



BIOTECNOLOGÍA HABANA 2008

BIOTECHNOLOGY HAVANA 2008

**AGRO-BIOTECNOLOGÍA: NUEVOS ENFOQUES
ANTE GRANDES RETOS**

***AGBIOTECHNOLOGY: FACING HUGE CHALLENGES
WITH NEW APPROACHES***

BIOTECNOLOGÍA HABANA 2008
BIOTECHNOLOGY HAVANA 2008

Noviembre 30- Diciembre 5, Habana, Cuba
November 30th- December 5th, Havana, Cuba

Los organizadores agradecen a nuestros auspiciadores/
The organizers gratefully acknowledge our sponsors:



CIGB

CONSEJO DE ESTADO DE LA REPÚBLICA DE CUBA



sartorius



Nota: Este listado fue conformado con fecha 28 de octubre de 2008, al momento de la entrega del manuscrito a impresión.

Note: This list was composed with date October 28, 2008, at the moment of delivery of the manuscript for printing.



BIOTECNOLOGÍA HABANA 2008
BIOTECHNOLOGY HAVANA 2008

**AGRO-BIOTECNOLOGÍA: NUEVOS ENFOQUES
ANTE GRANDES RETOS**
***AGBIOTECHNOLOGY: FACING HUGE CHALLENGES
WITH NEW APPROACHES***

Resúmenes / *Abstracts*



Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
La Habana, 2008

JElfos
SCIENTIAE

Compilación y Edición / Compiled and Edited:
Ernesto Galbán
Vladimir Torres

Revisión Editorial / Edition Review:
Lic. Hermes J Moreno

Composición / Composed:
Marlene Sardiña

Diseño de Cubierta / Cover Design:
Michel Magrañer

ISSN 1027-2860

© Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

Elfos Scientiae
POBox 6072
Havana 10600, Cuba
Phone: (53-7) 271 6022 ext. 1184
Fax: (53-7) 273 1917, 273 6008
E-mail: elfos@cigb.edu.cu
<http://elfosscientiae.cigb.edu.cu>

Todos los derechos reservados. Queda estrictamente prohibida, sin la autorización escrita de los titulares del derecho de autor, la reproducción parcial o total de esta obra en forma alguna, por cualquier medio. La reproducción por organizaciones no lucrativas y de países en desarrollo, así como con fines educacionales, no se incluye. Los autores están autorizados a reproducir y diseminar libremente la versión publicada, una vez hecha pública, siempre que se cite explícitamente la fuente, por lo cual se solicita a los autores abstenerse de publicar versiones diferentes al original aceptado.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored or transmitted in any form or by any means without the prior permission of the Publisher. Reproduction by non-profit organizations and organizations from developing countries, as well as for educational purposes, is not included. Authors are authorized to reproduce and freely disseminate the version published once it is released, provided that they explicitly credit its original version. Thus, authors are encouraged to abstain from publishing versions different from the accepted one.

COMITÉ ORGANIZADOR / ORGANIZING COMMITTEE

Presidentes/Presidentes

Dr. Luis S. Herrera
Dr. Carlos Borroto
Dr. Francisco Machado
Dra. Sonia Negrín

Secretario Científico/Scientific Secretary

Dr. Mario Pablo Estrada

**Jefes de Simposio y Programa General/
Head of Symposia and General Program**

Dr. Merardo Pujol
MSc. Marisela Suárez
Dr. Orlando Borrás
Dr. Oliberto Sánchez
Dra. Rebeca Martínez
Dr. Manuel Raíces
Dra. María Pilar Rodríguez
Dr. Lázaro Hernández
Téc. Ariel Cruz
Ing. Yamilka Rosabal
Lic. Meilyn Rodríguez
Téc. Ada Abad
Téc. Gabriel Romero
Dra. Carmen Menéndez
Dr. Camilo Ayra
Dra. María Cristina Pérez
Dr. Mariano González
Lic. Alejandro Fuentes

Información y registro/ Information and registration

Téc. Vladimir Torres
Lic. Alina Rodríguez
MSc. Yamila Carpio

Publicaciones/ Publications:

Lic. Ernesto Galbán
Lic. Raymundo Batista

Feria Comercial/ Commercial exhibition:

MSc. Madaisy Cueto
Dr. Héctor Machado

Soporte técnico/Technical support:

Ing. Renee Verdecie
Ing. Orestes Cabañas

Programa General / General Program

Horario/ Schedule	Domingo/ Sunday	Lunes/ Monday	Martes/ Tuesday	Miércoles/ Wednesday	Jueves/ Thursday	Viernes/ Friday
08:30 – 09:30	A Inscripción/ Registration fee	A Conferencia magistral/ Key lecture	A Conferencia magistral/ Key lecture		A Conferencia magistral/ Key lecture	A Conferencia magistral/ Key lecture
09:45 – 13:15		A (S1) B (S7) C(S8)	A (S1) B (S2) C(S8)	Día libre/ Free day	A (S5) B (S3) C(S4)	A (S5) B (S9) C(S10)
13:15 – 15:00		Almuerzo/ Lunch	Almuerzo/ Lunch		Almuerzo/ Lunch	Almuerzo/ Lunch
15:00 – 19:00	A Ceremonia de apertura y Coctel de bienvenida/ Opening ceremony and Cocktail	A (S1) B (S7) C(S8)	A (S4) B (S2) C (S7)		A (S5) B (S3) C(S6)	A Acto de despedida/ Farewell

A, B, C- Salas/ Rooms

S1-S10- Simposios/Symposia

Simposios / Symposia

S1- SIMPOSIO 1/ SYMPOSIUM 1

Biotecnología Acuática / *Aquatic Biotechnology*

S2- SIMPOSIO 2/ SYMPOSIUM 2

Biotecnología Moderna para la Salud Animal / *Modern Biotechnologies for Animal Health*

S3- SIMPOSIO 3/ SYMPOSIUM 3

Animales como Biorreactores y Biomodelos / *Animals as Bioreactors and Biomodels*

S4- SIMPOSIO 4/ SYMPOSIUM 4

Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y los Bioproductos / *Biosafety in Genetically Modified Organisms (GMO) and Bioproducts*

S5- SIMPOSIO 5/ SYMPOSIUM 5

Interacción Molecular Planta-Patógeno / *Molecular Plant-Pathogens Interaction*

S6- SIMPOSIO 6/ SYMPOSIUM 6

Probióticos y Prebióticos: Ingredientes Activos de Alimentos Funcionales / *Probiotics and Prebiotics: Active Ingredients of Functional Foods*

S7- SIMPOSIO 7/ SYMPOSIUM 7

Control Fitosanitario con Herramientas Biotecnológicas / *Control of Crop Pests with Biotechnology Tools*

S8- SIMPOSIO 8/ SYMPOSIUM 8

Producción de Farmacéuticos en Plantas / *Plant Made Pharmaceuticals*

S9- SIMPOSIO 9/ SYMPOSIUM 9

Oportunidades de Negocios en la Agro-Biotecnología / *Ag-Biotechnology. Business Opportunities*

S10- SIMPOSIO 10/ SYMPOSIUM 10

Microorganismos para Biofertilización / *Microorganisms as Biofertilizers*

CONFERENCIAS MAGISTRALES / KEY LECTURES

LUNES 1 / MONDAY 1

08:30 – 09:30

«El descubrimiento y aplicaciones potenciales de citocinas de peces»
«The discovery and potential application of fish cytokines»

DR. CHRISTOPHER SECOMBES

University of Aberdeen, Aberdeen, United Kingdom

MARTES 2 / TUESDAY 2

08:30 – 09:30

«Cultivos Biotecnológicos/Genéticamente Modificados – Perspectiva global y posibilidades futuras»
«Biotech/GM Crops - Global Overview and Future Prospects»

DR. CLIVE JAMES

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications

JUEVES 4 / THURSDAY 4

08:30 – 09:30

«Nuevos acercamientos a la comprensión y manipulación de la virulencia de patógenos y la resistencia de los organismos hospedantes»
«New approaches to understanding and manipulating pathogen virulence and host resistance»

PROF. DR. JONATHAN JONES

The Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, United Kingdom

VIERNES 5 / FRIDAY 5

08:30 – 09:30

«Señalización por azúcares y la reprogramación del metabolismo en plantas»
«Sugar signals and the reprogramming of metabolism in plants»

DR. SJEFF SMEEKENS

Utrecht University, Holland

ÍNDICE GENERAL / GENERAL CONTENTS

S1- SIMPOSIO 1/ SYMPOSIUM 1

Biotecnología Acuática / *Aquatic Biotechnology* / 41
Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts* / 41
Resúmenes de Carteles/ *Poster Abstracts* / 57

S2- SIMPOSIO 2/ SYMPOSIUM 2

Biotecnología Moderna para la Salud Animal / *Modern Biotechnologies for Animal Health*/ 83
Resúmenes de Conferencias/ *Lecture Abstracts* / 83
Resúmenes de Carteles/ *Poster Abstracts* / 93

S3- SIMPOSIO 3/ SYMPOSIUM 3

Animales como Biorreactores y Biomodelos / *Animals as Bioreactors and Biomodels* / 146
Resúmenes de Conferencias/ *Lecture Abstracts* / 146
Resúmenes de Carteles/ *Poster Abstracts* / 153

S4- SIMPOSIO 4/ SYMPOSIUM 4

Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y los Bioproductos / *Biosafety in Genetically Modified Organisms (GMO) and Bioproducts*/ 162
Resúmenes de Conferencias/ *Lecture Abstracts* / 162
Resúmenes de Carteles/ *Poster Abstracts* / 171

S5- SIMPOSIO 5/ SYMPOSIUM 5

Interacción Molecular Planta-Patógeno / *Molecular Plant-Pathogens Interaction* /181
Resúmenes de Conferencias/ *Lecture Abstracts* / 181
Resúmenes de Carteles/ *Poster Abstracts* / 192

S6- SIMPOSIO 6/ SYMPOSIUM 6

Probióticos y Prebióticos: Ingredientes Activos de Alimentos Funcionales / *Probiotics and Prebiotics: Active Ingredients of Functional Foods* / 219
Resúmenes de Conferencias/ *Lecture Abstracts* / 219
Resúmenes de Carteles/ *Poster Abstracts* / 229

S7- SIMPOSIO 7/ SYMPOSIUM 7

Control Fitosanitario con Herramientas Biotecnológicas / *Control of Crop Pests with Biotechnology Tools*/ 265

Resúmenes de Conferencias/ *Lecture Abstracts* / 265

Resúmenes de Carteles/ *Poster Abstracts* / 284

S8- SIMPOSIO 8/ SYMPOSIUM 8

Producción de Farmacéuticos en Plantas / *Plant Made Pharmaceuticals*/ 321

Resúmenes de Conferencias/ *Lecture Abstracts* / 321

Resúmenes de Carteles/ *Poster Abstracts* / 329

S9- SIMPOSIO 9/ SYMPOSIUM 9

Oportunidades de Negocios en la Agro-Biotecnología /*Ag-Biotechnology. Business Opportunities*/ 347

Resúmenes de Conferencias/ *Lecture Abstracts* / 347

S10- SIMPOSIO 10/ SYMPOSIUM 10

Microorganismos para Biofertilización / *Microorganisms as Biofertilizers*/ 352

Resúmenes de Conferencias/ *Lecture Abstracts* / 352

Resúmenes de Carteles/ *Poster Abstracts* / 361

**SIMPOSIO 1: Biotecnología Acuática/
SYMPOSIUM 1: Aquatic Biotechnology**

Resúmenes de Conferencias / Lecture Abstracts

S1-1

Improved body mass growth in teleost fish by blockade of myostatin signaling pathways / 42
Carpio Y *et al.*

S1-2

A novel recombinant pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) from teleost fish: from its discovery to their functions / 43
Lugo González JM *et al.*

S1-3

Marine biotechnology in Canada, 2008 / 44
van der Meer J

S1-4

Acuabio 1 enhances the larvae quality in tilapia (*Oreochromis sp*) and catfish. (*Ictalurus punctatus*) / 45
Martínez R *et al.*

S1-5

Avances sobre el cultivo de tilapia roja en agua salada / 46
Castillo Campo LF

S1-6

Avances en el estudio de las neurohormonas de la familia peptídica CHH/MIH/GIH del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* / 47
Ponce-Rivas E y Lago-Lestón A

S1-7

Polypeptidic fragment derived from tilapia somatotropin has enhanced biological activity in fish and a reduction in secretion *in vitro* / 48
Acosta J *et al.*

S1-8

Prolactin in the innate immune system of atlantic salmon (*Salmo salar*) and its probable relation with cytotoxic cells / 49
Hausmann Bielefeld D *et al.*

S1-9

Prolactin effect on innate immune system of *Salmo salar* / 50
Figueroa Valverde J *et al.*

S1-10

The discovery and potential application of fish cytokines / 51
Secombes C

S1-11

The biotech bullets needed for aquaculture: the metabolic modifiers / 52
Estrada MP

S1-12

Haliotis rufescens x *H. discus hannai*: biotecnología aplicada al desarrollo de un nuevo híbrido de abalón en Chile / 53
Gallardo C

S1-13

Production and evaluation of females genetically males (pseudofemales) in tilapia from the *Oreochromis aureus* species / 54
Abad Márquez Z *et al.*

S1-14

Characterization of the expression of tilapia growth hormone receptors after growth hormone induction / 55
Rodríguez Mallon A *et al.*

S1-15

New technologies in the development of vaccines for aquaculture / 56
Thompson KD

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts***S1-P1**

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in fish: working towards new avenues for enhancing the productivity of aquaculture / 58
María Lugo J *et al.*

S1-P2

Molecular biomarkers for differential detection of contaminant bacteria in fish meal and frozen fish by PCR / 59
Frias JR *et al.*

S1-P3

Acuabio 1 improve the *Litopenaeus vannamei* shrimp culture / 60
Arenal A *et al.*

S1-P4

Amplificación cruzada de *loci* microsatelite en abalón rojo (*Haliotis rufescens*)
obtenidos mediante partidores heterólogos / 61
Lafarga-De la Cruz F *et al.*

S1-P5

A novel recombinant crustacean hyperglycemic hormone from *Litopenaeus schmitti* expressed as fusion protein shows hyperglycaemic activity in *Litopenaeus vannamei* / 62
Morera Y *et al.*

S1-P6

Effects of microencapsulated bovine insulin as food additive on growth and metabolism of *Litopenaeus vannamei* larvae / 63
Piñero González J *et al.*

S1-P7

Clonación y expresión de la hormona hiperglucémica de crustáceos (Liv-CHH-SG1) de *Litopenaeus vannamei* en *Pichia pastoris* / 64
Ponce-Rivas E *et al.*

S1-P8

Valoración de la calidad alimentaria e inocuidad de alimentos balanceados para peces utilizados en la experimentación / 65
Forte Miranda CR

S1-P9

Effects of cryoprotectants at low temperatures on Mediterranean scallop *Pecten jacobaeus* spermatozoa motility. Preliminary results of cryopreservation / 66
Del Prete F *et al.*

S1-P10

Acuabio 1 is a shrimp (*Litopenaeus vannamei*) immune system enhancer: possible prebiotic effect / 67
Franco R *et al.*

S1-P11

Filogenia molecular de la familia *Mytilidae* en Chile basada en secuencias de ADNmt (16S, COI) y espaciadores internos transcritos / 68
Aguilera-Muñoz F *et al.*

S1-P12

Growth enhancement of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using tilapia growth hormone / 69
Martín L *et al.*

S1-P13

Utilización de proteína espermática Lisina como herramienta biotecnológica en la fecundación *in vitro* de abalón rojo (*Halotis rufescens*) / 70
Valenzuela Muñoz V *et al.*

S1-P14

Monosex tilapia *Oreochromis aureus* culture in floating cages / 71
Abad Z *et al.*

S1-P15

Sex determination by microsatellites in tilapia *Oreochromis aureus* / 72
Ramírez Núñez Y *et al.*

S1-P16

Acuabio3 enhance growth, innate immune functions and survival in fish /73
Acosta J *et al.*

S1-P17

Obtención de una formulación estable del producto Acuabio 3 / 74
Ruíz O *et al.*

S1-P18

Production of a high percentage of male offspring in growth-enhanced transgenic tilapia using *Oreochromis aureus* ZZ selected pseudofemales / 75
Abad Márquez Z *et al.*

S1-P19

Partial cloning and semi-quantitative expression analysis of nitric oxide synthase gene in the spiny lobster *Panulirus argus* / 76
Rodríguez-Ramos T *et al.*

S1-P20

Vitrificación espermática en «neomachos» de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): integridad de membrana plasmática, potencial mitocondrial y capacidad fecundante de los espermatozoides / 77

Figuerola E *et al.*

S1-P21

Bioensayos preliminares de criopreservación y vitrificación de semen de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante métodos asépticos / 78

Valdebenito Isler I y González Alfaro K

S1-P22

Fecundación en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con espermatozoides vitrificados: bioensayos preliminares / 79

Merino O *et al.*

S1-P23

Myostatin bioactivity blockage increases embryonic developmental speed in zebrafish / 80

Delgado I *et al.*

S1-P24

Biolixiviación de minerales sulfo-ferrosos en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados / 81

Juárez Alcaraz A

S1-P25

Estudio de genes con expresión diferencial en *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco del Pacífico) alimentados con fuentes convencionales y alternativas de proteína / 82

Chávez Calvillo G *et al.*

**Simposio 2: Biotecnología Moderna para la Salud Animal/
Symposium 2: Modern Biotechnologies for Animal Health**

Resúmenes de Conferencias / Lecture Abstracts

S2-1

Uso estratégico de vacunas contra la garrapata para reducir el uso de acaricidas y el desarrollo de resistencia en Latinoamérica / 84

Benavides E

S2-2

Immunopathology of the tick-host interface / 85

Bechara GH

S2-3

Development and characterization of a vaccine candidate against classical swine fever, based on the E2-CSFV glycoprotein produced in the milk of non-transgenic goats / 86

Sánchez Ramos O *et al.*

S2-4

Emerging lateral flow tests for veterinarian purposes according to Cuban biotechnology products / 87

Torres E

S2-5

Transgenic plants for improving animal health: approaches for active and passive vaccination / 88

Joensuu J *et al.*

S2-6

Vaccines against classical swine fever-developments in the European Union / 89

Greiser-Wilke I and Moennig V

S2-7

RT-PCR multiplex assay for the detection and differentiation of pestivirus infections in pigs / 90

Díaz de Arce Landa H *et al.*

S2-8

Evaluación del inmunógeno Heberbiogar aplicado dentro de un programa de control integrado de las garrapatas del ganado bovino en la República Bolivariana de Venezuela / 91

Ascanio E *et al.*

S2-9

Development of transmission-blocking anti-tick vaccines / 92

Nuttall P

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S2-P1

Producción de ADN plasmídico mediante cromatografía de intercambio iónico en membranas y de interacción hidrofóbica / 94
Guerrero-Germán P *et al.*

S2-P2

Cambios morfológicos de la bursa y respuesta inmune humoral por efecto de una vacuna complejo virus-anticuerpo contra la Enfermedad de Gumboro / 95
Saume de Sabaté E *et. al.*

S2-P3

A broad specificity inhibitor protects heterologous proteins from proteolysis in *Pichia pastoris* cultures / 96
Gil DF *et al.*

S2-P4

Detección de anticuerpos HI contra la Enfermedad de Newcastle a partir de la aplicación de la vacuna Newcastle inactivada para palomas, cepa La Sota en palomas susceptibles / 97
González Martínez S *et al.*

S2-P5

Genetic immunization of chicken for development of specific IgY against bovine interferon-gamma / 98
Nikbakht Brujeni G *et al.*

S2-P6

Generation of a CHO cell line expressing the soluble hemagglutinin H5 of Influenza virus for diagnostic purpose / 99
Venéreo Sánchez A *et al.*

S2-P7

Estudio de reformulación del inmunógeno Gavac / 100
Segura R *et al.*

S2-P8

Recombinant adenoviruses mediated efficient expression of calicivirus capsid protein and induction of an immune response comparable to the virus inactivated vaccine / 101
Fernández E *et al.*

S2-P9

Intact VP60 protein production in *Pichia pastoris* culture supernatant is mediated by the use of the broad specificity inhibitor of proteolysis ShPI-1 / 102
Fernández E *et al.*

S2-P10

Creation of a stable cell line expressing the Influenza virus hemagglutinin in its membrane using lentiviral vectors / 103
Venéreo Sánchez A *et al.*

S2-P11

Determinación de la estructura genética de tres poblaciones de ganado bovino autóctono cubano a través de la tipificación de RAPD / 104
Acosta A *et al.*

S2-P12

Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari:Ixodidae) dog tick / 105
Pérez Pérez D *et al.*

S2-P13

Assessing approaches for improved purification and aggregation diminishment of multimeric RHDV VP60 protein expressed in *P. pastoris*: Long term follow-up of immunogenicity in vaccinated rabbits / 106
Fernández E *et al.*

S2-P14

Development and validation of an Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay for anti – rBm86 antibodies detection in bovine serum samples / 107
Machado H *et al.*

S2-P15

Evaluation of immunochromatography test for serological diagnostic of anti rBm86 antibodies in sera and blood samples of cattle immunized with Gavac™ / 108
Machado H *et al.*

S2-P16

Impacto de la aplicación de inmunógeno Gavac en la región del Tolima, Colombia / 109
Constanza N *et al.*

S2-P17

Avian CD154 enhances humoral and cellular immune responses induced by an adenovirus vector-based vaccine in chickens / 110

González Pose A *et al.*

S2-P18

Virtual sensor for biomass estimation in feed batch fermentations, using an Artificial Neural Network with GMDH algorithm / 111

Hernández F *et al.*

S2-P19

The antibodies against antigen Bm86 diminish the recovery of immature instars and adult of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari:Ixodidae) dog tick / 112

Suárez M *et al.*

S2-P20

Physical and thermal stability of an oil-based vaccine formulation containing recombinant virus like particles of the VP60 capsid protein from rabbit hemorrhagic disease virus / 113

Farnós O *et al.*

S2-P21

Development of an ELISA for the detection of recombinant virus E2 protein of classical swine fever / 114

Santana Rodríguez E *et al.*

S2-P22

Implementación de ensayos de PCR para la detección de organismos genéticamente modificados (OGM) en la cadena agroalimentaria / 115

Martínez S *et al.*

S2-P23

Experiencia de Cuba en el diagnóstico de MOLLICUTES en animales y productos biotecnológicos de aplicación biomédica / 116

Lobos E *et al.*

S2-P24

Obtención de un prebiótico basado en β 1-3 glucano particulado lineal para su empleo por vía oral: influencia sobre indicadores de la respuesta inmune y productivos en las aves / 117

Pedroso JM *et al.*

S2-P25

RT-PCR multiplex assay for the detection and differentiation of pestivirus infections in pigs / 118

Díaz de Arce H *et al.*

S2-P26

Development and evaluation of PCR assays for the detection of pseudorabies and encephalomyocarditis viruses in clinical samples / 119

Díaz de Arce H and Pérez LJ

S2-P27

Caracterización de cepas de *Salmonella enteritidis* para el control de roedores / 120

González HRM *et al.*

S2-P28

Manual de necropsias de aves domésticas / 121

Colas Chávez M *et al.*

S2-P29

DNA fingerprinting of *Helicobacter pylori* J99 strain by Pulsed Field Minigel Electrophoresis / 122

Torres L *et al.*

S2-P30

DNA immunization using different routes of administrations of DNA in chicken / 123

Tadjbakhsh H *et al.*

S2-P31

Bioinformatic strategy for grouping strains of *Staphylococcus* and *Streptococcus* according to their genera using virtual pulsed field gel electrophoresis / 124

Cárdenas Y *et al.*

S2-P32

Nonenzymatic preparation of *Salmonella* genomic DNA and rapid macrorestriction analysis by contour clamped homogeneous electric field electrophoresis / 125

Corrales F *et al.*

S2-P33

Genetic characterisation of rabies viruses involved in a recent outbreak in Mpumalanga province (eastern South Africa) / 126
Sabeta C *et al.*

S2-P34

Estudio de la eficacia de un inmunosuero polivalente contra las principales enfermedades infecciosas del perro / 127
Guerra T *et al.*

S2-P35

Utilización de la cámara miniTAFE para la separación de los macrofragmentos de restricción del genoma de bacterias / 128
Garrido Nicot Y *et al.*

S2-P36

Molecular characterization of a Cuban strain of Bovine herpesvirus type 1 / 129
Rodríguez Medina M *et al.*

S2-P37

Tetralogía hemoparasitaria en ganadería doble propósito venezolana: situación actual y avances biotecnológicos en diagnóstico y control para un desarrollo sustentable / 130
Tamasaukas R *et al.*

S2-P38

Utilización de la piruvato cinasa como posible biomarcador molecular / 131
Ponce-Rivas E *et al.*

S2-P39

Carrageenan Lambda and *Trypanosoma cruzi* / 132
Nacife V and MNL M

S2-P40

Prueba comparativa de líneas puras camperas y sus híbridos en condiciones intensivas de manejo / 133
Fumero Durán JE *et al.*

S2-P41

Desarrollo de un ensayo de PCR anidado para el diagnóstico de gastroenteritis transmisible del cerdo / 134
Rodríguez E *et al.*

S2-P42

Relación entre la concentración de proteínas del plasma seminal, parámetros de calidad seminal y el incremento porcentual de espermatozoides con acrosoma reaccionado en semen de toros de razas Sanmartinero y Cebú en el trópico colombiano / 135

Coral Medina AR *et al.*

S2-P43

Efecto del clima sobre los perfiles electroforéticos de proteínas de plasma seminal y membrana del espermatozoide de bovinos criollos colombianos y su relación con la fertilidad / 136

Niño Cárdenas AI *et al.*

S2-P44

Predicting functional residues in *Fasciola hepatica* cathepsin B by combining sequence and structural analysis with molecular dynamics simulations / 137

Naranjo Feliciano D *et al.*

S2-P45

Vigilancia de encefalopatía espongiforme bovina: utilización del PCR para la detección de restos de mamíferos en concentrados y harinas destinados a la alimentación animal / 138

Corona B *et al.*

S2-P46

Obtención y evaluación de una vacuna bivalente contra la encefalomiелitis equina del este y toxoide tetánico / 139

Lorenzo Roche F *et al.*

S2-P47

Estudio de la estabilidad de la vacuna contra la Brucelosis bovina elaborada para dosis reducidas por LABIOFAM / 140

Pluma B *et al.*

S2-P48

Desarrollo de control positivo de amplificación para el diagnóstico por RT-PCR y *Real Time* RT-PCR de Influenza aviar / 141

Acevedo AM *et al.*

S2-P49

Obtaining and purification of the nucleoprotein of Avian Influenza for diagnostic use / 142

Santana Rodríguez E *et al.*

S2-P50

Cloning, expression and preliminary characterization of recombinant E2 glycoprotein expressed in *Pichia pastoris* / 143

Méndez Pérez L *et al.*

S2-P51

Escalamiento de columnas de cromatografía de membranas de intercambio iónico para la purificación de ADN plasmídico / 144

de la Vega Olivas J

S2-P52

Biological aspects of *Rhipicephalus sanguineus* under laboratory conditions / 145

Vargas Hernández M *et al.*

**Simposio 3: Animales como Biorreactores y Biomodelos/
Symposium 3: Animals as Bioreactors and Biomodels**

Resúmenes de Conferencias/ Lecture Abstracts

S3-1

Lentiviral vectors for generation and early detection of transgenic animals. Advances and difficulties / 147

Sánchez Ramos O *et al.*

S3-2

Transgenesis en animales domésticos / 148

F Salamone D *et al.*

S3-3

The mammary gland as a bioreactor of recombinant glycoprotein / 149

Montesino Seguí R *et al.*

S3-4

Technologies and applications of transgenesis in the chicken / 150

Sang H

S3-5

Transgenic mice as models for programmed cell death, lineage commitment, and stem cell function in mammary gland / 151

Watson C *et al.*

S3-6

Production of recombinant bispecific antibodies / 152

Brem G

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts***S3-P1**

Effect of the aspiration pressure, the category and the reproductive status of bovine donors on the oocytes collection by *in vivo* follicular puncture guided by ultrasound / 154

Denis R *et al.*

S3-P2

Risks assessment and establishment of biosafety measures for the development of transgenic animal by means of the employment of lentiviral vectors in the laboratory / 155

Santana Rodríguez E *et al.*

S3-P3

Heterologous promoter interference affects the expression of transgenes delivered by a bicistronic lentiviral vector / 156

Sánchez Ramos O *et al.*

S3-P4

Scale-up for the production of E2-CSFV based vaccine candidate / 157

Santana Rodríguez E *et al.*

S3-P5

In vitro and *in vivo* cryosurvival of vitrified 4-cell embryos derived from two selected transgenic mice lines / 158

Ramos Serrano B *et al.*

S3-P6

Relación entre la actividad enzimática de la aspartato-aminotransferasa y la calidad seminal de toros de razas criollas del trópico colombiano / 159

Rueda F *et al.*

S3-P7

Diagnóstico ultrasonográfico de la edad de la gestación en búfalas de río / 160
Herrera Vera P *et al.*

S3-P8

Determinación del período óptimo para la visualización del tubérculo genital e identificación del sexo del feto / 161
Pipaon E *et al.*

Simposio 4: Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y los Bioproductos / *Symposium 4: Biosafety in Genetically Modified Organisms (GMO) and Bioproducts*

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S4-1

Aplicación del Sistema de Autorizaciones de Seguridad Biológica para el trabajo con organismos genéticamente modificados / 163
Suárez Romero ME *et al.*

S4-2

Development and harmonisation of GMO detection procedures-An overview of EU activities / 164
Querci M

S4-3

Experiencia cubana en el desarrollo de la bioseguridad. Sistema nacional / 165
Menéndez de San Pedro López L *et al.*

S4-4

Establecimiento de un sistema de código de barras para la protección y registro de bioproductos / 166
Rodríguez Clavijo SY *et al.*

S4-5

Overview of Biotechnology and Biosafety in the Islamic Republic of Iran / 167
Salehi Jouzani G *et al.*

S4-6

Virus-resistant transgenic plants: benefits, risks and biosafety / 168
Thompson J *et al.*

S4-7

Detección, legislación y percepción pública de los OMG en Europa: Participación de un laboratorio español en el Proyecto Europeo COEXTRA / 169
Esteve Nuez T y Pla de Solà-Morales M

S4-8

GM Crop Regulations in the European Union: Unsustainable risk management / 170
Morris S and Spillane C

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts***S4-P1**

Establecimiento de la gestión de bioseguridad de un maíz transgénico con resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas teniendo en cuenta la legislación nacional vigente en Cuba / 172
Sosa Espinosa AE *et al.*

S4-P2

Evaluación toxicológica de tres biofertilizantes empleando la lombriz de tierra como especie bioindicadora / 173
Domínguez Y *et al.*

S4-P3

La ecotoxicología y su contribución en la Bioseguridad de Bioproductos y Organismos Genéticamente Modificados (OGM), en Cuba / 174
Beiro O *et al.*

S4-P4

Collaborative trial validation study of a Mon810 maize-specific quantitative Real Time PCR / 175
Marchesi U *et al.*

S4-P5

Sistema de inspección de seguridad biológica. Experiencia cubana / 176
López Fumero LG *et al.*

S4-P6

Risk management and implementation of biosafety measures in the area of aquatic organisms from the Agriculture Research Direction of Center for Genetic Engineering and Biotechnology / 177
Pérez Reytor DC *et al.*

S4-P7

A practical approach to screen for the presence of LLrice events in rice grains / 178

Morán-Bertot I *et al.*

S4-P8

Biosafety management in the investigation-development stages of assays of recombinants proteins expression in the goat milk and design of the facility requirements for the production stage / 179

Sosa Espinosa AE *et al.*

S4-P9

Formato documental de bioseguridad para la solicitud, desarrollo e informaci3n para ensayos de liberaci3n al ambiente de ma3z-Bt transg3nico / 180

T3llez-Rodr3guez P *et al.*

**Simposio 5: Interacci3n Molecular Planta - Pat3geno/
*Symposium 5: Molecular Plant - Pathogens Interaction***

Res3menes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S5-1

New approaches to understanding and manipulating pathogen virulence and host resistance / 182

Jones J

S5-2

Botrytis cinerea and *Arabidopsis thaliana*: is the plant helping the fungus? / 182

Metraux J

S5-3

Manipulation of plant host defences by a eukaryotic pathogen / 183

Birch P

S5-4

Genome resequencing and association genetics reveals novel *Magnaporthe oryzae* avirulence genes / 183

Terauchi R

S5-5

Interactions of plants with entire microbial communities: an environmental transcriptomics approach / 184

Schenk P

S5-6

Identification of bacterial genes induced during the *Xanthomonas*-tomato interaction by RIVET / 185

Burdman S *et al.*

S5-7

Impact of glucosinolates and their breakdown products on phytopathogenic fungi / 186

Yafe H and Levy M

S5-8

Antimicrobial phenolics involved in the defense response of the monocot plant calla lily against *Pectobacterium carotovorum* / 187

Yedidia I *et al.*

S5-9

Functional evaluation of plant defence signalling against *Fusarium* ear blight disease in *Arabidopsis* floral tissue / 188

Hammond-Kosack K

S5-10

From viral induced gene silencing to mRNA turnover pathways: viral RNA-mediated defence meets the RNA quality control machinery / 188

Lacomme C

S5-11

New insight related with tobacco disease resistance / 189

Borrás-Hidalgo O

S5-12

Resistance to *Fusarium* and fusaric acid in tomato mediated by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with the induction of antioxidants / 190

Harrach BD *et al.*

S5-13

Modificación de la reacción de hipersensibilidad al virus PVX en *Solanum tuberosum* L. cv. King Edward para conferir resistencia a *Phytophthora infestans* / 191
Rivera C *et al.*

Resúmenes de Carteles / Poster Abstracts

S5-P1

Identification of components involved in PM3-mediated powdery mildew resistance / 193
Jordan T *et al.*

S5-P2

Expression of defence responses genes in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) treated with two natural oligosaccharines / 194
González L

S5-P3

Response of transgenic *A. Thaliana* plants with modified levels of faldh to the interactions with bacterial pathogens and oomycetes / 195
Díaz Solares M *et al.*

S5-P4

Is a phytoplasma or simple plant disorder responsible for fig wilt disease on indian fig (*Opuntia ficus-indica* Mill) in Mexico central region? / 196
Noa Carrazana JC *et al.*

S5-P5

Descriptores morfológicos y moleculares de variedades comerciales de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) / 197
Machuca Sánchez ML *et al.*

S5-P6

Genetic polymorphism from six isolates of *Peronospora hyosciami* f. sp *tabacina*, causal agent of blue mold tobacco disease / 198
Silva Larrañaga YK *et al.*

S5-P7

Efficient Gene Replacement and Direct Hyphal Transformation in *Sclerotinia sclerotiorum* / 199
Levy M *et al.*

S5-P8

Análisis de la diversidad y evaluación de la resistencia al moho azul (*Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina*) en 17 híbridos interespecíficos (*Nicotiana tabacum* x *Nicotiana megalosiphon*) x *N. megalosiphon* / 200
Pérez Lara E *et al.*

S5-P9

U1 snRNP identificación en frijol negro Zacatecas y su importancia en dormancia y germinación / 201
Cortés Hermosillo JJA *et al.*

S5-P10

Empleo de marcadores ISSR para la caracterización genética de somaclones de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184 obtenidos en condiciones de estrés salino / 202
Fuentes Alfonso L *et al.*

S5-P11

Obtención de polimorfismos en chiles Puya y Ancho por AFLP's / 203
Cabral Arellano FJ *et al.*

S5-P12

Análisis del estrés oxidativo en aguacate criollo (*Persea americana* Mill Var *drymifolia*) en respuesta a la infección por *Phytophthora cinnamomi* Rands / 204
García-Pineda E *et al.*

S5-P13

Introduction to the characterization of RNA-dependent RNA polymerase 6 gene from the solanaceous *Nicotiana tabacum* and *Solanum lycopersicum* / 205
Ramos González PL *et al.*

S5-P14

Differential pattern of phytotoxic compounds and microbial proteins in culture filtrate of *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Cubense* RACE 1 and RACE 2 / 206
Portal González N *et al.*

S5-P15

Amplificación por círculo rodante (ACR): Una alternativa para el estudio de la diversidad de begomovirus en Cuba / 207
Fiallo-Olivé E *et al.*

S5-P16

Transcriptomic analysis of the putative role of brassinosteroids
in plant defence / 208
Coll Y *et al.*

S5-P17

Estudio de diversidad de la mosca barrenadora del tallo en haba
(*Melanagromyza ssp.*) / 209
Claire T *et al.*

S5-P18

Diagnóstico de virus y mollicutes del maíz en Bolivia / 210
Céspedes M y Avila Alba T

S5-P19

Identificación de secuencias de defensinas en *Lycopersicon esculentum* / 211
Rojas Arias AC y Zamora H

S5-P20

Diagnóstico de virosis de haba en Bolivia / 212
Céspedes M y Ávila Alba T

S5-P21

Secuencia interna de un gen que codifica para proteasa cisteínica de
Jacaratia mexicana a partir de cDNA / 213
María del Carmen OS y Paola BZ

S5-P22

Uso de marcadores RAPDs en el estudio del efecto de biorreguladores
cubanos en mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) / 214
Hernández RM *et al.*

S5-P23

Chromosome walking from a SCAR marker linked to blue mold resistance
in tobacco / 215
Canales E *et al.*

S5-P24

A novel antimicrobial protein isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers
high resistance to plant pathogens / 216
Portieles R *et al.*

S5-P25

Differences in glutathione-S-transferase gene in new rice genotypes highlighted by abiotic stress tolerance / 217

Rodríguez M *et al.*

S5-P26

Glutathione S transferase gene is required for defense of tobacco black shank / 218

Hernández I *et al.*

**Simposio 6: Probióticos y Prebióticos: Ingredientes Activos
de Alimentos Funcionales/
*Symposium 6: Probiotics and Prebiotics: Active Ingredients
of Functional Foods***

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S6-1

Fructans biology and plant fructosyltransferase functionality / 220

Smeekens S *et al.*

S6-2

A yeast-based biocatalyzer for 1-kestose production from sucrose / 221

Hernández L *et al.*

S6-3

Aprovechamiento de residuos cítricos en la elaboración de alimentos funcionales / 222

Jiménez-Vera R *et al.*

S6-4

Agave fructans: the new prebiotics in the market / 223

López MG

S6-5

Sugar signals and the reprogramming of metabolism in plants / 224

Smeekens S *et al.*

S6-6

Probiotic formulations from microorganisms and enzymes for the improvement of animal production / 225

Brizuela MA *et al.*

S6-7

Establecimiento de microorganismos en el rumen de terneros recién nacidos / 226

Ospina CA *et al.*

S6-8

Aislamiento y caracterización molecular de bacterias ácido-lácticas del queso Paipa / 227

Hernández Fernández JA y Neira Bermúdez E

S6-9

Selection and design of probiotic foods to improve human and animal health / 228

González SN

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S6-P1

Aplicación de tecnología enzimática en la obtención de productos bioactivos desde residuos agroindustriales / 230

Zuniga Hansen ME *et al.*

S6-P2

Evaluación de la actividad probiótica de los biopreparados en pollos / 231

Rondón Castillo AJ *et al.*

S6-P3

FOS production from sucrose-containing raw substrates by recombinant 1SST-expressing yeast / 232

Martínez García D *et al.*

S6-P4

Cloning, heterologous expression, and characterization of a new dextran-sucrase encoding gene from *Leuconostoc citreum* strain B-110-1-2 / 233

Fraga R *et al.*

S6-P5

Producción y estabilidad del Beta 1,3 glucano (Glutave), polisacárido con propiedades prebióticas en aves / 234

Soler Roger DM *et al.*

S6-P6

Almidón resistente II y III de malanga como sustrato para bacterias probióticas, patógenas y fecales / 235

Jiménez-Vera R *et al.*

S6-P7

Potencial antibacteriano asociado a BAL de productos lácteos fermentados y embutidos cárnicos frescos, de elaboración artesanal en la zona sur de Chile / 236

Cerda LF *et al.*

S6-P8

Aislamiento de *Lactobacillus* spp. de vagina de mujeres sanas en Cuba con fines probiótico / 237

Molina Guerra A *et al.*

S6-P9

Upgrading traditional fermented *Parkia Biglobosa* (JACQ.) benth seeds through mechanization process and the use of starter culture / 238

Lat Souk T *et al.*

S6-P10

Avances en el desarrollo de levaduras con potencial probiótico para rumiantes – estrategia Latinoamericana: Cuba-Colombia-México / 239

Marrero Y *et al.*

S6-P11

A pH shift-based procedure to easily detect FOS-fermenting bacterial and yeast strains as potential probiotics / 240

Trujillo LE *et al.*

S6-P12

Evaluación de la actividad probiótica de tres cultivos de *Bacillus subtilis* en algunos indicadores inmunológicos y microbiológicos en pollos / 241

Milián Florido G *et al.*

S6-P13

Propiedades prebióticas de almidón resistente de plátano y fibra dietética de naranja / 242

Jiménez-Vera R *et al.*

S6-P14

Producción de biomasa probiótica en sustratos agroindustriales / 243

Jiménez-Vera R *et al.*

S6-P15

Crecimiento de *Lactobacillus casei* shirota y *Lactobacillus johnsonii* en harina de semillas de noni / 244

Magaña Contreras A *et al.*

S6-P16

Use of immobilized cells in repeated fermentation cycles for an efficient biotechnological production of an alternative sweetener - Xylitol / 245

Sarrouh B and Silvério da Silva S

S6-P17

Evaluation of the therapeutic action of a vaginal ovule that contains a probiotic strain of *Lactobacillus* spp. Compared with metronidazol therapy / 246

Castro E *et al.*

S6-P18

Efecto de la administración de un inóculo microbiano sobre la incidencia de diarreas y ganancia de peso en terneros Holstein / 247

Cabra SM *et al.*

S6-P19

Microorganismos productores de biofilm aislados de industrias alimentarias / 248

Dávila Costa MDL *et al.*

S6-P20

Microorganismos productores de exopolisacáridos en la industria azucarera / 249

Anduni GJ *et al.*

S6-P21

Estudio de la morfología y microflora intestinal durante la administración de cepas probióticas a cerdos en fase de cría / 250

Ross GR *et al.*

S6-P22

Efecto inhibitorio *in vivo* de bacterias lácticas probióticas aisladas de cerdos frente a *Salmonella tiphymurium* / 251

Ross GR *et al.*

S6-P23

Influencia de la combinación de dos fuente de levadura (levadura viva y levadura enriquecida con minerales orgánicos) sobre el comportamiento productivo de vaquillas de engorda alimentadas con dietas altas en energía / 252

Plascencia A *et al.*

S6-P24

Influencia de la administración de leches fermentadas con bacterias lácticas sobre la secreción de leptina sérica y su relación con la protección contra infecciones entéricas en ratones sometidos a restricción calórica / 253

Gauffin Cano P *et al.*

S6-P25

An optimized procedure for genetic sugarcane transformation via microprojectile bombardment / 254

Banguela A *et al.*

S6-P26

High levan accumulation in transgenic tobacco expressing the Gluconacetobacter diazotrophicus levansucrase gene (*lsdA*) / 255

Banguela A *et al.*

S6-P27

Aislamiento y caracterización de levaduras nativas productoras de mezcal / 256

Esparza Ibarra EL *et al.*

S6-P28

Selection of probiotic bacteria: their immunostimulatory and growth effects in *Litopenaeus vannamei* / 257

Arenal A *et al.*

S6-P29

Efecto de la dieta probiótica en la flora intestinal de caprinos / 258

Apás AL *et al.*

S6-P30

Fluorescence study of galactose specific lectin-like receptors involved in the flocculation of wine yeast / 259

Sosa OA and Farías ME

S6-P31

Partial characterization of the inhibitory compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* / 260

Mendoza LM and Farías ME.

