez-Carabaloso<sup>1</sup>, Jorge López<sup>3</sup>, José M. Machado<sup>1</sup>, Lázaro Hernández<sup>4</sup>, Maritza Reyes<sup>1</sup>, Marisol Tejeda<sup>1</sup>, Nery Montano<sup>3</sup>, Bárbara Ocaña<sup>1</sup>, Laszlo Sagi<sup>2</sup>, Ronny Swennen<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. email: boris@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven (KUL). Bélgica.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. Cuba.

<sup>4</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Cuba.

##### **RESUMEN**

El 'CEMSA ¾' es uno de los cultivares más importantes de plátano cultivados en Cuba. El mismo fue afectado severamente por la entrada al país en 1990 de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la enfermedad conocida como Sigatoka negra. La resistencia a esta enfermedad puede incrementarse insertando

genes que codifiquen para proteínas antifúngicas a través de la transformación genética. En este trabajo suspensiones celulares embriogénicas del cultivar de plátano 'CEMSA 3/4' (*Musa AAB*) fueron transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Para la transformación, se utilizaron los plasmidios binarios pHCA58 y pHGA91 los cuales portaban los genes que codifican para quitinasa (*Phaseolus vulgaris*) y AP24 (*Nicotiana tabacum*) el primero y glucanasa (*Nicotiana tabacum*) y AP24 el segundo, todas relacionadas con la defensa de plantas ante el ataque de agentes patógenos. Ambos plasmidios portaban como marcador de selección el gen *bar*, el cual codifica para la fosfinotricin acetiltransferasa. Más de 200 plantas posibles transformadas fueron regeneradas después de tres meses en medio de cultivo selectivo y 30 líneas por cada plasmidio fueron aclimatizadas en casa de cultivo. De ellas, nueve líneas posibles transformadas por cada construcción genética fueron analizadas por la reacción en cadena de la polimerasa para comprobar la presencia en el genoma de la planta de los genes de interés, resultando todas positivas al gen *bar*.

Palabras clave: Ap24, glucanasa, quitinasa

### **AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF PLANTAIN CULTIVAR 'CEMSA 3/4' (MUSA AAB)**

#### **ABSTRACT**

'CEMSA 3/4' is one of the most important plantains cultured in Cuba. This cultivar was very affected after the introduction of Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). The resistance to this pathogen can be increased inserting genes that encoded to antifungal proteins through genetic transformation. In this work, *Agrobacterium*-mediated transformation by was carried out with embryogenic cell suspensions in the 'CEMSA 3/4' (*Musa AAB*) plantain cultivar. For transformation, binary plasmids pHCA58 and pHGA91 were used, which contain the combination of genes that encode for the antifungal chitinase from *Phaseolus vulgaris* and the ap-24 osmotin from *Nicotiana tabacum* the first one and glucanase (*Nicotiana tabacum*) and Ap-24 the second one. As a selectable marker gene *bar* was used in both plasmids. It encoded for PPT acetyltransferase. More than 200 putative transformed plants were regenerated after three months on selection medium. After *in vitro* multiplication 30 lines of each construct were acclimatized in the greenhouse. Nine lines of each one were checked by PCR to confirm the insertion of the genes of interest. All of them were positive to *bar* gene.

Key words: Ap24, chitinase, glucanase

### **METODOLOGÍA PARA EL DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL CULTIVAR DE PLÁTANO VIANDA 'NAVOLEAN' (MUSA SPP., GRUPO AAB)**

López, J.<sup>1\*</sup>, R. G. Kosky<sup>2</sup>, R. Trujillo<sup>3</sup>, N. Montano<sup>1</sup>, D. Reinaldo<sup>1</sup>, A. Rayas<sup>1</sup>, Ml. Roman<sup>1</sup>, M. Cabrera<sup>1</sup>, A. Santos<sup>1</sup>, J. Ventu.a<sup>1</sup>, V. Medero<sup>1</sup>, M. García<sup>1</sup>, M. Basail<sup>1</sup>, H. Toledo<sup>1</sup>, A. Cantero<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo 6, Sto Dgo., Villa Clara, CP 53 000. Cuba. e-mail: jlopez@inivit.co.cu

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

<sup>3</sup>Centro de Bioplasmas (UNICA). Cuba.

