

TALLER INTERACCIÓN PLANTA - PATÓGENO

INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO A NIVEL MOLECULAR: ASPECTOS BÁSICOS PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO

Ramón Santos Bermúdez

Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Avila. Carr. a Morón km 9. Ciego de Avila. CP 69 450. Cuba.
email: rsantos@bioplantas.cu

RESUMEN

Las plantas poseen múltiples mecanismos para protegerse por sí mismas frente al ataque de patógenos. Mecanismos específicos de reconocimiento del patógeno, gobernados por productos de genes de resistencia que interactúan con productos de genes de avirulencia del patógeno, usualmente conduce a una respuesta hipersensitiva en el sitio de invasión del patógeno, manteniendo al patógeno aislado del resto de la planta y dispara una secuencia de eventos que involucra diferentes sendas metabólicas en plantas. En la actualidad, se han conducido varios proyectos de investigación relacionados con el aislamiento de genes de resistencia y de avirulencia, así como estudios de diferentes sendas de traducción de señales. Este tema estará focalizado en las interacciones planta-hongo a nivel bioquímico y molecular, varias estrategias desarrolladas por una masa crítica de investigadores y algunos resultados que proporcionan una mejor comprensión de las interacciones planta-patógeno para el mejoramiento genético, con énfasis en los principales resultados de los proyectos de investigación desarrollados en el Centro de Bioplantas y particularmente en el aislamiento de metabolitos microbianos útiles para desarrollar estrategias de mejoramiento genético.

Palabras clave: genes de avirulencia, genes de resistencia, metabolitos microbianos, traducción de señales

MOLECULAR PLANT-PATHOGEN INTERACTION: BASIC ASPECTS FOR PLANT BREEDING

ABSTRACT

Plants possess multiple mechanisms to protect themselves against pathogen attack. Specific pathogen recognition mechanisms, governed by resistance gene products that interact with matching avirulence gene products from the pathogen, usually lead to a hypersensitive response at the site of pathogen invasion, keeping the pathogen isolated from the rest of the plant and trigger a sequence of events involving different metabolic pathway in plant. Nowadays, various research project has been carry out related with the isolation of both resistance and avirulence genes as well as the study of different signal traduction pathway. Our topic focus on plant-fungus interaction at biochemical and molecular level, several approaches developed by a critical mass of researchers and some results to provide a better understanding of basic host-pathogen interaction for plant breeding will be reviewed with emphasis on the main results of projects developed at Centro de Bioplantas and particularly about the isolation of microbial metabolites usefull for plant breeding strategies.

Key words: avirulence gene, microbial metabolites, resistance gene, signal traduction

ESTUDIO MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN NO COMPATIBLE ENTRE *Puccinia melanocephala* H. & P. Syd. Y *Saccharum sp.*

María I. Oloriz^{1*}, Luis Rojas¹, Víctor Gil², Aminael Sánchez-Rodríguez¹, Elio Jiménez¹, Orelvis Portal¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto 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: maria@ibp.co.cu

²Centro de Investigaciones Agropecuarias Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

RESUMEN

La roya de la caña de azúcar es una de las enfermedades que más daños ha ocasionado en la producción azucarera mundial. Las pérdidas estimadas en los rendimientos dependen de las condiciones medioambientales,

en Australia se estimaron entre un 10 y 20% y en Estados Unidos entre 20-40%. En Cuba al hacer su entrada en 1978, las pérdidas ascendieron a 1 000 000 t de azúcar. El único modo de control de este patógeno biotrófico, a escala de producción, es el empleo de variedades resistentes. Con el objetivo de conocer las bases moleculares que rigen la interacción no compatible entre *P. melanocephala* y un mutante de caña de azúcar var. B4362 (IBP 8518), se aislaron los genes diferencialmente expresados por la planta durante los eventos de la respuesta defensiva. Para ello se realizó una hibridación sustractiva por supresión generándose una biblioteca con los genes diferencialmente expresados por el mutante IBP 8518 durante los primeros 7 días de interacción con el patógeno. Los fragmentos de genes aislados fueron secuenciados y comparados con bases de datos mediante el algoritmo BLAST disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, se consideró $E=e^{-10^{-3}}$ como valor de corte de significación. Según estos resultados fueron identificadas y agrupadas estas secuencias en los diferentes niveles de la respuesta de defensa inducida, así como secuencias que supuestamente regulan la duración y extensión de esta respuesta en mutante IBP 8518. Otro grupo de las secuencias aisladas no fue posible su identificación por carecer de homología en bases de datos o en otros casos ser homólogos a genes inducidos por estrés pero sin función definida.

Palabras clave: caña de azúcar, enfermedades, interacción planta patógeno, roya

INTERACCIÓN SOLANUM TUBEROSUM-ALTERNARIA SOLANI. APLICACIONES Y RESULTADOS EN EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PAPA EN EL IBP

Novisel Veitia*, Lourdes R. García, Idalmis Bermúdez-Caraballoso, Mayra Acosta-Suárez Pedro Orellana, Yenny Padrón Montesinos, Michel Leiva-Mora, Carlos Romero, Niurka Hernández. *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: novisel@ibp.co.cu

RESUMEN

El tizón temprano, causado por el hongo *Alternaria solani* (Sor.), es una de las principales enfermedades fúngicas de la papa en climas cálidos. Este patógeno puede provocar daños foliares severos al cultivo tanto por la colonización del tejido como a través de la producción de fitotoxinas. Basados en el modelo de interacción anteriormente mencionado, en el presente trabajo se realizó la caracterización de aislados monospóricos de *Alternaria solani* (Sor.). Se estudiaron diferentes medios de cultivo para la producción de fitotoxinas, se determinó el tiempo óptimo de incubación del hongo, se estableció el método de aplicación del filtrado de cultivo sobre plantas cultivadas *in vitro* y se determinó la concentración óptima del filtrado de cultivo para la selección *in vitro* de callos y plantas procedentes del cultivo de tejidos. Posteriormente, se realizó la selección masiva del material vegetal con variabilidad inducida y se evaluó el comportamiento frente al tizón temprano de los genotipos seleccionados *in vitro* en casa de cultivo y campo. Como resultado se logró obtener genotipos que han presentado niveles de afectación inferiores a la variedad original Desirée frente al tizón temprano durante varios ciclos de evaluación en campo.

Palabras clave: callos, fitotoxinas, selección *in vitro*

IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF GENES INVOLVED IN PLANT RESISTANCE TO BIOTIC AND ABIOTIC FACTORS USING FUNCTIONAL GENOMIC TOOLS

Osmany Chacón¹, Roxana Portieles², Ingrid Hernández², Carlos J. Borroto², Yuniór López², Mayra Rodríguez², Eduardo Canales², Orlando Borrás - Hidalgo^{2*}. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera Tumbadero km 8, San Antonio de los Baños, Habana, Cuba.

²Center for Genetic Engineering and Biotechnology. P. O. Box 6162, 10 600 La Habana, Cuba. e-mail: orlando.borras@cigb.edu.cu

ABSTRACT

Modern-day plants are products of eons of evolution from primal living organisms in response to abiotic and biotic environmental changes. Plants, in nature, are generally resistant to most pathogens. The ability of a pathogen to cause disease in a host plant is usually the exception, not the rule. The interactions between plants and pathogens are specific, complex and dynamic. On the other hand, in the natural environment, plants often grow under unfavorable

conditions, such as drought, salinity, chilling, freezing, high temperature, flooding, or strong light. These conditions are known collectively as abiotic stresses, and any of them can delay growth and development, reduce productivity and, in extreme cases, cause the plant to die. Our group carried out several strategies to the identification, characterization and functional analysis of plant genes involved in trigger, signalling and response to biotic and abiotic factors. We use suppression subtractive hybridization (SSH) and cDNA - AFLP to generate cDNA libraries highly enriched for sequences up - regulated and transcript derived fragment (TDFs) up and down regulated. Moreover, the clones are sequenced and compared to sequences international databases using BLAST searches. The expression of genes is investigated using Northern analyses and RT - PCR under several conditions. On the other hand, candidate genes are cloned either into a virus vector for virus induced gene silencing (VIGS) or gain function vector to detect function.