S6-P32

Síntesis de galacto-oligosacáridos (GOS) con α -galactosidasa inmovilizada en soportes amino-epoxilados / 261

Huerta Sánchez LM *et al.*

S6-P33

Obtención de proteína a partir de cultivos mixtos con subproducto de plátano / 262

García Sánchez LK y Mejía Enciso BE

S6-P34

Calcium alginate immobilization of 1SST-expressing *Pichia pastoris* cells and scaled-up 1-kestose production from sucrose / 263

Pérez Cruz ER *et al.*

S6-P35

Efecto de la administración de *Lactobacillus fermentum* etc1 sobre actividad feruloil esterasa intestinal en ratones / 264

Abeijon Mukdsi MC *et al.*

**Simposio 7: Control Fitosanitario con Herramientas Biotecnológicas/
Symposium 7: Control of Crop Pests with Biotechnology Tools**

Resúmenes de Conferencias / Lecture Abstracts

S7-1

Resistance management of transgenic insect resistant crops: ecological factors / 266

Wright DJ and Raymond B

S7-2

Learning from insect – Bt interaction using functional genomic tools – Basic insights for the rational design of «SMART» insecticides / 267

Ayra-Pardo C

S7-3

Moth, beetle and mosquito toxins of *Bacillus thuringiensis* and their cognate receptors / 268

Ibrahim M *et al.*

S7-4

Improved recombinant bacterial larvicides / 269

Federici BA

S7-5

Insecticidal toxins from *Photorhabdus*: comparative genomics and Rapid Virulence Annotation (RVA) / 270

Ffrench-Constant R *et al.*

S7-6

Novel Cry toxins and α -amylase inhibitor mutant genes and their potential for insect control / 271

Grossi-de-Sa MF

S7-7

Desarrollo de insecticidas bacterianos para la protección agrícola y el control de vectores / 272

Benintende G *et al.*

S7-8

Actividad biológica de proteínas Cry recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de primer instar de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) / 273

López Pazos SA y Ceron Salamanca JA

S7-9

A novel *Bacillus thuringiensis* strain pathogenic to *Helicoverpa armigera* / 274

Thakur K

S7-10

Colecta, identificación y multiplicación de virus entomopatógenos en el género *Spodoptera* presentes en el cultivo del maíz / 275
Vargas Leandro JA *et al.*

S7-11

Identificación de polimorfismos en los genes *cry1aa*, *1ab*, *1ac* y *cry1b* en aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* por LSSP-PCR / 276
López Pazos A *et al.*

S7-12

Detection of putative novel *cry* genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* isolates / 277
Salehi Jouzani G *et al.*

S7-13

Improving the efficiency of plant pesticidal proteins in a multitrophic context - The model case of plant cystatins / 278
Dominique Michaud *et al.*

S7-14

Anhydrobiotic cells of the biocontrol agent *Tsukamurella paurometabola* C-924: Stability of formulated powders / 279
Hernández A

S7-15

Uso del bionemático HeberNem en cultivos vegetales y banano / 280
Mena J *et al.*

S7-16

RNA interference as a tool for tomato crop protection against TYLCV / 281
Fuentes A *et al.*

S7-17

Changes in Chemical Toxicity due to GMHT Canola / 282
Smyth S *et al.*

S7-18

Over-expression of ketocarotenoids in tagetes flowers to produce astaxanthin / 283
Bridg H *et al.*

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts***S7-P1**

Antagonistic activity against *Pyricularia grisea* and phytostimulation in rice crop of native *Pseudomonas putida* strains identified by polyphasic taxonomy / 285
Acebo-Guerrero Y *et al.*

S7-P2

Estudio del crecimiento y la viabilidad de la cepa C924 con el empleo del fortificante para plantas «Aminoplus» / 286
Wong Padilla I y Mena Campos J

S7-P3

Detección de *Tsukamurella paurometabolum* cepa C-924 por PCR / 287
Wong Padilla I *et al.*

S7-P4

Expression of sugarcane ethylene Responsive factor SodERF3 in transgenic rice results in increased salt tolerance *in vitro* / 288
Armas R *et al.*

S7-P5

Effective β -lactam antibiotics for *Agrobacterium tumefaciens* suppression in *indica* rice calli / 289
Pérez M *et al.*

S7-P6

Formulaciones del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, organismo controlador de plagas agrícolas / 290
Urtubia Henríquez I *et al.*

S7-P7

Orobanche related patent overview in tobacco:
new product development 291
Hernández Y *et al.*

S7-P8

Genetic transformation of guava (*Psidium guajava* L.) through *Agrobacterium tumefaciens* / 292
Peralta N *et al.*

S7-P9

Microesferas de quitosana para la liberación sostenida de agroquímicos / 293
Pérez J *et al.*

S7-P10

Functional analysis of a novel trypsin gene from *Spodoptera frugiperda* using RNAi silencing / 294
Rodríguez-Cabrera L *et al.*

S7-P11

A new approach to identify *Bacillus thuringiensis* virulence genes involved in the septicemic death of insects during pathogenesis / 295
Rodríguez-Cabrera L *et al.*

S7-P12

Manejo de callas (*Zantedeschia sp*) en sistemas de inmersión temporal (sit) / 296
Sánchez Velasco J *et al.*

S7-P13

Aislamiento y evaluación de la biodiversidad de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de manejo integrado de la Polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidóptera: Gelechiidae) en Colombia / 297
Ramírez L *et al.*

S7-P14

Establecimiento de una cría de *Hypsipyla grandella* Z. (Lepidoptera: Pyralidae) y actividad insecticida de cuatro toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* / 298
Morán-Díaz L *et al.*

S7-P15

Evaluation of *Bacillus thuringiensis* strains and their mutants / 299
Thakur K and Thakur K

S7-P16

Field trials and molecular evidences confirm the insecticide activity of Cry3A toxin expressed in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) plants against *Cylas formicarius elegantulus* / 300
Morán R *et al.*

S7-P17

Expresión de proteasas extracelulares en el cultivo de alta densidad del microorganismo con actividad bionematicida, *Tsukamurella paurometabola* C924 / 301

González N *et al.*

S7-P18

Ensayos preliminares para la transformación genética de *Musa* (AAB) con *Agrobacterium tumefaciens* / 302

Sánchez N *et al.*

S7-P19

Caracterización fenotípica de rizobacterias asociadas a los cultivos / 303

Fernández Santisteban MT *et al.*

S7-P20

Fermentación aerobia de la paja de cebada en la producción de *Pleurotus ostreatus* para mejorar el proceso de producción de empresas productoras de setas de la región / 304

González Cortés N *et al.*

S7-P21

Control fitosanitario con extractos crudos de *Magnolia dealbata* y *Magnolia schiedeana*: opciones para el aprovechamiento biotecnológico de dos especies endémicas de México / 305

Ramírez Reyes TI *et al.*

S7-P22

Transient overexpression of *gus* reporter gene in transgenic plants expressing the *p19* TBSV suppressor gene / 306

Callard D *et al.*

S7-P23

Caracterización y selección de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* nativos de Argentina con potencialidad elevada para el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas destinadas para el control de *Aedes aegypti* / 307

Monella R *et al.*

S7-P24

Transferencia y consumo de oxígeno en el cultivo de alta densidad del micro-organismo con actividad bionematicida *Tsukamurella paurometabola* C924 / 308

González Fernández N *et al.*

S7-P25

Chromatographic characterization of *Burkholderia cepacia* cell-free culture medium that improves seed germination rate and seedling growth in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*) / 309
Hernández-Rodríguez A *et al.*

S7-P26

Caracterización y evaluación de la actividad biológica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* / 310
Baró Robaina Y *et al.*

S7-P27

First report of *Tomato Chlorosis Virus* infecting tomato in single and mixed infections with *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* in Cuba / 311
Martínez-Zubiaur Y *et al.*

S7-P28

Binucleate *Rhizoctonia* native isolates against root rot causing pathogens in *Capsicum annuum* / 312
Del Real-Monroy M *et al.*

S7-P29

Antagonismo *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra hongos causantes de la pudrición de la raíz del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Durango, México / 313
Reséndiz-Arvizu VH *et al.*

S7-P30

Efecto de la densidad celular en la multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas de Musa (AAB) cv. Plátano «Hartón» / 314
Porrás Mejía DJ *et al.*

S7-P31

Proteomic analysis of transgenics pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] plants / 315
Yabor Cabrera L *et al.*

S7-P32

Caracterización de aislamientos argentinos de *Bacillus thuringiensis* y su empleo potencial en el desarrollo de herramientas biotecnológicas para el control de lepidópteros plaga / 316
Sauka D *et al.*

S7-P33

Changes of protein expression, aminoacids and sugars levels in *Arabidopsis* leaves induced by ammonium nitrate and elevated CO₂ / 317
Capdesuñer Y *et al.*

S7-P34

Single-chain variable fragment (scFv) antibodies from phage-display libraries to manage mycotoxin contaminations / 318
Franconi R *et al.*

S7-P35

Biodiversidad de genes *cry* insecticidas en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas del ecosistema de manglar / 319
Echeverri Franco AM *et al.*

S7-P36

Biolistic-mediated system to obtain fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants / 320
Aragão FJL

**Simposio 8: Producción de Farmacéuticos en Plantas /
Symposium 8: Plant Made Pharmaceuticals**

Resúmenes de Conferencias / Lecture Abstracts

S8-1

On the analytics of plant glycoprotein N-glycosylation that support plant engineering for the expression of glycotherapeutics with mammalian-like glycosylation / 322
Cremata JA *et al.*

S8-2

Glycoengineering of pharmaceutical proteins using targeted expression in the plant secretory pathway / 323
Faye L *et al.*

S8-3

Possible future bedside application of new plant-derived therapeutic vaccines against HPV-associated cancers / 324
Franconi R *et al.*

S8-4

Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants / 325

J. Conley A *et al.*

S8-5

Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication / 326

Sainsbury F *et al.*

S8-6

Trafficking, degradation and purification of recombinant IL-10 protein in plants / 327

Menassa R *et al.*

S8-7

Expression of pharmaceutical protein genes in transgenic plants / 328

Aragao F

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S8-P1

Novel method for the identification of N-terminal end for plant-derived proteins / 330

Sánchez A *et al.*

S8-P2

Expression of Phospholipase A2 from *Agkistrodon halys blomhoffi* in *Nicotiana bentamiana* plants / 331

Karbovskiy L

S8-P3

Taking advantage of Rubisco large subunit gene regulation signals for heterologous genes expression in tobacco plastid / 332

Cabrera Y *et al.*

S8-P4

Caracterización físico-química y actividad antimicrobiana del extracto acuoso del tallo *Spondias mombin* L. (jobo) / 333

Pérez Portero Y *et al.*

S8-P5

Anthraquinones from *in vitro* root culture of *Morinda royoc* L / 334
Borroto J *et al.*

S8-P6

Stable expression of pharmaceutical antibodies in progenies of transgenic plants / 335
Soto Córdova J *et al.*

S8-P7

Transgenic plants produce biological active aglycosylated antibody against the Human Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) / 336
Rodríguez M *et al.*

S8-P8

Prolonged stability of the plantibody HB-01 directed against the hepatitis B surface antigen in cryoconserved tobacco leaves / 337
Ferro W *et al.*

S8-P9

Development of *Nicotiana tabacum* lines for non-smoking use / 338
García H *et al.*

S8-P10

Functional study of cell wall proteins: production of the At1g28290 protein in plant cell and in bacteria / 339
Cisneros LDR *et al.*

S8-P11

Depth filtration for recovery of an IgG monoclonal antibody from transgenic tobacco plant / 340
Limonta Fernández M *et al.*

S8-P12

rProtein A sepharose fast flow stability in PHB-01 purification from tobacco extracts / 341
Geda D *et al.*

S8-P13

Purification methods of recombinant protein expressed in plants: as easy as it seems to be? / 342
Geda D *et al.*

S8-P14

In vitro regeneration of Cuban soybean variety INCASOY-36 / 343
Soto N *et al.*

S8-P15

Plantibody HB-01 extraction step optimization using different biomass-buffer proportion and pH / 344
Geda López D *et al.*

S8-P16

Approach on the expression of the recombinant antibody against the Hepatitis B surface antigen in tobacco plastid / 345
Barceló MT *et al.*

S8-P17

Expression in seeds of a monoclonal antibody against the Hepatitis B surface antigen (anti-HBsAg) / 346
Rodríguez M *et al.*

**Simpósio 9: Oportunidades de Negocios en la Agro-biotecnología /
Symposium 9: Ag-biotechnology. Business Opportunities**

Resúmenes de Conferencias / Lecture Abstracts

S9-1

To have or not to have intellectual property, that is the question (*for better negotiation of biotechnology projects*). The Hamlet dilemma applied to project negotiation at the CIGB / 348
Raíces M *et al.*

S9-2

Algae, Micro and Macro: from Food to Fuel» / 349
Benemann J

S9-3

Animal Health Industry and Biotechnology opportunities / 350
Bufala G

S9-4

Oportunidades de negocio en la Agro-Biotecnología. Un caso particular: ACUABIO 1 y la acuicultura en España / 351
Navarro Echevarría T

**Simpósio 10: Microorganismos para Biofertilización/
*Symposium 10: Microorganisms as Biofertilizers***

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S10-1

Microorganisms can contribute to N and P nutrition necessary for agricultural food production. A transdisciplinary view / 353
Ortega E *et al.*

S10-2

Phase variation in wild type and mutant strains of *Azospirillum brasilense* / 354
Lerner A *et al.*

S10-3

Avances en el manejo efectivo de la simbiosis micorrízica en agrosistemas tropicales / 355
Rivera R *et al.*

S10-4

RIZOFOS, inoculante bacteriano para los cultivos de Trigo y Maíz / 356
Bach T

S10-5

The state of the art and perspectives of biofertilization in gramineous crops / 357
Caballero-Mellado J *et al.*

S10-6

Promotion of plant seed germination and seedling growth by Reclafil™, a microbial biofertilizer / 358
Ibrahim M and Bulla LA

S10-7

Fructan metabolism in the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* / 359
Menéndez C *et al.*

S10-8

RIZOBACTER ARGENTINA S.A. Empresa líder en el mundo de la biotecnología agrícola / 360
Yapur R

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S10-P1

Fructose-inducible transcription and signal-peptide-dependent secretion of exolevanase (LsdB) in *Gluconacetobacter diazotrophicus* / 362
Menéndez C *et al.*

S10-P2

Interaction between the nematocidal bacterium *Tsukamurella paurometabola* C924 and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus fasciculatum* and *Glomus clarum* in lettuce (*Lactuca sativa* L.) rhizosphere / 363
Marin M *et al.*

S10-P3

Isolation and Identification of native arbuscular mycorrhizal fungi in polluted soils by heavy metals / 364
Zarei M *et al.*

S10-P4

Caracterización y selección de cepas de *Bacillus* para la promoción del crecimiento en el cultivo del arroz / 365
Rojas MM *et al.*

S10-P5

La biofertilización de cereales: una alternativa económica y ambiental para la agricultura de Cuba / 366
Bécquer CJ *et al.*

S10-P6

Promoción de crecimiento en maíz por aislados de bacterias metolitróficas / 367
Martínez Montiel N *et al.*

S10-P7

Influencia de algunos factores edáficos sobre la eficiencia de inoculantes en soya / 368
Nápoles García MC *et al.*

S10-P8

Phenotype characterization of *Azospirillum brasilense* SP7 ABC transporter (WZM) mutant / 369

Lerner A *et al.*

S10-P9

Caracterización molecular de la comunidad de hongos formadores de ectomicorrizas para el establecimiento de inóculos en plantaciones de *Abies religiosa* / 370

Ramos-Fernández A *et al.*

SIMPOSIO 1 / *SYMPOSIUM 1*

Biología Acuática/ *Aquatic Biotechnology*

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S1-1**Improved body mass growth in teleost fish by blockade of myostatin signaling pathways**

Carpio Y, Acosta J, Morales R, González O, Borroto I, Borrell A, Santisteban Y, Sánchez A, Estrada MP

CIGB, Habana, Cuba

AC: *Carpio Y (yamila.carpio@cigb.edu.cu)*

Myostatin is a member of the transforming growth factor β family that functions as a negative regulator of skeletal muscle development and growth in mammals. Recent findings demonstrate that myostatin plays an inhibitory role in muscle growth also in fish. In our laboratory, we have investigated the ability of dsRNA to inhibit myostatin function in the zebrafish. We obtained an increased body mass in myostatin dsRNA treated fish. Additionally, we have examined whether a similar double-muscled Piedmontese cattle mutation found in the myostatin gene affects muscle development in fish. To achieve this aim, a recombinant mutant variant was administered to hybrid red tilapia *Oreochromis* sp. fry. The fish weight increase obtained with mutant myostatin suggests that the myostatin containing the missense mutation exhibits a dominant negative activity in body mass growth of tilapia fry.

Previous studies in mammals have demonstrated that myostatin is capable of binding the two activin type II receptors (ActRII). The knowledge on the role of activin receptors in fish is limited. We examined the growth effect of administering a recombinant, soluble form of goldfish ActRIIB to juvenile and larval goldfish (*Carassius auratus*), African catfish (*Clarias gariepinus*) larvae and tilapia (*Oreochromis aureus*) larvae. We have demonstrated for the first time that this recombinant molecule stimulates growth in teleost fish in a dose-dependent manner providing evidences that this body weight increase is achieved by an increase in muscle mass and protein content. Histological analysis of the goldfish muscle revealed that treated fish exhibited hyperplasia as compared to controls.

All these findings together contribute to the understanding of the mechanisms that regulate growth in non-mammalian vertebrates and suggest powerful biotechnology approaches to improving fish growth.

S1-2**A novel recombinant pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) from teleost fish: from its discovery to their functions**

Lugo González JM, Carpio Y, Rodriguez A, Morales R, Morales A, Acosta J, Herrera F, Besada V, Sánchez A, Estrada MP

CIGB, Havana, Cuba;

AC: Lugo Gonzalez J (joana.lugo@cigb.edu.cu)

Nowadays, the studies of PACAP-related peptide (PRP) and PACAP in non-mammalian vertebrates, especially in fish, have paid attention mainly on the localization, cloning and structural evolution of the peptides, but very little is known about its biological functions as growth promoting factors in lower vertebrates. In this work, we reported for the first time the recombinant expression of PRP and PACAP from the commercially important North African catfish *Clarias gariepinus* in mammalian cells and bacteria and we have also demonstrated that the growth rate of fish is enhanced by both PRP and PACAP recombinant peptides. The results obtained *in vivo* in three different fish species, catfish (*Clarias gariepinus*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and carp (*Cyprinus carpio*) support that PACAP rather than PRP plays primordial role in the growth control in teleost fish. Additionally, we have demonstrated, that administration of recombinant *C. gariepinus* PACAP not only promotes growth but also increases lysozyme, nitric oxide synthase derived metabolites, lectins and antioxidant defenses in treated fry. In general, in the present study we provide some important insights with respect to the involvement of PACAP in the complexities of the interaction between endocrine and immune system in lower vertebrates, pointing out a possible role of this peptide as an important immunomodulator in fish. Taking into account our results we propose two ways of action of PACAP in the teleost fish immune system: by a paracrine via mediated by GH and by direct autocrine mechanism on immune cells.

S1-3**Marine biotechnology in Canada, 2008**

van der Meer J

Pan-American Marine Biotechnology Association, 145 Brook Street, Halifax, NS, Canada, B3N 2A7

AC: John P. van der Meer (john.vandermeer@gmail.com)

Canada is an active, world-class player in Marine Biotechnology. Basic research is undertaken at several universities and institutions, but with concerted marine biotechnology activity in only a few centers. These include both university and government-operated facilities. They are mostly dedicated to improving fisheries and aquaculture or deriving commercial products from marine sources. The leader among these is the NRC Institute for Marine Biosciences, which is well known for its work in genomics and marine toxins, including a Certified Reference Materials Program that provides marine toxin standards worldwide. There are approximately a dozen companies in the marine products area, two of which, Ocean Nutrition Canada and Acadian Seaplants Ltd., have reached substantial size.

Since 2000, a non-profit organization, Genome Canada, funded by the Canadian federal government, has provided the national framework for much of the biotechnology research in Canada. It fosters the development of large-scale, internationally peer-reviewed proposals and provides 50% of the funding required for approved projects. Genome Canada has supported several fish-related genomics projects, including: a \$5 M collaborative project with Genome Spain directed at enhancing commercial culture of Atlantic halibut and Senegal sole; an \$18 M project for Atlantic cod genomics and broodstock development and \$25 M for genomics projects on Atlantic salmon and other salmonids. Just approved is a \$9.2 M initiative with Chile and Norway to completely sequence the Atlantic salmon genome.

S1-4**Acuabio 1 enhances the larvae quality
in tilapia (*Oreochromis sp*)
and catfish (*Ictalurus punctatus*)**

*Martínez R¹, Herrera F¹, Vinjoy M², Carpio Y¹, Millares N², Damas T²,
Gonzalez I², Céspedes C², Navarro M⁴, Roche A⁴, Martínez Y¹, Morales R¹,
González V³, Estrada MP¹*

¹ División de Biotecnología Animal, CIGB, Cuba

² CEPAM, Mamposton. MIP, Cuba

³ Centro de Productos Naturales. CNIC. MES, Cuba

⁴ Pescavilla, Villa Clara, MIP, Cuba

AC: *Martínez R* (rebeca.martinez@cigb.edu.cu)

Acuabio 1 is a mixture of proteins and essential amino acids that exerts an important nutritional effect on early developmental stages of aquatic organisms. as well as in juvenile stage, A controlled challenge assay using *Aeromonas hydrophila* as pathogen was carry out , obtaining a higher survival percent in treated fishes. Moreover, the stimulating activity of Acuabio 1 was demonstrated by obtaining bagre and tilapia larvae with higher weight and size than controls at field trial. Their antioxidants defences, catalase and superoxide dismutase enzymes, and innate humoral immune response were also improved as well as the fatty acids profile exhibits and increase in polyunsaturated fatty acids. In correspondence with this results, the presence oh pathogens was also diminished in treated larvae to compare with control fish. All these properties make Acuabio 1 very attractive to improve the quality of aquatic organism larvae.

S1-5**Avances sobre el cultivo de tilapia roja en agua salada**

Castillo Campo LF

Aquatic Depot S.A. de C.V., Jalisco, México

AC: *Castillo Campo L (Lfcas_2000@yahoo.com)*

En Latinoamérica desde 1993 cuando se inició su introducción en las Camaroneras Ecuatorianas de la Provincia del Guayas afectadas por el Síndrome de Taura (TSV) la producción de Tilapia roja (*Oreochromis sp.*) en agua salada se ha convertido en una de las opciones más importantes en el desarrollo de la acuicultura especialmente en Ecuador y actualmente en México, Honduras, Colombia entre otros, se presenta una revisión de 15 años sobre los cambios histopatológicos como son hipertrofia y/o hiperplasia que presenta el epitelio branquial como respuesta adaptativa de estos híbridos de Tilapia a las diferentes condiciones de salinidad y una evaluación productiva en las diferentes concentraciones estudiadas 0%, 15%, 25% y 35% como son crecimiento diario, sobrevivencia, densidades de siembra, conversión alimenticia y rentabilidad, determinando diferencias altamente significativas entre los cultivos a 0% salinidad y en las salinidades propuestas, adicionalmente a los mejores resultados obtenidos con el incremento de las densidades de siembra.

S1-6**Avances en el estudio de las neurohormonas de la familia peptídica CHH/MIH/GIH del camarón blanco *Litopenaeus vannamei***

Ponce-Rivas E, Lago-Lestón A

Departamento de Biotecnología Marina, Ensenada B. C., México

AC: Ponce-Rivas E (eponce@cicese.mx)

La mayoría de los procesos fisiológicos en los crustáceos están regulados por neurohormonas, principalmente de naturaleza peptídica. A la fecha se han identificado alrededor de veinte neurohormonas, aunque la función de alguna de ellas todavía no está bien definida. Entre las neurohormonas secretadas por el complejo GS-OX se encuentran la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH) encargada principalmente de la regulación de glucosa en la hemolinfa, la hormona inhibidora de la muda (MIH), que es la responsable de mantener al animal en un período de intermuda y la hormona inhibidora de las gónadas (GIH).

Este trabajo presenta el estudio de las neurohormonas hiperglucémicas de *L. vannamei*. Basándonos en un trabajo previo en donde se reporta la clonación de MIH de *L. vannamei* (Liv-MIH-like) se diseñaron oligos y se ensayó la técnica de RT-PCR en diferentes condiciones de estrés. Los resultados mostraron diferencias importantes en la expresión del gen y se identificó un segundo transcrito el cual es producido por corte y empalme alternativo del gen mih. A diferencia de otras isoformas producidas por corte y empalme alternativo en *L. vannamei* que son producidas en dos tejidos diferentes, por ejemplo: glándula del seno (SG) y órgano pericárdico (PO), los dos transcritos: MIH1 y MIH2 son producidos en la glándula del seno del camarón. Los análisis filogenéticos y de estructura mostraron que MIH1 y MIH2 tienen una mayor similitud con otros genes del grupo de las CHH's que con las MIH's. Esto junto con los ensayos de actividad biológica in vivo con una neurohormona recombinante producida en levadura, nos permitieron comprobar la actividad hiperglucémica por lo que se propone renombrarlas como Liv-CHH-SG1 y Liv-CHH-SG2.

S1-7**Polypeptidic fragment derived from tilapia somatotropin has enhanced biological activity in fish and a reduction in secretion *in vitro***

Acosta J, Carpio Y, Morales R, Águila JC, Besada V, Herrera F, Sanchez A, Estrada MP

CIGB, Habana, Cuba

AC: Acosta J (jannel.acosta@cigb.edu.cu)

Pichia pastoris cells transformed with a plasmid engineered for the expression of tilapia growth hormone (tiGH) as a secreted product produced a proteolytically cleaved form of the recombinant protein. The resulting truncated hormone was a single chain protein lacking 46 amino acids from the C-terminal portion and therefore lacks the disulfide bonds involve in the large and small loops in the GH molecule. We showed that the truncated growth hormone produced in the *P. pastoris* culture supernatant has growth promoting effects and stimulates innate immunity in tilapia larvae.

To deepen in the characterization of the truncated tiGH in the immune functions in fish we evaluated the effects of this protein on phagocytic activity and proliferation in tilapia peripheral blood leukocytes *in vitro*. The administration of truncated tiGH increased superoxide anion production and has a mitogenic effect in leukocytes. Besides, we expressed truncated and intact tiGH in *Escherichia coli* and we compared the growth promoting activity. We found that truncated tiGH has enhanced effect over growth. In order to determine the role of C-terminal portion and disulfide bonds in the stability and secretion of GH molecule in fish we evaluated the secretion capacity of the truncated tiGH compared with intact tiGH and observed a significant reduction in the secretion of truncated tiGH compared with intact molecule.

These results suggest that the C-terminal portion of growth hormone is not required for its growth-promoting activity and the innate immune functions studied herein in fish, but is important in protein stability and secretion.

S1-8**Prolactin in the innate immune system of atlantic salmon (*Salmo salar*) and its probable relation with cytotoxic cells**

Hausmann Bielefeld D¹, Slebe Concha F¹, Kausel Kamp G¹, Folch Vilches H², Figueroa Valverde J¹

¹Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile., Valdivia, Chile

²Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

AC: Hausmann Bielefeld D (denisehausmann@uach.cl)

The fish immune system is modulated by hypophyseal hormone peptides such as prolactin (PRL). In addition, natural cytotoxic cells seem to play a vital role in the innate immune system of fish. Our hypothesis indicates that PRL stimulates the innate system and cytotoxic cells in Atlantic salmon. By immunohistochemistry and RT-PCR we evaluated the expression of the cytotoxic cell marker NCCRP-1 in diverse organs of healthy fish and salmon infected with ISA virus. On the other hand, the fish innate immune system is highly developed presenting effector macro-molecules *e.g.* IgM, lysozyme and other proteases. Within the proteases, the role of glandular kallikrein (GK) in the proteolytic processing of PRL and its direct participation as defensive protease was determined. Therefore salmon of 150 g (salt water) were injected with PRL and a mixture of PRL and proteolytic isoforms. At day 9 the fish were treated with *Piscirickettsia salmonis* and after three weeks head kidney macrophages were isolated. Immune parameters were evaluated, such as superoxide anion production, lysozyme activity, IgM concentration. Our findings suggest that PRL positively modulates macrophage activity *in vivo*, and that the isoforms generated by GK attenuate the effects generated by intact PRL.

Acknowledgement: CONICYT and DID-UACH S1-2008

S1-9**Prolactin effect on innate immune system
of *Salmo salar***

Figueroa Valverde J¹, Haussmann Bielefeld D¹, Parades Honorato M¹, Romero Zuñiga A², Olavarria Contreras V¹, Slebe Concha F¹, Ojeda Ojeda N¹, Kausel Kamp G¹

¹Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias,
Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

²Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática, Facultad Ciencias
Veterinarias, Universidad Austral, Valdivia, Chile

AC: *Figueroa Valverde J (jefigueroa@uach.cl)*

In fish the innate immune system is highly developed and macro-molecules like IgM, lysozyme, and others play a fundamental defensive role. Clear evidence demonstrate the interconnection of the immune-nervous-endocrine system mediated by several hormones, mainly from the hypothalamo-neurohypophyseal axis. We postulate that prolactin (PRL) stimulates the immune system of *S. salar* confronted with bacterial pathogens. We have cloned, sequenced and characterized copeptin, a polypeptide with PRL liberating function, from salmon and carp (*Cyprinus carpio*). Copeptin immunolocalized next to lactotrops showing clear morphologic relation with cells that generate PRL. Experiments of PRL release *in vitro* have confirmed copeptin as potent PRL-liberating factor. We have cloned the prolactin receptor of salmon and evaluated its participation in defensive functions. In order to prove our hypothesis, we purified salmon PRL and confirmed its capacity to stimulate *in vitro* head kidney macrophages of 20g fish. These results clearly showed the stimulatory effect of PRL on superoxide generation and quantity and activity of macrophages. For *in vivo* tests fish (body weight 150 g) were injected with PRL. After 7 days these fish were treated with *Piscirickettsia salmonis* pathogen (lethal dose 50) and 15 days after the challenge, in surviving fish the plasmatic superoxide generation and lysozyme activity was evaluated and IgM levels were determined by RT-PCR and immunocytochemistry. The results allow to conclude that in these conditions PRL clearly stimulates the innate immune system in salmon.

Acknowledgement: FONDECYT N° 1040073 and DID-UACH S36-2008

S1-10

**The discovery and potential application
of fish cytokines**

Secombes C

University of Aberdeen, Aberdeen, United Kingdom

AC: Secombes C (*c.secomb@abdn.ac.uk*)

There has been a tremendous increase in the number of fish cytokine genes discovered over the last few years, aided by the availability of fish genomes and EST sequences. In this talk the fish cytokine network will be reviewed, highlighting the genes/loci showing a high degree of conservation, compared with novel genes or less conserved loci. The usefulness of the molecules as markers of disease resistance in fish will be reviewed in the context of developing vaccination programmes for farmed fish, with examples, as well as their potential application as vaccine adjuvants.

S1-11**The biotech bullets needed for aquaculture: the metabolic modifiers**

Estrada MP

CIGB, Havana, Cuba

AC: Estrada M (mario.pablo@cigb.edu.cu)

The significant increment in the aquaculture production and the high densities that had been imposed to the fish cultures had lead to the outbreak of opportunist pathogens. This situation provokes important mortalities and diminishes the indexes of growth and health in the productive systems. Nowadays in order to increase growth rates, larvae survival and diseases resistant, we had been developed new biomolecules which have been proved their actions synchronizing a population of animals, switching on important genes or pathways that directly improve growth performance, immune system (innate and acquired), immune response, efficiency of growth, better digestibility or better reproduction among other important parameters.

We call these biomolecules metabolic modifiers. They are «a molecule or mixture of molecules» (neuropeptides, immune stimulants, molecular adjuvants, growth stimulators, etc) that are able to switch on or off molecular mechanisms producing a desired effect on a target animal.

The use of biotech products in the aquaculture should improve the aquaculture production significantly and it should contribute to reduce the use of antibiotics and chemicals given tools in the XXI century for the sustainability of the food production in the planet.

S1-12***Haliotis rufescens* x *H. discus hannai*: biotecnología aplicada al desarrollo de un nuevo híbrido de abalón en Chile**Gallardo C

Universidad de Concepción, Concepción, Chile

AC: Gallardo C (crisgallardo@udec.cl)

La producción comercial de híbridos en *Haliotis* ha sido realizada en países como Australia, Japón y China mediante cruzamientos controlados de sus principales especies comerciales. La hibridación interespecífica es una vía para el mejoramiento genético a través de la combinación de genomas de especies cercanamente relacionadas. En Chile, la introducción de abalón rojo (*H. rufescens*) y abalón verde (*H. discus hannai*), permite plantear el desarrollo biotecnológico de un nuevo híbrido de abalón. Actualmente, la industria produce cerca del 98% de abalón rojo, mientras que la producción de abalón japonés ha sido rezagada a pesar de su mayor valor comercial, debido a sus bajas tasas de supervivencia y velocidades de crecimiento. El objetivo del presente trabajo es describir las primeras aproximaciones en la producción de híbridos entre abalón rojo y verde. Los resultados han sido dirigidos a optimizar los procedimientos de fertilización *in vitro* a partir de heterogametos así como la caracterización genética de las progenies híbridas mediante marcadores de ADN. En términos productivos, el desarrollo de híbridos de abalón ha permitido incrementar variables de cultivo como tasa de crecimiento, resistencia a enfermedades y eficiencia alimenticia. En términos comerciales, los híbridos han sido utilizados para diversificar los mercados con nuevas variedades en texturas y sabores.

S1-13**Production and evaluation of females genetically males (pseudofemales) in tilapia from the *Oreochromis aureus* species**

Abad Márquez Z, González R, Mendoza I, Ramírez Y, Pimentel E, Basulto R, Estrada MP, Arenal A, Borroto C

CIGB-Camagüey, Camagüey, Cuba

AC: Abad Márquez Z (zoila.abad@cigb.edu.cu)

Obtaining high percentages of tilapia males increases the culture efficiency. In this work, we describe a method that enables a generation of homogametic spawners for the species of *Oreochromis aureus* tilapia yielding a genetically male tilapia offspring. The sex reversing process was applied to fries by using the feminizing hormone 17 β -stradiol containers in their daily food. The phenotypical females within the groups having significant differences among the rate of males and females as compared to the control group ($p < 0.01$) were evaluated by means of the progeny test as well as by the microsatellite technique. The formation and evaluation of a stock of genetically male (pseudo female) spawners was implemented within a broodstock center. The rearing of the offspring under different culture conditions was carried out, corroborating, in all cases, more than a 90% of males. As a result of the morphologic and meristic characterization of the fattening offspring from homogametic spawners ZZ, a decrease of the head as well as the lower jaw in respected *O. aureus* species. The fillet yielding in the analyzed animals was of a 35%. The chromosomic analysis showed no changes in the chromosomic formation of the progeny. The results point to a new line of tilapia within *O. aureus*.

S1-14**Characterization of the expression of tilapia growth hormone receptors after growth hormone induction**

Rodríguez Mallon A, Morales R, Morales A, Herrera F, González O, Estrada MP

CIGB, Havana, Cuba

AC: Rodríguez Mallon A (alina.rodriguez@cigb.edu.cu)

Growth hormone (GH) plays a central role as a pluripotent endocrine regulator of physiological functions in fish and higher vertebrates. The growth hormone receptor (GHR) is essential for the actions of GH on growth and metabolism. Duplicated fish GHRs represent a new and perhaps complex step on the regulation of fish somatotrophic axis. In this study, using Real Time PCR techniques, we characterized the expression pattern of GHRs in juvenile tilapias (tiGHRs) before and after GH induction by intraperitoneal injection of a GH secretagogue and we hypothesize about the role of each kind of receptor in respond to GH.

S1-15**New technologies in the development of vaccines for aquaculture**

Thompson KD

Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling FK94LA, Scotland, UK

AC: Thompson KD (k.d.thompson@stir.ac.uk)

Fish in culture are susceptible to a wide range of diseases, and these cause substantial economic losses to the aquaculture industry worldwide, annually. Although antibiotics and chemotherapeutants are used extensively to control disease, there is increasing concern about their use (drug residues in food, development of antimicrobial drug resistance, and a detrimental effect on the aquatic environment). Increasing attention is, therefore, focusing on vaccination and immunostimulants to help prevent disease outbreaks. Over 18 vaccines are now commercially available for aquaculture, most of which are comprised of inactivated (killed) pathogen. Live attenuated vaccines (usually through gene deletion), sub-unit vaccines, and recombinant vaccines offer an alternative to these when whole cell vaccines have been found to be ineffective.

Investment in vaccine development is increasing as the aquaculture industry grows, and their development has become more sophisticated as new vaccine technologies become available. A major development is DNA vaccination, whereby genetically engineered DNA, in the form of a plasmid, is injected into the muscle of the fish, where it is expressed and elicits an immune response. The application of technologies such as proteomics and epitope mapping allow vaccine antigens to be characterised with great precision. New approaches in vaccine adjuvants, vaccine delivery systems and antigen protection vehicles (for oral vaccination) will help to deliver safe and effective vaccines for fish. These advancements have the potential to revolutionise vaccine development for aquaculture.

SIMPOSIO 1 / *SYMPOSIUM 1*

Biología Acuática/ *Aquatic Biotechnology*

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S1-P1**Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in fish: working towards new avenues for enhancing the productivity of aquaculture**

Lugo JM¹, Carpio Y¹, Rodríguez A¹, Morales R¹, Helguera Y¹, León K¹, Morales A¹, González O¹, Acosta J¹, Herrera F¹, Besada V², Sánchez A², Estrada MP¹

¹Aquatic Biotechnology Department, Center for Genetic Engineering and Biotechnology P.O.Box.6162, Ciudad de La Habana, Cuba

²Physico-Chemistry Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology P.O.Box.6162, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Maria Lugo J (joana.lugo@cigb.edu.cu)

Control and manipulation of growth in fish is one of the principal purposes of an important number of laboratories dedicated to marine biotechnology. Potential products resulting from the biotech field are required to increase the productivity in the aquaculture and to maintain a sustainable fish production. To date, many technologies have been developed to increase the productivity in the aquaculture but not to much biotech product arrive to the market. Marine Biotechnology has the responsibilities to develop products to improve the health and well being of confined fish cultures and increase production, based on broodstock free of pathogens, safe and effective growth-promoting factors, therapeutic agents, immune modulators, and alternative systems for administering them. Over the past few years, we have cloned and characterized the PRP/PACAP cDNA from the commercially important North African catfish *Clarias gariepinus*. The obtained sequence agrees with the higher conservation of PACAP than PRP peptide sequences. We have also demonstrated that the growth rate of fish is enhanced by both PRP and PACAP mature recombinant peptides. The results obtained *in vivo* in different teleost fish species support that PACAP rather than PRP plays primordial role in the growth control in teleost fish. Additionally, we have demonstrated PACAP action as a regulator of the teleostean innate immune system, together with its physiological role in growth control in fish. Our studies identify PACAP as a prominent target with the potential to further develop modern fish farming.

S1-P2**Molecular biomarkers for differential detection of contaminant bacteria in fish meal and frozen fish by PCR**

Frias JR, Garces R, Vergara L, Riffo E, Garces K, Ortiz N, Echeverria P

Universidad San Sebastian, Concepcion, Chile

AC: Frias J (jfrias@uss.cl)

Microbiological control is an important step in final quality control in the fishing industry. Traditional microbiological methods for analysis involve several days to obtain final results.

Specific primers for 2-days PCR assay were designed to detect specific genes of *Salmonella* sp. (*invA*, 2 test, 300 or 450 bp), *Listeria monocitogenes* (*hlyA*, 1 test, 550 bp) and *Staphylococcus aureus* (*enterotoxin A*, 2 test, 100 or 150 bp), using reported sequences from GeneBank. Pure bacterial cultures were grown in peptone-broth 16 hours at 37°C and chromosomal DNA was extracted. Sterile and contaminated fish meal and frozen fish samples were pre-enriched in peptone-broth at 37°C and total DNA was extracted by using DNA-purification kits or conventional methods. Pure obtained DNA was used as template in PCR reaction mixture containing specific designed primers, and assay was run using Eppendorf thermocycler. Amplified DNA products were separated by 1.5% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized on a UV-transilluminator.

First PCR analysis was carried out for pure samples of target bacteria and reaction shows specific predict amplicons for these species. PCR assay in contaminated fish products gave specific and selective positive results for each analyzed microorganism, with 100% correlation between positive or sterile controls. Another microbial species, *Pseudomona* sp. and *Klebsiella* sp., was used as control to discard undesirable or false-positive results and they did not shown amplification with designed primers.

PCR assay developed in this work could be implemented to confirm, in a fast way, presence of bacterial contaminants in fishing industry samples.

S1-P3**Acuabio 1 improve the *Litopenaeus vannamei* shrimp culture**

Arenal A, Franco R, Martín L, Sotolongo J, Santiesteban D, Pimentel E, Martínez R, Estrada MP, Borroto C

CIGB, Habana, Cuba;

AC: Arenal A (amilcar.arenal@cigb.edu.cu)

Herein the use of Acuabio 1 in shrimp farm and hatchery is described. The treatment was evaluated in three hatchery tanks in a paired design; and the growth of the shrimp was followed in a shrimp farm. Shrimp postlarvae from Acuabio 1 group were heavier (20%) than the control group. An increase in the pairs of branch gills was also observed in the groups treated with Acuabio 1. The resistance to the osmotic stress was similar in treated and non-treated larvae, meaning that larvae had the nutritional quality demanded. The animals were stock in 2.7 ha ponds at 18 shrimps per m². The yield of the group treated with Acuabio 1 was higher (9.182 m³ per 106 millions of postlarvae) than the control group (8.642 m³ per 106 millions of postlarvae). The conversion factor of the animals treated with Acuabio 1 was lower (1.88) than the control group, indicating that the product increase the assimilation of the nutrients. The results herein indicate that Acuabio 1 improve the yield of *L. vannamei* cultures.

S1-P4**Amplificación cruzada de *loci* microsatélite en abalón rojo (*Haliotis rufescens*) obtenidos mediante partidores heterólogos**

Lafarga-De la Cruz F, Aguilera-Muñoz F, Perone-Millar C, Gallardo-Escárate C

Universidad de Concepción, Concepción, Chile

AC: Gallardo-Escárate C (cristian.gallardo@udec.cl)

Actualmente la utilidad de marcadores microsatélites ha sido descrita desde estudios de variabilidad genética poblacional hasta la obtención de mapas de ligamiento para la identificación de QTLs. Estudios genéticos basados en microsatélites en abalón rojo son escasos debido al bajo número de *loci* descritos para la especie. El presente estudio tiene por objetivo evaluar la utilización de *loci* microsatélites con amplificación cruzada en abalón rojo proveniente de especies cercanamente relacionadas. Para ello se evaluaron 25 partidores descritos para las especies de *H. corrugada*, *H. fulgens*, *H. kamtschatkana* y *H. discus hannai*. Doce *loci* microsatélite mostraron amplificación en *H. rufescens*. Sin embargo, ocho de ellos fueron informativos para determinar la variabilidad genética presente en una población de cultivo. Los valores promedios de H_o y H_e fueron 0.428 y 0.782 respectivamente. El análisis de microsatélites mostró una desviación de HWE para siete *loci*. El promedio del índice FIS fue 0.472 indicando que la población se encuentra en endogamia. Los *loci* microsatélites descritos permitirán establecer nuevos criterios para la selección y manejo de reproductores a fin de disminuir los efectos de consanguinidad en poblaciones de cultivo.