#### **RESUMEN**

El desarrollo de la embriogénesis somática, posibilita disponer de un sistema de cultivo útil para la mejora genética y una vía alternativa para la propagación de plantas. El presente trabajo se realizó con el objetivo de desarrollar una metodología de embriogénesis somática en el cv. 'Navolean' (*Musa spp.*, Grupo AAB) a partir de domos meristemáticos de yemas axilares. Se demostró que es posible la obtención de suspensiones celulares embriogénicas homogéneas a partir del explante antes mencionado y se lograron los mayores volúmenes de multiplicación celular a la densidad de 3.0% del volumen de células sedimentadas. La mayor cantidad de embriones somáticos se alcanzó a la densidad de 12.0% del volumen de células sedimentadas. La inoculación de 0.5 gMF de embriones somáticos en etapa globular en el medio de cultivo con zeatina, durante 30 días, permitió mejorar la maduración de los embriones somáticos. El uso del Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA con 0.5 gMF de embriones somáticos maduros, incrementó los valores de germinación a un 83.0%. Transcurridos dos ciclos de producción, las plantas provenientes de la metodología desarrollada mostraron un comportamiento agronómico similar a las plantas obtenidas por organogénesis y cormos.

Palabras clave: domos meristemáticos, embriones somáticos, yemas axilares

## OBTENCIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE BANANO Y PLÁTANO (*MUSA SPP. CV. 'GRANDE NAINÉ' (AAA) Y 'NAVOLEAN' (AAB) TOLERANTES A LA ENFERMEDAD SIGATOKA NEGRA (MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS MORELET) EN CAMPO*

Rafael G. Kosky,\*<sup>1</sup> Idalmis Bermúdez-Caraballoso<sup>1</sup>, Borys Chong<sup>1</sup>, Jorge López Torres<sup>2</sup>, Maritza Reyes<sup>1</sup>, Nery Montalvo Martín<sup>2</sup>, José M. Machado-Rodríguez<sup>1</sup>, Bárbara Ocaña<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>1</sup>, Michel Leiva-Mora<sup>1</sup>, Mayra Acosta-Suarez<sup>1</sup>, Mileidy Cruz-Martín<sup>1</sup>, Belkis Roque<sup>1</sup>, Rony Swennen<sup>3</sup>, Laszlo Sagi<sup>3</sup>, Lázaro Hernández<sup>4</sup>.  
\*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830 e-mail: kosky@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Ministerio de la Agricultura. Santo Domingo, Villa Clara. Cuba.

<sup>3</sup>Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven (KUL). Kasteelpark Arenberg 13. B-3001, Leuven, Belgium.

<sup>4</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Ciudad de La Habana. Cuba.

### RESUMEN

La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) ha sido en los últimos años, la enfermedad foliar más destructiva que afecta la producción de bananos y plátanos a nivel mundial. El presente trabajo tuvo como objetivo la obtención de plantas transgénicas de banano cultivar 'Grande naine' (AAA) y plátano cultivar 'Navolean' (AAB) tolerantes a esta enfermedad, con el uso de la transformación genética. Suspensiones celulares embriogénicas obtenidas de embriones somáticos formados a partir de flores masculinas inmaduras y yemas *in vitro* fueron utilizadas para la transformación por *Agrobacterium tumefaciens*. La cepa de bacteria fue la EHA-105 con los plásmidos binarios pHCA-58, pHCG-59 y pHGA-91, los cuales contienen diferentes combinaciones de genes que codifican para las proteínas antifúngicas, quitinasa clase 1,  $\alpha$ -1,3 glucanasa y la osmotina Ap24. El herbicida comercial BASTA® fue usado como agente selectivo. Un total de 95 putativas líneas transformadas de las tres construcciones del cultivar 'Grande naine' y 43 putativas líneas transformadas de dos construcciones del cultivar 'Navolean' fueron plantadas en campo. La evaluación durante tres ciclos de cultivo permitió la selección de un total de 21 líneas putativas tolerantes a la enfermedad Sigatoka negra. Los eventos transgénicos en las líneas seleccionadas fueron verificados por medio de los análisis de PCR, *Dot Blot* y *Southern blot* y estos confirmaron la integración estable de los transgenes en las plantas transgénicas que fueron seleccionadas en campo.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*, BASTA®, proteínas antifúngicas