INTERACCIÓN *MUSA-MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*. AVANCES Y APLICACIONES EN EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE *MUSA* EN EL IBP

Yelenys Alvarado-Capó*, Michel Leiva-Mora, Mayra Acosta-Suárez, Mileidy Cruz-Martín, Rafael G. Kosky, Idalmis Bermúdez-Carabaloso, Lourdes R. García, Pedro Orellana, Jeny Padrón, Maritza Reyes, Boris Chong, Miladys Mendoza, Orelvis Portal, Aminael Sánchez, Bárbara Ocaña, Elio Jiménez. *Autor para correspondencia.

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

RESUMEN

El patosistema *Musa-Mycosphaerella fijiensis* ha sido estudiado por numerosos autores con el propósito de encontrar vías y herramientas para el control de la enfermedad conocida como Sigatoka negra que causa daños severos tanto a plátanos como a bananos. El control químico y la obtención de plantas resistentes se encuentran entre las principales alternativas de solución. El programa de mejoramiento genético del IBP comenzó en la década del 90 (siglo XX) con la aplicación de radiaciones gamma al material vegetal obtenido por cultivo *in vitro*, la regeneración y plantación en campo de más de 10 000 plantas, sin resultados satisfactorios en la búsqueda de mutantes resistentes. Posteriormente se han continuado las investigaciones con el aislamiento y caracterización de cepas de *Mycosphaerella fijiensis*, el establecimiento de protocolos de trabajo para la selección *in vitro* con el uso del filtrado de cultivo del patógeno, la evaluación de la respuesta de diferentes cultivares a la inoculación artificial con diferentes estructuras del patógeno, la localización de genes de interés del patógeno y la planta durante la interacción. Entre los principales resultados se destacan la creación de una colección de aislados del patógeno de diferentes regiones del país, su caracterización y conservación a -80 °C, la creación de bibliotecas de ADN complementario (ADNc) en las cuales se han identificado genes del hongo y el desarrollo y aplicación de una metodología para la evaluación temprana de la resistencia al patógeno en casa de cultivo. Esta última ha sido aplicada con resultados satisfactorios en la evaluación de mutantes y plantas transgénicas, así como en la elaboración de las bibliotecas de ADNc. De igual forma se estandarizó una metodología para la transformación genética del patógeno con una construcción genética que porta el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP). Las herramientas de trabajo desarrolladas y su aplicación en el programa de mejoramiento genético de *Musa* contribuyen a la obtención de nuevos genotipos con resistencia a la enfermedad.

Palabras clave: bibliotecas de ADN complementario, inoculación artificial, Sigatoka negra, transformación

USING *PIPER TUBERCULATUM* AS A MODEL SYSTEM TO IDENTIFY PUTATIVE GENES IMPLICATED IN *NECTRIA HEAMATOCOCCA* F. SP. *PIPERIS* RESISTANCE

Ilmarina Campos de Menezes¹, Alessandra de Rezende Ramos², Maria de Lourdes Reis Duarte¹, Sylvain Darnet², Cláudia Regina Batista de Souza^{2*}. *Autor para correspondencia.

¹Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Caixa Postal 48, 66095-100 Belém, Pará, Brasil.

²Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas/Departamento de Genética, Rua Augusto Corrêa, número 01, Guamá, 66075-110 - Belém, Pará, Brasil. *e-mail: bsouza@ufpa.br

ABSTRACT

The Amazon Brazilian state of Pará is one the major world's producer of pepper, *Piper nigrum* (65.800 ton, IBGE 2004). The cultivated area is about 22.000 hectares and sustains thousand of small farmer families. The last years, instead a constant increase of cultivated area, the production is decreasing due to epidemic

propagation of *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. With the aim to obtain resistant *Piper nigrum* cultivar, our study is focalized on host-pathogen molecular interactions and plant defenses during the fungus infection. Our new study model is constituted by the pathogen *N. haematococca* f. sp. *piperis* and the host *Piper tuberculatum*. This *Piper* specie is endemical of the amazon region and tolerant to the pathogen infection. To identify specific genes implicated in the pathogen resistance, leaves and roots total mRNA are extracted from control plants and infected plants, 7 and 15 days after inoculation. This period represents the maximum fungus accumulation and mycotoxins secretion. The gene expression comparison is based on a subtracted cDNA library screening approach. The result of this screening will be define genes expression pattern, specific of the pathogen resistance. Northern blot and real-time PCR quantification experiments will confirm an implication of the identified genes in the process of plant defense in *P. tuberculatum* resistance.

Key words: *Fusarium*, pathogen, pepper, resistance, subtractive hybridization

CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE ADNc A PARTIR DE HOJAS DE LOS GENOTIPOS DE MUSA CALCUTTA 4 Y NIYARMA YIK INOCULADOS CON MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS MORELET

Milady Mendoza-Rodríguez^{1*}, Elio Jiménez¹, Frank Maier², Whilhelm Schäfer², Idalmis Bermúdez-Caraballoso¹, Yennys Padrón¹, Michel Leiva-Mora¹, Yelenys Alvarado-Capó¹, Mayra Acosta-Suárez¹, Orelvis Portal¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: milady@ibp.co.cu

²University of Hamburg. Center of Applied Molecular Biology of Plants. Institute of General Botany and Botanical Garden. Germany.

RESUMEN

Los estudios moleculares de la interacción planta-patógeno, son de gran importancia para la identificación de genes relacionados tanto con el proceso patogénico, como con la defensa de la planta. Estos genes podrán ser utilizados en los programas de mejoramiento genético, para la obtención de plantas con resistencia a enfermedades. El objetivo de este trabajo fue la construcción de bibliotecas de ADN complementario (ADNc), a partir de dos genotipos de *Musa* (uno resistente: 'Calcutta 4' y otro susceptible: 'Niyarma Yik') a la enfermedad Sigatoka negra, infectados artificialmente con el aislado de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet CCIBP-Pf1. La síntesis de la primera cadena de ADNc, fue a partir de 1 µg de ARN total con el oligonucleótido dT y la calidad de la misma fue comprobada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-del inglés *Polimerase chain reaction*), con los oligonucleótidos específicos para el gen del *citocromo b*. La síntesis de la segunda cadena de ADNc, fue realizada por marcaje homopolimérico con la combinación dC-BamH I + dT-Not I. Fueron obtenidas cuatro bibliotecas de ADNc a partir de plantas, en dos períodos de tiempo después de la infección con el patógeno. Fue realizada la secuenciación nucleotídica de 41 clones de una de las bibliotecas de 'Niyarma Yik' y la información obtenida de las mismas se corresponde con genes relacionados con hongos.