S1-P5**A novel recombinant crustacean hyperglycemic hormone from *Litopenaeus schmitti* expressed as fusion protein shows hyperglycaemic activity in *Litopenaeus vannamei***

Morera Y¹, Lugo JM², Ramos L¹, Rodriguez T¹, Estrada MP²

¹Center for Marine Research, Havana, Cuba

²CIGB, Havana, Cuba

AC: Morera Y (ymorera@cim.uh.cu)

The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) is the most abundant neuropeptide of the CHH family. It plays an important role in the regulation of hemolymph glucose levels as principal function, but it is also involved in other function such as growth, molting and reproduction. In the present study we have obtained for the first time, the recombinant CHH as an intein fusion protein, from the Atlantic Ocean shrimp *Litopenaeus schmitti*. Expression of proteins with a fusion partner has resulted in good production yield, but these methods require either chemical or enzymatic cleavage to free the peptide from the fusion protein. In this work, the cDNA from mature *L. schmitti* CHH was cloned in suitable expression vector pTYB2, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli* BL21(D3) and purified as intein tag by the electrolution method. The recombinant CHH resulted of the intein fusion approach, showed in the double eyestalks ablated shrimps an authentic hyperglycemic activity as compared to endogenous CHH in unablated animals. The present study and the future fully characterization of the CHH family neuropeptides could be an important tool to achieve a controlled hormonal manipulation in shrimp farming.

S1-P6**Effects of microencapsulated bovine insulin as food additive on growth and metabolism of *Litopenaeus vannamei* larvae**

Piñero González J, Carrillo Farnés O, Gaxiola G, Rosas Vázquez C

Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Ciudad Habana, Cuba

AC: Piñero González J (janet@fbio.uh.cu)

Several recent approaches to optimizing growth and development of cultivated shrimps include the use of stimulatory substances, both natural and artificial. Aquaculture techniques employ growth hormones as food additives, although they have not been widely used in shrimp culture. Nevertheless, the identification –in the past two decades– of several vertebrate hormones homologues in crustaceans has opened the door to their exploitation as possible food additives in the culture of commercial species of this group. Specifically, insulin-like activities have been identified in several lobster and crab species; moreover, insulin like peptides purified from *Panulirus gracilis*, used as food additive for *Litopenaeus vannamei*, improved weight gain of treated animals.

In this work, we examined the effect of microencapsulated bovine insulin as food additive on several biochemical parameters of cultured *L. vannamei* (2.19±0.16 g wet weight). We measured the variation of muscle and hepatopancreas glycogen, several haemolymph metabolites, and trypsin and chymotrypsin activities in treated animals with respect to control individuals whose diets were not supplemented with insulin.

We found that microencapsulated bovine insulin did not stimulate weight gain in treated animals. No significant differences could be found in hemocyanin, cholesterol, triacylglycerides or trypsin activity between treated and control groups. On the other hand, muscle and hepatopancreas glycogen, as well as hemolymph glucose significantly increased in treated animals. In addition, chymotrypsin activity was significantly elevated in treated specimens. Taken as a whole, our results suggest that (at the assayed doses) insulin administered as food additive has a major effect on carbohydrate metabolism rather than acting as a growth hormone.

S1-P7**Clonación y expresión de la hormona hiperglucémica de crustáceos (Liv-CHH-SG1) de *Litopenaeus vannamei* en *Pichia pastoris***

Ponce-Rivas E¹, Sánchez-Castrejón E¹, B Aguilar M², Díaz F¹

¹Departamento de Biotecnología Marina, Ensenada B. C., México

²Laboratorio de Neurofarmacología Marina, Juriquilla, México

AC: Ponce-Rivas E (eponce@cicese.mx)

La hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH) es el miembro más abundante y mejor estudiado de la familia CHH/MIH/GIH. CHH tiene su principal función en el control de los niveles de glucosa en hemolinfa, aunque también tiene un papel importante en la regulación de la muda, reproducción y osmoregulación. En este estudio, el DNAc de Liv-CHH-SG1 (antes llamada Liv-MIH-1), el cual codifica para un neuropéptido maduro del pedúnculo ocular del camarón, *Litopenaeus vannamei*, fue expresado en la levadura metilotrófica (*Pichia pastoris* KM71) bajo el control de un promotor de alcohol oxidasa. Liv-CHH-SG1 recombinante fue secretada al medio de cultivo utilizando la prepro-secuencia del factor-á sin las repeticiones Glu-Ala. La proteína esperada, la cual tiene un peso molecular de 12.1 kDa, fue detectada por una electroforesis en gel de acrilamida (PAGE) con Tricina-SDS y confirmado por Western blot. La proteína recombinante pura Liv-CHH-SG1 fue obtenida por cromatografía de afinidad y el análisis de la secuencia N-terminal confirmó la expresión de la proteína. Con esta proteína recombinante se llevaron a cabo ensayos de actividad biológica para CHH y MIH. Liv-CHH-SG1 recombinante mostró la habilidad de elevar los niveles de glucosa en la hemolinfa de *L. vannamei*, pero la muda no fue afectada. Estos resultados concuerdan con la alta similitud estructural y filogenética que se ha observado entre Liv-CHH-SG1 y otros miembros del grupo de las CHH's.

S1-P8**Valoración de la calidad alimentaria e inocuidad de alimentos balanceados para peces utilizados en la experimentación**

Forte Miranda CR

Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Habana, Cuba.

AC: Forte Miranda C (espalim@cenpalab.inf.cu)

Los piensos que consumen los animales tienen una profunda influencia en el status fisiológico de todas las etapas de desarrollo, siendo de gran importancia el control de la calidad nutritiva y de contaminantes de los alimentos, lo que se hace más evidente para los animales utilizados en la experimentación animal. El objetivo de este trabajo es la evaluación de la calidad nutritiva y microbiológica de tres específicos de alimentos balanceados para peces producidos en la fábrica de alimentos concentrados del CENPALAB. La calidad nutritiva se midió por el análisis de los indicadores: Materia Seca, Humedad, Proteína Bruta, Grasa Bruta, Cenizas, Calcio, Fósforo, Cobre, Magnesio; los indicadores microbiológicos: microorganismos viables, coliformes totales y fecales, *Salmonella* y *Shigella*, hongos, aflatoxinas B1 y G1, presencia de metales pesados y el peso promedio de los sacos de pienso producidos. La calidad nutritiva se mantuvo dentro de los parámetros establecidos siendo los de mayor estabilidad la proteína y grasa. Los valores de humedad, calcio, fósforo y vitamina A mostraron mayor variabilidad pero sin diferir significativamente, la totalidad de los lotes se encuentra dentro de las normas para el control microbiológico para los animales de experimentación. No se detectó la presencia de metales pesados. El 99.5% de los lotes de pienso producidos se encontraba dentro de las especificaciones para las dietas establecidas, solo hubo un rechazo del 0.5%, por lo que se manifiesta el resultado de la implantación de un sistema de control de calidad en el proceso de producción del alimento balanceado.

S1-P9**Effects of cryoprotectants at low temperatures on Mediterranean scallop *Pecten jacobaeus* spermatozoa motility. Preliminary results of cryopreservation**

Del Prete F, Langellotti AL, Lombardi D, Masullo P, Vitiello V, Sansone G

Università di Napoli «Federico II» -Dip. Scienze Biologiche & CRIAcq, Napoli, Italy

AC: Sansone G (giovanni.sansone@unina.it)

Pecten jacobaeus is one of the selected species for diversification of aquaculture productions in Mediterranean Sea. The effects of cryoprotectants, cooling rate and freezing on the Mediterranean scallop sperm motility (% of rapid and vigorous spermatozoa) was analyzed, compared to fresh semen. Five cryoprotectants were tested in their toxicity level at 20 °C: dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), 1-2 propylene glycol (PG) at 7%, 10%, 15% concentration, glycerol (Gly) 5%, 10% and methanol (Met) at concentration of 4%, 6%, 8%. Two adaptation/chilling rates were tested: (A)-1°C/min to 10 °C and (B)-2°C/min to 2 °C. Five cryopreservation shapes were also tested ranging between -4 °C/min and -65 °C/min.

Best conditions after chilling were obtained with A shape. Best recovery of motility at thawing was obtained with EG solutions at medium freezing rate, showing 50% of efficiency in the cryopreservation of Mediterranean scallop spermatozoa.

S1-P10**Acuabio 1 is a shrimp (*Litopenaeus vannamei*) immune system enhancer: possible prebiotic effect**

Franco R, Arenal A, Martín L, Santiesteban D, Sotolongo J

CIGB, Camagüey, Cuba

AC: Arenal A (amilcar.arenal@cigb.edu.cu)

Acuabio 1 is a mixture of essential protein and amino acids able to generate an important effect at preliminary developmental states of aquatic organisms. When Acuabio 1 is used, it is able to synchronize and stimulate the offspring growth and animal development and growth. In this work the enhancer effect of Acuabio 1 in shrimps (*L. vannamei*) was evidenced. The total haemocytes was higher in the animals treated with Acuabio 1 ($5.4E+6$ haemocytes/mL) than the shrimp controls ($4.3E+6$). The lectine titre was higher in the animals from Acuabio 1 treatment (16) than the controls (8). It was also observed that the enzymatic activities of peroxidase and phenoloxidase were stimulated in the Acuabio 1 group respect to the control group. The prebiotic effect of Acuabio 1 was suggested when it decreased the unit colony forming in a vibrio medium. These qualities make the product very attractive for being used in improving the survival rate, quality and quantities of shrimp at larvae stage.

S1-P11**Filogenia molecular de la familia *Mytilidae* en Chile basada en secuencias de ADNmt (16S, COI) y espaciadores internos transcritos**

Aguilera-Muñoz F, Lafarga-De la Cruz F, Gallardo-Escárate C

Universidad de Concepción, Concepción, Chile

AC: Gallardo-Escárate C (cristian.gallardo@udec.cl)

El complejo *Mytilus* es uno de los grupos de invertebrados marinos más ampliamente estudiados a nivel genético. La existencia de subespecies, zonas híbridas y movimiento de mitílidos por acción antropogénica, hace que la filogenia del grupo sea difícil. En Chile, estudios de relaciones sistémicas a nivel molecular han sido limitados solo a marcadores del gen ribosomal 18s y PCR-RFLP. El objetivo del presente estudio fue aportar con nueva información filogenética a nivel molecular para las especies de mitílidos presentes en Chile. Los marcadores de ADN 16S, COI e ITS fueron amplificados y secuenciados. El análisis filogenético fue realizado con el software Geneious en conjunto con PAUP y diferentes modelos de sustitución. Los resultados evidencian dos clados principales. Un gran clado compuesto por *M. edulis chilensis* y *M. galloprovincialis* (choro araucano) en conjunto con otros Mitílidos descritos para Europa y Norteamérica, mientras el segundo clado agrupa solo a *S. algosus* y *P. purpuratus*. Las especies de *C. chrorus* y *A. ater* se encuentran separadas de ambos clados pero en mayor cercanía con el clado mayor. La existencia de géneros monoespecíficos y su localización filogenética son discutidas.

S1-P12**Growth enhancement of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using tilapia growth hormone**

Martín L, Santiesteban D, Arenal A, Franco R, Sotolongo J

CIGB, Camagüey, Cuba

AC: Arenal A (amilcar.arenal@cigb.edu.cu)

Tilapia GH (TiGH) was used to determine the presence of GH receptor like in hepatopancreas of shrimp *L. vannamei* and evaluate the effect on growth of *L. vannamei* postlarvae. TiGH and control groups were treated three times each three days, with TiGH at $100 \mu\text{g L}^{-1}$ and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of total proteins of *E. coli*, respectively. The postlarvae from the TiGH group were 42.4% heavier and 5.2 % larger than the control group ($P < 0.05$). On the other hand, the water content was lower in TiGH (76.9 %) than the control group (77.3%) ($P < 0.05$). Content of soluble proteins per mg of weight was 1.33 times higher in the TiGH treated animals than control animals. No significant differences were detected in the survival rate between the experimental groups. The receptor assay was performed using brush border membrane vesicles (BBMV) from hepatopancreas of *L. vannamei* and the affinity constant was calculated by Bobrovnik's method. TiGH was capable to bond to a GH receptor like on BBMV with affinity constant: $K_a = 1.30 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. In conclusion, a TiGH receptor like was present on vesicles from hepatopancreas of shrimp *L. vannamei*. Also, it was established that the TiGH was able to enhance the growth of shrimp postlarvae.

S1-P13**Utilización de proteína espermática Lisina como herramienta biotecnológica en la fecundación *in vitro* de abalón rojo (*Haliotis rufescens*)**

Valenzuela Muñoz V, Astuya Villalon A, Uribe A, Gallardo-Escarate C

Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

AC: Gallardo-Escarate C (crisgallardo@udec.cl)

Dentro de las técnicas de *hatchery* para la producción de abalón, se encuentra el uso de *pooles* de gametos durante la fecundación *in vitro*, para aumentar el éxito reproductivo así como disminuir posibles efectos de consanguinidad. Estudios de asignación parental han demostrado que la utilización de *pooles* no garantiza una disminución de la competencia espermática, observándose dominancia de pocos machos. El objetivo del estudio es evaluar la utilización de la proteína espermática lisina como inductor de fecundación y disminución de competencia espermática. La proteína lisina fue purificada por medio de cromatografía CM-celulosa desde espermatozoides de abalón rojo, la que fue utilizada en ensayos de disolución de membrana vitelina en ovocitos. Paralelamente se obtuvo ARNm de lisina mediante primers específicos a partir de cDNA extraído desde tejido gonadal. Se discute la utilización biotecnológica de la lisina para disminuir la competencia espermática, así como en la producción de híbridos de abalón.

Financiamiento: Proyecto FONDEF D06I1027

S1-P14**Monosex tilapia *Oreochromis aureus*
culture in floating cages**

Abad Z, González R, Ramírez Y, Arenal A, Pimentel E, De la Torre D

CIGB-Camagüey, Camagüey, Cuba

AC: Abad Z (yamilka.ramirez@cigb.edu.cu)

It has been shown that increases the efficiency in cultured tilapia when used monosex fingerlings. Our group has homogametic spawners for the species of *Oreochromis aureus* tilapia yielding a genetically male tilapia offspring. In this paper we evaluate the productive performance of 10 cages planted with individuals all males. For comparison was taken as a reference the production of tilapia *O. aureus* in floating cages of the UEB «El Calvario» in the province of Ciego de Avila. The average weight at harvest, the gain in biomass and the growth rate in cages with fingerlings planted monosex were higher than in cages stocked with bisexual populations ($p < 0.05$). No significant difference in the conversion factor of food and survival rate was detected between the two groups analyzed.

S1-P15**Sex determination by microsatellites in tilapia
*Oreochromis aureus***

Ramírez Núñez Y, Abad Z, Arenal A, González R, Pimentel E, Díaz Y

CIGB-Camagüey, Camagüey, Cuba

AC: Ramírez Núñez Y (yamilka.ramirez@cigb.edu.cu)

It has been shown that increases the efficiency in cultured tilapia when used monosex fingerlings. Our group has homogametic pseudofemale of the species of *Oreochromis aureus* tilapia yielding a genetically male tilapia offspring. For pseudofemales identification is necessary to analyze the gonads of their progeny. This test requires that the animals be able to reproduce meaning food, time and energy consumption. This work reveals the use of a fast and accurate method to select pseudofemales ZZ, using microsatellite molecular markers linked to sex. As a result 70 females were identified as genetic males (ZZ), while 30 were females has genotype of (WZ). The molecular method was corroborated with gonads analysis of their offspring. The use of microsatellites is effective for sex determination gene in tilapia.

S1-P16**Acuabio3 enhance growth, innate immune functions and survival in fish**

Acosta J, Ruíz O, Carpio Y, Morales R, Herrera F, Águila JC, Valdéz J, Martínez E, Estrada MP

CIGB, Habana, Cuba

AC: Acosta J (jannel.acosta@cigb.edu.cu)

Acuabio3 is a novel product directed to ornamentals fish. It's composed by *Pichia pastoris* culture supernatant containing a polypeptide derived from tilapia somatotropin. Acuabio3 promotes growth, innate immune functions, survival rate and quality of larvae. This product has been proved in goldfish, carp and swordtail larvae and tilapia as model. In addition, Acuabio3 has effect over growth in juveniles.

In order to improve the stability of hormone contained in the culture supernatant we applied a heat shock at 60 °C and 75 °C and compared the effects over growth and immune functions of both treatment and Acuabio3 without heat shock. As results we obtained that Acuabio3 with heat shock at 60 °C has enhanced protein stability, growth and innate immune functions. All this results validate Acuabio3 as potently growth and innate immune stimulator that can be use in ornamentals fish production.

S1-P17**Obtención de una formulación estable del producto Acuabio 3**

Ruíz O, Acosta J, Valdés J, Estrada MP, Padrón S, Pestana Y, Díaz M, Morales R, Herrera F, Martínez E

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Ruíz O (odalys.ruiz@cigb.edu.cu)

El crecimiento de la población mundial y la necesidad de satisfacer sus requerimientos nutricionales exige que se apliquen técnicas cada vez más novedosas para aumentar la producción de alimentos, sobre todo de origen animal.

El objetivo del trabajo consiste en establecer un proceso de obtención de un suplemento nutricional para peces ornamentales que sea estable almacenado a 4 °C.

La cepa MP36 de *Pichia pastoris* fue empleada como sistema hospedero del plasmido portador del gen que codifica para la expresión de un Polipeptido derivado de la somatotropina de tilapia. Se emplearon fermentadores B.E MARUBISHI de 5 L de volumen efectivo a una temperatura: 30 °C ± 0.5, pH = 5.5, Aireación: 1 v.v.m y Agitación: 500-800 rpm. El volumen de incremento es de 1.5 L de metanol y fue adicionado una vez agotada la fuente de carbono inicial con un flujo escalonado. El medio de cultivo diseñado se probó en varias fermentaciones consecutivas obteniéndose resultados positivos, en cuanto a crecimiento y expresión de la proteína de interés. El sobrenadante de cultivo es sometido a un proceso de concentración hasta alcanzar dos veces el valor inicial de proteína específica, y finalmente se realiza un proceso de filtración por membrana de 0.45-0.2 µM para garantizar la esterilidad del producto final. En el trabajo se estudiaron diferentes variantes para estabilizar el producto almacenado a 4 °C obteniendo una condición que permite alcanzar este objetivo, demostrando 3 meses de estabilidad en tiempo real.

S1-P18**Production of a high percentage of male offspring in growth-enhanced transgenic tilapia using Oreochromis aureus ZZ selected pseudofemales**

Abad Márquez Z, González R, Mendoza I, Oliva A, Pimentel E, Pimentel R, Martínez R, Estrada MP, Ramírez Y, Arenal A

CIGB-Camagüey, Camagüey, Cuba

AC: *Abad Márquez Z (zoila.abad@cigb.edu.cu)*

Gene transfer has offered a new tool for the development of improved fish strains for aquaculture. Monosex fish populations could minimize the impact of genetically modified organisms in the environment. In *Oreochromis aureus*, the use of pseudofemale spawners (sex-reversed male with a female phenotype) is an alternative technique for producing genetically male tilapia offspring. *O. aureus* fry were treated with 17 β -estradiol at 100 mg/kg of food for 45 days. We obtained 77.1% females and 45.9% in the control group. Females randomly taken from the treated group were crossed with normal males. Fry from pseudofemales producing more than 90% male progenies were submitted to 17 β -estradiol treatment to obtain F2 pseudofemales. The results of the sexreversal were low and variable ranging between 66.0 and 84.3% females. F2 pseudofemales were crossed with transgenic males from the F70 line (*O. aureus* \times *O. urolepis hornorum*) and non-transgenic (*O. aureus*) males. The sex ratio of progeny of F2 pseudofemale deviated significantly (Pb0.01) in favor of males in the crosses with transgenic (90.2%) and non-transgenic (89.3%) males compared to the results observed with normal females (51.0 and 52.3%, respectively). The mean fry production with pseudofemales (per m²/day) was similar to the normal females in the crosses with transgenic and non-transgenic males. To our knowledge this is the first report on the production of a near monosex population in genetically modified fish.

S1-P19**Partial cloning and semi-quantitative expression analysis of nitric oxide synthase gene in the spiny lobster *Panulirus argus***

Rodríguez-Ramos T, Carpio Y, Hernández-López J, Gollas-Galván T, Espinosa G, Estrada MP

Centro de Investigaciones Marinas, Habana, Cuba

AC: *Rodríguez-Ramos T (tania@cim.uh.cu)*

Nitric oxide (NO) is a very important component of the innate immune system. It has antiviral, anti-bacterial, and anti-parasite properties by damaging the DNA, enzymes and membranes of pathogens, either directly or indirectly through its actions on the DNA bases and strands, proteins and membrane lipids. Surprisingly, the role of NO in the crustacean's immunity has been poorly studied.

The present research has the aim of characterize the nitric oxide synthase (NOS) gene in lobsters as it could be an important factor in successful lobster resistance to diseases. The partial cDNA was isolated, cloned and sequenced, obtaining the 60% of the full cDNA length. NOS expression in lobster gills, heart, stomach, digestive gland, muscle and haemocytes was analyzed by semi-quantitative RT-PCR showing differential expression in all those organs and haemocytes. The increase of NOS activity in hameocytes was demonstrated *in vitro* after exposure with *Escherichia coli* O55:B5 Lipopolisaccharyde as microbial elicitor of the immune system and this increment resulted to be time and dose dependent.

This is the first NOS cDNA sequence reported for a lobster and the second for a crustacean. It is also the first study on NOS activity from lobster haemocytes, as it relates to the immune system. The information is relevant in providing new insights into the functioning of the crustacean defense mechanisms, thereby contributing towards successful crustacean disease control.

S1-P20**Vitrificación espermática en «neomachos» de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): integridad de membrana plasmática, potencial mitocondrial y capacidad fecundante de los espermatozoides**

Figueroa E¹, Merino O¹, Valdebenito P², Risopatrón J¹

¹Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

¹Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile

AC: Risopatrón J (jennie@ufro.cl)

La criopreservación de semen en trucha arcoiris permite mejorar la producción y desarrollar herramientas biotecnológicas en actividades de acuicultura. Actualmente se ha demostrado que la vitrificación preserva en forma óptima la función y motilidad espermática en humanos, procedimiento simple y de menor costo que la congelación tradicional. Sin embargo, esta técnica no ha sido evaluada en espermatozoides de salmónidos. El objetivo de este trabajo fue vitrificar espermatozoides de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) «neomacho» y evaluar la función y la capacidad fecundante post-desvitrificación.

Los espermatozoides fueron vitrificados en medios: B. Cortland suplementado con sacarosa (0.13M), dimetil sulfóxido (DMSO) y plasma seminal (PS) y A. Cortland (control). Alícuotas de 30 µL de suspensión espermática fueron vitrificadas dejándolas caer directamente en nitrógeno líquido. La desvitrificación se realizó en medio Cortland (10 °C). Se evaluó post-desvitrificación espermática: viabilidad (PI), integridad de membrana plasmática (SYBR-14/PI) y potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ MMit/JC-1), por citometría de flujo. En la fecundación se evaluó la presencia de tubo neural en embriones de 7 días de desarrollo a 9 °C.

Los espermatozoides vitrificados con medio B, presentaron un mayor porcentaje de $\Delta\Psi$ MMit ($36.22\pm 7.1\%$) e integridad de membrana ($98.4\pm 1.4\%$) y viabilidad espermática ($95.31\pm 1.4\%$), observándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al medio A ($22.5\pm 3.4\%$; $80.1\pm 5.2\%$; $81.5\pm 1.9\%$, respectivamente). Resultados similares fueron observados en porcentajes de fecundación ($30.5\pm 3\%$ v/s $9.6\pm 7\%$). Estos resultados sugieren que la vitrificación de espermatozoides en «neomachos» de trucha arcoiris con sucrosa, DMSO y plasma seminal, disminuyen el criodaño. Se debe continuar la investigación para obtener mayores porcentajes de fecundación.

Financiamiento: Proyecto FONDEF IDO611020 Chile.

S1-P21**Bioensayos preliminares de criopreservación y vitrificación de semen de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante métodos asépticos**

Valdebenito Isler I, González Alfaro K

Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile

AC: Valdebenito Isler I (ivisler@uct.cl)

En el manejo reproductivo realizado en la salmonicultura, cada día es más necesario disponer de una biotecnología que permita disponer del almacenamiento prolongado de semen de las especies que se cultivan. A la fecha, la criopreservación no arroja resultados permanentes y confiables, razón por la cual, la evaluación de nuevas metodologías que permitan el almacenamiento en frío es una necesidad. La vitrificación, como técnica ultrarrápida de enfriamiento, asoma como una alternativa viable y que debe ser evaluada. En esta experiencia se comparó la criopreservación y vitrificación como métodos para almacenar semen de trucha arcoiris en NL, utilizando como control un grupo de ovas fecundadas con semen fresco. Como contenedores se utilizaron criotubos de 5 mL de capacidad y como crioprotector para la criopreservación se utilizó un medio basado en DMSO, sacarosa y yema de huevo. Para la vitrificación se utilizó un medio con etilenglicol y BSA.

Los resultados muestran que el mayor porcentaje de fecundación se obtuvo con el grupo control ($74.44 \pm 24.29\%$). Valor estadísticamente significativo respecto a los porcentajes de fecundación obtenidos con la criopreservación ($13.78 \pm 16.82\%$) y la vitrificación (11.74 ± 11.16).

Se debe continuar optimizando las técnicas de almacenamiento prolongado de semen ya que esta es una necesidad creciente en la salmonicultura, particularmente de una técnica que permita realizar el proceso en forma masiva y con altos porcentajes de fecundación.

Investigación realizada con aportes de los proyectos Fondef D0611020 y DGIUCTemuco N° 2007-DGI-CDA-05.

S1-P22**Fecundación en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con espermatozoides vitrificados: bioensayos preliminares**

Merino O¹, Figueroa E¹, Valdebenito I², Risopatrón J¹

¹Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

²Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile

AC: Risopatrón J (jennie@ufro.cl)

La criopreservación de semen de peces aún muestra deficiencias para lograr óptimas tasas de fecundación. Los métodos más utilizados son refrigeración y congelación. En este contexto, la vitrificación como técnica ultrarrápida de congelación, donde el semen diluido en un crioprotector está en contacto directo con el nitrógeno líquido (N₂L), podría mantener la capacidad fecundante de los espermatozoides de trucha arcoiris. Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que la vitrificación permite la criopreservación de células espermáticas (humanos y caninos). El objetivo fue vitrificar espermatozoides de trucha arcoiris y evaluar su efecto sobre parámetros de función espermática y fecundación.

Los espermatozoides fueron vitrificados en medios: A. Cortland suplementado con sucrosa y plasma seminal y B. Cortland (control). Alícuotas de 20 µL de suspensión espermática fueron vitrificadas dejándolas caer rápida y directamente en N₂L. Se evaluó postdesvitrificación: viabilidad (PI), integridad de membrana (SYBR-14/PI) y potencial de membrana mitocondrial (JC-1) por citometría de flujo. La fecundación se evaluó por presencia de tubo neural en embriones incubados por 7 días a 9 °C.

Los resultados preliminares de vitrificación espermática en medio A indican porcentajes de potencial de membrana mitocondrial mayor al control (36.55±18.75% v/s 24.84±16.84%). Sin embargo, el porcentaje de integridad de membrana plasmática es similar al control (76.9±1.73% v/s 73.35±8.39%). Con respecto al porcentaje de fecundación, fue 32±12.17% v/s 4±2%, respectivamente. Estos resultados preliminares sugieren que los espermatozoides de trucha arcoiris son factibles de ser vitrificados manteniendo su capacidad fecundante. Es importante continuar la investigación para obtener mayores porcentajes de fecundación.

Financiamiento: Proyecto FONDEF IDO6I1020

S1-P23**Myostatin bioactivity blockage increases embryonic developmental speed in zebrafish**

Delgado I, Fuentes E, Navarro C, Álvarez M, Vera MI, Reyes A, Molina A

Laboratorio de Biotecnología Molecular Universidad Andrés Bello, Santiago de Chile, Chile

AC: *Molina A (amolina@unab.cl)*

The «double muscle» phenotype described in mammals, which exhibits an outstanding increase of muscle mass, is a consequence of loss-of-function of the myostatin gene (MSTN), a member of the TGF-beta family. MSTN negatively regulates skeletal muscle growth during embryonic and adult development. MSTN is synthesized as an inactive pre-pro-peptide. Proteolytical processing renders a biologically active dimeric peptide with the capacity to bind to specific receptors in its target cells. The latency associated peptide (LAP) has been proposed as the major inactivating factor of the mature dimeric peptide. Considering this feature, we are interested in developing strategies to block the MSTN bioactivity using the over expression of different mutated forms of MSTN to induce an increase in growth and development in fish. In this regard, we transiently expressed mRNA coding for MSTN R265G, D76A, as well as the wild type form, in zebrafish embryos. The treated embryos were phenotypically analyzed and the expression of *act-r2b*, *igf-1*, *myf-5*, *gh-rb*, *gh-ra*, *igf-1ra*, *ifg-1rb*, *smad-2*, *myogenin*, and *myod* genes were studied. In addition, through using whole mount *in situ* hybridization we studied the expression pattern of the myogenic factor *MyoD*. Our results showed an increase in the developmental speed generated by MSTN negative dominants, and upregulation of myogenic and growth factors.

S1-P24**Biolixiviación de minerales sulfo-ferrosos en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados**

Juárez Alcaraz A

Tecnológico de Colima, Villa de Álvarez, México

AC: Juárez Alcaraz A (ajuarez12@hotmail.com)

Se evaluó el efecto de cultivos puros y mixtos de microorganismos sobre la biolixiviación de sustratos minerales con contenido de sulfuros, procedentes de depósitos residuales (jales) de una mina de fierro, en Minatitlán, Colima. Se encontró una biodiversidad de microorganismos quimilitotróficos y heterótrofos acidofílicos, provenientes del drenaje ácido de minas, jales y del suelo; donde se obtuvieron valores bajos de pH de 1.2, que favorecen las condiciones del desarrollo de los microorganismos acidofílicos. De acuerdo con la caracterización de 13 cultivos de microorganismos acidofílicos, tales como *Thiobacillus* sp., *Penicillium* sp. y *Rhodotorula* sp. fueron los predominantes y de mayor actividad oxidativa. A estos tres cultivos se les midió su capacidad oxidativa; así como para su combinación reportada como cultivo mixto. El tiempo para probar su capacidad y velocidad oxidativa en matraces agitados, fue de 45 días con mediciones de los parámetros indicadores de la reacción: pH, potencial redox, acidez, concentración de iones sulfato, Fe(II) y Fe(III) disueltos, proteínas totales y concentración de microorganismo libres, por cada cinco días. Para evaluar la capacidad oxidativa de los cultivos aislados se utilizaron tres fuentes de energía diferentes, donde los jales fueron el sustrato común, en uno de ellos fue la única fuente de energía, en las restantes se adicionaron FeSO₄ como fuente y FeSO₄ más extracto de levadura, el cual fue la mejor fuente de energía en cultivo mixtos. Resultando la capacidad y velocidad de oxidación de los minerales sulfurosos mayor para cultivos mixtos (2.0 mg.h⁻¹ Fe(II)) comparado con los puros (1.5 mg.h⁻¹).

S1-P25**Estudio de genes con expresión diferencial en *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco del Pacífico) alimentados con fuentes convencionales y alternativas de proteína**

Chávez Calvillo G, Lizama UC G, Arena Ortiz ML, Gaxiola Cortes G

Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México

AC: Chávez Calvillo G (gabvet.c@gmail.com)

El camarón continúa siendo el producto pesquero más importante en la acuicultura. En esta industria la alimentación de los organismos representa entre 50 y 70% de los costos de producción. El reconocimiento de que los nutrientes y otros compuestos de los alimentos tienen la capacidad de interactuar y modular mecanismos moleculares que subyacen a las funciones fisiológicas ha provocado una rápida revolución en el campo de la nutrición. Así la búsqueda de marcadores moleculares asociados a caracteres heredables de interés comercial ha tomado importancia. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de proteínas de origen vegetal y animal en la dieta en la expresión diferencial de genes en camarones blancos *Litopenaeus vannamei*.

Se extrajo y cuantificó el ARN de músculo y hepatopáncreas de cuatro grupos de camarones alimentados con dos dietas que contenían; una, proteína vegetal (coctel de soya, papa, trigo y espirulina) y otra con proteína animal (harina de calamar). Se obtuvieron los cDNA's por RT-PCR utilizando 7 combinaciones de 4 cebadores arbitrarios. Se observó que hubo una modificación en las poblaciones de mRNA entre los tratamientos. Los genes encontrados se pueden agrupar en ocho categorías de acuerdo con su función; metabolismo, respuesta inmune, reguladores de la transcripción, genes que codifican para proteínas estructurales del músculo, reguladores de señalización celular, subunidades ribosomales y no reportados.

Estos resultados demuestran que el origen de la proteína incluida en la dieta modifica la expresión genética en el hepatopáncreas y en el tejido muscular de los juveniles de *L. vannamei* y ha abierto la posibilidad de identificar marcadores moleculares para esa condición en el camarón blanco, o en otras especies.

SIMPOSIO 2 / SYMPOSIUM 2

**Biología Moderna para la Salud Animal/
*Modern Biotechnologies for Animal Health***

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S2-1**Uso estratégico de vacunas contra la garrapata para reducir el uso de acaricidas y el desarrollo de resistencia en Latinoamérica**

Benavides E

Universidad de Bogotá, Bogota, Colombia

AC: Benavides E (ebenavid@coldecon.net.co)

Resumen no disponible / Abstract not available

S2-2**Immunopathology of the tick-host interface**

Bechara GH

São Paulo State University, Jaboticabal, Brazil

AC: *Bechara G* (*bechara@fcav.unesp.br*)

Ticks are of great veterinary and public health importance due to direct damage caused by tick feeding and transmission of biopathogens to the hosts. Tick feeding induces a complex array of host immune responses; however the tick has developed a sophisticated arsenal of countermeasures to evade from them. Herein, it is highlighted contemporary research on host immune responses to ticks by employing the dog/rodents-*Rhipicephalus sanguineus* Brazilian strain interactions as experimental models.

The dog is considered to be the natural host of *R. sanguineus* and as its ancestor, the crab-eating fox *Cerdocyon thous*, is unable to develop appreciable resistance even after repeated feedings. Contrarily, guinea pigs and hamsters acquire marked resistance after one infestation with adult ticks. On the other hand, mice develop no protective immunity to *R. sanguineus* tick infestations also and this seems to be related to the induction of a Th2 associated cytokine profile. In addition, several differences between dogs and guinea pigs re-infested by *R. sanguineus* have been shown in the last decade. In fact, both an immediate and delayed type hypersensitivity to the *R. sanguineus* unfed adult extract injected intradermally can be observed on pre-sensitized guinea pigs; dogs develop only an immediate response. Moreover, while dogs show an influx of mainly granulocytes neutrophils into the tick feeding lesion, a cutaneous basophilia is seen on guinea pigs from the second infestation on.

In conclusion, these data reveal marked differences in the reactions of resistant and susceptible hosts to the kennel tick *R. sanguineus*.

S2-3**Development and characterization of a vaccine candidate against classical swine fever, based on the E2-CSFV glycoprotein produced in the milk of non-transgenic goats**

Sánchez Ramos O, Barrera M, Rodríguez MP, Castell S, Alfonso P, Naranjo P, Vega E, Santana E, Frías MT, Toledo JR

CIGB, Havana, Cuba

AC: *Sánchez Ramos O (oliberto.sanchez@cigb.edu.cu)*

Classical swine fever virus is the etiological agent of the most economically important highly contagious disease of swine worldwide. E2 is the major envelope glycoprotein present as a homodimer on the outer surface of the virus and represents an important target for the induction of neutralizing immune response against the viral infection. In this work the E2 extracellular domain was expressed in the milk of adenoviral transduced goats and its immunogenicity and protective capacity was assessed in a set of vaccination and challenge trials.

We found that the vaccine candidate based on milk-derived E2 is able to induce high titers of neutralizing antibodies in pigs, and confer protection from both clinical signs and viral infection after a challenge with 10^5 LD₅₀ of a highly pathogenic CSFV, since day 15 up to at least 9 months post-immunization. Vaccinated pigs challenged only one week after a single immunization showed a partial protection level which was noticeably improved after the incorporation of an immunostimulating cytokine in the vaccine formulation. Contrasting with vaccines based on C-strain, the water in oil formulation containing the milk-derived E2 supported conditions of thermal stress without evident alteration on its immunogenicity and protective capacity. Additionally, the vaccination of pregnant sows allowed conferring protective antibody levels to the newborn piglets up to about seven weeks after birth. Taken together, these results demonstrate the efficacy of the milk-derived E2 as vaccine antigen and highlight the advantages of using the mammary gland as bioreactor for the production of complex glycoproteins for veterinary purposes.

S2-4**Emerging lateral flow tests for veterinarian purposes according to Cuban biotechnology products**

Torres E

CIGB Santi Spíritus, Santi Spíritus, Cuba

AC: *Torres E (edel.torres@cigb.edu.cu)*

In conformity with present vaccination strategies for different goals in veterinarian field a number of rapid tests are developed as control for animal immune response and others to know about possible infections in the herd. Nowadays several rapid tests based on lateral flow technology have developed in order to know the protective antibody titer against bovine tick (*Boophilus microplus*) without requirement other equipment neither specialized personnel. In the same manner other rapid tests have been developed with this technology in relation to screening for Classical Swine Fever virus either for sick animals or vaccinated. These analytic tests employ nitrocellulose membranes as solid support and different biomolecules conjugated to colloidal gold particles as marker. Could be performed using serum or plasma samples and visual results could be read in only 10 to 15 minutes. The current tendency goes to use blood samples with the aim of making the assays more versatile.

S2-5**Transgenic plants for improving animal health: approaches for active and passive vaccination**

Joensuu J¹, Brown K¹, Conley A¹, Clavijo A², Menassa R¹, Brandle J¹

¹Agriculture and Agri-Food Canada, London, Canada

²Canadian Food Inspection Agency, Winnipeg, Canada

AC: Joensuu J (joensuu@agr.gc.ca)

A variety of plant species have been genetically modified to produce vaccine antigens and antibodies for human and animal health with the first products currently approaching the marketplace. Here, two case studies will be used as examples to discuss the aspects of production of plant-made vaccines and antibodies for veterinary use: (1) the production of an edible plant vaccine for porcine postweaning diarrhea, and (2) the development of a cost-effective production system of recombinant anti-Foot-and-Mouth disease (FMD) antibodies in plants.

(1) There is no current vaccine to protect piglets against postweaning diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). The major subunit of adhesive F4+ ETEC fimbriae was expressed in alfalfa and barley. The key properties for an oral vaccine, *i.e.* stability in gastrointestinal conditions, and binding to intestinal receptors were shown *in vitro*. Oral administration of transgenic plants to weaned piglets induced systemic and mucosal immune responses. In the following F4+ ETEC challenge, the duration and number of F4+ *E. coli* excreted, were reduced.

(2) FMD is the most significant constraint to international trade in animals and animal products. While current whole-virus-based vaccines are protective, there are several limitations restricting their usefulness as prophylactic treatment or to control outbreaks. Passive immunization, using low-cost recombinant antibodies, is an attractive alternative to protect susceptible animals during FMD outbreaks. A single chain antibody fragment (scFv) recognizing the FMDV coat protein VP1 was produced in transgenic tobacco. Robust and scalable purification procedures were established and plant-made scFv was shown to bind FMDV *in vitro*.

S2-6**Vaccines against classical swine fever – developments in the European Union**

Greiser-Wilke I, Moennig V

Institute of Virology, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany;

AC: Greiser-Wilke I (irene.greiser-wilke@tiho-hannover.de)

Classical swine fever (CSF) virus belongs to the family *Flaviviridae*, genus *Pestivirus*. Pestiviruses are enveloped viruses with a single stranded positive sense RNA genome of approximately 12.5 kb. It encodes one large open reading frame which is posttranscriptionally processed. Of the three envelope glycoproteins Erns, E1 and E2, the latter can induce protective immunity.

The disease is highly contagious and the fact that clinical signs and pathological findings are diverse often hampers immediate recognition. Thus, virus spread can be very fast leading to epidemics usually causing major economic losses.

In Western Europe, eradication was achieved towards the end of 20th century. Vaccination is banned in the European Union since 1990. Nevertheless, occasional outbreaks of CSF occur in wild boar and in domestic pigs, and emergency vaccination is now allowed. The combination of vaccination with live attenuated strains (*e.g.* C-strain) and culling of infected pigs has made it possible to eradicate the disease. However, using the C-strain for vaccination, it is not possible to differentiate between infected and vaccinated animals (DIVA), thus hampering disease control measures that rely on serology. Therefore, major efforts are being performed to develop DIVA vaccines and accompanying tests. A variety of genetically engineered vaccines have now been designed, ranging from peptide and subunit vaccines, DNA/RNA vaccines, replicons (pseudoviruses), deletion mutants, and chimeric Pestiviruses. Up to now, only a subunit marker vaccine containing the viral E2 glycoprotein as an antigen is commercially available. The corresponding discriminatory ELISA test is designed to detect antibodies against the Erns glycoprotein.

S2-7**RT-PCR multiplex assay for the detection and differentiation of pestivirus infections in pigs**

Díaz de Arce Landa H, Pérez Rodríguez LJ, Frías Lepoureaux MT

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, San José de las Lajas, Cuba

AC: *Díaz de Arce Landa H (heidy@censa.edu.cu)*

Viruses that comprise the *Pestivirus* genus cause significant losses to the livestock industry worldwide. Classical swine fever (CSF) is the most important pestivirus disease, one of the most important viral pathogen in pigs, and its control and prevention are of worldwide concern. All pestivirus species can infect pigs, therefore accurate and rapid pestivirus detection and differentiation is of great importance for the development of control measures in swine farming. Most of all because the clinical picture caused by ruminant pestivirus infections in pigs can suggest chronic CSF.

The development and evaluation of a novel multiplex, highly sensitive and specific

RT-PCR for the simultaneous detection of pestivirus and the differentiation of classical swine fever virus in clinical samples is described. The universal and differential detection was based on primers designed to amplify a fragment of the 5' non coding genome region and a fragment of the NS5B gene respectively.

The assay proved to be highly specific when different pestivirus species strains and pigs virus were evaluated. The analytical sensitivity was estimated to be as little as 0.89 TCID₅₀/50 µL. The assay analysis of 33 tissue homogenate samples from naturally infected and non CSF infected animals and 38 serum samples from experimentally infected pigs evaluated as part of two European Inter-laboratory Comparison Tests conducted by the Community Reference Laboratory (CRL), Hannover, Germany proved the potential usefulness of these methods for rapid, sensitive and specific pestivirus diagnosis from swine clinical samples.

S2-8**Evaluación del inmunógeno Heberbiogar aplicado dentro de un programa de control integrado de las garrapatas del ganado bovino en la República Bolivariana de Venezuela**

Ascanio E, Montero C, Chacón J, Joglar M, Alayón S, Durán S, Gadea R

UCV, Maracay, Venezuela

AC: *Ascanio E (eascanioe@cantv.net)*

Rhipicephalus microplus es la garrapata más común del ganado bovino en Venezuela y la causante de mayores pérdidas económicas al sector. Los químicos han sido el recurso más utilizado en el control de estas garrapatas, generando desarrollo de resistencia e ineficacia en su acción controladora y ha obligado a fomentar otros medios de control que pueden resultar ineficaces aplicados por separados, pero que dentro de un programa de control integrado podrían tener resultados alentadores.

Para evaluar el desempeño del inmunógeno Heberbiogar, en el control integrado de las garrapatas del ganado bovino en Venezuela, se procedió a escoger tres unidades de producción de tres estados del País, que representen los posibles ecosistemas donde se explota la ganadería bovina nacional. Las fincas seleccionadas fueron evaluadas previamente para tener datos de: sensibilidad/resistencia a los agentes químicos utilizados en el control de las garrapatas y datos del potencial biótico de la cepa en cuestión. Se procedió a establecer un protocolo de aplicación del inmunógeno en semana 0, 4, 7, 24 y 48, utilizándose controles químicos cuando el grado de infestación por teleogina era igual o mayor de 10 por animal. Muestras de garrapatas y sangre se colectaron cada 15 días para evaluar potencial biótico y títulos de anticuerpos anti Bm86.