## POTENCIAL PARA LA PROPAGACIÓN A GRAN ESCALA DE CULTIVARES DE *MUSA SP.* DE CONSUMO LOCAL, A PARTIR DE SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS: OBSERVACIONES AGRONÓMICAS DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA DE LAS PLANTAS EN EL CAMPO

M.E. Aguilar<sup>1\*</sup>; J.L. Ortiz<sup>1</sup>; J.A. Sandoval<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. CATIE 7170, Turrialba, Costa Rica, C.A. e-mail: aguiliarm@catie.ac.cr

<sup>2</sup>Cooperación Bananera Nacional, CORBANA. 390-7210, Pococí Limón, Costa Rica.

### RESUMEN

Los bananos y plátanos de consumo local representan uno de los cultivos agrícolas más importantes para pequeños productores por lo que juegan un papel socio-económico relevante en muchos países tropicales. La poca disponibilidad de material vegetal sano para plantación y las barreras impuestas al mejoramiento genético por la vía de hibridación convencional, aumentan la presión ejercida por el agricultor. La biotecnología ofrece alternativas para superar estas limitaciones, facilitar el manejo y mejoramiento del cultivo. En respuesta, el CATIE trabaja en la optimización de la regeneración celular de estos cultivos para utilizar la técnica de manera confiable satisfaciendo la demanda por semilla de calidad y como plataforma para el mejoramiento genético no convencional. Estudios sobre variación *in vitro* sugieren que altas concentraciones de 2,4-D y tiempo prolongado en cultivo, aumenta la posibilidad de variación. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales no se observó dicha tendencia. Los cv. 'Dátil', 'Gros Michel' y 'Dominico', presentaron alta estabilidad morfológica, independientemente de la concentración

de 2,4-D utilizada durante la inducción embriogénica y la edad de la suspensión. En contraste, el cv. 'Grande naine' es muy susceptible a sufrir cambios en su morfología, que afectan inclusive la producción. En este cultivar se identificó el enanismo, en plantas provenientes de callos obtenidos en diferente concentración de 2,4-D. Esta es una de las variaciones más frecuentes obtenida mediante el cultivo de ápices vegetativos. Asimismo, el cultivo en inmersión temporal, permitió la germinación de embriones, desarrollo de plantas en tiempo más corto y una rápida aclimatización al ambiente *ex vitro*, con valores superiores al 85% de supervivencia. Estos resultados, permiten sugerir la regeneración celular de suspensiones celulares embriogénicas como una vía apropiada para la multiplicación masal y la transformación genética de los cultivares estudiados de *Musa* sp.

Palabras clave: *Musa* sp., regeneración celular, variación genética

### **REGENERACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS DE PLÁTANO CV. 'CURRARÉ' (AAB) BOMBARDEADAS CON GENES ANTIFÚNGICOS PARA INTRODUCIR RESISTENCIA A LA SIGATOKA NEGRA (*MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*)**

J.L. Ortiz<sup>1</sup>; M. Gómez-Lim<sup>2</sup>; M.E. Aguilar\*<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE 7170, Turrialba, Costa Rica, C.A. e-mail: aguilarm@catie.ac.cr

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV, 629 Irapuato, Gto México.