Palabras clave: interacción banano-*Mycosphaerella fijiensis*, *Musa* spp., Sigatoka negra

CONSTRUCTION OF cDNA LIBRARIES FROM MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS MORELET INFECTED LEAVES OF THE CULTIVARS 'CALCUTTA 4' AND NIYARMA YIK

ABSTRACT

Molecular studies of plant-*Musa* genotypes are very important for the identification of gene (s) related with the pathogenic process, as well as with the plant resistance. These gene (s) could be use for the genetic improvement programs in order to obtain resistant cultivars. The aim of this work was to construct complementary DNA (cDNA) libraries from infected leaves with *Mycosphaerella fijiensis* CCIBP-Pf1 isolated of two *Musa* genotypes (a resistant one 'Calcutta 4' and another one susceptible 'Niyarma Yik'). First-strand cDNA synthesis, was made beginning with one microgram of total RNA by using oligo dT primer and cDNA quality was checked by Polimerase chain reaction (PCR) with *cytochrome b* specific primers. Second-strand cDNA synthesis was performed by using the homopolymeric tailing with dC-BamH I + dT-Not I primer combination. Four cDNA libraries of infected plants at different times of infection with the pathogen were obtained. Forty one clones of one of the libraries of 'Niyarma Yik' were sequenced and the obtained sequences correspond with genes related to fungi.

Key words: banana-*Mycosphaerella fijiensis* interaction, Black Sigatoka, *Musa* spp.

CONSTRUCCIÓN DE UNA BILIOTECA DE ADNc COMPLETA A PARTIR DE PLANTAS DE 'GRANDE NAINÉ' INFECTADAS CON *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*, EN UN ESTADIO TARDÍO DE DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

Orelvis Portal^{1*}, Aminaél Sánchez-Rodríguez¹, Mayra Acosta-Suarez¹, Milady Mendoza-Rodríguez¹, Luis Rojas¹, Ana Luisa Darías¹, Bárbara Ocaña, Berkis Roque¹, Yelenys Alvarado-Capó¹, Monica Höfte², Elio Jiménez¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: oportal@ibp.co.cu

²Facultad de Bioingeniería. Universidad de Gante. Coupure Links 653, Gante, Bélgica.

RESUMEN

Mycosphaerella fijiensis Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*) es el agente causal de la Sigatoka negra. Esta enfermedad se ha expandido por más de 20 años y actualmente se encuentra en muchas partes del mundo. La Sigatoka negra es considerada la enfermedad más devastadora en bananos y plátanos. *M. fijiensis* produce síntomas en las hojas las cuales, en cultivares susceptibles, contribuyen al colapso total de la planta. Para un mejor entendimiento de la interacción hospedante-patógeno cada vez se hacen más necesarios la realización de estudios moleculares. El objetivo de este trabajo fue la construcción de una biblioteca de ADNc completa a partir de hojas del cultivar susceptible 'Grande naine' infectado con *M. fijiensis*. Para la inoculación fueron utilizadas plantas de banano 'Grande Naine' de 20 cm de altura y cuatro hojas activas. La infección fue realizada siguiendo una metodología desarrollada en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (Cuba), en la cual, el aislado CCIBP-Pf-83, caracterizado como altamente patogénico fue utilizado como inóculo. El ARN fue purificado a partir de hojas infectadas después de 45-55 días de infección. Se obtuvo una biblioteca de ADNc completa usando la metodología no radiactiva del sistema comercial CloneMiner (Invitrogen). Se determinó que el título promedio de la biblioteca de ADNc fue de 8.1×10^4 ufc.ml⁻¹ y el total de unidades formadoras de colonias fue de 9.7×10^5 ufc. El análisis por PCR de 30 colonias seleccionadas al azar mostró que el tamaño promedio de los insertos fue de 1.37 kb, oscilando desde 0.4 kb hasta 4.0 kb. El análisis de secuencia de 22 de estos insertos evidenció una alta homología entre 16 de dichas secuencias y las registradas en bases de datos, aunque no se pudo adjudicar función alguna en cuatro casos, donde las secuencias de los seis insertos restantes mostraron una baja homología con las existentes en bases de datos. El resultado del análisis de secuencia de los insertos es presentado en detalles.

Palabras clave: bananos, EST, genómica, hongos, Sigatoka negra

CONSTRUCTION OF A FULL-LENGTH cDNA LIBRARY FROM 'GRANDE NAINÉ' INFECTED PLANTS WITH *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* AT THE LATE STAGE OF THE DISEASE DEVELOPMENT

ABSTRACT

Mycosphaerella fijiensis Morelet (anamorph *Pseudocercospora fijiensis*) is the causal agent of the Black Leaf Streak Disease (BLSD) or black Sigatoka. The disease has been spreading for more than 20 years and it is reported in most parts of the world. Black Sigatoka is considered as the major devastating disease of bananas and plantains. *M. fijiensis* induces foliar leaf streaks which, in highly susceptible cultivars, lead to the total collapse of the plant. Molecular studies are necessary for a better understanding of host-pathogen interactions. In the present work, we have attempted to construct a full-length cDNA library from leaves of a susceptible banana cultivar 'Grande Naine' infected with *M. fijiensis*. 'Grande Naine' banana plants, 20 cm height and four active leaves, were used for artificial inoculation. CCIBP-Pf-83 isolate, characterized as highly pathogenic, was used as inoculum for the infection process, which was conducted following a methodology developed at the Instituto de Biotecnología de las Plantas (Cuba). Total RNA was isolated from infected leaves 45-55 days post inoculation. Full-length cDNA library was obtained using the CloneMiner non-radiolabel cDNA construction methodology (Invitrogen). After plating assay, we concluded that the average titer of the cDNA library was 8.1×10^4 cfu.ml⁻¹ and the total number of colony-forming units was 9.7×10^5 cfu. Colony PCR analysis of 30 random clones showed that average insert size is approximately 1.37 kb, in a range from 0.4 kb to 4.0 kb. Sequence analysis of 22 of these clones indicated high homology between 16 of them and the sequences registered in the database, although not function were assigned in four cases, whereas the six remaining showed low homology with those in the database. The results of EST analysis will be presented.

Key words: banana, black Sigatoka, EST, fungi, genomics

DESARROLLO DE UN NOVEDOSO SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA PARA *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET

Orelvis Portal^{1*}, Mileidy Cruz-Martín¹, Frank J. Maier², Mayra Acosta-Suárez¹, Yelenys Alvarado-Capó¹, Wilhelm Schäfer², Elio Jiménez¹. *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830. e-mail: oportal@ibp.co.cu

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

RESUMEN

El hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*) es el agente causal de la enfermedad foliar más destructiva de bananos y plátanos a nivel mundial, conocida como la Raya Negra de la Hoja o Sigatoka negra. Los estudios moleculares sobre la interacción hospedante-patógeno son necesarios para un mejor entendimiento de los procesos de patogénesis y la búsqueda de genes que puedan ser usados en la implementación de nuevos fungicidas para el control de este patógeno. En este trabajo se describe una metodología novedosa para la transformación genética para *M. fijiensis* que puede ser utilizada en estudios para la identificación de factores de virulencia y la caracterización de la patogenicidad en este hongo. Para los ensayos de transformación fue utilizado el aislado CCIBP-Pf-83, caracterizado como altamente patogénico y el plasmidio pIG-PAPA, que porta el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP). Los protoplastos fueron obtenidos a partir de una suspensión micelial tratada con una mezcla de las enzimas Driselasa y Celulasa Onuzuka R-10. La transformación se realizó siguiendo una nueva metodología en la cual se varió el procedimiento para la mezcla de los protoplastos con el ADN plasmídico, así como las condiciones y tiempos de incubación en comparación con un método anteriormente descrito en la literatura científica. Después de tres días en medio de cultivo de regeneración e incubación a 28 °C y oscuridad, las placas de Petri fueron recubiertas con medio de cultivo agar agua con higromicina B para una concentración final de 20 µg mL⁻¹. El 90% de los mutantes de *M. fijiensis* analizados mostraron el fenotipo esperado de acuerdo con la expresión de la GFP. Se demostró, además, la funcionalidad del promotor *icl* de *Neurospora crassa* utilizado por primera vez en la transformación genética de *M. fijiensis*.