Los resultados obtenidos muestran una eficacia altamente significativa del inmunógeno Heberbiogar en el control integrado de las garrapatas del bovino, obteniendo una marcada reducción en la frecuencia de baños y un pronunciado deterioro del potencial biótico de las garrapatas procedentes de animales inmunizados.

S2-9**Development of transmission-blocking anti-tick vaccines**

Nuttall P

NERC Centre for Ecology & Hydrology, U.K., Wallingford, United Kingdom

AC: Nuttall P (pan@ceh.ac.uk)

Ticks are economically important pests of livestock in their role as both blood-feeding ectoparasites and as vectors of numerous pathogens that cause diseases such as babesiosis, theileriosis, and anaplasmosis. Control strategies rely on regular application of acaricides. A commercially available anti-tick vaccine (TickGARD or GAVAC) was first marketed in 1994. Since then there has been extensive research to develop more effective anti-tick vaccines, including vaccines that block or suppress the transmission of tick-borne pathogens. Ideally, transmission-blocking anti-tick vaccines should: (i) be effective against a wide variety of tick species and against different developmental stages; (ii) inhibit or suppress transmission of a broad range of tick-borne pathogens; (iii) provide long-lasting immunity; (iv) deter ticks from attaching; (v) not induce vaccine resistance; (vi) be cost effective. Progress in meeting these idealised requirements will be discussed.

SIMPOSIO 2 / SYMPOSIUM 2

**Biología Moderna para la Salud Animal/
*Modern Biotechnologies for Animal Health***

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S2-P1**Producción de ADN plasmídico mediante cromatografía de intercambio iónico en membranas y de interacción hidrofóbica**

Guerrero-Germán P¹, Montesinos-Cisneros RM², Tejeda-Mansir A³

¹Universidad de Sonora y Universidad Autónoma de Baja California, Hermosillo, México

²Departamento de Matemáticas. Universidad de Sonora, Hermosillo, México

³Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora, Hermosillo, México

AC: Guerrero-Germán P (pguerrero@iq.uson.mx)

Los plásmidos han surgido como una nueva clase de productos biofarmacéuticos, para ser utilizados como vectores en humanos y animales, para su aplicación en terapia génica y vacunas basadas en ADN. La velocidad con que se han desarrollado las investigaciones para obtener ADN plasmídico (pDNA) purificado desde sus inicios en 1990, hace evidente la necesidad de desarrollar procesos a gran escala, capaces de producir suficiente cantidad de pDNA con la calidad requerida para aplicaciones farmacéuticas. En este trabajo se desarrolló un bioproceso escalable para obtención de pDNA purificado a partir de cultivos de *Escherichia coli*, basado en operaciones de membrana e interacción hidrofóbica. La purificación de pDNA del lisado celular se realizó con una combinación de filtración de flujo tangencial, cromatografía frontal de membrana de intercambio iónico y cromatografía de elución de interacción hidrofóbica. En los resultados se muestra que más del 90% del ARN presente en el lisado se eliminó durante las operaciones de membrana y la pureza de la solución aumentó más de 21 veces. En la etapa de purificación final, la pureza de la solución colectada se incrementó más de 30 veces, sin embargo la concentración disminuyó más de tres veces. El ARN en la preparación final fue imperceptible en el análisis por electroforesis en gel de agarosa.

S2-P2**Cambios morfológicos de la bursa y respuesta inmune humoral por efecto de una vacuna complejo virus-anticuerpo contra la Enfermedad de Gumboro**

Saume de Sabaté E, Castro M, López E

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Maracay, Venezuela

AC: SAUME DE SABATÉ E (esaumei@nia.gob.ve)

La Enfermedad de Gumboro es causada por un virus que produce inmunosupresión en las aves, ocasionando pérdidas recurrentes en la industria avícola. Los programas de vacunación contra la Enfermedad de Gumboro deben considerar la inmunidad pasiva y activa de las aves. Actualmente las vacunas elaboradas con nuevas tecnologías están en proceso de evaluación, tales como las vacunas antígeno-anticuerpo, con este objetivo se realizó un estudio para evaluar los cambios morfológicos de la bursa y la respuesta inmune humoral, inducidos por una vacuna complejo virus-anticuerpo contra la enfermedad, se utilizaron 400 pollos de engorde raza Cobb x Cobb, de madres vacunadas, 200 vacunados vía subcutánea el primer día de edad y 200 sin vacunar como grupo control, manteniéndose cada uno en galpones aislados. Todos fueron evaluados mediante la relación bursa/peso corporal, índice bursal y títulos de anticuerpos. El grupo control presentó ausencia de títulos de anticuerpos desde los 15-21 días de edad, en el grupo vacunado se observó atrofia de la bursa y altos títulos de anticuerpos a partir de los 21 días de edad. Estos resultados llevan a la conclusión de que la vacuna complejo virus-anticuerpo contra la Enfermedad de Gumboro al ser administrada el primer día de edad en presencia de niveles variables de anticuerpos maternos no interfiere con la respuesta inmunitaria y elimina la necesidad de vacunaciones múltiples para contrarrestar el problema de la neutralización de los anticuerpos maternos causados por el uso de vacunas vivas.

S2-P3**A broad specificity inhibitor protects heterologous proteins from proteolysis in *Pichia pastoris* cultures**

Gil DF¹, González Y¹, Pérez M², Besada V², Díaz J¹, Gancedo C³, Chávez MA¹, Mansur M²

¹Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

²CIGB, La Habana, Cuba

³Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid, España

AC: Gil D (dayromgil@fbio.uh.cu)

ShPI-1 is a protease inhibitor isolated from sea anemone *Stichodactyla helianthus*. Its broad specificity against several serine, cysteine and aspartic proteases suggests its potential use as biotechnological tool to control proteolytic activity. Preliminary expression of ShPI-1A (a variant of ShPI-1) was previously in *Saccharomyces cerevisiae*, but low yields were obtained. In this work, rShPI-1A gene fused to *S. cerevisiae* prepro α Factor was placed under control of AOX1 promoter. Resultant plasmid pBM301 was transformed into *P. pastoris* KM71H strain. Selection was attained by increasing rounds of Hygromycin B. Resistant strain SH1 was cultured in 1.5 L high cell density fermentation. Trypsin inhibitory activity was detected in culture supernatants using Bz-Arg-pNA assay. Inhibitor was purified by ion-exchange chromatography on a Direct HST column, eluting by increasing both pH and ionic strength. Antitryptic fractions showed a high purity by SDS-PAGE and RP-HPLC. Mass determined by ESI-MS matches with the theoretical mass. N-terminal sequencing of rShPI-1A confirmed the identity of the molecule. K_i value against trypsin was similar to natural inhibitor, in subnanomolar order.

Incubation of cell-free broth of a *P. pastoris* strain (C27) fermentation producing human recombinant miniproinsuline (MPI) was used to determine protection against *P. pastoris* proteases. A higher MPI concentration remains intact when higher rShPI-1A concentrations are added to incubation media.

Use of rShPI-1A has demonstrated to be useful in reducing proteolytic degradation of heterologous proteins expressed in *P. pastoris*. This could be of valuable interest in the case of some proteins that suffers degradation on *P. pastoris* culture media.

S2-P4**Detección de anticuerpos HI contra la Enfermedad de Newcastle a partir de la aplicación de la vacuna Newcastle inactivada para palomas, cepa La Sota en palomas susceptibles**

González Martínez S, Smith Ramos A, Springer Spengler A, Fraga Murgado F

Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM), Boyeros, Cuba

AC: *González Martínez S (labiofam@ceniai.inf.cu)*

La enfermedad de Newcastle en palomas se presenta con trastornos respiratorios, digestivos y nerviosos, y las cepas aisladas son velogénicas clásicas de esta enfermedad. La circulación del virus representa un riesgo potencial para la avicultura del área que tiene un alto valor económico y representa una fuente de alimento para la población. El objetivo fue desarrollar una vacuna inactivada a partir de la cepa La Sota, adyuvada en gel de Hidróxido de Aluminio con una concentración antigénica superior a las vacunas clásicas de pollos y determinar si su aplicación en palomas susceptibles promovía la producción de anticuerpos HI. Se detectaron anticuerpos HI antes de la vacunación, a los 28 días de la primera dosis y a los 43 días de concluido el esquema. Se realizó un análisis de proporción de reactores con los títulos iguales o superiores a 1:16 que fue del 100% tanto a los 28 días de la primera dosis como a los 43 días de la segunda dosis. Se analizaron las medias geométricas y la desviación estándar de los títulos. La media geométrica fue 6.7143 a los 28 días de la primera dosis y 7.4667 a los 43 días de la segunda dosis. La aplicación de la vacuna obtenida promovió la producción de anticuerpos HI contra la enfermedad de Newcastle en palomas susceptibles.

S2-P5**Genetic immunization of chicken for development of specific IgY against bovine interferon-gamma**

Nikbakht Brujeni G, Jalali AH, Tadjbakhsh H, Rabbani M

University of Tehran, Tehran, Iran

AC: Nikbakht Brujeni G (nikbakht@ut.ac.ir)

Interferon-gamma (IFN- γ), a cytokine produced by sensitized T lymphocytes, is known to have an important role in the immune response to many intracellular bacteria via its effect on macrophage activation and induction of class I and class II MHC molecules. It is one of the key cytokines in defining Th1 immune responses. Quantitative evaluation of IFN- γ expression could provide an important tool for investigating immune responses to infectious diseases.

In this study, the bovine interferon gamma gene was cloned from spleen tissue RNA utilizing the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). IFN- γ cDNA was subcloned and expressed in an eukaryotic expression vector (pcDNA3.1(+)). Chicken were immunized by plasmid DNA and egg yolk antibody was extracted from eggs collected after immunization. IgY specific antibodies were evaluated by an antigen capture-ELISA using recombinant IFN- γ . Based on the results, fifty-fold diluted IgY responded up to 10 ng/mL of IFN- γ and developed capture-ELISA detected about 1 ng/mL of IFN- γ concentration.

IFN- γ produced *in vitro* by antigen stimulation of sensitized T lymphocytes, can be measured in ruminant whole blood as a sensitive and specific indicator of *M. bovis* exposure. Successful development of this assay could yield a vital tool for detecting, controlling and eradicating bovine tuberculosis within populations and minimizing risk of transmission.

S2-P6**Generation of a CHO cell line expressing the soluble hemagglutinin H5 of Influenza virus for diagnostic purpose**

Venéreo Sánchez A, González Pose A, Rodríguez Rodríguez E, Sánchez Ramos O

CIGB, Habana, Cuba

AC: *Sánchez Ramos O (oliberto.sanchez@cigb.edu.cu)*

Avian Influenza is a highly contagious viral disease affecting domestic and wild birds. Hemagglutinin (HA) is the main antigenic determinant of the Avian Influenza virus. It has a critical roll in viral pathogenesis and is the most important antigenic target able to raise a bulk of neutralizing antibodies. This characteristic makes the HA protein an attractive protein to its use in diagnostic ELISAs, allowing the antibody detection of infected birds. HA protein has a complex tridimensional structure which can be detrimental for its production in prokaryotes and yeasts systems. The expression of HA in superior cells could solve these problems. Thus, the creation of a cell line expressing soluble HA protein would allow us to have a permanent supply of antigen for a presumptive ELISA. This work describes the generation of a stable cell line expressing HA in the culture medium. With this purpose, the construction of a lentiviral vector containing the HA gen under the control of CMV promoter was carried out. Infective virions were amplified in a permissible cell line and used for the transduction of Chinese hamster ovary cell line (CHO). The clonal selection was made by a sandwich ELISA, in which 96 clones were detected. 6 of them successfully expressed the soluble HA protein at different levels.

S2-P7**Estudio de reformulación del inmunógeno Gavac**

Segura R, Pimentel R, Pérez E, Moreira A, Pérez C, Salinas D, Martínez L, Sardiñas M, Zamora J, González N

CIGB Camagüey, Camagüey, Cuba

AC: Segura R (ruthdaly.segura@cigb.edu.cu)

En el año 2007 la firma comercializadora Seppic decidió reemplazar del mercado el adyuvante Montanide 888 de origen animal, el cual forma parte de la formulación del inmunógeno Gavac, por un nuevo Montanide 888 VG de origen vegetal. En este trabajo se realizó un estudio de reformulación del inmunógeno. Se produjeron 20 L con la formulación actual y 20 L con el nuevo adyuvante, ambos divididos en tres sublotos y analizados por estabilidad mecánica, térmica, tamaño de gotas, viscosidad, potencia e inocuidad. Se compararon los resultados de ambas formulaciones. Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1. Se apreció un incremento en la viscosidad de la nueva formulación en 1.7 veces con respecto a la formulación actual, aunque los valores obtenidos siempre estuvieron por debajo de la especificación establecida. Se demostró mediante un estudio de estabilidad acelerada que la nueva formulación es estable desde el punto de vista gravitacional 5 días a 55 °C y 15 días a 37 °C. Se comprobó que la sustitución del Montanide 888 por el Montanide 888 VG, no varía el costo del inmunógeno Gavac, por lo que resulta económicamente factible su uso en la formulación del inmunógeno. Se obtuvo una formulación que cumple con las características de calidad vigentes para el inmunógeno Gavac.

S2-P8**Recombinant adenoviruses mediated efficient expression of calicivirus capsid protein and induction of an immune response comparable to the virus inactivated vaccine**

Fernández E, Toledo JR, Chiong M, Rodríguez E, Méndez L, Montero C, Farnós O

Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), Habana, Cuba

AC: *Fernández E (erlinda.fernandez@cigb.edu.cu)*

Two adenoviral vectors encoding the VP60 capsid protein from Rabbit Hemorrhagic Diseases Virus (RHDV) were constructed. The antigen expression was detected in cultured mammalian cells and groups of mice were immunized with each vector. In a group intravenously injected with AdVP60 (VP60 expressed without secretion signal), animals showed IgG RHDV-specific antibodies at 7 days post-immunization. Seroconversion was detected at day 14 in 100% of subcutaneously vaccinated mice. Titers of 1/9000 and 1/4000 were reached in about 6 or 9 weeks after intravenous or subcutaneous immunization, respectively. Mice immunized with the AdVP60sec (VP60 preceded by a secretion signal) developed a lower specific IgG response. The response was further evaluated using a competition ELISA, in which inhibition values over 90% were detected at day 28 post immunization in AdVP60-intravenously injected animals. Such levels were found at day 90 in mice subcutaneously immunized. Groups of rabbits were then vaccinated with AdVP60 by subcutaneous or intranasal routes. Inhibition values over 65% were detected 14 days after vaccination. Values over 85%, as those recorded in the positive control group consisting of an RHDV inactivated vaccine, were found in all animals. This response was maintained for one year, in which similar IgG levels were elicited in rabbits immunized by the subcutaneous or intranasal routes. The vectors employed demonstrated their utility to mediate high expression levels of VP60 and induction of an immune response comparable to that induced by inactivated RHDV.

S2-P9**Intact VP60 protein production in *Pichia pastoris* culture supernatant is mediated by the use of the broad specificity inhibitor of proteolysis ShPI-1**

Fernández E¹, Farnós O¹, Joglar M¹, Gil DF², González Y², Mansur M¹, Suárez M¹

¹Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), Habana, Cuba

²Center for Protein Studies, Center of Protein Studies, University of Havana, Havana, Cuba

AC: Fernández E (erlinda.fernandez@cigb.edu.cu)

The VP60 capsid protein of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) was fused to a signal peptide and to a histidine tag at the C-terminal to permit its secretion and its further purification via Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC). The final protein obtained, designated as VP60His, was produced at levels of 80 mg/L in the culture supernatant of *Pichia pastoris* X33 strain. The characterization of the recombinant VP60His by Western blot revealed that the antigen was susceptible to proteolytic degradation. The study of the integrity of this molecule at different times post-induction showed that degradation started at the beginning of protein production and was maintained until the end of the induction process. Different strategies were accomplished to prevent the proteolysis of recombinant VP60His. These approaches included the addition of excipients to the culture medium, the use of a peptidase deficient yeast strain, and the variation of culture conditions although no positive results were obtained. As a last option, we decided to prove the utility of a protease inhibitor, isolated from the anemone *Stichodactyla helianthus*, in preventing VP60His degradation. This molecule, called ShPI-1, has previously demonstrated to be effective against various aspartic, cysteine and serine proteases. A transformed *P. pastoris* KM71H strain that secretes a recombinant variant of ShPI-1 to the culture supernatant was used for our experiments. Three different strategies were evaluated with satisfactory results, as shown by Western blot analysis and the use of a conformational-sensitive monoclonal antibody directed against an external epitope of VP60 native protein.

S2-P10**Creation of a stable cell line expressing the Influenza virus hemagglutinin in its membrane using lentiviral vectors**

Venéreo Sánchez A¹, González Pose A¹, Barrera Valle M², Sánchez Ramos O¹

¹CIGB, Habana, Cuba

²CENSA, Habana, Cuba

AC: *Sánchez Ramos O (oliberto.sanchez@cigb.edu.cu)*

Diagnostic systems are crucial for the surveillance of the H5N1 strain of Avian Influenza virus (AIV) all over the world. Some methods based on the hemagglutinating properties of the virus offer the possibility of revealing the neutralizing antibody against the virus. These hemagglutination inhibition assays require inactivated heterologous strains. The obtaining of these strains is highly expensive because their production process needs high contention facilities and Specific Pathogen Free chicken embryonated eggs. The use of inactivated heterologous strains also may underestimate the results. Homologous strains could also be used for the hemagglutination inhibition assays, but scientists try to avoid them due to the biological risks they provide. Our group is trying to develop a homologous system based on the assembly of the AIV hemagglutinin (HA) in the envelope of the bovine coronavirus Mebus by its amplification in a cell line stably transformed with HA protein using lentiviral vectors. Here we describe the construction of a lentiviral vector with the HA gene and the creation of a stable cell line expressing the HA in the membrane. The extracellular segment of HA gene of the high pathogenicity strain H5N1 (A/Vietnam/1203/2004) was fused to a heterologous transmembrane region and inserted in the lentiviral vector genome. It was used for the transduction of the bovine kidney cell line MDBK. The selection of cellular clones was made by an indirect plate assay of immunoperoxidase, in which 5 clones expressing the membrane hemagglutinin were detected.

S2-P11**Determinación de la estructura genética de tres poblaciones de ganado bovino autóctono cubano a través de la tipificación de RAPD**

Acosta A, Uffo O, Vázquez S, Salazar E

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Acosta A (atzel@censa.edu.cu)

Se utilizó el polimorfismo de 5 primer RAPD de la serie OPA para examinar la estructura genética de tres poblaciones de ganado bovino autóctono cubano. Las poblaciones estuvieron ubicadas en las regiones occidental y oriental de la isla y pertenecen al rebaño genético del país de las razas Siboney de Cuba, Criollo de Cuba y Cebú Cubano. Se estimaron las frecuencias alélicas, se determinaron las relaciones filogenéticas entre las tres razas así como la diversidad intra e inter raza a nivel molecular. El estudio reveló la presencia de patrones de bandas específicos para cada raza en cada uno de los marcadores utilizados, con elevado PIC indicativo de la elevada variabilidad genética existente en cada uno de los rebaños. Se comprobó que los rebaños Siboney de Cuba y Criollo de Cuba se encuentran más cercanos genéticamente entre sí y más alejados del Cebú, lo que se corresponde con el origen de las tres razas. El estudio de marcadores RAPD contribuirá además de la caracterización de poblaciones, al establecimiento de estrategias de manipulación y conservación de los genofondos pecuarios locales.

S2-P12**Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari:Ixodidae) dog tick**

Pérez Pérez D¹, Bechara G², Zacarias R², de Andrade G², del Vecchio R², Suárez M¹, Vargas M¹, Farnós O¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba

²Universidade Estadual Paulista-UNESP, Jaboticabal, Brazil

AC: Pérez Pérez D (danny.perez@cigb.edu.cu)

The antigen Bm86 has been used to control ticks of *Boophilus* genera. Taking into account that recent studies of molecular phylogeny showed evidences that the *Rhipicephalus* genera includes all five *Boophilus* species, it was aimed to investigate the efficacy of this antigen on the *Rhipicephalus sanguineus* biotic potential by vaccinating dogs with Bm86 and challenging them with the ectoparasite. Eight dogs were divided into two groups of four animals each: non-vaccinated and vaccinated. The latter was given two doses of 50 mg of antigen at 21 days interval; the other group was given placebo. Each dog was challenged 21 days after the last dose of antigen or placebo with 250 larvae, 100 nymphs and 55 adults released inside feeding chambers glued to its shaved flank. The effect of the treatment was evaluated by determining some biological parameters of ticks. Moreover, sera were collected from dogs in several times after the last dose and used for Elisa-antibody detection. Yielding rates of larvae, nymphs and adult females fed on vaccinated animals were significantly ($p < 0.05$) decreased by 38%, 29% and 31%, respectively, when compared with non-vaccinated dogs. Significant reductions were also observed for engorged female and egg mass weights and ERCE, but not for hatch rate, of ticks fed on vaccinated dogs. Elisa data revealed a significant increase in optical densities of sera from vaccinated animals compared to the non-vaccinated ones. It can be concluded that the antigen Bm86 administered to dogs interferes on the viability and biotic potential of the *Rhipicephalus sanguineus*.

S2-P13**Assessing approaches for improved purification and aggregation diminishment of multimeric RHDV VP60 protein expressed in *P. pastoris*: Long term follow-up of immunogenicity in vaccinated rabbits**

Fernández E¹, Farnós O¹, Chiong M¹, González EM¹, Joglar M¹, Méndez L¹, Rodríguez E¹, Alfonso P², Suárez M¹, Rodríguez MP¹

¹Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), La Habana, Cuba

²National Center for Animal and Plant Health (CENSA), La Habana, Cuba

AC: *Fernández E (erlinda.fernández@cigb.edu.cu)*

In this work, we describe the assessment of purification strategies for recombinant VLPs of rabbit hemorrhagic disease virus VP60 capsid protein expressed in *P. pastoris*. We have approached VLP purification by a single size-exclusion chromatography step, and have tested a wide range of pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0) in buffers used for yeast cells disruption procedure and for the chromatographic step itself. We found that at pH 4 and 7, a maximum recovery of the recombinant protein could be achieved without distorting the expected chromatographic pattern. We have also screened a number of excipients for their ability to inhibit aggregation of RHDV VLPs. After these studies, it was corroborated the preservation of native conformational epitopes and the particulate nature of the VLPs. Protein purified at pH 7.0 was used for immunization experiments aiming to evaluate the long-term induction of specific immune responses in rabbits. An immunization trial was conducted in which the soluble VP60 was employed by subcutaneous (s.c.) injection either purified by the single chromatographic step or contained within raw disruption supernatant, emulsified in Montanide 888. The earliest IgG response, titers and persistence of antibodies were studied by competition ELISA and hemagglutination inhibition assays. All rabbits immunized developed a strong RHDV-specific response (including the «RHDVa» subtype) that lasted up to two years after the primary immunization. In overall, the immune response was similar to that induced by VP60 expressed in insect cultured cells and superior to the response elicited with an inactivated RHDV.

S2-P14**Development and validation of an Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay for anti – rBm86 antibodies detection in bovine serum samples**

Machado H, Joglar M, Montero C, Sánchez D, Suárez M

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Machado H (hector.machado@cigb.edu.cu)

An Indirect Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed and validated for detection of antibodies in bovine immunized with recombinant Bm86 antigen serum samples. This study was based in the methodology of evaluating of antibodies generated for vaccine, NC – 376-2004 and Regulation 47-2007. The diagnostic sensibility and diagnostic specificity of the quantitative test were assessed on 98.31% and 100% in sera collected on different farms of production conditions. Based on these results, the screening dilution of the indirect ELISA was adjusted to 1:500 and 1:1,000 final dilutions. Compared to the indirect ELISA described before, this new ELISA showed more specificity and results are obtained faster. Because sera are tested in two dilutions, the test is highly suitable for the evaluation of large number of serum samples.

S2-P15**Evaluation of immunochromatography test for serological diagnostic of anti rBm86 antibodies in sera and blood samples of cattle immunized with Gavac™**

Machado H, Joglar M, Torres E

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Machado H (hector.machado@cigb.edu.cu)

Bovine immunized with the anti-tick Gavac immunogenic showed protection against *Boophilus microplus* and also a correlation between Bm86 antibodies titers and protection. The system is based in the use of coated nitrocellulose strips with the recombinant Bm86 antigen. The strips are incubated for several minutes and the antibodies captured are detected with Bm86-colloidal gold conjugate and evaluated for detection of anti Bm86 antibodies in sera and blood samples of cattle immunized with Gavac™ (Heber Biotec, S.A). The clinical sensibility obtained in blood samples was 85.98% and serum samples was 96.72% and clinical specificity obtained in blood samples was 96.50% and serum samples was 98% of the qualitative test. The efficacy was 79.22% in blood sample and 88.86% in serum sample. The concordance study between immunochromatography test and ELISA system was 0.76 in blood samples and 0.84 in serum sample. This test does not require any equipment and results can be visualized in 10 minutes. The minimum antibody titers detect by this system is 1:640.

S2-P16**Impacto de la aplicación de inmunógeno Gavac en la región del Tolima, Colombia**

Constanza N, Machado H, López E, Redondo M, Acosta A, Borroto C

CIGB, Ciudad de la Habana, Cuba

AC: Constanza N (momav@hotmail.com)

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus microplus)* es en la actualidad uno de los parásitos que más pérdidas provoca en las explotaciones bovinas, teniendo en cuenta los cuantiosos daños que ocasiona. El inmunógeno GAVAC™, es parte activa del programa de Control Integral de lucha contra este vector y ha sido aplicado con gran éxito en la Hacienda Santa Cruz, en la región del Tolima, en un período de 13 años. Como resultado de esta aplicación se ha logrado reducir la frecuencia de baños en ganado en lactación a un promedio de un baño cada 159 días, lo cual es equivalente a realizar 2.29 baños / año y en ganado Horro es de un baño cada 267 días, lo que es equivalente a realizar 1.3 baño al año. En estos momento la hacienda Santa Cruz se encuentra realizando un baño cada 212 días, lo que equivale a realizar 1.81 baños / año. La incidencia de enfermedades hemoparasitarias y las muertes por esta causa a medida que avanzaba la aplicación del programa y se controlaba la población de garrapatas en el pasto ha tenido una significativa reducción, contribuyendo a establecer una estabilidad enzootica. Los niveles de prevalencia de hemoparásitos en animales adultos es menor del 0.5%, al realizar los análisis serológicos lo cual es un impacto económico positivo para la ganadería lechera.

S2-P17**Avian CD154 enhances humoral and cellular immune responses induced by an adenovirus vector-based vaccine in chickens**

González Pose A¹, Noda Gómez J², Toledo Alonso JR¹, Vega Redondo A², Díaz Archer D¹, Borroto Nordelo C¹, Venéreo Sánchez A¹, Sánchez Ramos O¹

¹CIGB, Habana, Cuba

²CENSA, Habana, Cuba

AC: Sánchez Ramos O (oliberto.sanchez@cigb.edu.cu)

The use of adenoviral vector based vaccines in poultry provides an opportunity to introduce vaccines that are, arguably, the most rapid and achievable ever developed. However, a very important criterion for an ideal vaccine in veterinary medicine is its low cost. This issue is especially important in developing countries and even more for poultry vaccination, where each vaccine dose should be sold for a few cents. The objective of this study was to test the ability of chicken CD154 to enhance the immunogenicity of an adenoviral vector-based vaccine against avian influenza virus in order to reduce the amount of antigen required to induce an effective immune response in chickens, and thus to reduce the costs of a single vaccine dose. The immune response in chicken vaccinated with three different doses of the adenoviral vector AdHA or AdHACD was assessed by determination of hemagglutination inhibition (HI) antibodies and relative quantification of IFN- γ as a key molecule secreted by Th1 differentiated lymphocytes. The results of the humoral immune response indicate that the adenoviral vector encoding for HA fused to CD154 is about 50-fold more immunogenic than its counterpart encoding for HA alone. The adenoviral vector encoding for the chimeric protein rendered also an improved cellular immune response as determined by the antigen-specific production of IFN- γ after an *in vitro* recall with the AdHA vector. These results show for the first time that CD154 has significant potential as molecular adjuvant for chimeric vaccine against infectious diseases in chicken.

S2-P18**Virtual sensor for biomass estimation in feed batch fermentations, using an Artificial Neural Network with GMDH algorithm**

Hernández F¹, Zamora J², González N², Herrera F³

¹Universidad de Camagüey, Camagüey, Cuba

²CIGB , Camagüey, Cuba

³Universidad de Santa Clara, Santa Clara, Cuba

AC: *HERNÁNDEZ F (lozano@cmw.ecasa.avianet.cu)*

One of the most important parameters in a fermentation process is the biomass concentration. The growth and behavior of the cells during this process depend largely of the chemical composition and the environment around their culture. The on-line, exact and continuous determination, of this parameter is one of the «main dreams» in biotechnology. The Virtual Sensors (Soft-Sensors) constitute a solution applying the principle of the inference. The Artificial Neural Networks (ANN) promotes the development of these sensors when applying models that emulate the behavior of biological neurons. In this work a virtual sensor that allows the estimation of biomass in a feed-batch fermentation process, using a new ANN model based in the Group Method of Data Handling (GMDH) algorithm was designed. The proposed architecture introduces neurons represented by a polynomial of third order with a sigmoidal function of exit and use a feedback loop. The steps for the training of the ANN use a regularity criterion that allows the optimization of the net and obtain a reduction of the computational cost. For the training only two data sets are needed, taken of the standard fermentations. How study case the data of the *Pichia pastoris* yeast fermentation for the Gavac® production was used. The performance of the obtained pattern is compared with other models as BackPropagation, Elman and others. The obtained results demonstrate their estimate capacity.

S2-P19**The antibodies against antigen Bm86 diminish the recovery of immature instars and adult of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari:Ixodidae) dog tick**

Suárez M, Vargas M, Pérez D, Sánchez D, Montero C, Machado H, Cabezas A, Chiong M

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Suarez M (marisela.suarez@cigb.edu.cu)

Rhipicephalus sanguineus, best known as the brown dog tick, is widely spread in the world and is an important source of diseases for humans and dogs. Taking into account the control over it is very difficult since is a three-phase species and the *Boophilus microplus* infestations have been successfully controlled using the Bm86 antigen, we proposed to evaluate if this antigen affect the biotic potential and diminish the infestations of *R. sanguineus* ticks. Another aim was to compare the Bm86 sequence with its homologous in the *R. sanguineus*. For this mean, Beagles dogs (n=6) were divided in two groups of three animals each: immunized and non-immunized. Following, immunized group was inoculate twice (0 and 4 week) with 50 µg of the antigen Bm86 as part of an experimental formulation and non-immunized with equal formulation without the antigen. Each dog was challenged 15 days after the last dose with antigen or placebo using 250 larvae and 55 adults (30 female and 25 male). Yielding rates of larvae and adult females fed on immunized animals decreased by 67 and 49%, respectively, when compared with non-immunized dogs being significantly ($p = 0.0126$) only for immature instars. Significant ($p < 0.001$) reductions were also observed for hatch rate (86.31%), but not for engorged female and egg mass weights, of ticks fed on immunized dogs. We can conclude that the antibodies induced in dogs with the formulation containing Bm86 cause a decrease in the population affecting the viability and biotic potential of the *R. sanguineus* tick.

S2-P20**Physical and thermal stability of an oil-based vaccine formulation containing recombinant virus like particles of the VP60 capsid protein from rabbit hemorrhagic disease virus**

Farnós O¹, Fernández E¹, Toledo JR¹, Barrera M², Hernández GR¹, Montero C¹, Sánchez D¹, Machado H¹, Méndez L¹, Alfonso P²

¹Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), La Habana, Cuba

²National Center for Animal and Plant Health (CENSA), La Habana, Cuba

AC: Farnós O (omar.farnos@cigb.edu.cu)

Recombinant virus-like particles (VLP) resembling rabbit hemorrhagic disease virus were expressed at high levels in *Pichia pastoris* disruption supernatant. The multimers were purified by sec-HPLC and adjuvanted in Montanide 888. The thermal stability of the formulation was assessed by incubating the final emulsion at 4 °C, 37 °C, 48 °C or 60 °C for one week. After comparing physicochemical properties from stressed and not stressed vaccine formulations, differences in the viscosity were recorded. However, the conformational structure of the antigen recovered from each sample was maintained in all formulations as evidenced by the use of conformational-sensitive monoclonal antibodies and electron microscopy, except in the case of the treatment at 60 °C, in which denaturation and particle disassembly was found. Size-exclusion chromatography did also show slight differences in the pattern of the eluted protein. The immunogenicity of the formulations containing the recombinant VLPs was also maintained for formulations treated at 4 °C, 37 °C and 48 °C. Rabbits immunized with two doses of 50 µg developed a rapid and potent IgG specific immune response that was detected by competition ELISA at day 14 post-immunization. Inhibition values over 85% were detected until the last determination practiced, at day 90 of the experiment. This result supports as well the practical value of this vaccine preparation for those regions in which cold-chain related issues tend to affect the immunogenicity and protective capacity of conventional virus attenuated vaccines.

S2-P21**Development of an ELISA for the detection of recombinant virus E2 protein of classical swine fever**

Santana Rodríguez E¹, Méndez L¹, Torres E¹, Pérez S¹, Blanco R¹, Barrera M², Suárez M¹, Sánchez O¹

¹Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba

² National Center for Animal and Plant Health, Havana, Cuba

AC: Santana Rodríguez E (elaine.santana@cigb.edu.cu)

The Classical Swine Fever (CSF) is a contagious and often fatal disease that affects both domestic and wild pigs. Glycoprotein E2 is considered the most immunogenic viral protein because of its ability to induce a response of neutralizing antibodies against VPPC in pigs. That's why there have been several attempts to produce E2 as a vaccine antigen, but the molecule has a high degree of complexity which make difficult its production in the commonly used expression system (bacteria, yeast and insect cells). That's why we assumed the challenge of expressing this molecule in the mammary gland of goats. The glycoprotein was obtained as homodimer of 120 kDa with a high degree of purity after chelate affinity Chromatography in Agarose Ni-NTA column. The presence of E2his in each of these samples was determined by western blotting tests and ELISA. The purified protein was used to obtain three monoclonal antibodies that recognized the protein in its native form. These antibodies were combined with the horseradish peroxidase and studies were undertaken to achieve the best combination and design a trial-type sandwich ELISA for the protein quantification and to make a proper monitoring of the process. These trials allow us to select the day of milk collect with significant levels of E2his (usually between 1 and 8 days post-infusion).

S2-P22**Implementación de ensayos de PCR para la detección de organismos genéticamente modificados (OGM) en la cadena agroalimentaria**

Martínez S, Corona B, Hernández Y, Uffo O

CENSA, Habana, Cuba

AC: *Martínez S (siomara@censa.edu.cu)*

A partir de los años 80, la aplicación de nuevas biotecnologías suscita la enorme polémica en que se encuentra sumergida la utilización o no de los denominados productos transgénicos u organismos genéticamente modificados en la elaboración de alimentos. Se debe tener en cuenta que para cada OGM deben ser tratados separadamente la evaluación de bioseguridad, y el método de detección, además de que existen OGM que su uso no está autorizado. Cuba necesita contar con tecnologías comprobadas que permitan la detección y el monitoreo de los OGMs para la trazabilidad de alimentos, para el monitoreo de los productos que se importan en el país, así como para comprobar la identidad de productos a exportar según las regulaciones internacionales. El objetivo del presente trabajo ha sido desarrollar sistemas de PCR para el monitoreo de OGM contribuyendo de ese modo a la seguridad alimentaria de la población y a la protección del medio ambiente. Para ello se pusieron a punto ensayos de PCR para la amplificación del gen endógeno de soya y maíz, así como para la amplificación del promotor P35 y el terminador Tnos en semillas y alimentos elaborados. Estos resultados preliminares sientan las bases para la detección de secuencias transgénicas en nuestro laboratorio para lograr el monitorio de los OGM.

S2-P23**Experiencia de Cuba en el diagnóstico de MOLLICUTES en animales y productos biotecnológicos de aplicación biomédica**

Lobos E, Hernández Y, Lozada YL, Martínez S

CENSA, Habana, Cuba

AC: Lobos E (elobo@censa.edu.cu)

Desde 1998 el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) ha venido desarrollado la temática de diagnóstico de micoplasmas en animales, productos biotecnológicos y plantas. En la salud animal, las infecciones por micoplasmas producen pérdidas económicas en el orden de los millones de dólares y en la rama biotecnológica es obligatoria su detección en productos biofarmacéuticos de aplicación biomédica. El Laboratorio de Diagnóstico de Micoplasmas (MYCOLAB) del CENSA ha desarrollado un sistema de gestión de la calidad encaminado a brindar un diagnóstico seguro y de alta calidad. Como resultado del trabajo en todos estos años se ha podido identificar y caracterizar aislados de micoplasmas en diferentes especies de animales, permitiendo conocer la situación de estas entidades en el país y el desarrollo de programas de control para las mismas. Otros de los resultados ha sido el diagnóstico de micoplasmas en productos biofarmacéuticos, en tal sentido MYCOLAB ofrece servicios científico-técnicos a centros del Polo Científico en el diagnóstico de estos microorganismos en productos finales y en controles de procesos, permitiendo la liberación de importantes productos de la biotecnología cubana. Este laboratorio desarrolla su trabajo cumpliendo los requisitos de Buenas Prácticas de Laboratorio, basado en un Sistema de Calidad bajo normas ISO/IEC 17025 para laboratorios acreditados, cuenta con técnicas validadas como el cultivo microbiológico, la hibridación de ácidos nucleicos y el PCR, Manual de la Calidad y 52 Procedimientos Normativos operacionales, además de la participación en estudios interlaboratorios con resultados satisfactorios, lo que avala su competencia técnica.

S2-P24**Obtención de un prebiótico basado en β 1-3 glucano particulado lineal para su empleo por vía oral: influencia sobre indicadores de la respuesta inmune y productivos en las aves**

Pedroso JM, Lavielle DM, Soler HC, Pérez A, M Camps D

CENSA, Habana, Cuba

AC: *Pedroso J M (pedroso@censa.edu.cu)*

Se obtuvo una suspensión de β 1-3 glucano particulado lineal (Glutave), con un año de estabilidad a la que se le establecieron los indicadores de calidad, es aceptada por los pollos y no afecta la digestibilidad.

El tratamiento estimula la respuesta inmune a las vacunas Newcastle incluso con ½ dosis y Gumboro, en este último caso con respuesta temprana a los 6 días post –vacunación, caracterizada por un coeficiente de variación por debajo de 30, 100% de respuesta en los tratados y título de hasta 6 000 unidades IDDEX en este momento evaluativo. El tratamiento favorece la expresión de caracteres productivos e indicadores de salud en pollos de engorde y la viabilidad y puesta en gallinas ponedoras tratadas al reemplazo o en el momento del pico de puesta.

En todas las evaluaciones con una aplicación de 10mg/kg se obtiene estimulación de los indicadores evaluados con la excepción de las gallinas tratadas a las 32 semanas que dan mejores resultados con dos aplicaciones, los resultados se obtuvieron con una relación costo-beneficio favorable.

Este producto fue evaluado en Italia con pollos Coob en las condiciones de crianza de Italia. Se obtuvo un incremento significativo de la viabilidad durante los primeros 21 días de crianza de los pollos tratados respecto a los controles. Frente a un fallo con vacuna Gumboro se obtuvo una sobrevivencia de 51% en los pollos tratados con Glutave, tanto con una o dos aplicaciones frente al 40% de los testigos.

S2-P25**RT-PCR multiplex assay for the detection and differentiation of pestivirus infections in pigs**

Díaz de Arce H, Pérez LJ, Frías MT

CENSA, Habana, Cuba

AC: Díaz de Arce H (heidy@censa.edu.cu)

Viruses that comprise the *Pestivirus* genus cause significant losses to the livestock industry worldwide. Classical swine fever (CSF) is the most important pestivirus disease, one of the most important viral pathogen in pigs, and its control and prevention are of worldwide concern. All pestivirus species can infect pigs, therefore accurate and rapid pestivirus detection and differentiation is of great importance for the development of control measures in swine farming. Most of all because the clinical picture caused by ruminant pestivirus infections in pigs can suggest chronic CSF.

The development and evaluation of a novel multiplex, highly sensitive and specific

RT-PCR for the simultaneous detection of pestivirus and the differentiation of classical swine fever virus in clinical samples is described. The universal and differential detection was based on primers designed to amplify a fragment of the 5' non coding genome region and a fragment of the NS5B gene respectively.

The assay proved to be highly specific when different pestivirus species strains and pigs virus were evaluated. The analytical sensitivity was estimated to be as little as 0.89 TCID₅₀/50 µL. The assay analysis of 33 tissue homogenate samples from naturally infected and non CSF infected animals and 38 serum samples from experimentally infected pigs evaluated as part of two European Inter-laboratory Comparison Tests conducted by the Community Reference Laboratory (CRL), Hannover, Germany proved the potential usefulness of these methods for rapid, sensitive and specific pestivirus diagnosis from swine clinical samples.

S2-P26**Development and evaluation of PCR assays for the detection of pseudorabies and encephalomyocarditis viruses in clinical samples**

Díaz de Arce H, Pérez LJ

CENSA, Habana, Cuba

AC: *Díaz de Arce H (heidy@censa.edu.cu)*

Pseudorabies and encephalomyocarditis viruses (PRV, EMCV) are both important porcine pathogens leading to severe economic losses in swine industry all over the world. In addition, the detection of both PRV and EMCV viruses is important in screening pig specimens collected for xenotransplantation. The conventional diagnostic procedures for these viruses are time-consuming therefore a rapid and accurate diagnosis of these infections is needed for the initiation of appropriate control strategies in affected herds not only because of the economic losses caused by them but also because of PRV and EMCV must be considered in the differential diagnosis of important transboundary diseases.

The development, optimization and evaluation of a polymerase chain reaction (PCR) and a reverse transcription followed by PCR (RT-PCR) tests are presented for the diagnosis of PRV and EMCV infections respectively. PRV and EMCV specific primers were designed using the Oligo 6.31 program based on highly conserved nucleotide region of both viruses. A BLAST search was performed against nucleotide databases of different related virus and random nucleotide sequences. PCR products of the expected size were obtained from PRV and EMCV strains in each case. Non-specific reactions were not observed when heterologous viruses and uninfected cells were used to assess the tests. The analytical sensitivity was estimated to be as little as 1.34 and 2 TCID₅₀/50 µL for PRV and EMCV assays respectively. The analysis of tissue homogenate samples from naturally infected animals proved the potential usefulness of these methods for a rapid diseases diagnosis from field cases.

S2-P27**Caracterización de cepas de *Salmonella enteritidis* para el control de roedores**

González HRM, Ramírez M, Capo V, Fraga J

LABIOFAM, C. Habana, Cuba

AC: Gonzalez H R (labiofam@ceniai.inf.cu)

Salmonelosis es una zoonosis que es causa importante de infecciones en el hombre y en animales domésticos, producidas por el género *Salmonella* que incluye a más de 2 400 serotipos (1, 2, 3), teniendo en cuenta que los Rodenticidas Biológicos que son utilizados en la actualidad tienen como componente activo una *Salmonella enteritidis*, se hace imprescindible la formulación de criterios que demuestren las particularidades genéticas que las diferencian entre sí, mediante la utilización de métodos de tiraje por Biología Molecular como la determinación del perfil plasmídico RAPD-PCR (4 y 5), así como comprobación bioquímica y serológica, prueba de susceptibilidad antimicrobiana, estudio macroscópico y microscópico de los órganos internos, patogenicidad en ratas Wistar y ratones Balb/c.