#### **RESUMEN**

Las musáceas de interés comercial son seriamente afectadas por la Sigatoka negra, la cual causa disminución de la producción y rendimiento con la pérdida de plantaciones y cosechas. El control de la enfermedad obliga al uso excesivo de productos químicos provocando la resistencia del patógeno a los mismos. El presente trabajo pretende informar sobre la regeneración de plantas a partir de cultivos celulares embriogénicos de plátano, bombardeados con genes antifúngicos con miras al control de la Sigatoka negra. Se utilizó una suspensión celular embriogénica del cv. 'Curraré' (AAB) de 6 meses de cultivo. La transferencia de genes se hizo mediante bombardeo de partículas utilizando microproyectiles de tungsteno. Se evaluaron tres vectores de transformación: G/Q (glucanasa/quitinasa), pKYLX80/J1 (J1 /0.462 kb) y pKYLX80/AFP (AFP/ 0.402 kb) que codifican para proteínas antifúngicas. Todos incluyen el gen reportero GUS, marcador *nptII*, y el promotor constitutivo 35S (CaMV). La expresión GUS se evaluó 48 horas después del bombardeo. El material se sometió a selección con el antibiótico kanamicina (100 mg.l<sup>-1</sup>). Los embriones se subcultivaron en los medios de cultivo M4 y M5 para germinación y desarrollo respectivamente. La regeneración de embriones somáticos fue lograda en los diferentes tratamientos utilizados; sin embargo hubo mayor cantidad de embriones para la relación vector 2:2:2 (G/Q:J1:AFP), esto coincidió con una mayor expresión del gen GUS (315 puntos azules) para ese mismo tratamiento. Numerosos embriones germinados en el medio de cultivo M4 con selección, fueron transferidos al medio de cultivo M5, obteniéndose más de 90 plantas en estado óptimo para su aclimatización. La obtención de embriones y la conversión de éstos en plantas después del bombardeo no es una limitante en nuestro sistema de regeneración. La respuesta obtenida en términos de resistencia de estas suspensiones al agente selectivo (kanamicina) también fue exitosa para algunos tratamientos. Estas plantas fueron llevadas a invernadero para su evaluación en presencia del agente patógeno.

Palabras clave: *Musa* sp., plátano, suspensiones celulares, transformación genética

### **EVALUACIÓN TEMPRANA DE LA RESISTENCIA DE CULTIVARES DE *MUSA* SPP FRENTE A *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET**

Yelenys-Alvarado Capó\*, Michel Leiva-Mora, Mayra Acosta-Suárez, Mileidy Cruz-Martín, Nayanci Portal, Berkis Roque. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e. mail yelenys@ibp.co.cu

#### **RESUMEN**

La evaluación temprana de la resistencia a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) como herramienta en los programas de mejoramiento genético de *Musa* spp. requiere de procedimientos que permitan diferenciar cultivares resistentes y susceptibles. El presente trabajo tuvo como objetivo principal, estandarizar un método

para la evaluación temprana de la respuesta de plantas *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp. frente a *Mycosphaerella fijiensis*, mediante la inoculación artificial de estructuras del patógeno (conidios y micelio). Se obtuvieron síntomas uniformes y homogéneos en las hojas inoculadas de similares características tanto para conidios como para micelio los cuales fueron semejantes a los observados en plantas jóvenes en condiciones naturales. Se confeccionó una escala cualitativa para facilitar la evaluación de la respuesta de genotipos de *Musa* spp. Esta y las variables cuantitativas (tiempo de evolución de los síntomas y tiempo de desarrollo de la enfermedad) permitieron diferenciar los cultivares. Todos con excepción del 'Yangambí km 5', tuvieron un comportamiento frente al patógeno similar al observado en condiciones naturales. La resistencia parcial expresada en los cultivares FHIA, se caracterizó por una lenta evolución en el desarrollo de los síntomas. El cultivar 'Calcutta 4' mostró el período más lento del desarrollo de los síntomas. Los cultivares 'Grade naine' y 'Niyarma Yik' mantuvieron su respuesta susceptible al alcanzar los mayores grados de afectación. La inoculación artificial de plantas de *Musa* sp. procedentes del cultivo *in vitro* resultó un método fácil, rápido y reproducible para conocer la expresión de la resistencia frente a *M. fijiensis* a este nivel. Los resultados de este trabajo constituyen una valiosa herramienta para la evaluación temprana de diferentes cultivares procedentes de los programas de mejoramiento genético que se han desarrollado frente a *M. fijiensis*.