Palabras clave: hongos, PEG, protoplastos, REMI, Sigatoka negra

DEVELOP OF A NOVEL SYSTEM FOR THE GENETIC TRANSFORMATION OF *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET

ABSTRACT

The fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorph *Pseudocercospora fijiensis*) is the causal agent of the foliar disease more destructive of bananas and plantains at the world level, well-known as Black Leaf Streak Disease or black Sigatoka. The molecular studies on the interaction host-pathogen are necessary for a better knowledge of the processes of pathogenesis and the search of genes that can be used in the implementation of new fungicides for the control of this pathogen. In this work a novel methodology is described for the genetic transformation of *M. fijiensis* that can be used in studies for the identification of virulence factors and the characterization of the pathogenesis in this fungus. For the transformation assay the isolated CCIBP-Pf-83 was used, characterized as highly pathogenic and the plasmid pIG-PAPA, that carries the genes that encodes for the fluorescent green protein (GFP). The protoplasts were obtained starting from a micelial suspension tried with a mixture of the enzymes Driselasa and Celulasa Onuzuka R-10. The transformation was carried out following a new methodology, in which the procedure was varied for the mixture of the protoplasts with the plasmid DNA, as well as the conditions and times of incubation in comparison with the method described in the scientific literature. After three days in regeneration media culture and incubation at 28 °C and darkness, the Petri dishes were recovered with water agar media culture with hygromycin B for a final concentration of 20 µg mL⁻¹. Mutants of *M. fijiensis* were obtained, where ninety percent of the analyzed colonies showed the prospective phenotype of agreement with the expression of the GFP. The functionality of the *icl* promoter of *Neurospora crassa* used for the first time in the genetic transformation of *M. fijiensis* was also demonstrated.

Key words: black Sigatoka, fungi, PEG, protoplasts, REMI

ENHANCED *IN VITRO* SPORULATION OF *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* FOR ARTIFICIAL INOCULATION OF *MUSA* PLANTS

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

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

RESUMEN

La producción *in vitro* de conidios de *Mycosphaerella fijiensis* constituye una de las principales dificultades en los estudios en condiciones controladas que sobre este patógeno se efectúan. El presente trabajo tuvo como objetivo principal mejorar la esporulación de *M. fijiensis* así como caracterizar morfológica, cultural y patogénicamente la cepa CCIBP-Pf39. Para inducir la esporulación de *M. fijiensis* se utilizaron nueve medios de cultivo sólido. A su vez se seleccionaron los cuatro mejores medios de cultivo (PDA, V8, agar Sabouraud dextrosa, Agar extracto de malta) para la esporulación en tubos. El mejor medio de cultivo fue seleccionado para estudiar la influencia de la temperatura de incubación en la producción de conidios. Para determinar la patogenicidad de la cepa se obtuvo una suspensión conidial la cual fue inoculada en plantas de 8 semanas de aclimatización de los cultivares 'Grande naine' y 'FHIA-18'. Las colonias observadas fueron elevadas, velvéticas, con micelio estromático oscuro y compactas con colores verde olivo, rosado y gris. Se obtuvieron conidios típicos de *Mycosphaerella* en todos los medios de cultivo, aunque en Agar Papa Zanahoria y V-8 se produjeron en mayor cantidad. La expresión de los síntomas en el cultivar 'Grande naine' fue mucho más rápida que en el 'FHIA-18', en correspondencia con lo observado en condiciones naturales. Los resultados de este trabajo permitieron obtener *in vitro* numerosos conidios que pueden servir para evaluar en condiciones controladas el comportamiento de genotipos de interés en los programas de mejoramiento genético de *Musa* spp.

Palabras clave: caracterización morfológica, cultivo de banano, esporulación, hongos patógenos, *Pseudocercospora fijiensis*, Sigatoka negra

ABSTRACT

Conidia produced by *Mycosphaerella fijiensis* are one of the main structures for dissemination in natural condition. However, the production of them is a hazardous task. Enhanced sporulation, morphological and pathogenic characterization of *Mycosphaerella fijiensis* (CCIBP-Pf39) strains were done in the present work. For *in vitro* conidia production on Petri dishes were used nine culture media. Conidia induction on assays tubes were done by selecting the best four culture media from Petri dishes and were included Dextrosa Sabouraud Agar, and Malt extract. The best culture medium was chosen for studying the influence of incubation temperatures and incubation time on conidia production. Five millilitres of sterile distilled water with Tween 80 at 0.05% were added and vortexed to remove conidia from each tubes. Eight-week-acclimatized plants from cultivars 'Grande naine' (AAA) and 'FHIA-18' (AAAB) were used to determine host pathogenicity, inoculation was realized by brushing abaxial leaf surface. Cultural colonies characteristics were raised, velvety, dark stromatic mycelia and compact. Green, pink and grey colors were predominant on superficial mycelia. *Pseudocercospora* conidia types were produced on all cultures media. Potato Carrot Agar and V-8 showed the maximum values. The symptoms evolution on 'FHIA-18' were slower and it was not observed necrotic spot with dry centre of grey colour, while in 'Grande naine' at 63th had necrosed all the inoculated leaves. This behaviour in both banana cultivars was in correspondence with symptoms evolution in natural conditions. By another hands, *in vitro* conidia production of *M. fijiensis* could mimic the natural infection process of this pathogen in controlled condition and with large amount of this structures, different banana cultivars could be evaluated onto *Musa* breeding programs.

Key words: Banana breeding, Black leaf streak, morphological characteristics, pathogen fungus, *Pseudocercospora fijiensis*, sporulation,

EVALUACION DE LA RESISTENCIA DE *XYLELLA FASTIDIOSA* EN DIVERSOS GENOTIPOS DE CITRICOS UTILIZANDO PCR Y ELISA

Elena Paola González Jaimes*¹, Ester Wickert², Paulo Sergio de Souza³. *Autor para correspondencia.

¹Politécnico Colombiano JIC, Cra 48 N. 7-151 Medellín-Colombia. e-mail: epgonzalez@elpoli.edu.co

²Universidade Estadual Paulista/ FCAV, Campus de Jaboticabal, CEP 14884-900 Jaboticabal-SP, Brasil. e-mail: ewickert@fcav.unesp.br

³APTA – Regional Nordeste Paulista, CEP 13730-972 Mococa-SP, Brasil. e-mail: pas_souza@yahoo.com.br

RESUMEN

La Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC), causada por la bacteria *Xylella fastidiosa*, es una de las enfermedades que más afecta la citricultura brasileña, con una incidencia de 43.28% en 2005. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar en condiciones de invernadero en la Estación Experimental de Bebedouro (EECB), 54 genotipos en relación con la resistencia a CVC y el efecto de los portainjertos en su respuesta a la inoculación de la bacteria. Los genotipos fueron introducidos por la EECB, Fundecitrus y CENARGEN. Adicionalmente se evaluó como control la variedad naranja Pera por su alta susceptibilidad. Se instalaron dos experimentos con cuatro repeticiones, el primero utilizando varios portainjertos y el segundo empleando como portainjerto citrumelo Swingle. La inoculación de la bacteria sobre el portainjerto se hizo por medio de un injerto lateral de una rama de la última brotación de aprox. 4 cm, proveniente de una planta infectada naturalmente. La inoculación de la bacteria y el injerto de la copa se hicieron al mismo tiempo, a una altura aproximada de 10 cm injertando primero la rama infectada y un poco más arriba la yema del genotipo. La detección de la bacteria se hizo mediante observación visual de los síntomas, por la prueba de ELISA y por PCR. En total se encontraron 35 genotipos positivos en la prueba de PCR, 11 correspondieron al primer experimento y 24 al segundo, con una coincidencia de nueve genotipos en los dos experimentos. Del total de positivos nueve presentaron síntomas y 26 fueron asintomáticos. Los genotipos en los cuales se detectó la bacteria con la prueba de ELISA pero que su resultado no se confirmó con la PCR se consideraron como falsos positivos, dada la mayor sensibilidad de la prueba PCR. En 19 de los 55 genotipos evaluados no fue encontrado ningún indicio de la bacteria.