Se realizó la caracterización de las cepas de *Salmonella enteritidis* utilizadas en el control de roedores: *Salmonella enterica*, subespecie *enterica*, serotipo Enteritidis variedad Danysz lisina negativa, fagotipo 6^a (componente activo del rodenticida Biorat), *S. enterica* subespecie *enterica*, serotipo Enteritidis 7/30, grupo D (mongolia), *S. enterica*, serotipo Enteritidis (cepa de referencia), y de cepas de *S. enteritidis* que provocaron brotes de salmonelosis humana en Cuba, se logra una diferenciación entre cada una de las cepas, corroborando que las pruebas utilizadas son una herramienta indispensable para la diferenciación de cepas y aportan información importante desde el punto de vista epidemiológico.

S2-P28**Manual de necropsias de aves domésticas**

Colas Chávez M, García Fumero AJ, Merino López A, Sánchez Prieto A, Corea de la Rosa A, Bacallao Marrero E, Reyes López I, Mojena Suárez K

Instituto de Investigaciones Avícolas (LIDA), Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Colas Chavez M (lidaiia@ceniai.inf.cu)

Con el objetivo de obtener resultados rápidos y eficaces en los laboratorios de diagnóstico aviar, diseñamos un manual multimedia que describiera gráfica y secuencialmente el conjunto de procedimientos que se deben realizar para ejecutar adecuadamente las necropsias y tomar una conducta diagnóstica (toma, conservación y envío de muestras) a los laboratorios especializados. Este producto consta de una descripción metodológica de todos los pasos comprendidos en la necropsia y de la conducta diagnóstica. Contiene más de 80 fotografías originales y 4 clip de video ilustrativos. Se elaboró para computadoras personales con un enfoque eminentemente didáctico y metodológico, utilizando el software freeware: eLibrary v.3.5 (www.dvdcatalogues.co.cu) y Web Album Generator v.1.8.2 (www.ornj.net). Es ejecutable en cualquier versión de Windows, no requiere instalarse en las computadoras para su ejecución. Resulta de utilidad para elevar el conocimiento del personal técnico y profesional de las empresas avícolas de la Unión del Combinado Avícola Nacional, y los centros productores de animales de laboratorio y de instituciones relacionadas con la crianza de aves.

S2-P29**DNA fingerprinting of *Helicobacter pylori* J99 strain by Pulsed Field Minigel Electrophoresis**

Torres L, López Y, Rodríguez BL, Riverón AM, López-Canóvas L

CNIC, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Torres L (lino.torres@cnic.edu.cu)

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) had been used for genetic characterization of *H. pylori* isolates, but procedures for its characterization in miniPFGE using Mini Contour Clamped Homogeneous Electric Field (miniCHEF, Guefast-06) have not been developed before. There are others *Helicobacter* species, that infects stomach of several animal species, and potentially colonize stomach human too. This study was made to establish the genomic profile of *H. pylori* J99 reference strain in Guefast-06 system. Complete genome of J99 was analyzed with NTI-Vector8 software to obtain its virtual DNA fingerprints. We analyzed several restrictions enzymes (*Apa* I, *Csp* I, *Kpn* I, *Not* I, *Xho* I) and *Not* I was selected, due to the number and size of bands obtained. The virtual band pattern of J99 was simulated by homemade software and the required electrophoretic conditions for the miniPFGE were predicted. Immobilized samples were incubated in an enzymatic solution over night and further treated with *Not* I enzyme; DNA macrorestriction fragments of J99 were resolved in Guefast-06. The electrophoretic pattern of J99 perfectly matches with the in silico predicted fingerprint. This is the first experimental procedure for *H. pylori* genetic characterization by Guefast-06, and probing the usefulness of this methodology for comparing genotypic profile between species from *Helicobacter* genus, infecting human and animals.

S2-P30**DNA immunization using different routes of administrations of DNA in chicken**

Tadjbakhsh H, Nikbakht Brujeni G, Emam M, Jalali A

University of Tehran, Tehran, Iran

AC: *Tadjbakhsh H (htaj@ut.ac.ir)*

Immunization strategy involving DNA plasmid vaccination has been reported to elicit humoral and cellular immune responses in chicken. The procedure allows for safe and persistent production of antibodies. Low cost, feasibility and compatibility for designing specific epitopes of antigens expressed from plasmid vaccines provides a useful tool for genetics and proteomics studies. Nevertheless, DNA immunization often does not produce the same level of antibody production as conventional protein immunization. One solution is to modify the route of immunization.

The present study was to compare different routes of administrations (intradermal tattoo versus intramuscular injection) of DNA vaccine encoding bovine IFN γ as a model antigen to produce specific antibodies in chickens. Immune responses were detected after two intradermal tattoo and intramuscular injection with 50 μ g and 200 μ g plasmid DNA, respectively. DNA tattoo immunizations induced significantly higher IFN γ -specific humoral immune responses than intramuscular DNA injections.

Delivery of plasmid DNA by tattoo in chickens is more effective than the alternative of intramuscular injection, which has so far been shown to have only limited efficacy. When more rapid and low cost immunization is desired, tattoos may provide the best choice for route of immunization.

S2-P31**Bioinformatic strategy for grouping strains of *Staphylococcus* and *Streptococcus* according to their genera using virtual pulsed field gel electrophoresis**

Cárdenas Y, Rodríguez W, López Y, López-Cánovas L, Riverón AM

Cuban Center for Neurosciences, Havana City, Cuba

AC: López Y (yaumara@cneuro.edu.cu)

Infectious diseases caused by microorganisms of *Staphylococcus* and *Streptococcus* genera have a high incidence in cattle and pigs. These bacteria share some pathogenic mechanisms which can trigger concomitant infections. Then, it would be useful to develop a strategy for undoubtedly discriminate clinical isolates of microorganisms from both bacterial genera.

We have developed a bioinformatic strategy based on DNA molecules analysis which allows grouping *Streptococcus* and *Staphylococcus* strains according to its genus. For this purpose all genomic sequences of these genera were downloaded from the European Bioinformatic Institute database. DNA sequences were virtually analysed with the software Simpulsetype. Different restriction enzymes were used and the DNA bands patterns that would be obtained in real experiments using a CHEF chamber were predicted. DICE coefficient was used to calculate distances between DNA bands patterns of studied strains employing the software GuefastScan. The same procedure was performed experimentally using four bacterial strains, two of each genus and DNA bands patterns were obtained in the miniCHEF Guefast06 chamber at the conditions predicted in silico.

Virtual and real experiments revealed that the DNA macrorestriction fragments obtained with Smal-Sfil enzyme combination gave useful information for grouping *Streptococcus* and *Staphylococcus* strains according to their genera.

S2-P32**Nonenzymatic preparation of *Salmonella* genomic DNA and rapid macrorestriction analysis by contour clamped homogeneous electric field electrophoresis**

Corrales F¹, Cárdenas Y¹, Garrido Y¹, Águila A², Niubo E¹, Riverón AM¹, López-Cánovas L¹

¹Cuban Center for Neurociences, Havana City, Cuba

²Pedro Kourí Institute for Tropical Medicine, Havana City, Cuba

AC: López-Cánovas L (llc@cneuro.edu.cu)

Salmonellosis is an economically important disease of pigs which causes the swine industry substantial losses annually. Its etiological agents are *Salmonella* spp. bacteria. Subtyping *Salmonella* strains isolated from infected pigs and contaminated environment is a helpful tool for identifying infection sources and allows the development of targeted prevention measures at farm level. *Salmonella* is an important source of foodborne illness in humans. Its effective control permits not only to increase herd's health, but also to reduce the amounts of this pathogen carried into the pork production chain. Contour Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis (CHEF) has been used internationally for molecular subtyping of *Salmonella* spp. The fastest CHEF protocol for *Salmonella* subtyping takes from 24 to 28 hours to be completed.

Here, we have developed a more rapid protocol for *Salmonella* serotype Braenderup H9812. Briefly, cells included in agarose miniplugs were lysed and deproteinized by incubation in a single enzyme-free solution. Genomic DNA was digested with 10 units of *Xba*I and fragments were separated in 5.33 hours by mini-CHEF electrophoresis at 10 V/cm. Mini-CHEF macrorestriction analysis took around 9.5 hours, including sample preparation. Different times were evaluated for DNA restriction and cells lysis/deproteinization. «One hour lysed»-»one hour digested» samples rendered bands patterns of sufficient quality to be properly interpreted.

This nonenzymatic sample preparation method is an economic alternative compared to expensive enzymatic protocols used worldwide for *Salmonella*. Our mini-CHEF results are comparable to those obtained by standardized protocols and can be accomplished three times faster.

S2-P33**Genetic characterisation of rabies viruses involved in a recent outbreak in Mpumalanga province (eastern South Africa)**

Sabeta C¹, Zulu G², Ngoepe E², Du Plessis B¹, Reninghaus B¹

¹Animal Health Services,, Nelspruit, South Africa

²Onderstepoort Veterinary Institute, Pretoria, South Africa

AC: Sabeta C (SabetaC@arc.agric.za)

Rabies virus (RABV) is the type species and genotype 1 member of the *Lyssavirus* genus (*Rhabdoviridae* family) and is composed of seven genotypes (1-7). Genotypes 1-4 are exclusively encountered in Africa. In southern Africa though and within genotype 1 are two recognized biotypes, namely the mongoose and canid rabies variants, independently maintained and transmitted by species of the *Herpestidae* and *Canidae* families respectively.

In this investigation, a panel of 25 rabies viruses recently recovered from domestic dogs (and of the canid biotype) from eastern South Africa were genetically characterized by sequencing 850bp-amplicons of the cytoplasmic domain of the glycoprotein gene and the G-L intergenic region. The nucleotide sequences of these viruses together with other previously characterised viruses from other parts of the country were analysed to assess their phylogenetic relationships and establish the exact origin of the recent rabies outbreak in the Nelspruit district of Mpumalanga. Phylogenetic analysis showed that the rabies viruses in this study sample belonged to a single cluster with a 100% sequence homology. These data suggest a single and very recent introduction of the viral infection into the dog population of Nelspruit from the adjacent Nkomazi district.

Dog rabies cycles prevail in densely populated communal areas including Nkomazi in eastern Mpumalanga and have thus emerged to become of much greater public and veterinary health significance in this country. Hence, control strategies including parenteral vaccination of dog populations are an urgent requirement towards the effective control of this fatal zoonotic disease in South Africa.

S2-P34**Estudio de la eficacia de un inmunosuero polivalente contra las principales enfermedades infecciosas del perro**

Guerra T, Contreras D, del Toro Y

Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM), Boyeros, Cuba

AC: Guerra T (labiofam@ceniai.inf.cu)

Se hiperinmunizó un bovino para obtener un suero hiperinmune con fines terapéuticos. La inmunización se realizó mediante un esquema de tres aplicaciones con intervalos de 14 días y luego de un reposo de 30 días se realizó una cuarta inmunización, 30 días después se realizó la sangría. El suero obtenido después de inactivado y filtrado fue preservado con mertiolato sódico. La potencia del inmunosuero fue evaluada por el método de seroneutralización en embriones de pollo para la valencia de moquillo, en células de línea MDCK para la valencia de hepatitis y células de línea CRFK para la valencia de parvovirus. La inocuidad fue realizada en perros beagles de 45 días de edad y cobayos de 250-300 g de peso, y ratones de 17-22 g para probar la ausencia de toxicidad. El resultado de la potencia fue de 103.16 DP50/ml para la valencia del parvovirus, 103.28 DP50/mL para el moquillo y 102.50 DP50/mL para la valencia de la hepatitis. La eficacia en perros fue comprobada en la clínica central de animales afectivos de Ciudad de La Habana en 20 casos clínicos de moquillo canino, obteniéndose la recuperación en 18 de los casos para un 90% de efectividad, 25 cachorros enfermos con gastroenteritis hemorrágica, de los que se recuperaron totalmente 20 casos para un 80% de efectividad, y tres casos de hepatitis los cuales fueron recuperados. A partir de estos resultados consideramos que el inmunosuero obtenido en bovino tiene capacidad terapéutica para combatir estas enfermedades en la especie canina.

S2-P35**Utilización de la cámara miniTAFE para la separación de los macrofragmentos de restricción del genoma de bacterias**

Garrido Nicot Y, León Arcia K, Riverón Rojas AM, López Cánovas L

Cuban Center for Neurosciences, Havana City, Cuba

AC: Garrido Nicot y (guanty@cneuro.edu.cu)

Los sistemas actuales de vigilancia epidemiológica se nutren de la información aportada por las técnicas de tipificación molecular, basadas en el análisis del ADN de los microorganismos, para identificar las cepas responsables de brotes infecciosos, determinar el flujo de los patógenos e identificar la fuente de la infección.

La electroforesis de campos pulsados (ECP) se considera el estándar de oro de la tipificación molecular porque permite la obtención de las huellas digitales del genoma bacteriano en un solo experimento. Las cámaras de ECP pueden ser de tipo CHEF ó TAFE en dependencia de la disposición de sus electrodos, pero la única utilizada en la tipificación bacteriana es la cámara CHEF. Sin embargo, en esa cámara en ocasiones se dificulta la comparabilidad intra e interexperimental de los resultados, debido a las distorsiones de los patrones de bandas que le son inherentes.

En este trabajo se determinaron las condiciones experimentales para obtener las 'huellas digitales' del ADN de *Salmonella braenderup*; *Stafilococcus aureus*; *Streptococcus pyogenes*; *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli* en la minicámara TAFE del Guefast06. Esta es una alternativa que mejora la comparabilidad entre los resultados, porque el TAFE brinda trayectos de migración rectos y las bandas en los patrones son más nítidas que en los obtenidos en la minicámara CHEF. Las condiciones diseñadas (20 °C, 10V/cm, tiempos de pulsos de 25-3 s durante 10 h) aportan patrones de bandas bien resueltas de los restringidos del ADN del genoma bacteriano. Estos patrones fueron útiles para comparar aislados de una misma especie y discriminarlos en subtipos.

S2-P36

Molecular characterization of a Cuban strain of Bovine herpesvirus type 1

Rodríguez Medina M¹, Barrera Valle M¹, Engels M²

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, San Jose de las Lajas, Cuba

²Institute of Virology, University of Zürich, Zürich, Switzerland

AC: *Rodríguez Medina M (majela@censa.edu.cu)*

A BoHV-1 isolate from Cuba (E8) has been compared with BoHV-1 strains from various other countries. The molecular information obtained by adoption of a clustering system based on restriction endonuclease analysis with the enzymes *Hind* III, *Hpa* I, *Pst* I and *Sfi* I led to identify the isolate E8 as a BoHV-1.1.III strain. It was not possible to find a reference strain with the same four restriction fragment patterns as the BoHV-1 E8. The largest number of similar strains originated from the European continent. These results are a contribution to the updating of the Cuban surveillance epidemiological program. Its introduction into the clustering data base is a contribution for future studies in tracing back the origin of novel IBR outbreaks.

S2-P37**Tetralogía hemoparasitaria en ganadería doble propósito venezolana: situación actual y avances biotecnológicos en diagnóstico y control para un desarrollo sustentable**

Tamasaukas R, Agudo L, Silva A, Sánchez J, Fernández M, Ron J, Florio J, Rivera S

LABIPRESAN-UNERG, San Juan de Los Morros, Venezuela

AC: *Tamasaukas R (tamasaukas.rita@gmail.com)*

En Venezuela, las afecciones causadas por agentes hemotrópicos parasitarios están distribuidas en todos los estados del país con vocación ganadera, en especial, en rebaños bovinos y bufalinos. Entre aquellos encontramos a especies del género *Anaplasma* (*Anaplasma marginale*), *Babesia* (*Babesia bigemina* y *B. bovis*), y *Trypanosoma* (*Trypanosoma vivax*), con una frecuencia de presentación endémica en el país con variaciones estacionales.

De allí la importancia de su estudio a fin de desarrollar estrategias de control y prevención sustentables, que conduzcan a la reducción del riesgo epidemiológico de su presentación, así como de las consecuencias sobre la producción y productividad de los rebaños establecidos en el país. Siendo el diagnóstico certero y oportuno, la base de la pirámide para lograr el objetivo antes indicado.

Es por ello que en el siguiente trabajo de revisión se expondrán resultados de investigaciones realizadas en el país, con la finalidad de aportar conocimiento de la situación actual de las hemoparasitosis por protozoarios y rickettsiales en Venezuela, con especial atención a la presentación de una tetralogía en rebaños bovinos, así como los avances desarrollados para su diagnóstico y control.

S2-P38**Utilización de la piruvato cinasa como posible biomarcador molecular**

Ponce-Rivas E¹, Muñoz-Márquez ME²

¹Departamento de Biotecnología Marina, Ensenada B. C., México

²Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Tijuana, México

AC: *Ponce-Rivas E (eponce@cicese.mx)*

La piruvato cinasa (PK) de algunos organismos tienen potencial para ser utilizadas como marcadores tumorales, biosensores, blanco para quimioterapia de parásitos y/o como modelo industrial para la sobreproducción de proteínas recombinantes. PK es una enzima clave de la vía glicolítica. Esta enzima cataliza la formación de piruvato y ATP a partir de fosfoenolpiruvato y ADP (1). La PK está presente en la mayoría de organismos y presenta una gran diversidad en sus características funcionales y regulación. Entre las principales características están las siguientes: A) La mayoría de los organismos contienen una sola PK, pero algunos organismos tienen dos o cuatro isoformas diferentes; B) La enzima está conformada por una o más subunidades y muchas de ellas presentan regulación alostérica y/o requieren de cationes monovalentes para su actividad. Debido a la relevancia y a la enorme diversidad de propiedades de esta enzima, en este trabajo se llevó a cabo un análisis de las características funcionales y catalíticas de las PK de diferentes organismos con base a las secuencias completas disponibles en bancos de datos y a las estructuras cristalográficas conocidas. Se presenta además, un análisis de los motifs de transcripción de las regiones intergénicas corriente arriba del operón *pykA-pfkA*, usando regiones conservadas para diferentes géneros bacterianos basados en las secuencias homólogos de bacterias Gram-positivas.

S2-P39**Carrageenan Lambda and *Trypanosoma cruzi***

Nacife V, MNL M

Laboratory of Biology Cellular – Oswaldo Cruz Foundation, Rio Janeiro, Brazil

AC: Nacife V (vnacife@ioc.fiocruz.br)

Carrageenan (CAR) is a family of polysulphated carbohydrates extracted from marine red alga. Purified forms of CAR vary as to type namely CAR-kappa, -lambda and -iota according to total sulphate-content distribution as well as molecular configuration. Nacife *et al.* (2000) demonstrated by ultrastructural analysis and light microscopy that *in vivo* administration of CAR-lambda represents a potent inflammatory stimulation for macrophages as compared to the macrophages collected from untreated animals as well as mice submitted to LPS. The present study proposes to evaluate the action of CAR-lambda analyzing the surface charge of cells activated by CAR and LPS through light and electron microscopy; the release of inflammatory mediators, the parasitaemia, the mortality and the pathophysiology of *T. cruzi* infection in mice. We observed that macrophage collected from mice stimulated by CAR showed a decrease in the number of cationized ferritin particles in their surface and displayed a remarkable increase in nitric oxide production, TNF- α and PGE2 release. Mice treated with CAR, 4 h or 24 h, before infection with *T. cruzi* presented a reduced parasitaemia as compared with control group. The histopathology analysis showed the presence of parasite nest but a lower inflammatory infiltrate. Further studies are being carried on to compare the action of CAR with LPS in experimental Chagas' disease

S2-P40**Prueba comparativa de líneas puras camperas y sus híbridos en condiciones intensivas de manejo**

Fumero Durán JE, Carreto JJ, Godínez O

Instituto de Investigaciones Avícolas, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: *Fumero Durán J (lidaiia@ceniai.inf.cu)*

Los camperos son la mejor opción para la producción de carne de ave por vías alternativas en comunidades campesinas y zonas suburbanas. Se evaluó el comportamiento productivo de las líneas puras y sus híbridos en condiciones intensivas para lo que se criaron las variedades lenta (L) y rápida (R) de la línea K3 y la K5 y los híbridos de los respectivos cruces K53 y K35. Se ubicaron a 12.5 aves por m² de piso, el consumo de agua y alimento fue a voluntad y la crianza se extendió hasta la novena semana de edad. Las variables analizadas fueron: peso vivo, consumo, conversión y viabilidad, el análisis de los datos se hizo con el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1. A los 63 días se observaron diferencias significativas para un mayor peso vivo en la K3L seguida por el híbrido K35; el mayor consumo lo alcanzó el híbrido K35 y entre las líneas puras no existieron diferencias, mientras que en la conversión el mayor valor fue para la línea K5 y el híbrido K35 sin diferencias entre estas, difiriendo entre sí la K3R y el K53 y con el valor más bajo la K3L. La viabilidad mostró diferencias para la K5 con el menor valor de 95.1% y los demás tratamientos alcanzaron valores superiores a 97.7%. La línea K3L y el híbrido K35 son los de mejor comportamiento en peso y viabilidad. Estos resultados reflejan una de las principales características del campero dado por su resistencia y adaptabilidad al medio y condiciones adversas.

S2-P41**Desarrollo de un ensayo de PCR anidado para el diagnóstico de gastroenteritis transmisible del cerdo**

Rodríguez E¹, Betancourt A¹, Relova D¹, Lee C², Yoo D², Barrera M¹

¹CENSA, Habana, Cuba

²Pathobiology Lab. University of Guelph, Ontario, Canada

AC: Rodríguez E (alex@isch.edu.cu)

Debido a la naturaleza altamente contagiosa de la gastroenteritis transmisible del cerdo, es imprescindible la disponibilidad de medios diagnósticos rápidos y específicos, que permitan obtener un resultado en corto tiempo para tomar las medidas necesarias e impedir la rápida diseminación de la enfermedad. Varios métodos se han utilizado para el diagnóstico de esta enfermedad, los cuales incluyen el aislamiento viral en cultivo de tejidos, el ELISA para la detección de virus en heces, las técnicas inmunohistoquímicas sobre cortes de tejidos (IP e IF) y los métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos que tienen un desarrollo acelerado en la actualidad, debido a sus ventajas en cuanto a sensibilidad y especificidad, entre ellas figuran la hibridación in situ, RT-PCR, RT-Nested PCR y PCR en tiempo real. El objetivo de este estudio fue desarrollar una PCR anidada para la detección rápida del virus de TGE. Los cebadores fueron diseñados a partir de regiones altamente conservadas de varias secuencias de este virus incluidas en el análisis. Con los cebadores externos se obtuvo la amplificación de un fragmento de la talla esperada de 441 pb en todas las muestras evaluadas por RT-PCR, pero de muy baja intensidad. En la segunda amplificación (PCR anidado), con los cebadores internos, se mostró la amplificación de un fragmento de la talla esperada de 168 pb, con una buena concentración. El desempeño del ensayo a partir de virus aislado en cultivo de tejidos y en muestras clínicas fue calificado como bueno para el diagnóstico virológico de la gastroenteritis transmisible del cerdo.

S2-P42**Relación entre la concentración de proteínas del plasma seminal, parámetros de calidad seminal y el incremento porcentual de espermatozoides con acrosoma reaccionado en semen de toros de razas Sanmartinero y Cebú en el trópico colombiano**

Coral Medina AR, Niño Cárdenas AI, Cardozo JA

Corpoica Tibaitata, Mosquera, Colombia

AC: Coral Medina A (acoral@corpoica.org.co)

Las herramientas tradicionales para predecir el comportamiento reproductivo del toro involucran, examen de salud física, aptitud para la monta y examen de calidad seminal. El macho participa con un 50% en la eficiencia reproductiva del hato. Los resultados de la evaluación de calidad seminal no siempre predicen eficientemente la fertilidad de un toro, pues no tiene en cuenta la habilidad del espermatozoide para procesos esenciales como la capacitación espermática, la reacción del acrosoma y la fertilización misma. En este trabajo se utilizan herramientas biotecnológicas para predecir este comportamiento, se determinó el mapa electroforético (unidimensional) de proteínas de plasma seminal, se estableció la correlación de los valores de concentración de proteínas de plasma seminal, los parámetros de calidad espermática con el incremento porcentual de espermatozoides con acrosoma reaccionado del semen de toros, en la raza criolla Colombiana Sanmartinero y Cebú. Los toros Sanmartinero presentaron incrementos en el % de espermatozoides con acrosoma reaccionado superiores ($p < 0.05$) a los presentados por los toros Cebú (228.4 vs. 180.1), lo que sugiere mayor capacidad fertilizante de sus espermatozoides. Los estudios electroforéticos evidencian la presencia de 17 bandas de proteína de plasma de los toros Sanmartinero, con pesos moleculares que oscilan entre 4.6 y 64.5 kDa, de las cuales 7 correlacionaron significativamente con calidad espermática y 4 con reacción del acrosoma. Para la raza Cebú, de 13 bandas con pesos moleculares que oscilan entre 8.2 y 67.5 kDa, cinco de ellas correlacionaron significativamente con parámetros de calidad y 4 bandas con la reacción acrosomal.

S2-P43**Efecto del clima sobre los perfiles electroforéticos de proteínas de plasma seminal y membrana del espermatozoide de bovinos criollos colombianos y su relacion con la fertilidad**

Niño Cárdenas AI, Coral Medina AR, Cardozo Cerquera JA, Rueda FL

Corpoica Tibaitata, Mosquera, Colombia

AC: Niño Cárdenas A (anino@corpoica.org.co)

Los análisis comúnmente utilizados para la evaluación de la calidad seminal se basan en la determinación de parámetros que incluyen volumen seminal, concentración, motilidad y morfología espermática, sin embargo estos patrones no permiten por si solos, asegurar el desempeño de un macho bovino en un programa de reproducción. El propósito del presente trabajo fue obtener un mapa de perfiles electroforéticos de proteínas de plasma seminal y de membrana del espermatozoide de bovinos criollos colombianos y comparar la presencia e incidencia de bandas de proteínas específicas asociadas a la reproducción durante las dos marcadas épocas climáticas (lluvia y sequía) típicas en Colombia. Se determinó la concentración de cada una de las bandas y se correlacionó con los parámetros de calidad seminal (motilidad, viabilidad, concentración y morfología espermáticas). Se utilizaron 180 muestras de plasma seminal y 180 de membrana espermática procedentes de toros de la razas, siete Blanco Orejinegro, cuatro Romosinuano, cuatro Costeño Con Cuernos, siete San Martinero y Ocho Cebú Brahman. Las muestras se colectaron mediante el uso de electroeyaculador. Para determinar los perfiles proteicos las muestras fueron cargadas para electroforesis degradante en minigeles de poliacrilamida SDS-PAGE. La electroforesis de plasma seminal reveló para las razas criollas colombianas en promedio 17 bandas de proteínas con pesos moleculares que oscilan entre 6.5 y 67 kDa. Para las proteínas de membrana espermática los pesos moleculares obtenidos oscilan entre 14 y 120 kDa. La importancia de la obtención de los mapas electroforéticos de proteínas de plasma seminal como de membrana espermática valida la utilización de herramientas moleculares como criterio de selección de machos en un programa reproductivo.

S2-P44**Predicting functional residues in *Fasciola hepatica* cathepsin B by combining sequence and structural analysis with molecular dynamics simulations**

Naranjo Feliciano D¹, Valiente PA², Carrasco Velar R³, Calero R⁴

¹CENSA, Habana, Cuba

²Facultad de Biología, C. Habana, Cuba

³Centro de Química Farmacéutica, C Habana, Cuba

⁴Instituto Finlay, C Habana, Cuba

AC: Naranjo Feliciano D (dany@censa.edu.cu)

The infection caused by the trematode *Fasciola hepatica* is a disease of veterinary medical importance, considered by several authors as an emergent parasitism. Cathepsin B protein is an excretion-secretion product present in the youthful stages of the parasite, a potential target in the therapy of fascioliasis. *Fasciola hepatica*'s pre-pro-cathepsin B sequence was used as departure material. A cysteine proteases sequence, structure and profile analysis was made –500 only– in wish were included *Fasciola hepatica*'s cathepsin B homologous proteins, from C1 family. Comparative three-dimensional models of the cathepsin B were obtained, whose targets were 14 from the 16 structures of human, bovine and rat cathepsins, available in the PDB. These models were evaluated using the UCLA SAVS web server tools: ERRAT, VERIFY_3D, PROVE and PROCHECK. A cavities prediction, ligand's interactions and a molecular dynamic simulations assay with a nitrite dipeptidyl inhibitor were made. Also, 13 residues in the catalytic pocket of the enzyme, potentially determinant in the substrate specificity was identified (Ser 24, Trp 30, Gly 72, Gly 73, Pro 75, Asn 68, Gln 71, Ser 74, Ala 173, Gly 174, Ala 197, Lys 199 e Ile 246) from which its suggest that three of them could enhances the design of selective cathepsin B *Fasciola hepatica*'s inhibitors regarding to mammalian' cathepsins B.

S2-P45**Vigilancia de encefalopatía espongiforme bovina: utilización del PCR para la detección de restos de mamíferos en concentrados y harinas destinados a la alimentación animal**

Corona B¹, Lleonard R², Carpio Y², Uffo O¹, Martínez S¹

¹CENSA, Habana, Cuba

²CIGB, Habana, Cuba

AC: Corona B (bcorona@censa.edu.cu)

La rápida identificación de restos de mamíferos en concentrados y harinas destinados a la alimentación animal es esencial para el control efectivo de esta fuente potencial de transmisión de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), como parte del programa de vigilancia que se desarrolla en nuestro país para evitar la aparición de esta enfermedad. En el presente trabajo se pusieron a punto ensayos de PCR para la detección de restos de mamíferos (bovino, caprino, ovino y porcino) en concentrados y harinas destinados a la alimentación animal. El ADN se purificó utilizando tiocianato de guanidinium en el método de extracción y para la realización del PCR se sintetizaron los cebadores a partir de las secuencias publicadas en la literatura para cada especie en particular, que amplifican una región altamente conservada del ADN mitocondrial (ADNm). Se determinó la sensibilidad y especificidad analítica en cada caso, resultando los ensayos de PCR específicos para cada especie en particular, permitiendo la detección en estos concentrados de hasta un 1% de material derivado de restos de bovino y un 1.5% de material derivado de restos de ovino, caprino y porcino. Los objetivos más importantes de los programas de prevención y control de la EEB son reducir el riesgo de exposición de los animales y humanos al agente, por lo que contar con ensayos de PCR que permiten la detección rápida de restos de estas especies de mamíferos constituye una poderosa herramienta en la lucha contra esta enfermedad.

S2-P46**Obtención y evaluación de una vacuna bivalente contra la encefalomiелitis equina del este y toxoide tetánico**

Lorenzo Roche F, Fraga A, Montes N, Pérez JE

LABIOFAM, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Lorenzo Roche F (labiofam@ceniai.inf.cu)

Teniendo en cuenta la susceptibilidad de los equinos a padecer estas enfermedades tan peligrosas y difundidas, nos dimos a la tarea de obtener primero la vacuna contra la Encefalomiелitis Equina del Este en Cultivo Celular (EEEC) de superior calidad a la tradicional obtenida en embrión de pollo y el toxoide tetánico concentrado, por lo que el objetivo fue la obtención y evaluación de la vacuna en condiciones de campo, estableciendo la documentación tecnológica de producción, control y registro. El virus de la EEECC fue inactivado con Bromoetilenimina, el clostridium tetánico con formaldehído, adyuvados ambos con gel de hidróxido de aluminio. El virus fue adaptado al cultivo de línea celular BHK-21 Clon 13 y el clostridium en medio sintético y concentrado, mezclando ambas vacunas y evaluándose en equinos de diferentes provincias y categorías. El control de la calidad de la vacuna fue evaluado en cuanto a esterilidad, inactividad, inocuidad e inmunogenicidad con resultados satisfactorios. Los equinos fueron evaluados durante 3 años consecutivos, con títulos de anticuerpos sueroneutralizantes de 1:8 hasta 1:64, inhibidores de la hemoaglutinación mayor de 1:40 y a toxoide tetánico mayor de 5 UI/mL, iguales o superiores a las vacunas monovalentes tradicionales. Se concluye que se obtuvo una vacuna combinada inocua, capaz de proteger contra ambas patologías de forma satisfactoria con múltiples ventajas de factibilidad, ahorro y calidad.

S2-P47**Estudio de la estabilidad de la vacuna contra la Brucelosis bovina elaborada para dosis reducidas por LABIOFAM**

Pluma B, López A, Carrero R, González S

Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM), Boyeros, Cuba

AC: *González S (labiofam@ceniai.inf.cu)*

La necesidad de mantener los logros del programa cubano contra la brucelosis bovina, motivó a iniciar en Cuba la producción de la vacuna *Brucella abortus* cepa 19. Actualmente se formula la vacuna para dosis reducida. Se expone en este trabajo de forma general el proceso de producción y evaluación de la misma, así como el estudio de la estabilidad. Se produjo por método fermentativo y se formuló a la concentración de 3×10^9 a 10×10^9 unidades formadoras de colonias x dosis. Los lotes producidos cumplieron con las especificaciones de pureza, estado de disociación, identidad, conteo de viables, inocuidad y humedad residual. Para el estudio de estabilidad se evaluaron 5 lotes colocándose muestras representativas de cada lote entre 4-8 y 25 0 °C, por un período de tiempo que alcanzó los 450 días. Además a todos los lotes se les estudio la viabilidad a 370 °C durante 60 días. Los resultados confirman que entre 4-80 °C se obtiene a los 360 días una disminución del 30% de las colonias viables mientras que a 250 °C esta reducción ocurre a partir de los 270 días y a los 7 días a 370 °C. Los valores de humedad residual se mantuvieron por debajo del 3%, no existiendo diferencias significativas entre los lotes investigados. Se concluye que la estabilidad de la vacuna contra la Brucelosis bovina para dosis reducida elaborada por LABIOFAM muestra un comportamiento similar al reportado por otros investigadores.

S2-P48**Desarrollo de control positivo de amplificación para el diagnóstico por RT-PCR y *Real Time* RT-PCR de Influenza aviar**

Acevedo AM, Santana E, Díaz de Arce H, Pérez LJ, Caballero A, Suárez L, Sánchez O

CENSA, Habana, Cuba

AC: *Acevedo A (acevedo@censa.edu.cu)*

La influenza aviar constituye una amenaza para la salud animal y humana por lo que es una prioridad el fortalecimiento de los sistemas de diagnóstico frente a probables brotes, de ahí la importancia de la detección por métodos moleculares (RT-PCR y *Real time* RT-PCR) por la elevada rapidez, sensibilidad y especificidad de éstos. Describimos la obtención y evaluación de un control positivo de amplificación para RT-PCR y *Real Time* RT-PCR obtenido a partir del clonaje de un producto de PCR que corresponde a una región del gen de la hemaglutinina del subtipo H5. Los cebadores se seleccionaron teniendo en cuenta que el producto de PCR incluyera las regiones correspondientes de parejas de cebadores de H5 reportados tanto por RT-PCR y *Real Time* RT-PCR de laboratorios de referencia de la OIE/FAO para el diagnóstico de esta enfermedad. De un RNA extraído a partir de la cepa de H5N2 se obtuvo el cDNA que se utilizó como molde para la amplificación con los cebadores J3/J1c. Se seleccionó un clon a partir del cual se logró amplificar un fragmento de la talla esperada, el cual se ha utilizado como control positivo en los ensayos de detección de ácido nucleicos para el subtipo H5. Además, el plásmido se evaluó por *Real Time* RT-PCR y se obtuvo una curva estándar con un CT de 15. El control de amplificación obtenido para la detección del subtipo H5 permitirá estandarizar los ensayos y evaluar posibles falsos negativos para la detección rápida de este subtipo en Cuba.

S2-P49**Obtaining and purification of the nucleoprotein of Avian Influenza for diagnostic use**

Santana Rodríguez E¹, Caballero A², González D¹, Torres E¹, Noda J³, Díaz de Arce H³, Vega A³, Borroto C¹, Perera CL³, Sánchez O¹

¹Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba

²National Center for Scientific Research, Havana, Cuba;

³National Center for Animal and Plant Health, Havana, Cuba

AC: Santana Rodríguez E (elaine.santana@cigb.edu.cu)

Avian Influenza detection should be determined by means of checking program and uninterrupted surveillance based on serology results, DNA detection and virus isolation. It is crucial for the Influenza epidemic surveillance plan, to have a diagnosis system that allows us to make serological studies of domestic population, wild and migratory birds. The current methods of serological diagnosis based on the employment of commercial ELISA kits or IHA hemagglutinants antigens for H5 and H7 serotypes of IA are very expensive. Obtaining large quantities of antigen by a quick and efficient recombinant method would be the base to implement in our country a system that includes the detection of antibodies group specify of IA for ELISA. With this objective the gene of the nucleoprotein (NP) was isolated and purified starting from a sample of total RNA of the H7N1 virus strain A/ck/1067/V99. The DNA fragment coding the amino acids 49 to 375 witch contains the main antigenic domains of nucleoprotein (NP49-375), was amplified by PCR. The gene was introduced in a bacteria expression vector containing a segment of 6 hystidine located towards the end N-terminal, allowing the purification for the Immobilized metal affinity chromatography method (IMAC). The purified protein was used to obtain antibodies for the epidemiologic diagnosis by ELISA in serums from birds of economic interest.

S2-P50**Cloning, expression and preliminary characterization of recombinant E2 glycoprotein expressed in *Pichia pastoris***

Méndez Pérez L, Suárez M, Joglar M, Sánchez O, Sánchez D, Fernández E, Cabezas A, Farnós O

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Méndez Pérez L (lidice.mendez@cigb.edu.cu)

E2 is the major envelope glycoprotein exposed as a homodimer on the outer surface of the classical swine fever virus and represents the most significant target for the induction of the immune response in pigs. Considering these facts, we have approached in this work the E2 protein expression using the *Pichia pastoris* expression system. With this purpose, the complete E2 coding sequence was first cloned in the pPS7 vector under the transcriptional control of the *AOX1* gene and the *SUC2* secretion signal. After *P. pastoris* MP36 strain transformation and selection of recombinants, the protein was detected in the culture supernatant at levels ranging from 0.5 to 1 mg per liter of culture. However, protein recovery was hampered by aggregation events that led to the use of the expression system composed of the pPICZ α vector and X-33 *P. pastoris* strain, in which a His tag was added at the C-terminal portion of the protein. In this system, the recombinant protein was detected in the disruption supernatant at levels of about 0.1-0.2 mg/L, even with improved culture conditions that included the use of vitamins and different carbon sources. Thus, the final strategy included expression of an optimized E2 synthetic gene whose design took into account the proper codon usage for *P. pastoris*. Under these conditions the E2 recombinant protein expression was over 40-fold higher than that obtained with the non-optimized sequence. It was recognized by conformational-sensitive monoclonal antibodies and was obtained in the disruption supernatant at approximately 8.0 mg/L, leaving an open scene for further processes of purification and optimization of expression levels.

S2-P51**Escalamiento de columnas de cromatografía de membranas de intercambio iónico para la purificación de ADN plasmídico**

de la Vega Olivas J

Universidad de Sonora, Hermosillo, México

AC: *de la Vega Olivas J (jdelavegao@gmail.com)*

Se desarrolló y evaluó un nuevo bioproceso para la propagación, recuperación y purificación de ADN plasmídico. A nivel laboratorio, se llevó a cabo la propagación del plásmido pcDNA-Ehcp112 por medio de replicación autónoma en células de *E. coli* de la cepa DH5 α en una fermentación por lote. En la lisis alcalina y neutralización se utilizó agitación moderada para provocar la formación de flóculos bien definidos que facilitarían la clarificación del lisado celular. La purificación final se llevó a cabo en columnas de cromatografía empacadas con membranas de intercambio iónico, utilizando un gradiente que permitió la elución diferenciada de los ácidos nucleicos presentes en el lisado, separando claramente al ARN del ADNp, de acuerdo al análisis realizado por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Se realizaron estudios de escalamiento utilizando simulación con el software SuperPro Designer v.7.0, y se utilizó como base de comparación el Proceso I reportado en la literatura. Se escaló el bioproceso desarrollado en el laboratorio, Proceso II, demostrándose su factibilidad técnico-económica. Se realizó la validación del Proceso I cambiando a fermentación continua en la simulación, logrando obtener los resultados reportados, Proceso III. El Proceso IV fue desarrollado basado en los resultados del laboratorio y en reportes de la literatura, agregando varias modificaciones al proceso original, presentando muy buenos resultados de rendimiento y factibilidad económica.

S2-P52**Biological aspects of *Rhipicephalus sanguineus* under laboratory conditions**

Vargas Hernández M, Montero C, Sánchez D, Suárez M, Pérez D

CIGB, La Habana, Cuba

AC: Vargas Hernandez M (milagros.vargas@cigb.edu.cu)

The hard tick *Rhipicephalus sanguineus* is a cosmopolitan parasite and probably the most prevalent of ixodid species. It is the natural parasite of the dog. This paper reports data on the biological cycle of *Rhipicephalus sanguineus* fed on rabbits and dogs which were kept in laboratory conditions at 28 °C + 1.90% RH and 12 h of light-dark periods. Tick yield of adult females fed on rabbits at dogs was 43.3 and 61.1% respectively. There was no difference between the values of egg mass (0.065-0.062), mass egg production efficiency (58.15-47.85%) and hatching percentage (95.77-96.35%) on rabbits and dogs, although the engorged tick weight differed significantly between the hosts. The recovery values of larvae (78.8-88.3 %) and feeding mean period (5.6-3.5d) were similar on both hosts. The recovery of nymphs from rabbits was 89.73%. In dogs, the recovery was not determined. These studies showed the requirements of ticks according to the host (rabbits-dogs) and would allow the use of reference values hereby presented to determine the model to be used according to the experiment.

SIMPOSIO 3 / SYMPOSIUM 3

**Animales como Bioreactores y Biomodelos/
*Animals as Bioreactors and Biomodels***

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S3-1**Lentiviral vectors for generation and early detection of transgenic animals. Advances and difficulties**

Sánchez Ramos O, Prieto Carratalá Y, Ramos Serrano B, Maura Pérez R, Aguilar Figueredo A

CIGB, Playa, Cuba

AC: Sánchez Ramos O (oliberto.sanchez@cigb.edu.cu)

For livestock, the possibility to select the transgenic embryos prior their transference to the surrogate mother is a very important issue because it allow saving a lot of time, money and work by preventing the transference of non-transgenic embryos. The incorporation of a GFP expression cassette into lentiviral vectors could be a very attractive approach to accurately select transgenic embryos prior their transference to a surrogate mother. The application of this procedure would require, besides the tissue specific expression cassette with the desired protein, the additional incorporation of a constitutive expression cassette for GFP expression inside the same lentiviral vector.

Here shown our results on the use of the lentiviral vectors for the generation of transgenic mammals. This technology allowed us to obtain founder transgenic mice with efficiencies ranging from 27% to 85%. Specifically with the aim to select early transgenic embryos, we created two lentiviral vectors, one encoding the GFP under the control of the ubiquitous early SV40 promoter and the other one containing an additional transcriptional unit for the expression the E2 glycoprotein from classical swine fever virus (CSFV) driven by a mammary gland-specific promoter. Evaluation of GFP expression in the resultant transgenic mice revealed interference between the promoters used to generate the double transgenic mice. Our results demonstrate that a tissue specific expression cassette is able to interfere with the expression of a ubiquitous transcriptional unit and highlight the importance of performing rational lentiviral vector designs and evaluations before undertake the generation of a transgenic livestock.