Palabras clave: conidios, inoculación artificial, micelio, Sigatoka negra

### **CAMBIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS ASOCIADOS A LA TRANSICIÓN *IN VITRO-EX VITRO* DE PLANTAS DE PLÁTANO (CEMSA ¾). DIFERENCIAS FUNCIONALES ENTRE HOJAS Y TALLOS**

Aragón, Carlos E\*, M. Escalona, I. Capote, D. Pina, I. Cejas, R. Rodríguez, M.J. Cañal, J. Sandoval, S. Roels, P. Debergh, J. González-Olmedo. \* Autor para correspondencia.

Centro de Bioplantas. Carretera a Morón km 9 ½. UNICA. Ciego de Ávila. Cuba.

#### **RESUMEN**

La propagación del plátano ('CEMSA ¾') en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) presenta una serie de ventajas ya que aumenta el número de plantas en cortos periodos de tiempo con alta estabilidad genética. El crecimiento de las mismas en los BIT y ulterior aclimatización transcurre a través de cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que permiten un uso más eficaz del medio interno. La investigación se desarrolló con el objetivo de mejorar el protocolo de propagación *in vitro* en BIT de plantas de plátano ('CEMSA ¾') y aumentar el conocimiento bioquímico y fisiológico en estos sistemas y durante la posterior aclimatización. Los experimentos se realizaron en plantas provenientes de BIT y durante la aclimatización. Se caracterizó la fisiología y el metabolismo del carbono. La fase de aclimatización quedó reducida a cinco semanas. Las altas exposiciones de luz desarrollaron mayor actividad PQ con respecto al control en condiciones ambientales (1.4 veces), lo cual durante los primeros días de la aclimatización puede agotar las reservas almacenadas por las plantas. La enzima FEPC aumentó su actividad 1.6 veces en altas condiciones de luz y CO<sub>2</sub>. El almidón constituyó la fundamental fuente de azúcar de reserva con 340 veces mayor cantidad que la sacarosa. Estas condiciones posibilitaron la recuperación más rápida de la cantidad de almidón en los tallos al final de la aclimatización (2.74 veces), lo que facilitó la mejor calidad de plantas con un 99.8 % de supervivencia. Además las condiciones en los BIT le confirieron a las plantas de plátano un mayor desarrollo funcional en cuanto a altura, expansión foliar, calidad de raíces, masa fresca y masa seca, se favoreció un balance compensado de las enzimas del metabolismo del carbono favorable al anabolismo y una mejor movilización de almidón de reserva en los tallos durante la aclimatización.

Palabras clave: aclimatización, almidón, biorreactores de inmersión temporal

#### **ABSTRACT**

The micropropagation of plantain plants ('CEMSA ¾') in Temporary Immersion Bioreactors (TIB) has a lot of advances because of the multiplication rate and genetic stability is increases. During the transition of the plants from *in vitro* conditions to *ex vitro* environmental atmospheric is better with metabolic function induced by TIB. The present research were carried out in order to get a better micropropagation plantain system and to know the real metabolic and physiological changes of plants in TIB and during the posterior acclimatization phase. The plant materials was plantain plants during the elongation phase in TIB and during the posterior acclimatization. The metabolically and physiological behaviour were described through phosphoenol piruvate carboxylase (PEPC) and piruvate kinase (PK) activities. The light intensity induces the PK activity (1.4 times) that can consume the carbohydrates storage reserves during the first days of the acclimatization phase. In other hand the PEPC activity increases too at 1.6 times by the high exposition to light and CO<sub>2</sub> concentration. These environmental conditions permit the starch accumulation in the plantain, 340 times higher than sucrose and 2.74 times in stem compared with plantain leaves. The survival rate in the acclimatization reaches at 99.8 %. The plant high, foliar expansion,

rooting process, fresh weigh and dry matter weigh. The most important effects were the induction of anabolic pathways and the rapid recuperation of starch concentration in stem at 28 days of the acclimation phase.