Palabras clave: bacteria, CVC, inoculación por rama

XYLELLA FASTIDIOSA RESISTANCE EVALUATION IN DIVERSE CITRUS GENOTYPES USING PCR AND ELISA

ABSTRACT

The Citrus Variegated Chlorosis (CVC), caused by the *Xylella fastidiosa* bacteria is one of the most important disease affecting the Brazilian citriculture, having in 2005 a 43.08% of incidence. The objective of these experiment carried out in the Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB) in greenhouse conditions, was the evaluation of the 54 citrus materials behavior introduced by the EECB, Fundecitrus and Cenargen, in relation with the CVC and the rootstock effect in the inoculation response. In addition a Pera orange was evaluated as susceptible. There was made two experiments with four replications, the plants were multiplied in the first experiment on several rootstock and in the second one on Swingle citrumelo; the grafting of the materials and the bacteria inoculation by grafting of disease stem were made at the same time. The plants were evaluated by symptoms presence, ELISA and PCR test. In the PCR test 35 were found positives, 11 from the first experiment and 24 from the second one, with a nine coincidence genotypes among both experiments. From all positives nine showing symptoms of the disease and 26 were asymptomatic. Instead, the materials where the bacteria was reported by the ELISA but not by the PCR test were grouped like false positives and do not were accepted as susceptible. In 19 genotypes there were not found any evidence of the bacteria.

Key words: bacteria, CVC, grafting inoculation

EVALUACIÓN TEMPRANA DE LA RESPUESTA A SIGATOKA NEGRA CON EL EMPLEO DE SUSPENSIONES CONIDIALES DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* (MORELET) DEIGHTON

Mayra Acosta-Suárez, Yelenys Alvarado-Capó*, Mileidy Cruz-Martín, Michel Leiva-Mora, Berkis Roque Morales. *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 respuesta a la Sigatoka negra en los programas de mejoramiento genético de *Musa* spp. frente a *Mycosphaerella fijiensis*, requiere de procedimientos que permitan diferenciar cultivares resistentes y susceptibles. Los objetivos de este trabajo fueron: evaluar diferentes medios de cultivo para la obtención de conidios de *Mycosphaerella fijiensis* así como la respuesta de dos genotipos de *Musa* mediante la inoculación artificial de suspensiones conidiales. Se utilizaron los medios de cultivo Agar Mycophil, Agar Papa y Dextrosa, Agar Dextrosa de Sabouraud, Agar V-8 modificado, Agar Extracto de Malta y Agar Papa Zanahoria los que fueron inoculados con una suspensión micelial del patógeno y se incubaron a 20°C y luz constante durante 10 días. La concentración de conidios se determinó en cámara de Neubauer por observación al microscopio óptico *Olympus*. Además, se inocularon 10 plantas de 'Grande naine' y 'FHIA-18', de tres meses de cultivo, con suspensiones conidiales (10^5 conidios.ml⁻¹) y gelatina al 1% y se incluyeron 10 plantas sin inocular para ser utilizadas como controles. La inoculación se realizó con un pincel sobre el envés de las tres hojas más jóvenes totalmente extendidas. Hasta los 63 días de inoculadas las plantas, en cada cultivar, se evaluó el período de incubación, el tiempo de evolución de los síntomas y el desarrollo de la enfermedad en el tiempo. La mayor concentración de conidios se logró en los medios de cultivo Agar Papa y Dextrosa, Agar Papa Zanahoria y Agar V-8 modificado. Fue posible obtener síntomas sobre los cultivares 'Grande naine' y 'FHIA-18' a partir de la inoculación artificial de suspensiones conidiales de *M. fijiensis* en casa de cultivo. Se observó la respuesta susceptible del cultivar 'Grande naine' con respecto a la resistencia parcial manifestada por el cultivar 'FHIA-18'. La inoculación artificial de plantas procedentes del cultivo de tejidos mediante el empleo de suspensiones conidiales de *M. fijiensis* resulta ser un método fácil, rápido y reproducible para conocer la respuesta de diferentes cultivares frente a la Sigatoka negra que puede ser utilizado en los programas de mejoramiento genético de *Musa*.

Palabras clave: conidios, inoculación artificial, Rayado negro de la hoja

ABSTRACT

Early evaluation of black Sigatoka in *Musa* breeding programs, requires a set of procedures to differentiate resistant and susceptible cultivars. The present work was focused in: to evaluate different culture media for conidia production and the behaviour of two *Musa* genotypes by artificial inoculation using conidia suspension. Different culture media were used (Mycophil Agar, Potato dextrose Agar, Sabouraud dextrose Agar, V-8 modified Agar, Malt Extract Agar and Carrot Potato Agar.) Inoculated Petri dishes were incubated at 20°C, with continuous fluorescent light for 10 days. Conidia concentration was determined by Neubauer haematocytometer under *Olympus* microscope. Ten 'Grande naine' and 'FHIA-18', plants with 3 month of acclimatization were, inoculated with conidia suspension (10^5 conidia.ml⁻¹) with gelatin 1%. Other 10 plants without inoculation were used as control. Inoculation was done by brushing the first three open leaves in the abaxial leaf surface with the prepared inoculum. Until 63 days after inoculation the inoculated plants were evaluated recording: incubation period, symptoms evolution time, disease development time. A greater conidia production was observed in Potato dextrose Agar, Carrot Potato Agar and V-8 modified Agar. Typical symptoms of young infected plants were obtained in the inoculated cultivars, 'Grande naine' and 'FHIA-18' using conidia suspension as inoculum. 'Grande naine' cultivar was more susceptible than 'FHIA-18' in the last evaluation. Artificial inoculation techniques of acclimatized vitroplants using conidia suspension of *M. fijiensis* result a very easy, practical, rapid and reproducible method for early screening of *Musa* cultivars to assist *Musa*-black Sigatoka breeding Programs.

NUEVO MÉTODO PARA LA DIFERENCIACIÓN A NIVEL FOLIAR DE LA RESISTENCIA A *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE*

Companioni B.^{1*}, N. Mora¹, L. Díaz¹, A. Pérez¹, M. Arzola¹, P. Espinosa¹, M. Hernández¹, J. Ventura², M. C. Pérez³, R. Santos¹, J. C. Lorenzo¹. *Autor para correspondencia.

¹Laboratorio de Mejoramiento Genético, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.
e-mail: bcompanioni@bioplantas.cu

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

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

RESUMEN

En trabajos previos se desarrolló un procedimiento para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia y susceptibilidad de cultivares de banano a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. El presente trabajo incluye evaluaciones de otros indicadores tales como componentes bioquímicos. La utilización del análisis

discriminante para la diferenciación de la resistencia y susceptibilidad de cultivares de banano en el programa de mejoramiento genético constituye un aspecto novedoso en este trabajo. Tal estimación se realizó a partir de una matriz de datos que incluyó el efecto del filtrado del cultivo del hongo (área de la lesión y niveles de fenoles libres y ligados a las paredes celulares, aldehídos excepto malondialdehído, y proteínas) en hojas de siete cultivares de banano.