S3-2**Transgenesis en animales domésticos**

F Salamone D, Pereyra Bonnet F, Gibbons A, Fernández Martín R

Laboratorio Biotecnología Animal. Facultad Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

AC: *F Salamone D (salamone@agro.uba.ar)*

Intentamos incrementar la tasa de supervivencia de los embriones clonados en bovinos adultos, comparando tipos de células donantes y sistemas de cultivo embrionario. Estableciéndose que los fibroblastos y el medio SOF (5% de CO₂ y O₂) son adecuadas para producir embriones clonados. Luego, en experiencias de transfección de las células fetales bovinas con una construcción que contiene el promotor de la beta-caseína y la hormona de crecimiento humana, y ovoplastos tratados con roscovitina, se evaluó el desarrollo de embriones generando vacas que producen altos niveles de dicha hormona en leche. La transgénesis no afectó la capacidad de desarrollo de los embriones clonados y del tratamiento con roscovitina dio lugar a crías viables. Se determinó el efecto de diferentes eventos de transfección sobre el desarrollo embrionario y fetal, todos los tratamientos tuvieron igual desarrollo embrionario *in vitro*, pero algunos eventos fueron incapaces de generar preñeces y nacimientos. También se produjeron crías bovinas luego de una segunda ronda de clonación usando como donantes clones bovinos transgénicos, determinándose que las células del cordón umbilical eran más eficientes que fibroblastos de oreja para producir nacimientos. Finalmente se ensayó la transgénesis mediada por ICSI y utilizamos espermatozoides que previamente incubados con el plásmido pCX-EGFP, logramos obtener embriones que expresaban entre 24 y 60% la proteína en cinco especies de mamíferos (ovinos, porcinos, felinos, bovinos y equinos). Los embriones generados por ICSI no deberían presentar problemas de imprinting, como los de clonación evitando de esta forma las pérdidas de gestación y neonatales.

S3-3**The mammary gland as a bioreactor of recombinant glycoprotein**

Montesino Seguí R, Cremata JA, Toledo JR, Sánchez O, Zamora Y, Rudd P, Harvey DJ, Royle L, Kamerling J

CIGB, La Habana, Cuba

AC: Montesino Seguí R (raquel.montesino@cigb.edu.cu)

Recently, our group reported the expression of human erythropoietin (rhEPO) and E2, the envelope glycoprotein from the classical swine fever virus (CSFV) in goat milk by mammary gland transduction with the adenoviral vector Ad-protein-his. The glycosylation pattern characterization by Normal-Phase HPLC profiling of the fluorophore labeled N-Glycan pools, enzymatically released with PNGaseF, combined with MALDI, ESI-MS and LC/MS, and sequential exoglycosidase digestions revealed that low branched, core-fucosylated, N-glycans predominate. Fractionation by anion exchange chromatography into neutral and charged fractions revealed that the charged N-glycans were mostly alfa-2,6-monosialylated with Neu5Ac or Neu5Gc in a ratio of 1:1, some of them with the more unusual non-reducing terminal GalNAc–GlcNAc motive and without outer-arm fucosylation. These structural characteristics of the N-glycan repertoire in two very distinct recombinant glycoproteins, synthesized in the goat milk, emphasize on the importance to know the glycosylation machinery of the host cell to chose.

S3-4**Technologies and applications of transgenesis in the chicken**

Sang H

The Roslin Institute, University of Edinburgh, Roslin, United Kingdom

AC: Sang H (helen.sang@roslin.ed.ac.uk)

The ability to genetically modify any organism provides a powerful tool with many applications both in contributing to basic science and with the potential for practical applications. The development of methods to genetically modify the chicken has only recently made significant advances. We have shown that lentiviral vectors can be used to introduce transgenes with high efficiency. The efficiency of the production of founder transgenic birds relates to the titre of the vector that is produced, with efficiencies of generation of founder transgenic birds ranging from 100% to approximately 10%. Transmission through the germline from founder transgenic cockerels ranges from 45% to 0.2%. Transgenes introduced using lentiviral vectors are stable through several generations and transgene expression is also maintained, in contrast to transgenic birds generated using retroviral vectors. We are using this technology in a range of applications. The potential to utilise the protein synthetic capability of the laying hen's oviduct to synthesise human therapeutic proteins was proposed many years ago. We have shown that regulatory sequences from the ovalbumin gene, the gene encoding the major egg white protein, can be used to direct expression of three candidate human therapeutic proteins to the oviduct, resulting in their incorporation in egg white. A major potential application of transgenesis in commercial poultry is the production of disease resistant birds. We are developing vectors expressing microRNAs that can be targeted to knockdown expression of viral genes during infection. A range of other transgenic approaches may be taken to interfere with infections.

S3-5**Transgenic mice as models for programmed cell death, lineage commitment, and stem cell function in mammary gland**

Watson C, Khaled W, Neoh K, Oliver C, Kreuzaler P, Tevendale M, Li W, Stingl J

University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

AC: *Watson C (cjlw53@mole.bio.cam.ac.uk)*

The mouse mammary gland is an ideal system in which to study the molecular processes that regulate programmed cell death. We have shown, using genetically engineered mice, that a number of signaling pathways are critically involved in controlling the initiation of apoptosis in the post-lactation mammary gland. In particular, conditional deletion of either Stat3 or the IKK2 upstream activator of the NF-kappaB pathway, results in the abrogation of cell death and a delay in involution. Using microarray to analyse the downstream targets of these pathways, we have identified a number of genes that may have a role in regulating cell death and involution. Recent work using genetically modified mice deficient for these target genes suggests that a non-conventional form of apoptosis is required to remove the secretory alveolar cells following lactation.

The mammary gland develops from stem cells that probably arise in the embryo. We have shown that commitment of these stem/progenitor cells to the alveolar lineage requires the IL-4/IL 13/Stat6 pathway and that deletion of Stat6 delays development of the mammary gland during pregnancy. Using FACS and fat pad transfers, we have shown that mammary stem cells can be highly enriched on the basis of surface markers and that this technique, coupled with transgenic animals, is a powerful tool for the identification of genes involved in lineage commitment. Recently, we have shown that the tumor suppressor PML controls the balance of ER positive and negative luminal progenitors. Current work is aimed at defining the mammary epithelial stem cell hierarchy.

S3-6**Production of recombinant bispecific antibodies**

Brem G

Veterinary University Vienna, Viena, Austria

AC: Brem G (gottfried.brem@agrobiogen.de)

In contrast to monoclonal antibodies bispecific antibodies comprise two binding sites. The main problem in context with this approach for treatment of tumor cells with bispecific antibodies is not of pharmacogenetic but of technical nature. The yield in common cell fermenters is far away to be high enough to cover the quantities needed.

We solved this problem by production of bispecific antibodies in B-cells of transgenic rabbits and cattle. B-cells are the immune cells of the body usually producing antibodies. In order to direct B-cells to produce bispecific antibodies we first generated transgenic rabbits using four different gene constructs.

Our final transgenic rabbits expressed more than 0.1 g of functional bispecific antibodies per liter serum. This amount is very high compared to conventional *in vitro* bioreactors. We were also able to demonstrate the functionality of those bispecific antibodies produced in transgenic rabbits in different *in vitro* tests.

To generate transgenic cattle we transferred this construct into bovine fetal fibroblasts and performed somatic cell nucleus transfer. In total 11 transgenic cloned calves were born. Expression analyses showed an expression rate very similar to the transgenic rabbits.

We have established a purification system and could demonstrate the functionality of these purified bispecific antibodies. The functionality was as effective as the crude serum of the transgenic cattle in killing tumor cells *in vitro* and *in vivo*. We were already able to show this effect *in vitro* using human melanoma tumor cells (PNAS USA 2004; 101:6858-6863, 2004) and *in vivo* in a SCID mouse brain model using human glioblastoma cells (Int J Cancer 2005;117:1060-1064).

SIMPOSIO 3 / SYMPOSIUM 3

**Animales como Bioreactores y Biomodelos/
*Animals as Bioreactors and Biomodels***

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S3-P1**Effect of the aspiration pressure, the category and the reproductive status of bovine donors on the oocytes collection by *in vivo* follicular puncture guided by ultrasound**

Denis R, Fuentes D, Bernal A, Lliteras E, Chong M

CIMAGT, Habana, Cuba

AC: Denis R (denis@cima-minag.cu)

This research has been done to obtain cummulus oocytes complexes (COCs) steadily to be used in the development of other biotechnologies by means of «*in vivo*» follicular puncture guided by ultrasound (OPU), as well as to assess the effect of the aspiration pressure, category and reproductive status of the donors regarding the quantity and quality of the COCs. We used an ultrasound Aloka SSD-500 coupled to a 5 MHz convex transducer transvaginally used and an aspiration pump IVM. The females used for the trial were Siboney de Cuba. The statistical process of the data was done through a variance analysis using the GLM procedures and multiple comparisons of corresponding average of the statistical package SAS (1996). It was shown that the aspiration pressure of 26 mL/min was excellent for the collection rate as well as the quantity and quality of the collected oocytes. Lower and higher pressures (18 mL/min and 36 mL/min) cause unfavorable changes of the evaluated indicators. Moreover, it was shown that the category of the donors influences significantly ($p < 0.01$) the OPU results. We obtained better results in cows than in heifers, regardless the reproductive status (pregnant or empty).

S3-P2**Risks assessment and establishment of biosafety measures for the development of transgenic animal by means of the employment of lentiviral vectors in the laboratory**

Santana Rodríguez E, Sosa A, Maura R, Ramos B, Prieto Y, Venéreo A, González A, Suárez L, Sánchez O

Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba

AC: *Santana Rodríguez E (elaine.santana@cigb.edu.cu)*

From the beginning of the 80th the modification of the genome was performed by the introduction of foreign genes by means of direct microinjection of naked DNA into pronucleus of recently fecundated embryos. This procedure has an efficiency of approximately 5% when it is applied in mice and below 0.5% for animals of productive interest. With this efficiency, time and costs of production for transgenic founder was considerably high. Since 2002, the employment of lentiviral vectors in the generation of transgenic animals demonstrated that it is possible to obtain transgenesis efficiency in mice superior to 80%. This methodology has also been used in rats, goats, sheep, and chickens, with a superior efficiency to the one achieved by other procedures. The implementation of this methodology in our country allows us to generate a bigger number of transgenic animals for biomodels of human illnesses and as bioreactor in the case of animals of economic interest. In this work, a risk assessment and the establishment of the biosafety management for the transgenic animals area was carried out. The approval from the national regulatory entities was successfully granted to the facilities located at the Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

S3-P3**Heterologous promoter interference affects the expression of transgenes delivered by a bicistronic lentiviral vector**

Sánchez Ramos O, Prieto Carratalá Y, Ramos Serrano B, Maura Pérez R, Aguilar Figueredo A

CIGB, Havana, Cuba

AC: *Sánchez Ramos O (oliberto.sanchez@cigb.edu.cu)*

For the production of transgenic livestock, it is very desirable the selection of preimplantatory transgenic embryos, in order to avoid the transference of non-transgenic embryos; this strategy have been successfully demonstrated by using lentiviral vectors containing the GFP gene. However, so far there is not any report about the use of lentiviral vector carrying an interest gene in addition to the GFP as a selection marker for such purposes. In this work we constructed two lentiviral vectors, one encoding the GFP under the control of the ubiquitous early SV40 promoter and the other one containing an additional transcriptional unit for the expression the E2 glycoprotein from classical swine fever virus (CSFV) driven by a mammary gland-specific promoter. Direct observation under fluorescence microscope and flow cytometric analysis showed that the GFP expression was markedly lower in cell cultures transduced with the bicistronic lentiviral vector. Of the 31 mice born, 23 (74%) carried the transgene DNA and 19 (82.6%) of these mice expressed the transgene. In contrast, the microinjection of the bicistronic lentiviral vector did not rendered GFP positive embryos. However, of the 28 mice born, 24 (85%) carried the transgene DNA and 3 of the 6 female assayed expressed E2 in milk at levels detectable by western blot. Our results demonstrate that a tissue specific expression cassette is able to interfere with the expression of a ubiquitous transcriptional unit. We neither can exclude a possible down expression of the mammary specific expression cassette caused by the ubiquitous down stream promoter.

S3-P4**Scale-up for the production of E2-CSFV based vaccine candidate**

Santana Rodríguez E¹, Toledo JR², Díaz-Archer D¹, Oramas N¹, Rodríguez E¹, Maura R¹, Rodríguez MP¹, Alfonso P³, Barrera M³, Sánchez O¹

¹Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba

²Faculty of Biology, University of Havana, Havana, Cuba

³National Center for Animal and Plant Health, Havana, Cuba

AC: *Santana Rodríguez E (elaine.santana@cigb.edu.cu)*

E2 is the major envelope glycoprotein exposed on the outer surface of the classical swine fever virus (CSFV) and represents the most important target for induction of the immune response. A replication defective adenoviral vector Ad-E2his was generated containing the E2-CSFV extracellular domain and a hexa-histidine tag in its C-terminus (E2his). The direct transduction of the goat mammary gland with the Ad-E2his induces high expression levels of E2his antigen in the milk.

The present work describes the general process for the production of the E2his based vaccine candidate. The Ad-E2his vector was amplified in HEK-293 cells suspension culture in 1 L spinner flask obtaining 10⁹ infective units/mL. Intracellular vectors were released by three rounds of freeze/thaw and titered by end point dilution. Ad-E2his were diluted in PBS/EGTA 36 mM until 10⁹ IU/mL and infused in the goat udder by the teat channel. The E2his antigen was detected in the goat milk between days 2 and 8 postransduction. The E2his purification was carried out in two steps. At first, the skimmed goat milk was diluted in order to separate serum milk from casein micelles. The clarified material containing the recombinant protein was loaded onto Chelating Sepharose Fast Flow column. The E2his eluted as a pure homodimer of approximately 120 kDa, according to SDS-PAGE and western-blotting analysis. Three different batches had been formulated as a water-in-oil emulsion with the oil-based adjuvant Montanide and had shown a high protective capacity in pigs after potency test, according OIE parameters.

S3-P5***In vitro* and *in vivo* cryosurvival of vitrified 4-cell embryos derived from two selected transgenic mice lines**

Ramos Serrano B, Maura Pérez R, Aguilar Figueredo A, Sánchez Ramos O

CIGB, Playa, Cuba

AC: Sánchez Ramos O (oliberto.sanchez@cigb.edu.cu)

The present study was undertaken to investigate the effect of vitrification on 4-cell embryos derived from two different lines of transgenic mice. Post-thaw morphological survival, *in vitro* developmental competence to blastocyst stage and embryo viability after transfer were used as endpoints to evaluate cryosurvival. Transgenic embryos at 4-cell stage were obtained from superovulated hybrid B6D2/F1 females and mated with homozygote transgenic males of ATAXIA(+/+) and TRANSFERRINE(+/+) lines. Controls consisted 4-cell embryos collected from non-transgenic lines, but with the same genetic background. The original vitrification protocol was reported earlier (Shaw. *Reprod Fertil Dev* 1991; 5: 621-626) and the freezing medium consisting 4.5 M DMSO plus 0.25 M sucrose in M2 medium. The embryos were equilibrated for 3 min at room temperature, loaded into 0.25 ml straws and then vitrified by direct plunge into liquid nitrogen. Frozen embryos were thawed in 37 °C water for 30 sec and then equilibrated in dilution medium (0.25M sucrose + M2 medium) for 15 min. Finally, the embryos were washed 3 times with fresh M2 medium and cultured in 20 µL drops of M16 medium in a humidified atmosphere of 5% CO₂, at 37 °C for 1h or used to embryo transfer. As summarized in Table 1, there was a high survival in all aspects evaluated showing that the method used is highly effective for the cryopreservation of the transgenic lines studied.

S3-P6**Relación entre la actividad enzimática de la aspartato-aminotransferasa y la calidad seminal de toros de razas criollas del trópico colombiano**

Rueda F, Abadía B, Cardozo J

CORPOICA, Mosquera, Colombia

AC: *Rueda F (leorueda21@yahoo.com)*

La producción del hato bovino se relaciona con la fertilidad del macho reproductor y específicamente se encuentra ligada a componentes del plasma seminal y a los espermatozoides. La enzima aspartato-aminotransferasa (AST) está contenida en el segmento medio de los espermatozoides y participa en su metabolismo aeróbico. Valores altos de actividad enzimática extracelular suponen daño de la membrana plasmática y comprometen la viabilidad y los procesos metabólicos del espermatozoide. El objeto de este trabajo fue determinar la actividad enzimática intra y extracelular de la AST y su relación con la calidad seminal de toros pertenecientes a tres razas criollas colombianas: Romosinuano, Costeño con Cuernos, y Sanmartinero, mediante la técnica espectrofotométrica de Reitman-Frankel adaptada para semen y modificada en este trabajo para evitar interferencias provocadas por otros componentes del semen. Las medias generales de la actividad enzimática intra y extracelular fueron 48.5 y 61.4 UI/10⁹ espermatozoides (spz), respectivamente. La actividad enzimática intracelular en semen de las razas Romosinuano, Costeño con Cuernos y Sanmartinero fue de 52.28, 51.80 y 38.23 UI × 10⁹ spz respectivamente, mientras la extracelular fue de 66.81, 58.22 y 56.21 UI × 10⁹ spz, respectivamente. La actividad enzimática intracelular presentó correlación positiva ($r = 0.36$; $P < 0.05$) con la concentración espermática y, en la raza Romosinuano, con la viabilidad espermática ($r = 0.5844$; $P < 0.05$). Estos resultados justifican nuevas investigaciones en actividad enzimática encaminadas a optimizar la manipulación del semen en el proceso de crioconservación y al desarrollo de marcadores bioquímicos para seleccionar los mejores reproductores.

S3-P7**Diagnóstico ultrasonográfico de la edad de la gestación en búfalas de río**

Herrera Vera P, Campo Pipaon E, Denis García R, Fundora Sánchez O, Vega Rodríguez N

UNAH, La Habana, Cuba

AC: *Herrera Vera P (pavel_herrera@isch.edu.cu)*

Se analizó un total de 28 búfalas en edades comprendidas entre 4 y 8 años, con un peso promedio de 580 a 690 kg. El conceptus fue examinado transrectalmente cada 7 días usando un equipo de ultrasonografía ALOKA-SSD-500, tiempo Real modo B, acoplado a un transductor lineal de 5 MHz. El estudio se realizó a partir del décimo día postmonta, donde se registró el comienzo del primer latido cardíaco, así como la detección por vez primera del saco amniótico. Semanalmente se midió el largo del conceptus y de la vesícula 3.5 días/± gestacional hasta el día 73. El embrión se observó a los 22.5 promedio y midió 6 mm hasta 46 mm de largo desde su aparición hasta los 73 días. El primer latido cardíaco se detectó a partir del día 28. El crecimiento de la vesícula gestacional en el área de la localización del embrión fue desde 5 mm en 3.8 mm del día 60. Se concluye que estos ± 3.5 hasta 116 ± el día 22.5 parámetros pueden ser utilizados para monitorear el desarrollo fisiológico de la gestación en búfalas de río de la raza Bufalypso.

S3-P8

Determinación del período óptimo para la visualización del tubérculo genital e identificación del sexo del feto

Pipaon E, Vera P, García R, Sánchez O, Rodríguez N

UNAH, La Habana, Cuba

AC: Vera P (pavel_herrera@isch.edu.cu)

Esta investigación se realizó para evaluar la eficacia del diagnóstico precoz del sexo del feto en búfalas en condiciones de producción, para lo cual se trabajó con 35 búfalas de río (raza Bufalypto) del Instituto de Ciencia Animal. La visualización del tubérculo genital fue investigada por ultrasonografía entre los 45 a 60 días de gestación utilizando un equipo de ultrasonografía ALOKA-SSD-500 tiempo Real modo B, acoplado a un transductor lineal de 5 MHz. El período óptimo para visualizar el tubérculo genital fue de 55 a 60 días. Utilizando la metodología descrita fue posible identificar el sexo del feto con una eficacia superior al 80%. Recomendamos realizar la identificación del sexo del feto acorde a los resultados de este trabajo.

SIMPOSIO 4 / SYMPOSIUM 4

**Bioseguridad de Organismos Genéticamente
Modificados (OGM) y los Bioproductos/
*Biosafety in Genetically Modified Organisms
(GMO) and Bioproducts***

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S4-1

Aplicación del Sistema de Autorizaciones de Seguridad Biológica para el trabajo con organismos genéticamente modificados

Suárez Romero ME, García Santos L, Pastor Chirino L, Verdera Hernández J, Barceló Pérez V, Lorenzo Hernández M

Centro Nacional de Seguridad Biológica, La Habana, Cuba

AC: *Suárez Romero M (marvis@oraseen.co.cu)*

Los organismos genéticamente modificados, a pesar de ser instrumentos muy útiles para distintos usos en la industria farmacéutica incluso en la alimenticia, se reconoce internacionalmente que los mismos pudieran tener efectos adversos sobre la salud humana y la biodiversidad una vez que se liberen al medio ambiente y sobre el tema aún existen debates entre científicos, reguladores y el propio público. Dichos organismos serían capaces de producir impactos ecológicos y económicos significativamente negativos si no son sometidos a una evaluación de riesgos antes de adoptar una decisión sobre la realización de cualquier actividad relacionada con ellos.

Cuba respondiendo a los acuerdos adoptados como estado parte del Convenio sobre la Diversidad Biológica, así como del Protocolo de Cartagena; establece y mantiene medios para regular, administrar o controlar los riesgos derivados de la utilización y la liberación de organismos vivos modificados que pudieran amenazar a ecosistemas, hábitats o especies.

En este sentido, el Centro Nacional de Seguridad Biológica como órgano regulador ha establecido un sistema de autorizaciones de seguridad biológica, que se sustenta legalmente en el Decreto Ley 190/99 «De la Seguridad Biológica» y la Resolución 180/07 «Reglamento para el otorgamiento de la autorización de seguridad biológica». La aplicación de este mecanismo de control para el caso de actividades que involucran organismos transgénicos, son objetivo de nuestro trabajo.

S4-2**Development and harmonisation of GMO detection procedures - An overview of EU activities -**

Querci M

EC Joint Research Centre, Ispra (Varese), Italy

AC: Querci M (maddalena.querchi@jrc.it)

Within the European legal frame on GMOs, a key role is played by the European Commission Joint Research Centre (JRC); accordingly, the Biotechnology and GMOs Unit of the Institute for Health and Consumer Protection (IHCP), undertakes, by legal mandate, a series of actions to assure that the legal system is enforced uniformly and effectively across the EU, and that the critical measures required within the process of implementation are available. The presentation illustrates those activities regarding the development, validation and harmonisation of GMO detection methods and sampling procedures within the European Union, it describes the established structures and the research activities that have already led to a well-attuned control system of GMO labelling throughout Europe. The approach may also serve as a model for other countries and regions seeking to achieve harmonisation of methods on an international level.

The expert network of regulatory authority laboratories established within EU countries, the European Network of GMO Laboratories (ENGL) led by the EC's JRC, is also presented. Finally, an overview of the training and capacity building activities on GMO analysis carried on within and beyond EU borders, is given and the training tools developed illustrated.

S4-3

Experiencia cubana en el desarrollo de la bioseguridad. Sistema nacional

Menéndez de San Pedro López L¹, Rodríguez Dueñas J²,
Arce Hernández LL¹, López Fumero LG¹, Pastor Chirino DL¹

¹Centro Nacional de Seguridad Biológica, La Habana, Cuba

²Instituto Superior de Ciencia y Tecnologías Aplicadas, La Habana, Cuba

AC: Menéndez de San Pedro López M.Sc. L (jc@orasen.co.cu)

El marco cubano de Bioseguridad, ya sea en su estructura o en su regulación, ha tenido como base una serie de factores que han incidido en que este revista unas características muy particulares. El desarrollo alcanzado en las ciencias biológicas en Cuba a partir de la década de 1980, la ausencia de un sector privado en estas esferas, las condiciones económicas del país, la existencia de Tratados Internacionales en esta rama entre otras, crearon las condiciones propicias para el surgimiento de una voluntad estatal dirigida a la creación de un órgano regulador en la esfera de la Bioseguridad.

Como resultado, el marco cubano de Bioseguridad se caracteriza por la existencia de estructuras que atienden la actividad de forma permanente, la existencia de un Centro, de carácter nacional, que agrupa su atención en las tres esferas fundamentales (humana, animal y vegetal) y un enfoque amplio, dado por la legislación en vigor, que comprende los Organismos Vivos Modificados, las especies exóticas y los agentes biológicos. Estos elementos marcan la diferencia en cuanto a los patrones seguidos por Cuba en relación con otros países del área.

El Sistema Nacional de Seguridad Biológica de Cuba, encabezado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA) y nucleado por el Centro Nacional de Seguridad Biológica, se extiende por todo el territorio nacional y se apoya en la creación de varios subsistemas que han posibilitado organizar la actividad reguladora. La presentación de este sistema con todos sus elementos, constituye el objetivo fundamental de este trabajo.

S4-4**Establecimiento de un sistema de código de barras para la protección y registro de bioproductos**

Rodríguez Clavijo SY, Duplat L, Rodríguez Villamizar F

CORPOICA - CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA, Mosquera, Colombia

AC: Rodriguez Clavijo S (soniayanira@gmail.com)

Los productos agropecuarios ecológicos en Colombia (Ley 170 de 1994) enmarcan todos los sistemas agrícolas que promueven la producción sana y segura de alimentos, desde lo ambiental, social y económico. Desde el punto de vista ambiental la producción ecológica disminuye el impacto de toxicidad y deterioro causado por los químicos en el agua, el suelo, la vegetación y los animales, pues son sustancias que preocupan al sector ganadero. Por medio del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural se legisla y controla la utilización de tecnologías, fertilizantes o plaguicidas, antibióticos y otros, que puedan tener efectos nocivos para el medio ambiente y la salud humana. La creciente demanda y utilización de bioproductos para generar alimentos más limpios, es congruente con la actual política del gobierno colombiano. Las capacidades biotecnológicas permiten el crecimiento de la infraestructura para el desarrollo y comercialización de bioproductos no solo para productores agrícolas sino también ganaderos y la población humana. Dentro de la estrategia de bioprospección del Ministerio de Agricultura, éste proyecto desarrolló un sistema de identificación molecular de los bioproductos, para implementar un protocolo de Huella Genómica a nivel de género y especie de microorganismos con potencial agro-industrial y desarrollar así un Sistema de Código de Barras o *BarCode*, con lo cual se pretende establecer un emprendimiento innovador hacia la protección intelectual, identificación, registro y control de calidad de los bioproductos que el país hoy desarrolla, brindándole a productores y comercializadores de productos biológicos una herramienta de protección en contra de la creciente biopiratería.

S4-5

Overview of Biotechnology and Biosafety in the Islamic Republic of Iran

Salehi Jouzani G, Khayam Nekouei SM, Osfoori R

Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

AC: Salehi Jouzani G (gsalehi@abrii.ac.ir)

In this report the status of biotechnology and biosafety in Iran is presented. Iran has achieved significant results in the area of modern biotechnology, including animal cloning (sheep), human stem cells and plant genetic engineering. It is the first country in the region producing two transgenic plants (rice and cotton) ready for release after regulation processes. Furthermore, research on other transgenic plants such as rapeseed, wheat, palm, corn, alfalfa and potato is underway. In the last years, more than 250 million doses of traditional and recombinant vaccines and serums has been produced. Other achievements include production of healthy potato seeds using tissue culture, micropropagation of different horticultural plants, fingerprinting and molecular identification of native pistachio, olive, pomegranate and wheat varieties as well as production of biofertilizers and biopesticides. In 2001, Iran signed the Cartagena Protocol on Biosafety (CPB). In 2003, the Parliament of Iran ratified CPB. In 2004, the Protocol came into force in Iran and thereby all its contents turned binding. The biosafety capacity building project was performed with the co-operation of UNEP-GEF in 2002. As a result, the National Biosafety Framework was compiled. The last achievements are establishment of The National Coordination Committee (NCC), a comprehensive survey of National Biosafety Law (NBL) of different countries and survey of national capacity, preparation of draft of NBL by the working groups and NCC and finally approval of the document by National Biosafety Council and the Cabinet. Future plan is ratification of NBL by the Parliament and its implementation.

S4-6**Virus-resistant transgenic plants:
benefits, risks and biosafety**

Thompson J, Turturo C, Friscina A, Chiappetta L, Morroni M, Tepfer M

ICGEB, Ca' Tron di Roncade, Italy

AC: *Thompson J (thompson@icgeb.org)*

Concerns have been raised regarding the potential environmental impact of VRTPs, in particular those which express viral genes. One hypothetical risk is that viral sequences expressed from the transgene could recombine with the genome of a non-target virus, and thus lead to emergence of a novel virus. Recent work carried out by the Virology Group at Ca' Tron has focused specifically on cucumoviruses (family Bromoviridae). A sensitive and robust RT-PCR method has been optimized to detect viral recombinants both under conditions of high and low selection pressure, where the virus inoculated is either disabled or wild-type, respectively. Under conditions of low selection pressure, it was concluded that in this specific case novel viral recombinants are not expected to appear. Conditions of high selection pressure for the analysis of recombinants were produced by engineering mutants. Results so far show an increase in the number of observed recombination sites compared to the low selection pressure study. Detailed studies on and around one of the principal recombination hotspots found (nt 1902) have shown it to be directly involved in the production of a short subgenomic RNA known as RNA5. The RNA structure around hotspot nt 1902 has been determined both in vitro and in silico, with phylogenetic and recombinant analyses identifying its putative role in cucumovirus evolution. It is intended that this study should eventually provide a model for assisting researchers in designing safer viral transgenes, while improving our understanding of the mechanism(s) involved virus RNA recombination, and therefore evolution.

S4-7

DetECCIÓN, LEGISLACIÓN Y PERCEPCIÓN PÚBLICA DE LOS OMG EN EUROPA: PARTICIPACIÓN DE UN LABORATORIO ESPAÑOL EN EL PROYECTO EUROPEO COEXTRA

Esteve Nuez T, Pla de Solà-Morales M

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IBMB-CSIC), Barcelona, España

AC: *Esteve Nuez T (tengmp@cid.csic.es)*

El cultivo de OGM ha seguido creciendo a nivel global, su aceptación pública y la percepción social generada ha creado una cierta controversia. Muchos países han establecido una normativa para la regulación del cultivo y la comercialización de OGM. La UE, como importador importante de maíz y soja desde USA y Argentina, así como en el caso de España como productor de maíz transgénico, ha establecido además la obligatoriedad de trazabilidad y coexistencia que ha conllevado la necesidad de métodos capaces de detectar, identificar y cuantificar OGM en alimentos. La normativa europea establece un nivel máximo de contaminación accidental de OGM, correspondiente al 0.9%, por encima del cual es obligatorio el etiquetado de los alimentos. La investigación en la UE, concretamente en el marco del proyecto Co-ExTra (en el cual el Servei d'Anàlisis Biològiques Quantitatius IBMB-CSIC participa), tiene como intereses principales (i) el desarrollo de nuevos métodos capaces de incrementar el número de OGM que se puedan analizar simultáneamente (destacan PCR multiplex asociado a marcaje específico y CGE, desarrollado por nuestro laboratorio, arrays de baja densidad, ensayos basados en SNPlex; (ii) el desarrollo de sistemas para detectar OGM no autorizados o desconocidos; (iii) la identificación de controles específicos de especie adecuados para la cuantificación de OGM; (iv) la validación de métodos de ensayo multiplex mediante ring-trials; y los métodos de muestreo; además de (v) herramientas de asistencia a la toma de decisiones y aspectos económicos y sociales.

S4-8**GM Crop Regulations in the European Union:
Unsustainable risk management.**

Morris S, Spillane C

University College Cork, Cork, Ireland

AC: Morris S (shane.morris@student.ucc.ie)

The current framework for regulating GM crops in the EU weakens the precautionary principle as a policy tool and is not likely to be sustainable in its present form, particularly given the rapid pace of advances in plant biotechnology. Furthermore, because the framework is solely process-based so as to regulate GM plants but not other varieties, the genetic constitution of which has been modified by using alternative or traditional methods it is not in accordance with the precautionary principle, which is the EU's chosen basis for risk assessment and the regulation of new technologies. A more appropriate regulatory framework, would more logically reflect the idea of the precautionary principle, should focus on comparatively assessing the potential environmental and health risks versus benefits of a product, rather than overly focusing on the process through which the product a new plant variety was created. In essence, the GM regulatory fiasco has largely been a construct of past policy decisions to choose a process rather than a product-based approach to regulate new plants or foods, including GM crop varieties.

See EMBO Reports 9, 6, 500-504 (2008) <http://www.nature.com/embor/journal/v9/n6/index.html>

SIMPOSIO 4 / SYMPOSIUM 4

**Bioseguridad de Organismos Genéticamente
Modificados (OGM) y los Bioproductos/
*Biosafety in Genetically Modified Organisms
(GMO) and Bioproducts***

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S4-P1**Establecimiento de la gestión de bioseguridad de un maíz transgénico con resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas teniendo en cuenta la legislación nacional vigente en Cuba**

Sosa Espinosa AE, Tellez-Rodríguez P, Morán-Bertot I, Trujillo-Bacallao D, Oliva-Barbón O, García Muñiz E, Ayra-Pardo C, Borroto Nordelo C

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de la Habana, Cuba

AC: *Sosa Espinosa A (angela.sosa@cigb.edu.cu)*

La bioseguridad está basada en prevenir la ocurrencia de eventos indeseables en un proceso determinado.

Para poder diseñar una gestión efectiva y cumplir este llamado «principio precautorio» es importante basarse en un análisis de riesgo caso específico para establecer acciones seguras de cada etapa del proceso.

Las plantas transgénicas son un caso particular del análisis de riesgo. Esto se debe a que hasta la fecha no se han reportado eventos adversos sobre el hombre, los animales o el ambiente. Sin embargo, el desarrollo desigual de la biotecnología agropecuaria en los diferentes países, las diferencias en las legislaciones nacionales y la percepción de los consumidores ha determinado regulaciones muy estrictas en relación con la liberación al ambiente. Esto hace que el principal riesgo de una liberación al ambiente lo constituya el incumplimiento de la legislación nacional. Adicionalmente cada cultivo y escala de trabajo va a requerir un análisis de los riesgos potenciales particulares.

Este trabajo propone una gestión de la bioseguridad basada en la evaluación de riesgos potenciales en la liberación al ambiente de un maíz transgénico que es resistente a insecto y tolerante a herbicidas.

S4-P2

Evaluación toxicológica de tres biofertilizantes empleando la lombriz de tierra como especie bioindicadora

Domínguez Y, Fraga R, Beiro O, Lóriga E, López Y, Castañeda JM, Trujillo J, Carballo O

Centro Nacional de Toxicología, Ciudad Habana, Cuba

AC: Domínguez Y (yordankad@infomed.sld.cu)

Los fertilizantes biológicos constituyen una opción más benigna para el ambiente que los de origen químico. Esto ha motivado que a nivel internacional exista una tendencia creciente en la formulación de nuevos productos bajo este principio. No obstante las ventajas que estos compuestos proporcionan, se hace necesaria la evaluación ecotoxicológica de los mismos antes de su liberación al ambiente. El suelo es uno de los compartimentos que mayor impacto recibe por el uso de productos agrícolas, la evaluación de los efectos tóxicos sobre su fauna es de suma importancia. La lombriz de tierra es una de las especies más representativa del ecosistema terrestre. En este estudio se evaluaron los efectos que sobre este organismo provocan la exposición a tres biofertilizantes (CTA-Humus, CTA-Stimulant y Mudra).

Se trabajaron con lombrices de la especie *Eisenia andrei*, sanas, adultas, con un peso comprendido entre 300-400 mg. Se emplearon dos tipos de ensayos: por contacto en papel de filtro y en sustrato artificial, evaluándose en cada caso los niveles de concentraciones recomendados en las Guías para cada tipo de ensayo. Los resultados obtenidos evidenciaron una toxicidad más marcada en los estudios por contacto, la cual fue menor en los estudios con sustrato, demostrándose una vez más la influencia de la matriz o soportes empleados en los estudios de toxicidad.

S4-P3**La ecotoxicología y su contribución en la Bioseguridad de Bioproductos y Organismos Genéticamente Modificados (OGM), en Cuba**

Beiro O, Castañeda JM, Loriga E, Domínguez Y, Fraga R, Trujillo J, Saiz Y, López Y, Reyes A, Carballo O

Centro Nacional de Toxicología., Ciudad Habana, Cuba

AC: *Beiro O (odettebeiro@infomed.sld.cu)*

En Cuba se desarrollan las evaluaciones ecotoxicológicas a bioproductos previo a su liberación al medio ambiente y en la actualidad se enfrenta al reto de la evaluación ecotoxicológica de plantas transgénicas. En este trabajo se presentan propuestas de cambios en la organización de la red de laboratorios de toxicología y ecotoxicología, que permitirán el perfeccionamiento del sistema en la evaluación de productos agropecuarios generados por los principales centros de investigación en el país, el proceso de certificación de ensayos y su registro. Además se muestra la experiencia del Centro Nacional de Toxicología (CENATOX), como ejemplo de institución donde se desarrollan las evaluaciones ecotoxicológicas a bioproductos.

S4-P4

Collaborative trial validation study of a Mon810 maize-specific quantitative Real Time PCR

Marchesi U, Gatto F, Verginelli D, Paternò A, Quarchioni C, Fusco C, Amaddeo D, Ciabatti I

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, Rome, Italy

AC: *Ciabatti I (ilaria.ciabatti@izslt.it)*

European Union legislation on GM food and feed, enforced since 2004, established a legal framework for the marketing authorisation and the labelling of food and feed containing, consisting or produced from GMOs. Considering the increasing number of transformation events which are being authorised, the European enforcement laboratory is facing the challenge of implementing analytical procedures, both qualitative and quantitative, which prove to be reliable and practicable, in terms of time and cost-effectiveness, at the same time.

A collaborative study for the validation of a MON810 maize-specific quantitative real time PCR method was carried out within the Italian Network of GM food and feed Laboratories. The method tested was derived by the Community Reference Laboratory endorsed one, with some modifications introduced in order to improve practicability. Nineteen official control laboratories were involved, which received twenty blind DNA samples representing four GM concentration levels plus one negative control. A plasmidic calibration system which allows to express quantitative results as DNA copy numbers, as it is required by Recommendation 2004/787/EC, has been used. The method proved to be fit for purpose with validation parameters, calculated according to ISO standards, fulfilling internationally recognised performance requirements.

S4-P5**Sistema de inspección de seguridad biológica.
Experiencia cubana**

López Fumero LG, Menéndez de San Pedro López L, Izquierdo Terán DIS, Pérez Cárdenas LBJ, Gandolff Dovo LCE, Martínez Ruíz DMC, Prieto Sosa DMP, Carmenate Germán IH, García Santos LL, Arce Hernández LL

Centro Nacional de Seguridad Biológica, La Habana, Cuba

AC: López Fumero L (gricel@orasen.co.cu)

La Seguridad Biológica basa su actividad esencialmente reguladora en mecanismos de control, los mismos suponen la elaboración de una base legal apropiada, el establecimiento de un sistema de autorizaciones, y por último, un *sistema de inspección* dirigido a la oportuna y eficaz verificación del cumplimiento de los mecanismos anteriores. De ahí que las inspecciones constituyen uno de los eslabones fundamentales, en tanto es el encargado de dar seguimiento y de verificar *in situ* el cumplimiento de la legislación vigente en esta materia en Cuba.

El sistema de inspecciones es aplicable por el Centro Nacional de Seguridad Biológica y las Delegaciones Territoriales del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), a las instalaciones con riesgo biológico, las que integran el Sistema Nacional de Contabilidad y Control, así como a las áreas de liberación de *organismos modificados genéticamente* o exóticos al medio ambiente, ubicadas en el territorio nacional.

En el presente trabajo se describen los elementos de dicho sistema, mostrándose los principales resultados alcanzados en los últimos cinco años.

S4-P6

Risk management and implementation of biosafety measures in the area of aquatic organisms from the Agriculture Research Direction of Center for Genetic Engineering and Biotechnology

Pérez Reytor DC, Morales Rojas A, Herrera Miyares F, Sosa Espinosa AE, Olano Ruiz E, Domínguez I, García Muñiz E, Martínez Rodríguez R, Estrada García MP

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: *Pérez Reytor D (diliana.perez@cigb.edu.cu)*

In agricultural biotechnology, the creation of Genetic Modified Organisms (GMO) is highly law-regulated by the government in the 190/99 decree and several resolutions with the main objective of ensure an accurate security level in the laboratory work, experimentation and the correct use of GMO. The working facilities for these organisms must have special characteristic in order to guarantee the employee and environment protection against any hazardous procedure. The risk evaluation of each case step by step is the key to carry out the design of an effective management within the biosafety principles. It also ensures the establishment of a safety course of action at the facilities and the accomplishment of scientific documentation, allowing traceability by the Biosafety National Center, the regulatory entity for this activity.

The national legislation declares different contention level for the transgenic aquatic animals according to its specie and the characteristics of the inserted transgene. To put into operation a proper biosafety management, it was necessary to formulate a risk analysis to identify what kind of adverse event may occur and to achieve appropriate measures to prevent them.

Here, we describe the implementation of the documentation system in the Aquatic Organism section of the Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Also, a biosafety management based on the risk evaluation for assays with transgenic fishes is depicted. This work concluded with the obtaining of the facilities biosafety authorization by the BCN.

S4-P7**A practical approach to screen for the presence of LLrice events in rice grains**

Morán-Bertot I¹, Rodríguez-Cabrera L¹, Ayra-Pardo C¹, Morán Valdivia R², Borrás-Hidalgo O¹, Ponce-Castillo M¹, Pujol Ferrer M¹, Borroto Nordelo C¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología-Camagüey, Camagüey, Cuba

AC: Ayra-Pardo C (camilo.ayra@cigb.edu.cu)

To count on a reliable method to test for the presence of GM products is often complicated mainly because of the lack of certified reference materials and molecular information of the GM variety. In 2006 Bayer CropSciences notified that unregulated LLrice601 was present in some samples of commercial rice seed at low levels. In the present work we describe a practical analytical approach developed in our laboratory to check on rice imports for the possible presence of genetically modified rice LLrice601.

The isolation of genomic DNA from rice grains is sometimes tricky because of the high starch content in this material compared with the low content of DNA that might be fragmented. Here we describe the use of the sodium bisulfite method with minor modifications to obtain rice grain genomic DNA with high quality for PCR and qPCR amplification. A combination of both end-point PCR and Real Time PCR to qualitatively test for the presence of *bar* gene, *35S-bar* and the specific event LLrice601 using either plasmid DNA or a synthetic event-specific fragment instead of certified reference materials is reported. For RT-PCR analysis we used the QIAGEN QuantiTect SYBR Green PCR Kit as compared with the EC official methods for P35S::Bar and LLrice601 event-specific detection that both performed Taqman PCR procedures for semi-quantitative detection.

S4-P8

Biosafety management in the investigation-development stages of assays of recombinant proteins expression in the goat milk and design of the facility requirements for the production stage

Sosa Espinosa AE¹, Santana-Rodríguez E¹, García-Muñiz E¹, Rodríguez-Moltó MP¹, Abeledo MA², Alfonso P², Rodríguez N², Suárez M³, Sánchez O¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de la Habana, Cuba

²Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Habana, Cuba

³Centro Nacional de Seguridad Biológica (CSB), Ciudad Habana, Cuba

AC: *Sosa Espinosa A (angela.sosa@cigb.edu.cu)*

The protein expression in the milk of mammals is one of the alternatives of the Modern Biotechnology for obtaining proteins of biomedical or veterinarian interest. Our project of expression of recombinant proteins in the milk of animals, seeks to establish the methodology of the expression of recombinant proteins in the goat milk, study and using the commercial system of adenoviral vectors AdEasy. The prospective benefit implies the production of considerable volumes of recombinant proteins of high therapeutic value at a very low cost. It could have a great impact in Cuban public health and in the economy. The generation of considerable quantities of these proteins could be used as possible vaccines candidates or pharmaceuticals products for the control or treatment of diverse illnesses. According to results, the use of this vector in goats doesn't imply risks neither for animals nor for the environment. However, these protein expression systems are a peculiar case of application of the biosafety national legislation. To be able to implement the biosafety management from the conception of the project allowed us to make an risk assessment of each step and to foresee the regulatory complexities that can be presented in every stage of the process with the approval of different assay by the Biosafety National Center as national entity in charge of Biosafety and Biosecurity.

S4-P9**Formato documental de bioseguridad para la solicitud, desarrollo e información para ensayos de liberación al ambiente de maíz-Bt transgénico**

Téllez-Rodríguez P¹, Sosa-Espinosa AE¹, Ayra-Pardo C¹, Trujillo-Bacallao D¹, Morán-Bertot I¹, Rodríguez-Acosta E², Rabí Bravo O², Borroto Nordelo C¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, C. Habana, Cuba

²Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova, La Habana, Cuba

AC: Ayra-Pardo C (camilo.ayra@cigb.edu.cu)

En la biotecnología agropecuaria los aspectos de bioseguridad determinan la aprobación de los ensayos en las diferentes etapas (escala de laboratorio, invernadero, casa cultivo, parcela, campo). Para lograr el éxito es imprescindible contar con un sistema documentado por los órganos reguladores nacionales.