Key words: acclimatization, starch, Temporary Immersion Bioreactors

## EVALUACIÓN EN INVERNADERO DE LA RESISTENCIA AL RAYADO NEGRO DE LA HOJA EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *MUSA*

Michel Leiva-Mora\*, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Mileydi Cruz-Martín, Berkis Roque, Rafael G. Kosky, Borys Chong, Idalmis Bermúdez-Caraballoso, Maritza Reyes. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: michel@ibp.co.cu

### RESUMEN

La evaluación temprana de la resistencia como herramienta en los programas de mejoramiento genético de *Musa* sp. frente a *Mycosphaerella fijiensis*, requiere de procedimientos que permitan diferenciar cultivares resistentes y susceptibles. El presente trabajo tuvo como objetivo principal, evaluar la respuesta de varias líneas transgénicas de *Musa* spp. frente a *M. fijiensis* en comparación con los cultivares controles 'Grande naine', 'Navolean' y 'FHIA-18'. Se utilizó una suspensión micelial la cual fue aplicada mediante un pincel a la superficie adaxial de las primeras tres hojas abiertas de plantas aclimatizadas durante 12 semanas, utilizando gelatina al 1% como adherente. Se obtuvieron síntomas uniformes y homogéneos en las hojas inoculadas de todos las líneas de los cultivares inoculados. Se lograron observar diferencias entre la respuesta de varias líneas transgénicas y sus respectivos controles, siendo estos últimos los más afectados. Algunas líneas del cv. 'Grande naine' en la evaluación final tuvieron un mejor comportamiento que el cv. parcialmente resistente 'FHIA-18'. Los resultados de este trabajo constituyen la primera aplicación de la evaluación temprana de líneas transgénicas de *Musa* spp. frente a *M. fijiensis*.

Palabras clave: líneas transgénicas, *Musa* spp., selección temprana

## GREENHOUSE EVALUATION OF MUSA TRANSGENIC PLANTS FOR ITS RESISTANCE TO BLACK LEAF STREAK

### ABSTRACT

Early screening to differentiate *Musa* cultivars respect Black leaf streak is basic for assist *Musa* breeding programs. The aim of the present work was to evaluate the response of *Musa* transgenic lines of *Musa* spp. to *M. fijiensis* in comparison to 'Grande naine', 'Navolean' y 'FHIA-18' not transgenic controls. Mycelial suspension was applied by brushing the 3 first open leaves by abaxial leaf surface of plants acclimatized during 12 week, using gelatin 1% as adherent. Homogeneous symptoms were obtained in the inoculated leaves of *Musa* transgenic lines and controls. It was possible to differentiate the reaction of some transgenic *Musa* lines respect their controls. Controls were more affected than transgenic lines in most of case. Some 'Grande naine' transgenic lines had less symptoms at the last evaluation than the partial resistance cultivar 'FHIA-18'. These results are the first application of early screening in greenhouse to differentiate *Musa* transgenic lines respect their response to *M. fijiensis*.

Key words: early screening, *Musa* spp., transgenic lines

## CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE SOMACLONES EN EL GÉNERO *MUSA*

Maria Isabel Román<sup>1\*</sup>, Clara González<sup>2</sup>, Xonia Xiqués<sup>2</sup>, Miguel Hernández<sup>1</sup>, Lianet González<sup>1</sup>, Teresa Ramírez<sup>1</sup>, Francisco Dueñas<sup>2</sup>, Maruchi Alonso<sup>2</sup>, Marlyn Valdés<sup>2</sup>, Alejandro Rojas<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo 6, Sto. Dgo., Villa Clara, CP 53 000, Cuba. e-mail: roman@fbio.uh.cu

<sup>2</sup>Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Cuba.