Palabras clave: análisis discriminantes, enfermedad Mal de Panamá, selección

NEW METHOD FOR THE DIFFERENTIATION OF RESISTANCE TO *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE* AT LEAF LEVEL

ABSTRACT

We previously developed an easy-to-do procedure to differentiate field-grown resistant and susceptible banana cultivars of *Fusarium* wilt at leaf level. The present report includes measurements of other indicators such as biochemical compounds. The use of discriminant analysis to differentiate resistant and susceptible banana cultivars in breeding programmes is also a novel aspect of this report. Such estimation was performed from a data matrix that included the effects of the fungal metabolites (leaf lesion area and levels of free and cell wall-linked phenolics, aldehydes, except malondialdehyde, and proteins) over banana leaves of seven cultivars.

Key words: discriminant analysis, early selection, Panamá disease

ACTIVIDAD FITOTÓXICA Y PROTEINAS MICROBIANAS EN FITRADOS DE CULTIVO DE *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE* RAZA 1

Nayanci Portal González^{1*}, Bárbara Companioni², Christelle Achade¹, Beaufray Mvila¹, Mayda Arzola², Mayra Acosta-Suárez³, Cynthia Sánchez-García³, Michel Leiva-Mora³, Belkis Roque³, Yelenys Alvarado-Capó³, Ramón Santos Bermúdez². *Autor para correspondencia.

¹Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 1/2. Ciego de Ávila. e-mail:nayanci@agronomia.unica.cu, nayansi@bioplantas.cu

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

³Instituto de Biotecnología de las Plantas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

RESUMEN

Los bananos y los plátanos son dos de los cultivos más importantes a nivel mundial. La enfermedad conocida como Mal de Panamá, provocada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, está considerada como una de las enfermedades que causan mayores problemas en este cultivo a nivel global. Una importante vía para obtener plantas resistentes a esta enfermedad lo constituye el uso de herramientas biotecnológicas desarrolladas a partir de estudios de la interacción hospedero-patógeno. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar la actividad fitotóxica y las proteínas totales del filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. Se utilizó la cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 perteneciente al grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) 01210, y los cultivares 'Gros Michel' y 'FHIA -01', susceptibles y resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. Se determinó la actividad fitotóxica de los filtrados de cultivo del microorganismo concentrados al 80% de su volumen inicial y la masa fresca del micelio en cada momento de evaluación. Se cuantificó la concentración de proteínas totales presente en el filtrado crudo de cultivo y la absorbancia en un rango de 200- 300 nm. Se evidenció que *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (GCV 01210) produce los mayores niveles de actividad fitotóxica extracelular en la fase logarítmica de su crecimiento. La máxima actividad fitotóxica se obtuvo a los 15 días de crecido el hongo filamentoso, con una respuesta genotípica diferencial de los cultivares susceptibles y resistentes frente a los filtrados de cultivos concentrados al 80 % de su volumen inicial, mientras que el microorganismo fue capaz de excretar los mayores tenores de proteínas luego de 13 días de la inoculación y alcanzó niveles de 1.698 mg.m.l⁻¹. El máximo crecimiento del microorganismo se registró a los 21 días posteriores a la inoculación. Las principales moléculas excretadas al medio de cultivo registraron sus mayores absorbancias a los 270 nm.

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

APLICACIÓN DE RIZOBACTERIAS COMO AGENTES DE BIOCONTROL EN EL SISTEMA PLANTA – PATÓGENO MAÍZ - *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

Acela Díaz*, Ivan Trujillo, Annia Hernández. *Autor para correspondencia.

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

RESUMEN

El empleo de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB) como agentes de biocontrol resulta una tecnología que ha cobrado mucha fuerza dado su carácter ecológico, bajo costo y eficiencia. Teniendo en cuenta que las enfermedades de origen fúngico son las mayormente asociadas al cultivo del maíz (*Zea mays*), se escogieron dos fitopatógenos de esta gramínea pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Alternaria*, con los cuales se realizaron ensayos *in vitro* estudiando la inhibición del crecimiento de los hongos en presencia de dos cepas de referencia y de un grupo de rizobacterias previamente aisladas del cultivo del maíz. También se desarrollaron bioensayos *in vivo* con las cepas seleccionadas y el patógeno *Fusarium verticillioides* utilizando la variedad de maíz Francisco mejorado. Los resultados mostraron que las rizobacterias seleccionadas tienen la capacidad de producir metabolitos del tipo sideróforos y ácido salicílico e inhiben de forma parcial o total el crecimiento de los fitopatógenos estudiados. También se demostró su efectividad en el biocontrol de patógenos que atacan al cultivo y en la inducción de resistencia en el sistema maíz-*Fusarium verticillioides*. Estos resultados muestran las potencialidades de las cepas de referencia y autóctonas estudiadas para ser utilizadas como agentes de biocontrol en nuestra agricultura.

Palabras clave: ácido salicílico, enfermedades, hongos

APLICACIÓN DE RIZOBACTERIAS PARA INDUCIR RESISTENCIA EN LOS SISTEMAS *PHASEOLUS VULGARIS* L. – *COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM* (SACC. AND MAGNUS) LAMS.-SCRIB. Y *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.- *BOTRYTIS CINEREA* PERS. FR.

Annia Hernández-Rodríguez¹, Ana Niurka Hernández-Lauzardo², Miguel Gerardo Velázquez-Del Valle², Mónica Hofte³. *Autor para correspondencia.

¹Universidad de la Habana, Departamento de Microbiología, Calle 25 esquina J, Ciudad Habana, Cuba CP 10347.

²Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (IPN), Departamento de Biotecnología, km 8.5 Carr. Yauatepec-Jojutla, Morelos, México CP 62731.

³Universidad de Gent, Departamento de Protección Vegetal, Coupure Links 653, Gent, Bélgica CP B-9000.

RESUMEN

En este estudio se evaluaron diferentes rizobacterias en la elicitación de resistencia sistémica inducida (RSI) en los sistemas frijol (*Phaseolus vulgaris*) - *Colletotrichum lindemuthianum* y tomate (*Lycopersicon esculentum*) - *Botrytis cinerea*. Como inductores se utilizaron las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-562, KMPCH y 7NSK2, *Pseudomonas fluorescens* WCS 417 y J-143, *Burkholderia cepacia* 0057, y el producto químico Benzothiadiazole (BTH). Para la elaboración de los inóculos fúngicos se utilizaron las cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* 06/038 y *Botrytis cinerea* R16. Los resultados demostraron que en el cultivo del frijol las cepas de *P. aeruginosa* 7NSK2 y KMPCH, *P. fluorescens* WCS 417 y J-143, *B. cepacia* 0057 y el BTH, inducen resistencia en plantas contra *C. lindemuthianum*. Se destacaron por el mejor comportamiento las cepas de *P. aeruginosa* KMPCH y *P. fluorescens* J-143. En el cultivo del tomate todas las rizobacterias estudiadas y el BTH indujeron resistencia contra *B. cinerea*. Las cepas de *B. cepacia* 0057, *P. fluorescens* J-143 y *P. aeruginosa* KMPCH manifestaron las mejores respuestas, demostrándose un grado de inducción de resistencia en dependencia de la especie vegetal donde fueron aplicadas.

Palabras clave: *Burkholderia*, *Pseudomonas*, resistencia sistémica inducida

ENSAYO EN FRAGMENTOS DE HOJAS DE BANANOS Y PLÁTANOS (*MUSA SPP.*) PARA EL ESTUDIO A NIVEL MONOCÍCLICO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS SÍNTOMAS DE LA SIGATOKA NEGRA CAUSADA POR *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET

Luis Pérez-Vicente^{1*}, Michel Pérez-Miranda¹, María Isabel Jiménez², María Jama². *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura de Cuba.