Aunque existen grupos de normas de operación que son aplicables, cada etapa requiere el establecimiento de una documentación que va a depender de: tipo de cultivo, del evento que contenga la planta transgénica y de las características del lugar de liberación, por lo que cada caso requiere un análisis para poder establecer un sistema de gestión teniendo en cuenta las particularidades y el diseño del ensayo así como los aspectos de bioseguridad.

En este trabajo se propone un sistema de documentación para los ensayos de liberación de maíz resistente a insectos y tolerante a herbicidas en áreas de 1 ha, en cada una de las fases del cultivo que permite la gestión efectiva de la bioseguridad.

SIMPOSIO 5 / SYMPOSIUM 5

**Interacción Molecular Planta-Patógeno/
*Molecular Plant-Pathogens Interaction***

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S5-1**New approaches to understanding and manipulating pathogen virulence and host resistance**

Jones J

The Sainsbury Laboratory, Norwich, United Kingdom

AC: Jones J (jonathan.jones@sainsbury-laboratory.ac.uk)

Resumen no disponible / Abstract not available

S5-2**Botrytis cinerea and Arabidopsis thaliana: is the plant helping the fungus?**

Metraux J

University of Fribourg, Fribourg, Switzerland

AC: Metraux J (jean-pierre.metraux@unifr.ch)

Resumen no disponible / Abstract not available

S5-3

**Manipulation of plant host defences
by a eukaryotic pathogen**

Birch P

SCRI, Dundee, United Kingdom

AC: Birch P (Paul.Birch@scri.ac.uk)

Resumen no disponible / Abstract not available

S5-4

**Genome resequencing and association
genetics reveals novel *Magnaporthe*
oryzae avirulence genes**

Terauchi R

Iwate Biotechnology Research Center, Kitakami, Japan

AC: Terauchi R (terauchi@ibrc.or.jp)

Resumen no disponible / Abstract not available

S5-5**Interactions of plants with entire microbial communities: an environmental transcriptomics approach**

Schenk P

University of Queensland, St Lucia, Australia

AC: Schenk P (p.schenk@uq.edu.au)

We have developed new tools for functional genomics analyses of plants and associated microbes. These include direct mRNA isolation from environmental microbial communities in the plant's rhizosphere, the construction of cDNA libraries and anonymous cDNA microarrays, and 454 sequencing. These methods can quantify the activities of unknown microbial genes that are affected by environmental factors, linking soil parameters and plant defence responses with microbial activities. The advantages of this novel mRNA-based approach are that it measures the microbial activity (RNA) rather than the presence (DNA) of specific microbes, can monitor the activities of many microbial groups simultaneously, and provides insights into whole-system soil biology, collectively treating soil as a 'super-organism'.

Using this environmental transcriptomics (metatranscriptomics) approach we have studied plant-microbe interactions during (1) plant defence responses, (2) organic and inorganic nitrogen uptake and conversion, and (3) yield decline associated with crop rotation and soil microbial diversity. Our results from studies with field-grown sugarcane show that the effect of crop rotation and fertiliser applications on microbial gene expression profiles is striking, with significant changes detected across several hundreds of genes. The results provide insights into the eco-physiological processes altered in response to cropping management. Similarly, plant defence responses have been studied in the rhizosphere in *Arabidopsis*. Results will be shown for one of the induced defence genes with antimicrobial activities. When secreted in the cell wall in response to pathogen attack this protein confers resistance against nematodes and bacterial pathogens, providing a protective barrier.

S5-6**Identification of bacterial genes induced during the *Xanthomonas*-tomato interaction by RIVET**

Burdman S, Tamir-Ariel D, Rosenberg T, Navon N

Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

AC: *Burdman S (saulb@agri.huji.ac.il)*

The establishment of bacterial pathogens in their host depends on a complex process that requires the coordinated activity of many genes, whose identity and mode of action are largely unknown. Several bacterial genes involved in pathogenicity have been identified using *in vitro* systems. However, these approaches are limited in their capability of mimicking the pathogen-host interaction. Therefore, *in vivo* approaches are desirable to further our understanding of pathogenesis. We used a 'Recombinase *In vivo* Expression Technology' (RIVET) approach to identify *in vivo*-overexpressed (*ivx*) genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), the causal agent of bacterial spot disease of tomato. This screen revealed genes belonging to different categories. To verify expression of some of these genes, their promoter activities were monitored using fusions with the *uidA* (GUS) reporter gene. GUS activity was monitored in rich and in minimal media, the latter mimicking to some extent the plant environment. All tested promoters showed increased activity in minimal as compared to rich medium. Several *ivx* genes were further characterized, and some of them were shown to contribute to bacterial virulence. One of these genes is *citH*, encoding a citrate transporter highly similar to the characterized CitN of *Bacillus subtilis*. An Xcv *citH* deletion mutant was significantly impaired in its ability to grow *in planta* and to cause symptoms compared to the wild type. This mutant was also unable to grow in minimal medium with citrate as the sole carbon source. We intend to further understand the role of citrate uptake in Xcv virulence

S5-7**Impact of glucosinolates and their breakdown products on phytopathogenic fungi**

Yafe H, Levy M

Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

AC: Levy M (levym@agri.huji.ac.il)

Plant pathogens challenge our efforts to maximize crop production, mainly due to our limited understanding of the pathogenesis and defense mechanisms involved in plant-pathogen interactions. One such mechanism involves the enormous variety of phytochemicals produced by plants to cope with pathogens and environmental changes. Glucosinolates are a class of sulfur-containing phytochemicals found mainly in the *Brassicaceae*. Upon tissue damage, glucosinolates are hydrolyzed to biologically active products which have various effects of biological and nutritional importance to plants, animals, and humans, ranging from plant defense to cancer prevention. In this study, we utilized different *Arabidopsis thaliana* mutants altered in their contents of glucosinolates and glucosinolate breakdown products to study the impact of these phytochemicals on phytopathogenic fungi. We compared the broad-spectrum fungus *Botrytis cinerea* and the *Brassicaceae*-specific fungus *Alternaria brassicicola*. Our findings demonstrate that different *B. cinerea* isolates have variable sensitivity to glucosinolates and their hydrolysis products, while *A. brassicicola* is more resistant. We verified these findings with in-vitro assays utilizing glucosinolate breakdown products. We conclude that *A. brassicicola* has adapted to glucosinolates and can cope with their high content and hydrolysis products, whereas *B. cinerea* is more sensitive to these phytochemicals.

S5-8**Antimicrobial phenolics involved in the defense response of the monocot plant calla lily against *Pectobacterium carotovorum***

Yedidia I, Luzzatto T, Kerem Z

Agricultural Research Organization Volcani Center, Bet Dagan, Israel

AC: *Yedidia I (irisys@volcani.agri.gov.il)*

Calla lilies are herbaceous monocotyledonous plants highly sensitive to *Pectobacterium carotovorum*, the causal agent of soft-rot disease. Two plant defense activators, Bion, acting through the salicylic acid pathway, and methyl jasmonate, involving the jasmonate-dependent signaling pathway, differed in both their capacity to induce accumulation of polyphenols, and resistance against the pathogen. To characterize and identify specific compounds that are involved in calla lily induced resistance response, a high resolution method was developed for the separation of individual compounds. An advanced chromatography modeling software DryLab® was used to optimize the separation method. Several upgrading steps were made according to the software guidelines including the increasing of the separation period and the temperature. The improved PDA-HPLC profiling of the free phenolics fraction allowed efficient separation and visualization of 17 distinct peaks and subsequent purification of peaks 14 and 15. The polyphenolic nature of the induced compounds was supported by auto-fluorescence, absorbance spectra, and reaction with Folin-Ciocalteu reagent. To further characterize the nature of induced compounds, peaks 14 and 15 which share similar UV absorbing spectra were collected and UPLC-MS and UPLC-MS/MS were performed to completely separate the pooled compounds. Finally, the compounds were identified as c-glycosylflavonoids, swertisin and isovitexin by mass and NMR spectroscopies.

S5-9**Functional evaluation of plant defence signalling against *Fusarium* ear blight disease in *Arabidopsis* floral tissue**

Hammond-Kosack K

Rothamsted Research, Rothamsted, United Kingdom

AC: Hammond-Kosack K (kim.hammond-kosack@bbsrc.ac.uk)

Resumen no disponible / Abstract not available

S5-10**From viral induced gene silencing to mRNA turnover pathways: viral RNA-mediated defence meets the RNA quality control machinery**

Lacomme C

SCRI, Dundee, United Kingdom

AC: Lacomme C (c.lacomme@ed.ac.uk)

Resumen no disponible / Abstract not available

S5-11

New insight related with tobacco disease resistance

Borrás-Hidalgo O

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Borrás-Hidalgo O (orlando.borras@cigb.edu.cu)

Black shank and blue mold, caused by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and *Peronospora tabacina* constitute the most important diseases of tobacco in the worldwide. Our group developed the identification, molecular characterization and functional analysis of genes involved in the resistance and susceptibility to both diseases. Results related with the glutathione S transferase gene, molecular markers and a tobacco defensina are included. New evidences of the role of these genes in tobacco disease resistance are shown.

S5-12**Resistance to *Fusarium* and fusaric acid in tomato mediated by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with the induction of antioxidants**

Harrach BD¹, Baltruschat H², Fodor J², Kogel K-H²

¹Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

²Institute of Phytopathology and Applied Zoology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

AC: Harrach B (harrach@nki.hu)

The endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of a broad range of host plants. Besides increasing biomass and yield, *P. indica* also confers tolerance to salinity stress and enhances plant resistance against both root- and leaf-infecting pathogens. These beneficial effects are associated with a considerable induction of antioxidants. In this study, the impact of *P. indica* on tomato was investigated during stress caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* or fusaric acid.

P. indica-colonised tomato plants showed a pronounced increase in shoot fresh weight as compared to non-colonised control plants. When *P. indica*-colonised plants were infected with *Fusarium*, biomass production was not reduced significantly by the root pathogen, whilst *Fusarium* infection caused severe biomass reduction of tomato plants in the absence of *P. indica*.

Total ascorbate content was slightly elevated in *P. indica*-colonised tomato roots. *Fusarium* infection altered the ratio of reduced to oxidised ascorbate, resulting in a strong shift towards the oxidised form in the absence of *P. indica*. In contrast, an elevated ratio of reduced to oxidised ascorbate was observed in *P. indica*-colonised tomato roots upon inoculation with *Fusarium*. Levels of reduced and oxidized glutathione dropped significantly in tomato roots following inoculation with *Fusarium*, but remained relatively stable in *P. indica*-colonised plants. *Fusarium* infection decreased the activities of several enzymes of the ascorbate»glutathione cycle in tomato roots, but *P. indica* colonisation prevented the impairment of these antioxidants. Interestingly, similar effects were observed in fusaric acid-treated tomato as well.

S5-13**Modificación de la reacción de hipersensibilidad al virus PVX en *Solanum tuberosum* L. cv. King Edward para conferir resistencia a *Phytophthora infestans***

Rivera C, Medrano G, Ghislain M

Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú

AC: Rivera C (crivera@cgjar.org)

La cubierta proteica del virus PVX (uk3) es conocido como el elicitador de la respuesta de hipersensibilidad en las plantas que llevan el gen Nx. Tal mecanismo de resistencia es bien conservado en reacción con el patógeno de la planta el cual lidera la respuesta de hipersensibilidad (HR) hacia al ataque de *Phytophthora infestans*. La variedad King Edward de *Solanum tuberosum* que porta el gen Nx fue genéticamente transformada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando un gen quimérico que expresa la cubierta proteica del virus PVX aislamiento uk3 controlado bajo el promotor inducible *gst1* que es activado por *P. infestans*.

Esta metodología mostró como resultado la transformación genética de 70 líneas transgénicas. La presencia del transgen fue verificada por pruebas moleculares como PCR y Southern blot, además de la prueba de resistencia a kanamicina. Mediante la técnica de Southern blot, se determinó que hubo 70 eventos independientes de inserción del transgen.

Se realizaron inoculaciones en los invernaderos de bioseguridad con dos aislamientos de *P. infestans* PE8406 y POX067 a las 70 líneas transgénicas, mostrando diferentes grados de progreso de la enfermedad, así como también en algunas líneas transgénicas una clara mancha necrótica típica de una respuesta de hipersensibilidad. Las hojas que mostraron esta respuesta fueron analizadas mediante la prueba de NCM-ELISA de tejido impreso y PCR en Tiempo Real, las cuales confirmaron la expresión del transgen.

SIMPOSIO 5 / *SYMPOSIUM 5*

**Interacción Molecular Planta-Patógeno/ *Molecular
Plant-Pathogens Interaction***

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S5-P1**Identification of components involved in PM3-mediated powdery mildew resistance**

Jordan T, Gross A, Kamber T, Keller B

University of Zurich, Zurich, Switzerland

AC: Jordan T (tjordan@botinst.uzh.ch)

Powdery mildew is one of the major diseases of wheat in temperate regions and can strongly affect grain yield. It is caused by the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Resistance to powdery mildew is mediated by over 30 Pm genes. Only, an allelic series of Pm3 genes has been cloned so far (Srichumpa *et al.*, 2005; Yahiaoui *et al.*, 2006; Yahiaoui *et al.*, 2004). Pm3 mediated resistance is race-specific and associated with a hypersensitive response (HR). The gene products belong to the CC-NB-LRR class of resistance proteins but show only 40% similarity to the MLA powdery mildew resistance proteins in barley. We hypothesise that the fungus secretes effector proteins into the plant cytoplasm that are recognised directly or indirectly by the resistance protein PM3B. Upon recognition a signalling pathway is activated possibly involving multiple protein-protein interactions that finally lead to the induction of an HR. To identify components of this PM3-mediated defense pathway we use the yeast two hybrid system. We constructed two different cDNA libraries from infected leaf tissue. One library covers the early time-points after infection from 0-6 h. The second library covers late time-points (8 and 24 h pi). Both libraries were screened with different PM3 constructs, *i.e.* CC, NB, CC-NB, and LRR domains. Until now we identified nine proteins that interacted with different PM3 domains. These were confirmed in yeast, and will now be validated in planta. Newest results will be presented at the congress.

S5-P2**Expression of defense responses genes in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) treated with two natural oligosaccharines**

González L

Universidad de la Habana, Habana, Cuba

AC: González L (liengonza@fbio.uh.cu)

Cuba is working on the production of natural bioproducts to be used as biorregulators in plants. Among these are the xyloglucans and Pectimorf (Patent no. 1998/171) arising from the partial degradation of plant cell wall. In both cases, it has been found that they have biological activity, including morphogenesis and defence responses depending on the bioproduct concentration used. In this study the aim was the determination of the effect on the expression of five defence responses genes in *Nicotiana tabacum* L. (non-PR expressed genes NPR1, pathogenesis-related protein PR1a, Gluthation transferase GST, Ethylene response factor ERF5 and metacaspase MetalINt), of both bioproducts by RT-PCR. Botanical seeds of *N. tabacum* L. were germinated and grew in Murashige-Skoog medium (MS, 1962). After ten days, plants were acclimatized in liquid MS for 24 hours and treatment was applied. Each bioproduct were evaluated at four concentrations (0.01, 0.1, 5 and 10 mg/L), four times (1, 3, 6 and 8 h), and were used a negative control (MS). Total RNA obtained was reverse transcribed by RT-PCR. The results showed the induction of the genes NPR1, PR1a, GST and a metacaspase Type II gene recently found in *N. tabacum* L. (MetalINt), at all concentrations and time assess. However, the induction of Ethylene response factor ERF5 was not detected. Implication of the bioproducts on plant defence responses and their possible way of action are discussed.

S5-P3**Response of transgenic *A. Thaliana* plants with modified levels of faldh to the interactions with bacterial pathogens and oomycetes**

Díaz Solares M¹, Martínez MC², Rustérucci C³

¹EEPF «Indio Hatuey», Perico, Cuba

²Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³Université Jules Verne-Picardie Sciences, Amiens, France

AC: *Díaz Solares M* (maykelis.diaz@indio.atenas.inf.cu)

Nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) are signaling molecules involved in plant defense. The glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (FALDH) (EC 1.2.1.1), also known as ADH class III, has GSNO reductase activity (GSNOR). For these reasons the response of transgenic plants with modified levels of FALDH in the interactions with two types of pathogens was studied: the oomycete *Peronospora parasitica* and the bacteria *Pseudomonas syringae*, to find out how the modification of the FALDH /GSNOR levels influenced the defense reactions of the plant. The results obtained show that the reduction of the quantity of intracellular FALDH increases the basal resistance to the two pathogens used. The antisense transgenic line was less susceptible to the infection than the control line. The FALDH could play a double role in defense reactions: in the activation/deactivation of the signalization way of NO or GSNO, and modulating the intracellular concentration of the thiol type compounds which can generate nitrosative stress. The over-expression of FALDH/GSNOR hinders the establishment of systemic acquired resistance (SAR), while the plants with 50% less FALDH/GSNOR activity do not show interference in such establishment, which is similar to the control plants. These results suggest that with higher GSNO reductase activity, there is lower quantity of free GSNO, which is necessary to establish plant resistance to diseases. Due to all the above-explained it can be concluded that FALDH is an enzyme involved in the defense processes.

S5-P4**Is a phytoplasma or simple plant disorder responsible for fig wilt disease on indian fig (*Opuntia ficus-indica* Mill) in Mexico central region?**

Noa Carrazana JC¹, Hernández Pérez R², Gaspar R³, Mata P³, Flores Estévez N¹

¹Universidad Veracruzana, INBIOTECA, Xalapa, México

²Centro para la Transformación Agrícola Sostenible (CETAS), Universidad de Cienfuegos, Cuatro Caminos, Cuba

³Laboratorio de Fitodiagnóstico GISENA, Texcoco, México

AC: Noa Carrazana J (jnoa@uv.mx)

Plants wilt, with arrested plant growth and deep yellowing of cladodes and die was observed in Indian Fig (prickly pear cactus) (*Opuntia ficus-indica* Mill) in Mexico central region. In order to find the causal disorder/disease the cladodes showing unknown symptom was analyzed through grafting and a nested-PCR reaction. The symptoms found, deforming, buds proliferation, thickening and heart-shaping in cladodes, with, were all attributed to the presence of a phytoplasma given the amplification of a 1,200 bp fragment of the 16S rRNA gene using primers R16 F2/R2 and P1/P7. Although the symptoms observed do not completely match those described for this organism in the region, a 1,200 bp fragment was amplified, leading us to assume that the phytoplasma corresponds to subgroup 16SrII, previously reported for other crops. The plant-pathogen interaction will be discussed as continue work aims to deep a molecular and morphological fig-phytoplasma characterization.

S5-P5**Descriptorios morfológicos y moleculares de variedades comerciales de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

Machuca Sánchez ML¹, Caro Velarde F¹, Flores Berríos E²

¹Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, México

²CIATEJ A.C., Guadalajara, Mexico

AC: Flores Berríos E (eflores@ciatej.net.mx)

En México, la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es considerada como un cultivo no tradicional, que posee gran potencial en la generación de bioactivos para la industria alimentaria y farmacéutica. Sin embargo, no existen reportes sobre esquemas de selección o registro de las variedades comerciales, lo que limita el desarrollo de procesos biotecnológicos para la obtención de productos de mayor valor agregado, con respecto a la comercialización del cáliz. El presente trabajo integra la primera propuesta de descriptorios morfológicos y moleculares de la especie, particularmente en tres variedades de uso común (Criolla, China y Reina) cultivadas en el estado de Nayarit, México. La caracterización se basó en 41 caracteres analizados estadísticamente observando que la altura de la planta y los días a floración son características agronómicas mayormente correlacionadas con las características morfológicas. El ACP permite diferenciar las tres variedades en estudio y los caracteres con mayor peso son: semilla, tallo, hoja, flor, fruto y contenido antocianinas, días a floración. La caracterización molecular se realizó por medio de marcadores RAPD, utilizando 20 decameros arbitrarios, se obtuvieron 80 marcadores que expresan un porcentaje de polimorfismo de 43%, observando marcadores únicos para las tres variedades. Se construyó una matriz de presencia/ausencia de bandas con la cual se realizó un análisis de agrupamiento (UPGMA). El dendrograma obtenido permitió distinguir las tres variedades. El trabajo genera una importante base para la identificación de cultivos con potencial para los mercados farmacéutico y de alimentos.

S5-P6**Genetic polymorphism from six isolates of *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*, causal agent of blue mold tobacco disease**

Silva Larrañaga YK, Muiño B, Chacón Chacón O, Crespo Romero JA, Borrás Hidalgo O

Instituto de Investigaciones del Tabaco, Habana, San Antonio de los Baños, Cuba

AC: *Silva Larrañaga Y (yussuan@iitabaco.co.cu)*

Very little is known about the genetics or molecular biology of *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. The objective of this study was to analyze a DNA polymorphic region to find genetic variability among *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* Cuban isolates. The 1602 genomic region from *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* Kentucky (EEUU) isolate was selected to detect the genetic polymorphism between the six previously collected Cubans isolate. The purified genomes from the six isolates were used as template for the 1602 region specific -PCR amplification. A 232 bp (base pairs) DNA fragment was yielded from the PCR. The fragment from the six isolates was sequenced and alignments were performed. The region amplified shown high degree of genetic polymorphism within the isolates so that the sequence differences allowed relate to them with the own origin area. The 5 and 6 isolated from Pinar del Río shared among them a high sequence homology (98%) and were the most similar to 1602 region with a 97% homology sequences. The isolated from Havana 1, 2 and 3 were very closer between them because they shared an identity sequence of a 98%, however the similarities with the 1602 and the Pinar del Río isolated was poor, approximately 29% and 31% respectively. In the other hand the isolate 4 from Holguín shown the most little similarities with the region 1602 (24%) and when its compare with the Pinar del Río and Havana isolated the nucleotide identity was 35% and 45% respectively.

S5-P7**Efficient Gene Replacement and Direct Hyphal Transformation in *Sclerotinia sclerotiorum***

Levy M, Erental A, Yarden O

Hebrew university of Jerusalem, Rehovot, Israel

AC: Levy M (levym@agri.huji.ac.il)

Homologous recombination is required for gene-targeted procedures such as gene disruption and gene replacement. Ku80 is part of the nonhomologous end-joining DNA-repair mechanism in many organisms. We identified and disrupted the Ku80 homologue in *Sclerotinia sclerotiorum* and generated heterokaryon mutants enriched with Ku80-deficient nuclei (ssku80). Sclerotial formation and pathogenicity of ssku80 mutants were normal on tomato fruits. The frequencies of homologous recombination in these strains were much higher than those of the wild type when transformed with a *cna1* (encoding calcineurin) replacement construct. We coupled the increase in homologous recombination with a direct BIM-LAB-mediated transformation procedure, which utilizes compressed air to assist the transforming DNA in penetrating fungal hyphae of *S. sclerotiorum*. We found this method to be efficient and reproducible, and to not alter the mutants' fitness. We also demonstrated the first case of direct transformation of sclerotia. In this study, nourseothricin was introduced as a selectable marker in *S. sclerotiorum*. The described tools and procedures will improve our ability to study gene function in *S. sclerotiorum* and are most likely to be adaptable for use in other plant pathogens.

S5-P8**Análisis de la diversidad y evaluación de la resistencia al moho azul (*Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina*) en 17 híbridos interespecíficos (*Nicotiana tabacum* x *Nicotiana megalosiphon*) x *N. megalosiphon*.**

Pérez Lara E¹, García H¹, Canales E¹, Molina S², Infante D²

¹Instituto de Investigaciones del Tabaco, San Antonio de los Baños, Cuba

²Fundación Instituto de Estudios Avanzados, Caracas, Venezuela

AC: Pérez Lara E (enid@iitabaco.co.cu)

La hibridación interespecífica es una de las vías por las que han evolucionado las plantas cultivadas y un mecanismo muy importante en la formación de nuevas especies, en la actualidad, continúa siendo una importante herramienta en el mejoramiento del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), ya que el vasto reservorio de germoplasma potencialmente utilizable del género *Nicotiana* continúa inexplorado; otra consideración para su empleo, es que los cultivos genéticamente modificados incluyendo el tabaco están siendo, justamente o no, vistos con recelo por el público en general. Con el objetivo de conocer la diversidad existente en una muestra de 17 híbridos interespecíficos (*Nicotiana tabacum* x *Nicotiana megalosiphon*) x *N. megalosiphon* y efectuar la selección de los genotipos más promisorios, se evaluaron diez marcadores SSR, un marcador SCAR descrito para la resistencia al moho azul (*Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina*) (Julio y col., 2006) y se efectuó la prueba de resistencia al moho azul mediante el Test Cotiledón. El polimorfismo detectado mediante SSR fue elevado, la banda correspondiente al marcador SCAR fue observada en ambos progenitores y en todos los híbridos excepto en cuatro, que a pesar de no presentar esta banda resultaron resistentes al moho azul en la prueba de resistencia a este.

S5-P9**U1 snRNP identificación en frijol negro Zacatecas y su importancia en dormancia y germinación**

Cortés Hermosillo JJA, Cabral Arellano FJ, Esparza Ibarra EL, Valdez Cepeda RD

Universidad Autónoma de Zacatecas, Guadalupe, México

AC: Cortés Hermosillo J (jesuscortes59@gmail.com)

Las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs) son partículas conformadas por ARN y proteínas, presentes en las células de eucariotes, conservadas evolutivamente. Involucradas en el splicing de pre-ARNm. Las principales snRNPs se denominan U1, U2, U4, U5 y U6, se unen de manera ordenada con el pre-RNA_m y múltiples factores proteicos conformando el espliceosoma, donde ocurre el «*splicing*». El objetivo fue identificar la expresión de U1snRNP en embriones de frijol en dormancia utilizando autoanticuerpos Sm/RNP. Se inmunizaron conejos blancos Nueva Zelanda con proteínas purificadas de embriones, los sueros de los conejos inmunizados fueron probados por W. B. e inmunoprecipitación. Se inmunoprecipitó el U1snARN de embriones, se determinó la presencia de ARNm de los péptidos U1 70 kDa y de U1A 32 kDa por RT-PCR. Por W. B. se demostró la homología en peso molecular entre los péptidos de células HeLa y embriones de frijol; presentando capacidad de inmunoprecipitar las snRNPs de embrión. Las interacciones proteína-proteína en los complejos U1snRNP, se co-inmunoprecipitaron por métodos no isotópicos, demostrando la presencia de complejos de U1snRNP en embriones de semilla en dormancia, indicando la presencia de estructuras macromoleculares del espliceosoma, preformadas y disponibles para los eventos tempranos de la germinación. Probablemente el *splicing* es un evento temprano que participa en el control del desarrollo de la planta, dado que los factores ambientales que activan la germinación son tan solo agua, oxígeno y temperatura; la presencia de ARNm de vida larga en período de dormancia, en un estado de espera, también influyen en el control de ese desarrollo

S5-P10**Empleo de marcadores ISSR para la caracterización genética de somaclones de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184 obtenidos en condiciones de estrés salino**

Fuentes Alfonso L¹, Domínguez A¹, Ruíz ML², García P², González AI², Mesa A³, González S⁴

¹Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba

²Área de Genética Universidad de León, León, Spain

³EEPF «Indio Hatuey», Perico, Cuba

⁴Facultad de Biología Universidad de La Habana, Vedado, Cuba

AC: *Fuentes Alfonso L (leticia.fuentes@umcc.cu)*

Stylosanthes guianensis CIAT-184 es una leguminosa promisoría para la recuperación de suelos pobres y poco fértiles de Cuba. Las dificultades para aplicar métodos de mejora convencional en las especies de este género han conllevado a la aplicación del cultivo *in vitro* de células y tejidos, la selección *in vitro* y la transformación genética como herramientas viables en estrategias de mejora. El objetivo del presente trabajo fue la caracterización genética de somaclones obtenidos en condiciones de salinidad, utilizando marcadores ADN de tipo ISSR. Fragmentos de hipocótilos fueron inducidos y subcultivados varias veces en medio suplementado con MS, 1mg/L de 2,4-D, 2 mg/L de 6-BAP y 100 mM de NaCl. A partir de regenerantes obtenidos en medio suplementado con 3 mg/L de 6-BAP, 0.01mg/L de ANA y 100 mM de NaCl se aisló ADN genómico que fue comparado con ADN genómico extraído de 20 plántulas germinadas en cámara húmeda suplementada con solución Hoagland. De los cebadores para marcadores ISSR utilizados se seleccionaron los que amplificaran más de 6 bandas y menos de 13. Utilizando el Software Tulkas para comparación de bandas se determinó que el índice de polimorfismo era similar entre regenerantes (SC3) y la población original. Aunque con una frecuencia muy baja fue posible detectar la ausencia de determinadas bandas al comparar somaclones obtenidos del mismo callo.

S5-P11**Obtención de polimorfismos en chiles Puya y Ancho por AFLP's**

Cabral Arellano FJ, Esparza Ibarra EL, Valdez Cepeda RD, Cortés Hermosillo JJA

Universidad Autónoma de Zacatecas, Guadalupe, México

AC: *Cabral Arellano F (fjcabral@gmail.com)*

El chile en Zacatecas destaca por su importancia socioeconómica, ya que representa gran parte del producto interno bruto agropecuario del estado. El objetivo del trabajo fue caracterizar a nivel molecular los diferentes biotipos de chile que se producen como selecciones locales, a saber: ancho y puya. Se generó información de los polimorfismos de su ADN mediante AFLP's de los chiles secos de la región; con el fin de contar con la identidad de estos materiales criollos, evitando así el saqueo por la biopiratería.

Se germinaron las semillas de los chiles: 1) Ancho Saladillo 2) Ancho Calera 3) Puya Saladillo y 4) Puya Calera, seguidamente extracción del ADN utilizando buffer de extracción con CTAB; se verificó la integridad del ADN, por electroforesis en geles de agarosa. Para el protocolo de AFLP's, se realizó una digestión del ADN con enzimas de restricción y después se ligaron los adaptadores y se preamplificó con iniciadores específicos. Se hizo una segunda PCR selectiva con dos iniciadores marcados con fluorocromo (700 y 800 nm). Los fragmentos generados, se resolvieron en gel utilizando equipo secuenciador. Los dendogramas, se generaron utilizando STATISTICA v4.2. En conclusión se extrajo ADN de calidad de diferentes chiles secos con los cuales se obtuvo un patrón característico de AFLP's con cada iniciador para cada biotipo y los cuales fueron útiles para detectar polimorfismos y genotipificar los cultivares; observando las distancias de los grupos en el dendograma y en los cuales los chiles anchos son el grupo más diverso genéticamente.

S5-P12**Análisis del estrés oxidativo en aguacate criollo (*Persea americana* Mill Var *drymifolia*) en respuesta a la infección por *Phytophthora cinnamomi* Rands**

García-Pineda E, Castro-Mercado E, Benezzer-Benezzer

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, Morelia, México

AC: Garcia-Pineda E (egpineda@zeus.umich.mx)

La muerte descendente del aguacate causada por *Phytophthora cinnamomi* es la enfermedad más devastadora de los árboles de aguacate a nivel mundial. El objetivo de este trabajo fue analizar la respuesta oxidativa en raíces de aguacate criollo infectadas por *P. cinnamomi*, lo cual incluyó el análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO): anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo como peroxidación de lípidos; de la actividad de catalasa extracelular de *P. cinammomi in vitro*; y de la actividad de peroxidasas totales; así como la determinación de la concentración de lignina y de epicatequina. Se encontró que las ERO se acumulan en respuesta a la infección por *P. cinnamomi*; que el patógeno es capaz de secretar catalasa, lo cual le permite contrarrestar el peróxido de hidrógeno producido por la planta; que la actividad de peroxidasas totales se incrementa de una manera dependiente del tiempo de inoculación y que dicho incremento no se debe a su participación en el proceso de lignificación ya que la cantidad de lignina no cambia como resultado de la infección. Finalmente, la concentración de epicatequina disminuye en respuesta a la infección lo cual correlaciona con el incremento en la cantidad de peróxido de hidrógeno. Esto favorece la permanencia de dicha especie en niveles elevados, lo que podría facilitar el proceso de infección por *P. cinnamomi*, al disparar la muerte celular hipersensible. Se concluye que la respuesta oxidativa es evadida por *Phytophthora cinnamomi* durante la infección del aguacate criollo.

S5-P13**Introduction to the characterization of RNA-dependent RNA polymerase 6 gene from the solanaceous *Nicotiana tabacum* and *Solanum lycopersicum***

Ramos PL, Ruíz Y, Nordelo A, Martínez W, Rodríguez R, Sánchez Y, Callard D, Fuentes A, Pujol M

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Ramos González P (pedro.ramos@cigb.edu.cu)

RNA-dependent RNA polymerases are one of the four primary classes of proteins enlisted in plant RNA silencing machinery. Up to date, six different RDR genes have been identified in the *Arabidopsis thaliana* genome. Arabidopsis RDR6 is involved in initiation steps of silencing pathways in the synthesis of dsRNA from transgenes, viral dsRNA, convergent transcription or microRNA-cleaved mRNA. It is also implicated in the maintenance steps of post transcriptional gene silencing. In solanaceous plants RDR6 gene has been only characterized in *Nicotiana benthamiana*. Here we reveal the nucleotide sequence of the *Nicotiana tabacum* var. BHmN RDR6 gene. It is deposited at the gene bank database under de accession number FM202385. On the other hand, the putative sequence of the RDR6 gene from tomato (*Solanum lycopersicum*) was identified after a Blast assisted survey of the Genbank database using sequences derived from the tobacco RDR6 gene. The putative tomato RDR6 gene was localized at the chromosome 8 (acc. no. AP009260). Nucleotide comparison analyses show that tobacco and tomato RDR6 genes share a 97.6% and 77.5% of identity with the RDR6 from *Nicotiana benthamiana*, respectively. *In silico* studies suggested no presence of introns along the tobacco RDR6 sequence and the presence of two introns in tomato RDR6 gene. Southern blots analyses have revealed the presence of more than a copy of RDR6 gene in tobacco genome. A phylogenic analysis among RDR genes is also shown.

S5-P14**Differential pattern of phytotoxic compounds and microbial proteins in culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense RACE 1 and RACE 2**

Portal González N, Arzola M, Achade C, Persaud I, Acosta M, Leiva M, Roque B, Alvarado Y, Companioni B, Santos R

Centro de Bioplantas, Ciego de Ávila, Cuba

AC: Portal González N (nayanci@agronomia.unica.cu)

Panama disease or Fusariosis, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, is one of the most important diseases for musaceas plants. The present research was developed with the objective to evaluate of phytotoxic activity and total proteins in culture filtrate of *F. oxysporum* f. sp. cubense race 1 and race 2. It was evident that *F. oxysporum* f. sp. cubense race 1 and race 2 are able to produce the highest levels of extra cellular phytotoxic activity in the log phase of growing with slower difference in the moment for that (15 and 16 days). The microorganism like to Race 1 produced and excreted to the liquid medium proteinaceous molecules since 11 days of growing. Although with different patterns of synthesis during the growing phase, the higher levels were achieves at 13 days. For the microorganism linked with Race 2, the excretion of proteinaceous compounds started before, since 5 days it was recorded a value superior to 0.448 mg.mL⁻¹, reaching the higher concentration at 21 days. Related to the differential response from different cultivars toward the concentrated culture filtrate of *F. oxyporum* f. sp. cubense race 1 (day 15) and race 2 (day 16) it was evident a partial resistance or tolerance in the cultivars FHIA 01, FHIA 02, FHIA 03, FHIA 04, FHIA 18 and FHIA 21 to both races. While the cultivars more susceptible toward race 1 were Gross Michel, Yangambi, Pisang and Manzano criollo, for the race 2 were Burro criollo, Burro CEMSA and Pisang jari guaya.

S5-P15**Amplificación por círculo rodante (ACR):
Una alternativa para el estudio de la diversidad
de begomovirus en Cuba**

Fiallo-Olivé E¹, Martínez-Zubiaur Y², Quiñonez M²

¹Facultad de Biología, Universidad de La Habana, C. Habana, Cuba

²Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana, Cuba

AC: *Fiallo-Olivé E (elvirafiallo@gmail.com)*

La amplificación por círculo rodante (ACR) ha constituido una alternativa eficaz y rápida para los estudios de diversidad biológica de geminivirus en diferentes regiones de mundo. La amplia diversidad de begomovirus presentes en diferentes cultivos en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, ha impedido contar con cebadores genéricos efectivos para el estudio de este género viral. En Cuba, extensas áreas dedicadas a cultivos de hortalizas, papa, frijol y tabaco, son afectadas por diferentes especies de begomovirus. El uso de la ACR ha permitido en el último año la clonación y caracterización de componentes virales, identificándose nuevos virus afectando los cultivos de tomate, pimiento y tabaco, así como la confirmación de especies en malezas que actúan como reservorio natural de virus y vector. En los trabajos de prospección nacional se colectaron plantas con síntomas asociados a la posible presencia de begomovirus, se realizaron extracciones del ADN viral y se sometieron a amplificación por círculo rodante con el objetivo de obtener copias del genoma viral íntegro. Como resultado, se determinó la presencia de un nuevo begomovirus bipartito en el cultivo del tomate en Cuba, y dos nuevos begomovirus afectando tabaco, uno de los cuales se detectó también en pimiento. Fueron encontradas nuevas especies virales en malezas como *Rhynchosia minima* L. y *Walteria indica*. Los resultados obtenidos confirman la utilidad del uso del ACR para profundizar en los estudios de las nuevas especies de begomovirus y su diversidad e interacciones en los agroecosistemas productivos.

S5-P16**Transcriptomic analysis of the putative role of brassinosteroids in plant defence**

Coll Y, Borrás O, Chacón O, Coll F

Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Ciudad Habana, Cuba

AC: Coll Y (yamcoll@fq.uh.cu)

Plant defence against pathogens is generally the result of the activation of a complex network of mechanisms and reactions organized at different levels of regulation. Among others, compounds with known function in growth and development of plants, including phytohormones, play also a role in plant defence.

Brassinosteroids (BR) comprise a class of over 40 polyhydroxylated sterol derivatives that appear to be ubiquitously distributed throughout the plant kingdom. BRs regulate the expression of numerous genes, impact the activity of complex metabolic pathways, contribute to the regulation of cell division and differentiation, and help control overall developmental programs leading to morphogenesis. A particular feature of BRs is their potential to increase resistance in plants to a wide spectrum of stresses, such as low and high temperatures, drought, high salt, and pathogen attack. However, only a few studies aimed at understanding the molecular mechanism by which BRs promote stress resistance have been undertaken.

In this work, studies intended to provide clues about the regulation of genes associated to the protective response of plants mediated by BRs are described. Data obtained upon treatment of plants with BRs and inoculation with plant pathogens -including the behaviour of several genes previously known as components of the plant response to pathogen attack- is reported here.

S5-P17**Estudio de diversidad de la mosca barrenadora del tallo en haba (*Melanagromyza* spp.)**

Claire T, Moya K, Céspedes M, Ávila T

Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani, Cochabamba, Bolivia

AC: *Avila T (t.avila@fundacionpatino.org)*

El cultivo de haba en Bolivia es atacado por diversas plagas que limitan la producción, entre ellas, la mosca barrenadora (*Melanagromyza* spp.) Esta mosca ocasiona heridas en la base del tallo del haba por las cuales se introducen hongos, principalmente los del género *Fusarium*, que ocasionan la pudrición de la raíz. Se han encontrado especímenes en los valles y cabecera de valles, de los departamentos de Cochabamba, Chuquisaca, Potosí y Santa Cruz. Con el objetivo de estudiar la variabilidad del insecto se ha realizado una caracterización morfológica y molecular de los especímenes colectados en todos los lugares del país donde esta plaga está difundida. Se ha estandarizado la metodología para la extracción de ADN, obteniéndose mejores resultados utilizando 1% de proteinasa K en el buffer de extracción y utilizando solamente el tórax y el abdomen de las moscas. Se han empleado 29 marcadores encontrándose 15 con polimorfismo, 12 RAPD y 3 ISSR (RAPD-FM, RAPD-1, RAPD-2, RAPD-3, RAPD-4, OPB-08, U-109, OPH-3, V20-1100, OPT-01, P-3, UCB-85, ISSR3, ISSR4 e ISSR5). En los resultados de la caracterización molecular se puede observar que existe variabilidad genética en las muestras estudiadas y además los individuos recolectados en el valle alto de Cochabamba agruparon de manera separada a los recolectados en el resto del país.

S5-P18

Diagnóstico de virus y mollicutes del maíz en Bolivia*Céspedes M, Ávila Alba T*

Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani, Cochabamba, Bolivia

AC: Avila Alba T (t.avila@fundacionpatino.org)

Durante los ciclos 2003/2004 y 2004/2005 se colectaron muestras foliares de plantas, con síntomas típicos de la presencia de virus y mollicutes, en 41 localidades de las principales zonas maiceras de Bolivia. Estas zonas comprendieron ambientes de valle templado, valle mesotérmico, subtropical y trópico y chaco subandino. Las muestras colectadas fueron analizadas mediante pruebas serológicas (DAS-ELISA) y moleculares (PCR y RT-PCR), para verificar la presencia de 7 virus y 2 mollicutes reportados con mayor frecuencia a nivel de Centro y Sudamérica.

Los patógenos encontrados con mayor frecuencia a nivel nacional, fueron: el mollicute CSS (Espiroplasma del achaparramiento del maíz), el MRFV (Virus del rayado fino del maíz), el MDMV (Virus del mosaico enanizante del maíz), el SCMV (Virus del mosaico de la caña de azúcar) y el MCMV (Virus del moteado clorótico del maíz). El CSS fue detectado por DAS-ELISA y PCR, el MRFV por RT-PCR y los 3 restantes por DAS-ELISA.

Los patógenos más frecuentes a nivel de zonas fueron: en la zona de chaco subandino, el CSS detectado en 8 de las 10 localidades recorridas; en los valles templados, el CSS encontrado en 15 de 19 localidades y el MRFV encontrado en 12 de 17 localidades; y en los valles mesotérmicos el MDMV y el SCMV detectados en 5 de las 7 localidades recorridas. En la zona de subtropical y trópico húmedo se encontraron solamente 3 de los 9 patógenos, el MRFV en 6 de las 7 localidades recorridas, el SCMV en 5 localidades y el CSS en 4 localidades.

S5-P19**Identificación de secuencias de defensinas
en *Lycopersicum esculentum***

Rojas Arias AC, Zamora H

Grupo de investigación en Bioquímica Fitopatológica y Evolución molecular de la Universidad Nacional, Bogotá D.C., Colombia

AC: *Rojas Arias A (acrojasa@unal.edu.co)*

Los organismos multicelulares producen péptidos antimicrobianos como una defensa innata ante los patógenos. Actualmente en tomate existe evidencia experimental de genes que codifican como defensinas, y dos genes recientemente encontrados por similitud *In silico*. Nosotros, utilizando el modelo oculto de Harkov implementando el algoritmo HMMER 2.3.2., identificamos cinco nuevos genes DELFs sobre lo que va secuenciado sobre el genoma del tomate a la fecha (25% aprox). La identificación de estos nuevos genes en un proyecto de secuenciación apenas emergente representa un punto de partida para la exploración del mecanismo de defensa de esta planta basado en defensinas.

S5-P20**Diagnóstico de virosis de haba en Bolivia**

Céspedes M, Ávila Alba T

Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani, Cochabamba, Bolivia

AC: *Avila Alba T (t.avila@fundacionpatino.org)*

El cultivo de haba en Bolivia es muy importante, sobre todo en los Departamentos de La Paz, Potosí, Cochabamba, Chuquisaca y Tarija. Los últimos años se observaron síntomas de virosis en este cultivo y se realizaron algunos trabajos de diagnóstico los años 2006 y 2007. Se colectaron muestras sintomáticas foliares para verificar, mediante detección serológica, la existencia de algún virus.