### RESUMEN

En Cuba en el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) se han realizado numerosos estudios de detección de la variabilidad genética en variantes somaclonales y clones donantes mediante el empleo de marcadores morfoagronómicos, citogenéticos, genético-bioquímicos y moleculares. En los clones

de bananos 'SH-3436' y la variante somaclonal 'SH-3436L-9', el clon 'FHIA 18' y las variantes somaclonales S1, S2, S3, S4, S7, S8, Sr, en los clones de plátanos 'Saba' y el Somaclon de Saba, el clon 'FHIA 21' y las variantes 1 y 2. De acuerdo con la evaluación morfoagronómica se pudo establecer que los somaclones aventajaron a los clones donantes en las variables relacionadas con las componentes del rendimiento. El estudio citogenético del material vegetal analizado mostró para los bananos la presencia en los somaclones S1, S2, S3, S4 y Sr de  $2n=3x=33$  cromosomas; en el somaclon S8 y SH 3436 L-9 se mantuvo el número cromosómico de  $2n=4x=44$  de sus clones donantes 'FHIA 18' y 'SH 3436'. El somaclon S7 presentó un mosaico cromosómico, pues se detectaron células con  $2n=2x=22$  y células con  $2n=3x=33$  cromosomas, respectivamente. Para los plátanos pudo observarse que sólo el somaclon 1 mantuvo el número de cromosomas de  $2n=4x=44$  de su clon donante 'FHIA 21' y en el somaclon 2 se determinó la presencia de células con  $2n=3x=33$  cromosomas, para Saba y su Somaclon con  $2n=4x=44$  cromosomas, se pudo comprobar en algunas de las variantes somaclonales fluctuaciones en el número cromosómico de la planta que le dio origen. Los resultados obtenidos de los sistemas isoenzimáticos empleados en este estudio han revelado diferencias entre los clones donantes y sus somaclones para algunos sistemas y bandas propias que denotan las diferencias en esos materiales. Existen bandas que identifican a los bananos y a los plátanos, se observa que en el material vegetal tetraploide hay un mayor número de bandas. Se empleó un marcador de ADN ISTR (Repeticiones de Secuencias Inversas Marcadas) el que permitió la diferenciación de los clones donantes y sus variantes somaclonales. La combinación F3/B5A permitió diferenciar al clon donante de bananos y sus variantes y la combinación F2/B2B diferenció al clon donante y sus variantes. Los estudios realizados demuestran la existencia de nuevos materiales vegetales que pueden ser incluidos en la colección de bananos y plátanos (*Musa spp.*) de Cuba.

Palabras clave: citogenéticos, sistemas isoenzimáticos, variabilidad genética

#### **CRIOPRESERVACIÓN DE SUSPENSIONES EMBRIOLÓGICAS DE NAVOLEAN (*MUSA AAB*)**

Leyanis García-Águila<sup>1\*</sup>, Rafael G. Kosky<sup>1</sup>, \*Jorge López<sup>2</sup>, Boris Chong<sup>1</sup>, Maritza Reyes<sup>1</sup>, Marisol Freire-Seijo<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>1</sup>, Marisol Tejeda<sup>1</sup>, Laisyn Posada-Pérez<sup>1</sup>, Jorge Gallardo-Colina<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara. Cuba CP 54 830. e-mail: leyanis@ibp.co.cu

<sup>2</sup>INIVIT

#### **RESUMEN**

Con el objetivo de conservar suspensiones celulares embriológicas de plátano cultivar 'Navolean' se utilizó el método de criopreservación. Para ello, se evaluó la influencia del precultivo con alta concentración de sacarosa y la crioprotección del Dimetilsulfóxido (DMSO), sobre la vitalidad de suspensiones celulares embriológicas criopreservadas. El precultivo con alta concentración de sacarosa durante 24 horas afectó considerablemente la vitalidad de los agregados celulares después de dos semanas en nitrógeno líquido. Los tratamientos no precultivados con sacarosa y crioprotectados con concentraciones de 10 y 15% de DMSO mostraron los mejores porcentajes de vitalidad de los agregados celulares (96.2 y 95.2 %). Después de 15 días de cultivo en medio de cultivo líquido se observó el oscurecimiento de las suspensiones pertenecientes a los tratamientos precultivados con alta concentración de sacarosa. El resto de las suspensiones celulares presentaron apariencia similar al control no criopreservado.