²Investigadores del Centro biotecnológico del Ecuador (CIBE) de la Escuela Politécnica del Litoral en Guayaquil, Ecuador.

RESUMEN

Se describe el desarrollo de un ensayo de inoculación artificial sobre fragmentos de hojas de clones de bananos y plátanos con diferentes niveles conocidos de resistencia parcial a Sigatoka negra. Se colectaron fragmentos de hojas de 3.5 x 3.5 cm de la primera hoja completamente expandida (10 fragmentos/clon), se lavaron con agua estéril y se colocaron en una placa de Petri de 10 cm con agar agua + benzimidazol (20 agar g.l.⁻¹ + benzimidazol 40 ì g.m.l.⁻¹). Se inocularon con diferentes concentraciones de conidios de *M. fijiensis* obtenidos de cultivos *in vitro* del patógeno y se incubaron bajo luz fluorescente. Se determinó en días consecutivos la cantidad de lesiones y su evolución por estados durante un ciclo infeccioso. Se determinó la concentración óptima de inóculo para el desarrollo del ensayo. Existió una correspondencia entre las curvas de aparición de lesiones en relación con el tiempo en los fragmentos de hoja *in vitro* a nivel monocíclico y las curvas de desarrollo de la enfermedad en el campo a nivel policíclico en los clones respectivos, por lo que el método es aplicable para estimar el nivel de resistencia parcial de los clones frente a Sigatoka negra y para comparar la agresividad de los aislamientos bajo condiciones controladas. La duración de la vida verde de las hojas en el ensayo no permitió determinar la intensidad de la reproducción sexual del patógeno. Se requiere continuar estudiando las condiciones que permitan alargar la vida verde de los fragmentos de hojas hasta lograr el desarrollo de los cuerpos fructíferos sexuales en las manchas.

Palabras clave: conidios, condiciones controladas, resistencia, Sigatoka negra

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE LAS CEPAS DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* J-143 Y *BURKHOLDERIA CEPACIA* 0054 ANTE PATÓGENOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR

Yanelis Acebo*, Iván Trujillo, Annia Hernández, Mayra Heydrich. *Autor para correspondencia.

Universidad de la Habana, Departamento de Microbiología, Calle 25 esquina J, Ciudad Habana, Cuba CP 10 347. e-mail: acebo@fbio.uh.cu

RESUMEN

La utilización de antagonistas microbianos para el control de fitopatógenos se ha catalogado como un importante complemento en el manejo integrado de las enfermedades de las plantas. Las rizobacterias de las especies *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* constituyen de los grupos más estudiados, debido a su capacidad de colonizar un amplio número de cultivos y ser antagonistas de varios patógenos que se encuentran asociados a las raíces de las plantas. Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto antagónico de cepas de rizobacterias ante los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp. y *Curvularia* sp. Para ello se realizaron tres experimentos *in vivo* con el objetivo de determinar el efecto antagónico de las cepas y el inhibitorio de los metabolitos activos producidos por ellas. Se utilizaron las cepas de *Pseudomonas fluorescens* J-143 y *Burkholderia cepacia* 0054, procedentes de la Colección de Cultivos de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. Los hongos fitopatógenos utilizados proceden de la Colección de Cultivos del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Se utilizaron los medios de cultivo King B y Papa Dextrosa Agar (PDA). En todos los casos se siguió la metodología descrita por Bashan y colaboradores en 1996. Los resultados demostraron que tanto los antagonistas como los hongos fitopatógenos crecen satisfactoriamente en ambos medios de cultivo, manifestando un óptimo crecimiento en el medio PDA y conservando sus características micromorfológico - culturales. La cepa de *Pseudomonas fluorescens* J-143 inhibió casi totalmente el crecimiento de los dos hongos, mientras que *Burkholderia cepacia* 0054 solo logró una inhibición parcial de los dos patógenos utilizados. Esta cepa mostró la mayor inhibición frente a *Fusarium* sp. Se demostró que los metabolitos producidos por las bacterias desempeñan un papel rector en el biocontrol de patógenos fúngicos en los sistemas planta – patógeno estudiados, corroborándose los resultados obtenidos en otras gramíneas como el maíz y el arroz.

Palabras clave: antagonistas, bacterias, *Curvularia*, *Fusarium*, metabolitos

VARIABILIDAD DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET. ESTABILIDAD DE LA RESISTENCIA A SIGATOKA NEGRA DE LOS CLONES HÍBRIDOS DE LA FHIA

Michel Pérez-Miranda¹, Luis Pérez-Vicente^{1*}, Roberto Trujillo² y Dulce M. Betancourt³. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ministerio de Agricultura. e-mail: lperezvicente@hotmail.com.

²LAPROSAV Ciego de Avila, Provincia Ciego de Avila.

³ETPP Baracoa, Baracoa, Provincia de Guantánamo.

RESUMEN

La Sigatoka negra (SN) causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Mf) es la enfermedad más importante de los bananos y plátanos. La medida más eficaz de control de la enfermedad, es el uso de clones con resistencia parcial. En Cuba existen más de 14 mil ha de clones con resistencia parcial por lo que la presión de selección de patotipos con mayor agresividad es por tanto elevada. Se establecieron parcelas en La Habana; Ciego de Ávila y Guantánamo de clones susceptibles y con resistencia parcial. Se determinó la severidad del ataque y la velocidad de evolución de la enfermedad así como la formación de fructificaciones en las manchas en parcelas de fincas situadas en Guira de Melena y Alquizar en la Provincia de La Habana, La Cuba en Ciego de Avila y en las localidades de San Luis y Mosquitero en Baracoa, provincia Guantánamo. Se comparó la agresividad de aislamientos monoascospóricos pertenecientes a poblaciones de *M. fijiensis* de Cavendish de zonas donde nunca se cultivaron clones con resistencia parcial y de clones con resistencia parcial fuertemente afectados de SN en ensayos *in vitro* en fragmentos de hojas colocados en agar con benzimidazol incubados a 27°C a la luz. Los clones de la FHIA en La Habana y Baracoa mostraron una resistencia elevada a la enfermedad, mientras que los niveles de ataques y la producción de peritecios en Ciego de Avila, fue similar a la de los clones susceptibles y mucho más intensa que la observada en 1994/95, cuando los clones con resistencia parcial fueron introducidos en Cuba por primera vez. Las inoculaciones sobre fragmentos de hojas del clon 'Grande naine' (susceptible) y 'FHIA 18' con resistencia parcial, con aislados salvajes (procedentes de clones Cavendish de zonas libres de clones con resistencia parcial) y de plantas de 'FHIA 18' de Ciego de Avila fuertemente afectadas, demostró la mayor agresividad de los aislamientos de Ciego de Avila sobre el clon 'FHIA 18', que el procedente de una población salvaje del patógeno. Este constituye el primer informe de cambios de la agresividad de las poblaciones del patógeno o de erosión de la resistencia parcial a Sigatoka negra del clon 'FHIA 18'.