Palabras clave: 'Navolean', nitrógeno líquido, suspensiones celulares

#### **CULTIVO DE FLORES MASCULINAS INMADURAS DIRECTAMENTE EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES DEL CULTIVAR HÍBRIDO 'FHIA 21' (*MUSA AAB*)**

Leyanis García-Águila<sup>\*</sup>, Rafael G. Kosky, Boris Chong, Maritza Reyes, Marisol Freire-Seijo<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>1</sup>, Marisol Tejeda<sup>1</sup>, Laisyn Posada-Pérez<sup>1</sup>, Jorge Gallardo-Colina<sup>1</sup>, Justo Clavero. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara. Cuba CP 54 830. e-mail: leyanis@ibp.co.cu

**RESUMEN**

Con el objetivo de establecer suspensiones celulares del cultivar híbrido 'FHIA 21' se colocaron flores masculinas inmaduras en medio de cultivo líquido. Para ello se establecieron las condiciones para la colecta de la inflorescencia masculina y el control de la oxidación fenólica de las flores. Se colectaron inflorescencias masculinas después de emitidas las 10 primeras brácteas, de la 10 a la 20 y de la 20 a la 30. Las flores extraídas se sumergieron en una gota de solución de ácido cítrico. Se estudiaron diferentes concentraciones del mismo (50, 100 y 200 mg.l<sup>-1</sup>) para evaluar su efecto sobre el control de la oxidación fenólica de las flores. Se comprobó que el estado de desarrollo de la inflorescencia masculina (medida a partir del número de brácteas emitidas después de la última mano) influyó sobre el desarrollo morfológico de las flores masculinas inmaduras en medio de cultivo líquido y, por consiguiente, en el establecimiento de las suspensiones celulares. La colecta de la inflorescencia masculina debe realizarse después de emitidas las primeras 10 brácteas para obtener mayor formación de estructuras globulares de color amarillo a partir de las flores. Estas estructuras liberaron pequeños agregados de células meristemáticas de citoplasma denso y rico en gránulos de almidón. La oxidación fenólica de las flores fue atenuada con el empleo de soluciones de ácido cítrico entre 100 y 200 mg.l<sup>-1</sup>, en el momento su extracción.

Palabras clave: embriogénesis somática, *Musa*, oxidación fenólica

**EMPLEO DEL BIOSTAN EN LA FASE DE MULTIPLICACION *IN VITRO* DEL PLATANO, CV. 'FHIA-18' (MUSA) AAAB**

Maugly Cabañas\*; Antonio Torres; Eduardo H. Ardisana; Milagros Ginebra. \*Autor para correspondencia.

Universidad Agraria de la Habana. Carretera a Tapaste km 23 ½ . Autopista Nacional, San José de las Lajas. La Habana. Cuba.

**RESUMEN**

Los reguladores del crecimiento son utilizados en la gran mayoría de los protocolos de micropropagación existentes en la biotecnología vegetal; sin embargo su empleo constituye generalmente un brusco incremento en el costo de dicha técnica. Se desarrolló un experimento en el que se añadieron concentraciones de 1, 3 y 5 mg.l<sup>-1</sup> de Biostan al medio de cultivo con el objetivo de estudiar su efecto como posible sustituto o potenciador de los reguladores tradicionalmente empleados (AIA y 6-BAP) y el efecto fisiológico de este bioestimulante sobre los explantes del plátano cv. 'FHIA-18' en la fase de multiplicación *in vitro*. De manera general se observa un efecto favorable del bioproducto en el crecimiento y calidad de los explantes. Se alcanzaron los mejores resultados en los tratamientos que contenían Biostan sin reguladores. Este resultado sugiere la posibilidad de la sustitución de los reguladores empleados tradicionalmente y constituye una valiosa alternativa en las Biofábricas del país.

Palabras clave: bioestimulante, micropropagación, reguladores del crecimiento