Palabras clave: durabilidad de la resistencia parcial, *Mycosphaerella fijiensis*, Sigatoka negra, variabilidad patogénica

CHARACTERIZATION OF *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET ISOLATED TO BE USED IN *MUSA* SP. IMPROVEMENTS PROGRAMS

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

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

ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objectives of isolating and identifying *Mycosphaerella fijiensis* Morelet isolates of different regions of Villa Clara and Ciego de Ávila provinces, to characterize them culturally, morphologically and physiologically as well as to evaluate their pathogenicity and virulence on four *Musa* cultivars. The growth in solid and liquid cultures media was evaluated, the structures of asexual reproduction were characterized and the subculture number effect on the conidia production was determined, and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Higromicin B and Carbendazim was determined. Nine *M. fijiensis* isolates were obtained and their cultural and morphological characteristic coincided with those referred in the scientific literature for this specie. It was demonstrated that the *M. fijiensis* isolates growth in liquid cultures media was influenced by the composition of them. It was also proven, that the *in vitro* conidia production by the isolates diminished with the increment of the subcultures number and that it was independent of the isolates. It was possible to determine the MIC of Higromicin B and Carbendazim against the assayed isolates with the agar dilution method using mycelia suspensions as inoculums. The results evidenced the

variability of the *M. fijiensis* isolates taking into account speed of growth in PDA and M1-D medium, morphological characteristic of the asexual reproduction structures, susceptibility to Higromycin B and Carbendazim. It was demonstrated their pathogenicity on *Musa* genotypes artificially inoculated with mycelia suspensions and there were differences in respect their virulence.

CARACTERIZACIÓN DE REGIÓN ITS - 5.8S ARNr EN ESPECIES DE *PIPER* MEDIANTE COMPARACIÓN DE SECUENCIAS Y PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA

Cleonilde da Conceição Silva Queiroz¹, Ilmarina Campos de Menezes², Natália Florêncio Martins³, Cláudia Regina Batista de Souza^{1*}. *Autor para correspondencia.

¹Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas/Departamento de Genética, Rua Augusto Corrêa, número 01, Guamá, 66 075-110 - Belém, Pará, Brasil. *e-mail: bsouza@ufpa.br

²Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Caixa Postal 48, 66 095-100 Belém, Pará, Brasil.

³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Caixa Postal 02 372, Asa norte, 70 770-900, Brasília-DF, Brasil

RESUMEN

El género *Piper* incluye más de 1 000 especies y cerca de 450 se encuentran en Brasil. Colectas y trabajos de identificación taxonómica de plantas de *Piper* han sido realizados por diferentes grupos, aunque estudios de caracterización molecular de las especies en Brasil son escasos. En este trabajo fue hecha la caracterización de región ITS de la secuencia de ADN de ARNr 5.8S de especies de *Piper*. Cerca de 20 especies de *Piper* colectadas en norte del Brasil (Estado de Pará), fueron utilizadas en este trabajo, entre estas *Piper hispidinervium*, *Piper columbrinum* y *Piper roxeminianum*. Dos cultivares de *Piper nigrum*, especie originada del continente asiático, también fueron incluidas en este estudio. Muestras de genómico fueron extraídas de hojas de diferentes plantas y utilizadas en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores para las regiones ITS. Los fragmentos amplificados fueron clonados en vectores bacterianos y secuenciados. Las secuencias amplificadas contienen 107 pb de la región ITS, 167 pb del gene 5.8S del ARN ribosomal y 270 pb de la región ITS. Los análisis de similaridad con BLAST muestran que las secuencias obtenidas presentan cerca de 98% de identidad con secuencias ITS de *Piper* depositadas en el Genbank. Los programas utilizados en este estudio fueron PAUP para análisis filogenético y MFOLD para predicción de estructura secundaria. Estos resultados muestran distancias genéticas significativas entre las diferentes especies estudiadas, que forman dos grupos filogenéticamente distintos.

Palabras clave: estructura secundaria, filogenia, ITS, *Piper*

MARCADORES MOLECULARES DE TIPO INDELS EN LA DETERMINACIÓN DE RELACIONES EVOLUTIVAS EN PROTEOBACTERIAS

Ania Margarita Cutiño Jiménez^{1*}, Alexander Martin Tornet. *Autor para correspondencia.

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Cuba. e-mail: ania@amcj.uo.edu.cu; aniac@cmt.uo.edu.cu

²Departamento de Informática, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Cuba.

RESUMEN

La división proteobacterias incluye la mayoría de las bacterias Gram-negativas conocidas. Especies de este grupo, como las pertenecientes al género *Xanthomonas*, presentan gran interés investigativo por su carácter fitopatogénico en cultivos de importancia económica como el arroz, algodón, los cítricos y la uva. Las singularidades de los miembros del grupo *Xanthomonadales* y los resultados controvertidos que cuestionan su posición dentro de las proteobacterias, motivan al mejor conocimiento de su biología y origen evolutivo. El estudio se basó en el análisis de secuencias de proteínas conservadas en proteobacterias. Se consideraron enzimas involucradas en procesos de replicación y reparación del ADN, provenientes de bases de datos públicas e identificaron marcadores moleculares. Se utilizó la Metodología de Gupta, basada en el estudio de INDELS como criterio filogenético (inserciones y deleciones presentes en conjuntos de proteínas homólogas), con el objetivo de determinar la posición evolutiva del grupo *Xanthomonadales* que incluye los géneros

Xanthomonas y *Xylella*. Se seleccionaron las proteínas ADN polimerasa III (subunidad alfa), ADN ligasa NAD dependiente y ADN Topoisomerasa I, con la obtención de algunos marcadores INDELS considerados útiles para inferir relaciones evolutivas en proteobacterias. El alineamiento de las proteínas ADN Topoisomerasa I y ADN polimerasa III (cadena alfa), mostró inserciones propias de los miembros de proteobacterias gamma y que excluyen al grupo *Xanthomonadales*. Resultado soportado por los hallazgos en las proteínas ADN polimerasa y ADN ligasa NAD dependiente. El alineamiento de éstas, reveló inserciones exclusivas para los miembros del grupo *Xanthomonadales*. Los marcadores moleculares hallados, corroboran estudios previos que cuestionan la posición basal del grupo *Xanthomonadales* dentro de las proteobacterias gamma.

Palabras clave: INDELS (inserciones y deleciones), marcadores moleculares, secuencias de proteínas, subdivisión Proteobacterias, *Xanthomonadales*

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE CEPAS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA ENDÓFITA DE TRES GENOTIPOS DE CAÑA DE AZÚCAR

Marcia Rojas*, Anar J. Rodríguez, Yaremis Felipe, Mayra Heydrich. *Autor para correspondencia.

Universidad de la Habana Facultad de Biología, Dpto. de Microbiología, Calle 25 #455 e/ J e I Vedado, CP 10 400. Ciudad Habana. e-mail: marcia@fbio.uh.cu

RESUMEN

Muchas rizobacterias se han estudiado con el fin de ser utilizadas en el biocontrol de fitopatógenos, pero en los últimos años los endófitos y su interacción con la planta, han despertado el interés de muchos investigadores. Entre las posibles vías de beneficio a la planta está la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, el estudio de cepas nativas con potencialidades como biocontroladoras resulta de gran importancia en la sostenibilidad agrícola. En el presente trabajo se aislaron e identificaron por métodos moleculares miembros de la comunidad endófito de tres genotipos de caña de azúcar. Se estudió la potencialidad *in vitro* de estas cepas de inhibir el crecimiento de la bacteria *Xanthomonas albilineans* y los hongos *Fusarium* y *Dreschlera* en los medios de cultivo Agar Nutriente y Agar Malta, respectivamente. Los aislados de los tres genotipos de caña de azúcar pertenecen a los géneros *Gluconacetobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Comamonas* fundamentalmente. De ellos dos cepas mostraron efecto antagónico contra los patógenos utilizados, lo cual pudiera ser de especial interés en el biocontrol de estas enfermedades en el cultivo de la caña de azúcar.

Palabras clave: biocontrol, cepas nativas, microorganismos patógenos