Se encontraron 5 virus, de los cuales tres fueron los de mayor distribución geográfica: el BLRV (Virus del enrollamiento de la hoja del frijol), el BYMV (Virus del mosaico amarillo del frijol) y el AMV (Virus del mosaico de la alfalfa); encontrados en La Paz, Potosí, Chuquisaca y Tarija.

Los virus con menor distribución geográfica fueron: el BCMV (Virus del mosaico común del frijol), encontrado también en los 4 departamentos, pero con menor frecuencia dentro de cada uno de ellos y el BCMNV (Virus del mosaico común necrótico del frijol), encontrado en La Paz, Potosí y Tarija, con una frecuencia muy baja.

De acuerdo con la caracterización de síntomas a nivel de campo, se encontraron las siguientes relaciones entre síntomas y presencia de virus detectado por pruebas serológicas (DAS y TAS ELISA): Clorosis internerval y mosaico, con la presencia de BYMV, BCMV y BCMNV, mosaico y otros patrones cloróticos, con la presencia de AMV y hojas coriáceas, clorosis y enanismo de plantas, con la presencia de BLRV.

S5-P21**Secuencia interna de un gen que codifica para proteasa cisteínica de *Jacaratia mexicana* a partir de cDNA**

María del Carmen OS, Paola BZ

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, Ticomán, México

AC: Paola B Z (oliveripn@hotmail.com)

Las proteasas o peptidasas tienen gran diversidad de funciones fisiológicas en todos los organismos vivos, por lo cual son de gran interés científico e industrial. Asimismo, hemos demostrado que dichas enzimas pueden competir favorablemente con la papaína de *Carica papaya*. Dado que esta planta no ha sido domesticada, una alternativa de producción de estas enzimas es por medio de la sobreexpresión de esta proteasa, utilizando un sistema más controlable que dicha planta silvestre como *Escherichia coli*.

Se realizó PCR usando oligos diseñados en nuestro laboratorio; el fragmento obtenido fue de aprox. 600 pb. Se clonó el fragmento en TOPO TA y se obtuvo su secuencia de nucleótidos que tuvo similitud con las secuencias de proteasas de planta.

Por otra parte, en la extracción de DNA se obtuvieron 390 µg de DNA/g de hoja valor similar obtenido en un estudio anterior a partir de hojas de plantas adultas de *J. mexicana* y en hojas de la papaya.

El producto amplificado por PCR de aprox. 700 pb fue de una región interna del gen hasta la región carboxilo que posiblemente codifica para una o varias proteasas cisteínicas, en base al diseño de iniciadores realizado con respecto a la secuencia de aminoácidos de una de las proteasas caracterizadas con anterioridad por el grupo de trabajo. El fragmento amplificado de aprox. 700 pb es un fragmento del gen que codifica para una o varias proteasas de *Jaccaratia mexicana*.

S5-P22**Uso de marcadores RAPDs en el estudio del efecto de biorreguladores cubanos en mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.)**

Hernández RM, Diosdado E, Peteira B, Pino B, Linacero R, Vázquez A, Cabrera JC, Coll F

Centro Universitario Isla de la Juventud, Isla de la Juventud, Cuba

AC: *Hernández R (rmargarita@hotmail.com)*

El desarrollo de la Biotecnología en la solución de problemas concretos en la agricultura ha adquirido un gran auge en los últimos años, tal es el caso de la utilización de marcadores moleculares para obtener información acerca de la estabilidad genética de las plantas regeneradas en medios de cultivo con biorreguladores cubanos, de los cuales no se conoce su modo de acción. Existen diversos procedimientos para poder estudiar la variabilidad presente en las secuencias de ADN, sin ser necesario un conocimiento previo de las mismas. Entre estas técnicas podríamos destacar las técnicas de los RAPD. Se utilizaron plántulas obtenidas a partir de la embriogénesis somática en medio de cultivo MS suplementado con diferentes concentraciones de biorreguladores cubanos, para un total de 5 tratamientos incluyendo al control. Teniendo en cuenta estos antecedentes, los objetivos del presente trabajo estuvieron encaminados a la aplicación de los RAPDs para determinar la variabilidad genética que pudiera inducir el empleo del Biobras-6, MH5 y 24-epibrasinólido y el Pectimorf®, al ser utilizados en el cultivo *in vitro* de mandarina Cleopatra, en sustitución de fitohormonas comerciales de alto costo y que generalmente producen variabilidad genética. Se emplearon las condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y 18 cebadores de Operon Technologies Alameda California. Los resultados de la PCR mostraron que hubo amplificación con los 16 cebadores de RAPDs de los 18 empleados, siendo el número total de bandas polimórficas de 23, observándose un bajo polimorfismo genético.

S5-P23**Chromosome walking from a SCAR marker linked to blue mold resistance in tobacco**

Canales E, García H, Chacón O, Pujol M, Borrás-Hidalgo O

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Borrás-Hidalgo O (orlando.borras@cigb.edu.cu)

Blue mold, caused by the fungal pathogen *Peronospora hyoscyami* de Bary f. sp. *tabacina*, is one of the most important foliar diseases of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Cuba and worldwide. A SCAR marker linked to blue mold resistance, have been previously reported. In an attend to know the genetic factor involve in this resistance, a chromosome walking was performed in the 3' and 5' orientation, by mean of the PCR-based method self-formed adaptor PCR (SEFA PCR) from a Cuban highly resistant tobacco variety, BHmN. Three fragment were cloned and sequenced, one walking into the 5' and two into the 3' end of the known DNA sequence, with a size of 3,304 pb (SW5-1), 1950 pb (SW3-1), and 3,969 pb (SW3-2) respectively. PCR amplification using primers designed from the fragments SW3-1 and SW5-1 have a high coincidence with the original SCAR marker, tested on 40 accessions, including varieties, lines and species. Analysis of sequence comparison with public databases revealed a significant homology with expressed and genomic sequences from *Nicotiana* and others *Solanaceae* species, including a putative NBS-LRR protein. This information should aid in a better understanding of blue mold- tobacco interaction.

S5-P24**A novel antimicrobial protein isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers high resistance to plant pathogens**

Portieles R, Ayra C, González E, Rodríguez R, Chacón O, López Y, Pujol M, Enríquez G, Borrás-Hidalgo O

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Borrás-Hidalgo O (orlando.borras@cigb.edu.cu)

Defensins are small cysteine-rich peptides with antimicrobial activity. We demonstrate that the *Nicotiana megalosiphon* antifungal peptide (NmDef02) defensin displays strong activity against the agronomically important fungal pathogens. Expression of the NmDef02 peptide in transgenic plants provides robust resistance in greenhouse condition. Additionally, the synthetic cDNA with codons preferred in yeast was cloned into the pPIC9K plasmid directly in-frame with the secretion signal alpha mating factor, and highly expressed in *Pichia pastoris*. Activity assays showed the recombinant NmDef02 inhibited specifically the growth of several pathogenic fungi.

S5-P25**Differences in glutathione-S-transferase gene in new rice genotypes highlighted by abiotic stress tolerance**

Rodríguez M, González MC, López Y, Pérez N, Borrás-Hidalgo O

CIGB, Ciudad Habana, Cuba

AC: Borrás-Hidalgo O (orlando.borras@cigb.edu.cu)

The breeding of new rice varieties with tolerance to abiotic factors is a vital goal in breeding programs. In this work was evaluated by molecular markers AFLP, a group of somaclones and mutants of rice that showed good agronomic traits and tolerance to salinity in the field. The polymorphic bands that were present only in tolerant genotypes were sequenced and their nucleotide sequences were compared with those reported in the GenBank database using the Blast alignment. The results revealed that several fragments AFLP are counterparts to fragments of genes and proteins from rice and other plant species. One such gene homologies corresponded to glutathione-S-transferase (GST) that has been reported to be associated with responses to abiotic factors in plants, through its participation in detoxification process. It is discussed the importance of the differences in the GST gene from the tolerant genotypes compared with the susceptible donor variety.

S5-P26**Glutathione S transferase gene is required for defense of tobacco black shank**

Hernández I, Rodríguez R, Chacón O, López Y, Pujol M, Borrás-Hidalgo O

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Borrás-Hidalgo O (orlando.borras@cigb.edu.cu)

During the infection by fungal pathogens, plants cells respond by expressing a battery of disease genes, which can result in the production of several toxic plants products, including species of active oxygen and fitoalexins. In addition, a pathogenic fungus can produce stress inducing chemicals, such as the phytotoxins, resulting in a significant stress and damage in the host cells. One response in plants is the increased expression of glutathione S-transferase (GST) following by the infection of pathogens. Molecular characterization and function analysis of the glutathione S transferase gene during a compatible interaction was evaluated. Stable silencing of GST in susceptible tobacco plants induced strong resistance to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. The results shown evidence about the role of GST during a compatible interaction.

SIMPOSIO 6 / SYMPOSIUM 6

**Probióticos y Prebióticos: Ingredientes Activos
de Alimentos Funcionales/
*Probiotics and Prebiotics: Active Ingredients of
Functional Foods***

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S6-1**Fructans biology and plant fructosyltransferase functionality**

Smeekens S¹, Hernández L², Ritsema T¹

¹Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, Netherlands

¹CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: *Smeekens S (j.c.m.smeekens@uu.nl)*

Fructans are fructose polymers that can be synthesized by a number of plants. The enzymology and molecular biology of fructans has been worked out in the past two decades and transgenic plants have been produced that accumulate fructans. Many different plant fructosyltransferase (FT) and fructanhydrolase genes were identified and the functionality established. We have been involved in cloning onion FT genes and in using such genes for biotechnological applications. Introduction of onion 1-SST and 6G-FFT cDNA's in sugar beet led to the production of onion-type inulin neo-series, showing that 1-SST and 6G-FFT are together sufficient to produce the fructans found in onion. Fructans accumulate to high level with a concomitant reduction in sucrose. No yield loss was observed in these experiments (Weyens *et al.*, Plant Biotechnol J 2004; 2:321–327). Recent research in the laboratory focuses on the enzymatic properties and mechanism of action of the fructosyltransferase enzymes. It has been proposed that fructosyltransferases evolved from vacuolar invertases and we are especially interested in understanding the evolutionary events that changed such invertases into fructosyltransferases. For this we have initiated a mutagenesis program to identify the crucial enzyme regions and important amino acids that increase fructosyltransferase over hydrolase activity (Ritsema *et al.*, Plant J 2006; 48:228-237). Our findings and those obtained by other groups will be discussed.

S6-2

A yeast-based biocatalyzer for 1-kestose production from sucrose

Hernández L¹, Trujillo LE¹, Alfonso D¹, Menéndez C¹,
Pérez E², Martínez D², Ramírez R¹, Arrieta JG¹

¹CIGB, La Habana, Cuba

²CIGB, Sancti Spíritus, Cuba

AC: Hernández L (lazaro.hernandez@cigb.edu.cu)

Fructooligosaccharides (FOS) are typical prebiotics of increasing demand in the functional food market. The health-promoting effects of FOS intake are widely documented in animals and humans. The trisaccharide 1-kestose (GF₂) is the most commercially attractive FOS due to its more efficient transport and fermentation by colonic *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species. In an attempt to develop a biocatalyzer yielding high levels of 1-kestose from sucrose, our group has investigated the expression of wild-type and mutated fructosyltransferases from different sources in *Pichia pastoris*. The endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* secretes a levansucrase (referred as LsdA) which transforms sucrose into glucose, fructose, short-chain FOS, and the B(2,6)-linked polyfructan levan. LsdA is catalytically more efficient than fungal and plant FTFs, but 1-kestose accumulation is limited by the undesired simultaneous reactions conducting to fructose release and levan formation. Levan-abolishing mutations induced by chemical treatment of the *lsdA* gene improved FOS yields but increased sucrose hydrolysis. The enzyme sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) initiates fructan synthesis in plants by using sucrose both as fructosyl donor and acceptor to produce 1-kestose and glucose. A biocatalyzer composed of *1sst*-expressing yeast cells entrapped in calcium alginate beads was found to be more competitive than current fungal systems in terms of: negligible sucrose hydrolysis, 1-kestose above 50% of total carbohydrates in the reaction mixture, and reusable beads with a low-production cost and straightforward operability.

S6-3**Aprovechamiento de residuos cítricos en la elaboración de alimentos funcionales**

Jiménez-Vera R, González-Cortés N, Magaña-Contreras A, Parra-Pérez JJ, Mosqueda-Juárez H

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tenosique, México

AC: *Jiménez-Vera R (roman.jimenez@damr.ujat.mx)*

La fibra dietética es la porción comestible de plantas o carbohidratos que son resistentes a la absorción en el intestino delgado humano con una fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Sus efectos fisiológicos están derivados de su fermentación colónica, relacionados con la protección frente a enfermedades como el estreñimiento, cáncer de colon, diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares. La fibra dietética de cereales ha sido la más frecuentemente usada en la formulación de alimentos, sin embargo, la fibra proveniente de frutas tiene una mejor calidad debido a su mayor cantidad de fibra dietética soluble. La fibra de cítricos es un residuo contaminante de la extracción de jugos que puede ser aprovechado como fuente de fibra dietética para alimentos destinados al consumo humano, ya que se ha reportado un contenido de fibra dietética total de 40%. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la fibra en la microflora colónica, así como establecer un proceso para eliminar el amargor y elaborar alimentos tradicionales como longaniza de cerdo y yogurt reducidos en grasa y calorías, con alto contenido de fibra dietética. Se encontró que la fibra de naranja es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. Se encontró que el mejor método para disminuir el amargor de los cítricos fue el empleo de cloruro de sodio y temperatura. Se obtuvo una longaniza con bajo contenido de grasa y alto contenido de fibra dietética con buena calidad microbiológica y sensorial, así como yogurt con alto contenido de fibra.

S6-4

Agave fructans: the new prebiotics in the market

López MG

CINVESTAV-IPN, Irapuato, México

AC: López M (*mlopez@ira.cinvestav.mx*)

Fructans of the inulin type possess mainly B(2-1) linkage that escapes from the action of digestive enzymes; therefore they reach the large bowel unchanged where they serve as fermentative substrates. Previous reports indicate that fructans stimulate the growth and activity of Bifidobacteria and Lactobacilli in the gut in a selective manner, and consequently inhibiting the growth of pathogenic bacteria. Based on the well-known health benefits of inulin, there is a great interest on Agave fructans prebiotics properties.

The capacity of probiotics to ferment different Agave fructans as the principal carbon source was studied. The growth of six Bifidobacteria and four Lactobacilli species in Mann Rogosa and Sharpe medium containing 10 g of fructan/L of Agave (native as well as short-DP and long-DP) or commercial fructans as the sole carbon source was performed. The absorbance at 630 nm and pH were determined. The short chain fatty acids generated from their metabolic action were also analyzed by gas chromatography and high performed liquid chromatography. Most native Agave fructans showed better prebiotic effect when compared with commercial fructans, only Raftilose®Synergy1 presented some comparable levels. Short chain DP fructans from *A. angustifolia* and *A. potatorum* grow more than long DP with most probiotics, except for *A. tequilana*. The correlation between the growth and pH drop was not always good, and it was higher for long-DP in the case of *A. tequilana*. In conclusion, the obtained absorbance and pH values showed that independently of the DP, most Agave fructans stimulated the growth of both genera more efficiently than commercial inulins. As previous reports, acetic, formic, propionic, and lactic acids were the main detected acids but differences were found with different analytical techniques.

S6-5**Sugar signals and the reprogramming of metabolism in plants**

Smeeckens S, Rahmani F, Hanssen M, Schuurmans J, Hanson J

Faculty of Sciences, Utrecht University, Utrecht, Netherlands

AC: *Smeeckens S (j.c.m.smeeckens@uu.nl)*

Sugars like glucose and sucrose are powerful regulators of gene expression and play key roles during the life cycle of plants. Glucose phosphorylating enzyme hexokinase functions as a glucose sensor. Sucrose is sensed by an independent signaling system. Sucrose is a central molecule in the 'carbon economy' of plants and is important for long distance transport and as a storage molecule. Such sucrose signaling is essential for matching supply and demand of sugars with respect to energy metabolism of individual cells and growth and reproduction of the entire organism.

The Arabidopsis genome harbors five so-called S-class bZIP genes (*AtbZIP1, 2, 11, 44, 53*) that are regulated by sucrose at the level of translation. Sucrose overrides transcriptional control of these five genes by repressing translation of the mRNA. Translation of a 5'-upstream open reading frame (uORF) encoded peptide, named the sucrose control (SC) peptide is essential for sucrose control. This peptide is highly conserved among mono- and dicotyledonous plant species. In the presence of sucrose the peptide promotes ribosome stalling and in this way efficiently shuts down translation of the major bZIP-encoding ORF.

Transcriptional profiling experiments suggest a function of bZIP11 in regulating intermediary metabolism. The five S-class bZIP proteins form heterodimers with C-class bZIP proteins and these heterodimers are powerful transcriptional activators that are central regulators of plant metabolism. A picture emerges in which transcriptional control of the S-class bZIPs and is overridden by sucrose. In this way sucrose is a central signaling molecule in the regulation of plant metabolism.

S6-6

Probiotic formulations from microorganisms and enzymes for the improvement of animal production

Brizuela MA¹, Serrano P¹, León JA¹, Camps D², Piloto JL³,
Bueno G¹, Delgado G¹, Arenal A⁴, Pérez H¹, Tortoló K¹

¹ICIDCA, Habana, Cuba

²IIA, Habana, Cuba

³IIP, Habana, Cuba

⁴CIGB, Camagüey, Cuba

AC: *Brizuela M* (maranto.brizuela@icidca.edu.cu)

The objective of this work is to present some of the results reached by ICIDCA about the possibilities and benefits of employment of microorganism probiotics and enzymes as natural alternative to the use of antibiotic promoters of growth in the animal production. The studies and results presented refer to the development of a procedure to obtain probiotic compounds from lactic acid bacteria and enzymes. The basic product (PROBICID) was obtained starting from *Lactobacillus rhamnosus* strain LB/103-1-5, selected by its probiotics properties and GRAS characteristics. Very attractive results are presented referred to the formulation of different end products based in the active principle of probiotic PROBICID and enzyme pool. The products were extensively evaluated under experimental conditions in broilers, laying hens, new born pigs and in shrimp cultivation. In new born pigs, the results were more significant in the reduction of the mortality (50%), reduction of the occurrence of diarrheas and in the percent of retarded animals. In broilers the use of probiotic formulations induced a significant increment of the live weights, higher than the one obtained with similar conventional products. The animal viability index was markedly higher in comparison with the control. In laying hens significant differences were obtained in the feed conversion and in the production of eggs adding probiotic to the fodder. The results of the preliminary evaluation in the shrimp cultivation showed a positive effect: a significant increase on the length and weight of the probiotic fed shrimps was evidenced.

S6-7**Establecimiento de microorganismos en el rumen de terneros recién nacidos**

Ospina CA¹, Aldana C¹, Cabra SM¹, Carvajal F², Rodríguez F¹

¹CORPOICA, Mosquera, Colombia

²Productos Naturales de la Sabana S.A., Alquería, Cajicá, Colombia

AC: Carvajal F (fcarvajal@alqueria.com.co)

El suministro de microorganismos a terneros ha mostrado beneficios para la salud, ganancia de peso corporal y mejor digestibilidad de los ingredientes dietarios. En esta investigación se suministró un probiótico de dos microorganismos (1 y 2) a terneros neonatos, con el fin de determinar su presencia y establecimiento en el rumen, mediante PCR en tiempo real. cinco animales recibieron el probiótico durante 30 días, mientras que otros cinco no tratados fueron considerados como el grupo control. Las muestras de contenido ruminal se tomaron vía oroesofágica a los 20 y 40 días después del nacimiento. Con ADN extraído de las muestras de contenido ruminal, se detectaron y cuantificaron por PCR en tiempo real los microorganismos componentes del probiótico, al igual que el grupo de bacterias totales. Se determinó la eficiencia de la PCR-TR y la temperatura de disociación de los fragmentos amplificados. Este estudio demostró que los microorganismos 1 y 2 se establecieron en el rumen de los terneros a los 20 días, ($2^{-\Delta Ct} = 0.0113$) y ($2^{-\Delta Ct} = 0.00028$) respectivamente y aumentaron su concentración a los 40 días del ensayo, microorganismo 1 ($2^{-\Delta Ct} = 0.0327$) y microorganismo 2 ($2^{-\Delta Ct} = 0.00068$). En los animales control no se detectaron los dos microorganismos a los 20 días de nacidos, pero si a los 40 días, microorganismo 1 ($2^{-\Delta Ct} = 0.0068$) y microorganismo 2 ($2^{-\Delta Ct} = 0.000015$). Los resultados muestran la rápida colonización de los microorganismos que componen el probiótico en los terneros neonatos y un aumento en su concentración en el tiempo.

S6-8

Aislamiento y caracterización molecular de bacterias ácido lácticas del queso Paipa

Hernández Fernández JA, Neira Bermúdez E

Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia

AC: Hernández Fernández J (javier.hernandez@utadeo.edu.co)

En la presente investigación se aislaron, identificaron y caracterizaron molecularmente las bacterias ácido lácticas presentes en queso Paipa con 1, 5 y 10 días de maduración con el fin de preparar un fermento iniciador. Las muestras fueron recolectadas en los municipios de Belén (Boyacá), Pacho (Cundinamarca) y Paipa (Bóyaca). Los aislamientos se obtuvieron a partir de siembras de diluciones de los quesos e incubadas a tres temperaturas y en cuatro medios de cultivo diferentes: 32 °C APT y M17 y EMB, 42 °C MRS en aerobiosis; y a 32 °C MRS en anaerobiosis. Se obtuvieron 38 cepas nativas aisladas de queso tipo Paipa proveniente de Pacho, 29 de Belén y 16 de Paipa. Posteriormente, se seleccionaron las cepas nativas aisladas con reacción catalasa negativa, oxidasa positiva y bacilos y/o cocos Gram positivos, se extrajo DNA y se amplificó el gen 16S rRNA por PCR. Los productos amplificados de aproximadamente 1500 pb se cortaron con las enzimas de restricción *HpyCH4* III, *Alu* I, *Bfa* I y *Hpa* II y los productos se revelaron en geles de agarosa al 2%. Al mismo tiempo se generaron los perfiles electroforéticos *in silico* para las 25 bacterias más comunes en quesos, y se compararon con los perfiles obtenidos experimentalmente. Los resultados obtenidos permitieron determinar que las especies de bacterias ácido-lácticas que predominan en el queso paipa son: *L. acidophilus*; *L. delbrueckii* subesps. *lactis*, *bulgaricus* y *delbrueckii*; *L. parabuchneri*; *L. cremoris*; *L. helveticus*; *L. paracasei*; *L. plantarum*; *Lactococcus lactis cremoris*; *Streptococcus thermophilus*; *Staphylococcus lentus*; *Leuconostoc pseudomesenteroides*; *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *mesenteroides* y *Enterococcus durans*.

S6-9**Selection and design of probiotic foods to improve human and animal health**

González SN

Univ Nac Tucumán, CERELA-CONICET, Tucumán, Argentina

AC: González S (sgonzal@cerela.org.ar)

Nutrition is a key pillar in the health and development of human and animal life. The dietary supplements, with a series of regulations, fortifications and enrichment, led to the development of «functional foods», with «probiotics», «prebiotics» and «symbiotics» included in them. For over 15 years, our working group is dedicated to the design of this type of foods. The protocols for selecting human probiotic bacteria have considered different beneficial properties, among them, restoration of intestinal flora balance, specific anti-pathogenic activities, ability for conjugating linoleic acid, release of short-chain fatty acids in the intestine, cinnamoyl esterase production as anti-oxidant effect, inhibition of synthesis of mutagenic, effect on leptin secretion (for rehabilitation of protein calorie malnutrition). Additionally, for industrial scale applications, technological properties, from selected strains, were identified. Our researches related to functional foods for human consumption, have lead to two transfers, with marketed products by an argentine dairy industry.

In terms of probiotics for animal health, our experience related to chickens includes lactic acid bacteria with anti-Salmonella effect. Probiotic microorganisms for goats were selected by antagonistic activities on nematodes and enterotoxigenic *Escherichia coli*, and at the present we are considering regulator effect of *Coccidia* and *Brucella*. On the other hand *Lactobacilli*, selected as probiotic pigs, have anti-Yersinia activity, but we are running studies aimed at clarifying effect about parasitic infections (specifically anti-*Triquinella spiralis*)

Our «productor-country foods» condition must include providing them without restrictions, for this reason the common overall goal of our projects is to design and select the most successful diet for recovery and / or maintenance of nutritional, immunological and biochemical parameters, with elimination or reduction of chemicals products in feeding strategies.

SIMPOSIO 6 / SYMPOSIUM 6

**Probióticos y Prebióticos: Ingredientes Activos
de Alimentos Funcionales/
*Probiotics and Prebiotics: Active Ingredients of
Functional Foods***

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S6-P1**Aplicación de tecnología enzimática en la obtención de productos bioactivos desde residuos agroindustriales**

Zuniga Hansen ME, Laroze L, Concha J

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

AC: *Zuniga Hansen M (mzuniga@ucv.cl)*

La agroindustria produce una significativa cantidad de residuos y descartes sólidos con poca aplicación y valor. Estos descartes son potenciales fuentes de bioactivos como antioxidantes fenólicos y prebióticos. Se analiza la incorporación de un proceso enzimático de bajo costo en la recuperación de estos bioactivos.

Los antioxidantes fenólicos se encuentran principalmente distribuidos en cáscaras, pieles y semillas por sobre la pulpa de frutas y vegetales, su extracción se efectúa convencionalmente con solventes orgánicos. La aplicación de un tratamiento enzimático que degrade la matriz de polisacáridos insolubles como celulosa, hemicelulosa y pectinas, podría incrementar el rendimiento de recuperación del extracto antioxidante. Sobre la base de la actividad antioxidante extraída por proceso convencional se seleccionan los residuos de arándanos y frambuesas como aquellos que generan extractos con mayor actividad. Posteriormente con el pretratamiento enzimático, usando enzimas comerciales se mejora en un 10-15% la extracción convencional.

Los oligosacáridos se obtienen por extracción desde fuentes naturales, síntesis enzimática o hidrólisis enzimática parcial de polisacáridos. Los polisacáridos presentes en la hemicelulosa y pectinas pueden ser hidrolizados a oligosacáridos con actividad prebiótica. Se propone un proceso para producir prebióticos desde la fracción hemicelulósica de residuos agroindustriales. Sobre la base de una caracterización de los polisacáridos y oligosacáridos presentes en distintos residuos agroindustriales, se selecciona la coseta agotada de remolacha por su alto contenido en hemicelulosa y bajo en lignina. Se diseña un proceso de recuperación de la hemicelulosa para su posterior hidrólisis con enzima.

S6-P2

Evaluación de la actividad probiótica de los biopreparados en pollos

Rondón Castillo AJ, Bocourt Salabarría R, Samaniego Fernández LM, Milián Florido G, Laurencio Silva M

Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba

AC: Rondón Castillo A (ana.rondon@umcc.cu)

Se evalúa el efecto probiótico de los biopreparados C7, C65 y la mezcla de ambos en indicadores microbiológicos, inmunológicos, fermentativos, morfométricos, hematológicos, productivos y de salud en pollos. Se obtuvo una mejora en los indicadores microbiológicos, al incrementar las poblaciones de lactobacilos y anaerobios totales y disminuir la población de coliformes en el ciego. Se mejoraron algunos indicadores inmunológicos, al aumentar el peso relativo de la bolsa de Fabricio y del bazo a los 42 días y estimular el aumento de los títulos HI para la vacuna de Newcastle a los 35 y 42 días. Se incrementó la actividad fermentativa en el ciego, al aumentar la concentración de AGCC totales y de ácido láctico, con una consecuente disminución del pH. Disminuyeron los pesos relativos (PR) del intestino y aumentan el PR de la grasa abdominal, en cambio, no influyen en el PR del hígado, corazón y molleja. Mejoraron los indicadores hematológicos al incrementar la hemoglobina, el hematocrito y las proteínas totales. El producto ejerció un efecto positivo en los indicadores productivos al aumentar el peso vivo, el incremento de peso y la eficiencia alimenticia, con una disminución en la conversión alimenticia, sin provocar efectos en el consumo de alimentos, el PR de la canal, la mortalidad y la viabilidad.

S6-P3**FOS production from sucrose-containing raw substrates by recombinant 1SST-expressing yeast**

*Martínez García D¹, Pérez Cruz ER¹, Sobrino A¹, Vázquez M¹,
Hormaza JV², Montero Y², Hernández L³*

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Sancti Spíritus, Sancti Spíritus, Cuba

²Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras, Boyeros, Cuba

³Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Playa, Cuba

AC: *Martínez García D* (duniesky.martinez@cigb.edu.cu)

Fructooligosaccharides (FOS) are considered as functional food components based on their proven prebiotic effect in humans and several monogastric animals. FOS are produced commercially from crystalline sucrose using a fructosyltransferase from the fungal genera *Aspergillus* or *Aerobasidium*. In this work, *Pichia pastoris* cells expressing a plant sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) were entrapped in calcium alginate beads and assayed for FOS production from different sucrose-containing substrates. The transgenic yeast acquired the ability to utilize sucrose as the energy source for growth allowing high biomass yields (350 g/L wet weight) under fermentation conditions at relatively low production costs. The biocatalyzer reaction on refined cane sugar, crude brown cane sugar or cane molasses produced similar FOS yields, with a predominant accumulation of 1-kestose.

S6-P4

Cloning, heterologous expression, and characterization of a new dextransucrase encoding gene from *Leuconostoc citreum* strain B-110-1-2

*Fraga R*¹, *Martínez A*¹, *Fernández MT*¹, *Moulis C*²,
*Escalier P*², *Remaud-Simeon M*², *Monsan P*²

¹Cuban Research Institute on Sugar Cane By-Products (ICIDCA), Havana City, Cuba

²Département de Génie Biochimique et Alimentaire INSA, Toulouse Cedex 4, France

AC: *Fraga R* (reynaldo.fraga@icidca.edu.cu)

Leuconostoc citreum B-110-1-2 is a strain belonging to the culture collection of ICIDCA. It was isolated from sugarcane juice and has been used during years in the production of dextran and dextran derivatives at industrial and pilot scales respectively. Due to the very wide and versatile use of this polymer in the alimentary, pharmaceutical and biotechnological industries it has a strong demand in the market. In this work we have isolated a new dextransucrase gene from *Leuconostoc citreum* B-110-1-2. Using LA PCR technique with degenerated primers designed from sequence homology between conserved N-terminal and C-terminal regions of amino acid sequences of dextransucrases previously deposited at GenBank, it was possible to amplify and sequence a DNA fragment of 5,841 bp. The sequence analysis shows one open reading frame of 3,772 bp. The amino acid sequence of the ORF's catalytic domain shares a 53 % of identity with other dextransucrase catalytic domains. The *dsrF* gene encodes for a putative protein of 1,077 amino acids, with a theoretical molecular mass of 120,118.22 Da (~120 kDa). The recombinant dextransucrase protein resulting from the gene expression in *Escherichia coli* JM109 produced a glucose-polymer identified as dextran by NMR analysis.

S6-P5**Producción y estabilidad del Beta 1,3 glucano (Glutave), polisacárido con propiedades prebióticas en aves**

Soler Roger DM, Correa H, Lorenzo M, Sánchez L, Lavielle J, Pedroso M

CENSA, La Habana, Cuba

AC: Soler Roger D (dmsoler@censa.edu.cu)

En el presente trabajo se realizó la producción del Beta 1,3 glucano (Glutave) a nivel de planta piloto y se evaluó su estabilidad en anaquel. Se estableció el flujo de producción con los controles de proceso y se produjeron tres lotes en los reactores de 250 L, posteriormente se almacenaron a temperatura de refrigeración (4-12 °C) durante 18 meses, realizando muestreos cada 6 meses. Se evaluaron los indicadores de calidad como contenido de carbohidratos, características organolépticas, volumen de llenado, pH e indicadores sanitarios. Los lotes fabricados bajo condiciones productivas establecidas, cumplieron con los límites establecidos en las especificaciones de calidad y fueron estables durante 18 meses.

S6-P6

Almidón resistente II y III de malanga como sustrato para bacterias probióticas, patógenas y fecales

Jiménez-Vera R, González-Cortés N, Magaña-Contreras A, Aguilar-Hernández S, Escalante-Romero E

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tenosique, México

AC: *Jiménez-Vera R (roman.jimenez@damr.ujat.mx)*

Se evaluó el efecto de almidón resistente II (AR₂) y III (AR₃) de malanga en el crecimiento de bacterias probióticas, patógenas y fecales del humano. Como fuente de almidón se utilizaron cormos de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott). El AR₂ se obtuvo mediante un método enzimático y, AR₃ con una combinación de autoclavado y enzimático. Se utilizaron cepas probióticas de *Lactobacillus casei shirota* y *Lactobacillus johnsonii*, patógenas de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. e inóculo fecal humano. La fermentación se realizó durante 12 h en frascos de 250 mL, adicionados con 2.5% del almidón a evaluar. Se encontró que ambos almidones resistentes pueden ser empleados como fuente de carbono por bacterias probióticas. El crecimiento de *Lactobacillus casei* fue estimulado por AR₂, mientras que *Lactobacillus johnsonii*, por AR₃. Ninguna de las bacterias patógenas pudo utilizar AR₂ como fuente de carbono. Se obtuvo mayor especificidad en la estimulación de grupos bacterianos fecales con AR₂. El almidón resistente de malanga puede ser usado como sustrato para el crecimiento de bacterias probióticas, pero no por patógenas, lo que sugiere un efecto prebiótico, por lo que se sugiere realizar mayores evaluaciones para conocer la producción de metabolitos.

S6-P7**Potencial antibacteriano asociado a BAL de productos lácteos fermentados y embutidos cárnicos frescos, de elaboración artesanal en la zona sur de Chile**

Cerda LF¹, Flores AC², González SF², Contreras MC², Reyes BL²

¹Dpto. Ingeniería en Alimentos, Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile

²Universidad de Concepción, Facultad de Medicina Veterinaria

AC: Cerda L. F (fcerda@ubiobio.cl)

La zona sur de Chile se caracteriza por la elaboración en forma artesanal de productos lácteos fermentados (quesos y yogurt) y productos cárnicos embutidos frescos (longanizas), que cuentan con gran aceptación del consumidor regional. El objetivo del estudio fue comparar el poder inhibitorio de los componentes del yogurt artesanal y de cepas de BAL aisladas desde longanizas sobre cepas de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* O157:H7. A través de la técnica de microdilución en placa; se logró determinar que los granos, el yogurt y el filtrado de yoghurt presentaron efecto inhibitorio sobre los tres patógenos; siendo *S. enteritidis* la cepa más sensible y *L. monocytogenes* la cepa más resistente. Las cepas de BAL aisladas desde longaniza, no mostraron inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*.

La sola presencia de cepas de BAL presente en un producto alimenticio, no permitiría extrapolar el potencial de inocuidad atribuido a esta flora; quedando por evaluar los atributos tecnológicos y funcionales en las diferentes matrices de alimentos.

Financiamiento: Proyecto INNOVA Bío-Bío N° 04-B1-235

S6-P8

Aislamiento de *Lactobacillus* spp. de vagina de mujeres sanas en Cuba con fines probiótico

Molina Guerra A, Laurencio Silva M, Pérez Quintana M, Ascunse del Sol G

Universidad de Matanzas, Cuba, Matanzas, Cuba

AC: *Molina Guerra A (manuel.perez@umcc.cu)*

Se aislaron 80 cepas de *Lactobacillus* spp. autóctonas del tracto urogenital de 23 mujeres clínicamente sanas, en edad fértil, que asistieron a consulta para diagnóstico de embarazo en el Hospital Gineco-Obstétrico de Matanzas, Cuba. Cada paciente confirmó su consentimiento por escrito. Las muestras fueron tomadas y colocadas en tubos de ensayo con caldo Mann Rogosa Sharper (MRS) estéril. Los aislamientos se realizaron en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas. Para ello se hicieron diluciones seriadas y siembra en placas con medio Agar-MRS. La incubación se desarrolló en un tiempo de 48 h a una temperatura de 37 °C. Las cepas aisladas fueron colocadas en medio Agar-MRS semisólido y posteriormente purificadas por agotamiento, en el medio antes señalado. Para la selección del género se realizaron las siguientes pruebas: forma de la célula y de la colonia, tinción de Gram y ensayo de la enzima catalasa. Las cepas seleccionadas pertenecientes al género *Lactobacillus* fueron identificadas hasta especie mediante PCR. La conservación se realizó en medio Tioglicolato semisólido en una colección de cultivo perteneciente al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Matanzas.

S6-P9**Upgrading traditional fermented *Parkia Biglobosa* (JACQ.) benth seeds through mechanization process and the use of starter culture**

Lat Souk T, Luc L, Astou D, Ababacar N

Institut de Technologie Alimentaire, Dakar, Senegal

AC: Lat Souk T (Itounkara@ita.sn)

Most rural women in Senegal depend on agriculture for income generation in order to sustain their family livelihood. Fermented products are widely used for nutrition and household income generation. Usually these products processed in rural setup are based on variable sensory quality, hygiene and unattractive presentation to consumers due to high level of impurities. Studies were conducted to develop an appropriate household/small scale enterprise level technique for the production of high quality fermented *Parkia biglobosa* seeds.

In order to peel the *Parkia* seeds, products were previously roasted at 120 °C about 45 min before using mechanization process which included the use of a hammer mill equipped with a grid of 8 mms of stitch diameter and controlled to 1000 rpm. Results show that the percentage of peeled seeds was about 61% with regards to the weight of previously treated seeds.

Fermentation process was conducted by using starter culture of bacillus spp. on previously soaked and boiled peeled seed. The humidity was maintains to 60%. After 72 h fermentation was complete. Sensory characteristics, amino acid pattern, proximate composition (moisture, protein, fat, ash) pH and titratable acidity were used as the indices of quality. The energy values ranged between 527.83-550.35 kcal/100 g and protein ranged between 30.68% - 38.95%.

Based on the findings of the study, the mechanization of the process and the use of starter culture suggest a viable option of promoting the nutritional quality of *parkia biglobosa* seeds with acceptable presentation.

S6-P10

Avances en el desarrollo de levaduras con potencial probiótico para rumiantes-estrategia Latinoamericana: Cuba-Colombia-México

Marrero Y¹, Galindo J¹, González N¹, Rodríguez F², Martín E²,
Rodríguez S², Castillo Y³, Ruíz O³, Burrola E³

¹ICA, Habana, Cuba

²CORPOICA, Mosquera, Colombia

³UACH, Chihuahua, México

AC: Marrero Y (ymarrero@ica.co.cu)

El empleo de levaduras en la producción de animales rumiantes constituye una alternativa para sustituir el empleo de antibióticos promotores del crecimiento. En el mercado mundial existen múltiples productos con levaduras que se comercializan a altos precios y que muchas veces no producen el efecto deseado en animales que consumen dietas fibrosas como los de nuestra región. Cuba, Colombia y México trabajan en el desarrollo de un probiótico a base de levaduras nativas que demuestren potencial para su empleo como aditivos y resulte competitivo en el mercado internacional. Los tres países cuentan con colecciones de cepas autóctonas adaptadas a las condiciones de cada país. Cuba ha demostrado efectos positivos de levaduras nativas en la población de microorganismos ruminales, la degradabilidad *in vitro* de la MS y la producción de leche. El Laboratorio de Microbiología Molecular de CORPOICA, Colombia ha implementado una plataforma de herramientas moleculares para monitorear el efecto de estos aditivos en las poblaciones microbianas del rumen y la adecuada identificación molecular de microorganismos con potencial probiótico. Por su parte la UACH en México ha trabajado en el aislamiento e identificación de levaduras resistentes a las condiciones ruminales a partir de fermentados de manzana con resultados alentadores.

El presente trabajo expone los avances alcanzados en 5 años de trabajos conjuntos e interacción, donde se han aprovechado las fortalezas de las instituciones participantes, y además se prepararan a nuevos jóvenes investigadores en el empleo de técnicas de avanzada. Además, se presentan las perspectivas comerciales futuras.

S6-P11**A pH shift-based procedure to easily detect FOS-fermenting bacterial and yeast strains as potential probiotics**

*Trujillo LE¹, Arrieta JG¹, Pérez H², Brizuela MA²,
Ramírez R¹, Pérez ER³, Hernández L¹*

¹Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba

²Instituto Cubano de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Habana, Cuba

³Center for Genetic Engineering and Biotechnology, S.Spíritus, Cuba;

AC: Trujillo L (luis.trujillo@cigb.edu.cu)

Besides lactic and bifido-bacteria, yeasts are emerging as potential biotherapeutic agents due to their proven efficacy in health improvement. Strains able to ferment fructo-oligosaccharides (FOS) are desirable to develop probiotic-based dairy products for human and animals consume. In this work, we established a simple screening procedure to visually detect FOS-fermenting yeast and bacteria. The method relies on the addition of the pH indicator bromthymol blue to the commonly used rich medium YP, LB or MRS (liquid or solid) supplemented with 1-2% of a purified FOS (96% as 1-kestose, GF2) fraction as the sole carbon source. FOS-fermenting species like *Lactobacillus rhanmnosus*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. dentium*, *Saccharomyces* spp., *Saccharomyces boulardii* and *Kluveromyces fragilis* are widely used as probiotics in human and animals. Their growth under aerobic or anaerobic conditions turned the medium color from the initial green (pH 6.5) to yellow (pH below 6.0) revealing acidification due to 1-kestose consumption. By contrast, the yeast *Pichia pastoris* and the bacterium *E. coli* that are unable to utilize FOS, turned the medium color to blue (pH above 7.5) due to the release of ammonia by the catabolic oxidation of the media constituents yeast extract, tryptone and/or peptone. This method constitutes a powerful tool to isolate new FOS-fermenting yeast and bacterial strains to be used as potential probiotics.

S6-P12

Evaluación de la actividad probiótica de tres cultivos de *Bacillus subtilis* en algunos indicadores inmunológicos y microbiológicos en pollos

*Milian Florido G, Pérez Quintana M, Bocourt Salabarría R,
Rondón Castillo AJ, Laurencio Silva M*

Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba

AC: *Milian Florido G (grethel.milian@umcc.cu)*

Se realizó un experimento con pollos como animales de laboratorio para evaluar la actividad probiótica de tres cultivos de *Bacillus subtilis* en indicadores microbiológicos y algunos inmunológicos como la bolsa de Fabricio, bazo y los títulos de HI para la respuesta vacunal medida a través de la vacuna de Newcastle. Con un diseño completamente aleatorizado en el que se incluyeron cuatro tratamientos: C-31, C-34, E-44 y CN. El suministro de los biopreparados microbianos con *Bacillus subtilis* y sus endosporas mejoró el balance microbiano del ciego en pollos, lo que se demostró por incrementos en la población de *Lactobacillus*, endosporas, anaerobios totales, así como la reducción en los coliformes a los 21 y 42 días. A los 35 y 42 días la bolsa de Fabricio, el bazo y los títulos de HI para la respuesta vacunal medida a través de la vacuna de Newcastle, son superiores ($P < 0.001$) en los tratamientos con *Bacillus subtilis*. Si se integran los indicadores evaluados (tamaño de la bolsa de Fabricio, bazo y títulos de HI) con la respuesta inmune como un índice de actividad probiótica, se puede afirmar que existe una respuesta de mejora en el sistema inmune como a nivel del tracto gastrointestinal de los pollos con el empleo de los tres cultivos de *Bacillus subtilis* evaluados.

S6-P13**Propiedades prebióticas de almidón resistente de plátano y fibra dietética de naranja**

Jiménez-Vera R¹, Monroy Ó², García-Garibay M², Corona-Cruz A³

¹Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tenosique, México

²Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, México

³Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México

AC: *Jiménez-Vera R (roman.jimenez@damr.ujat.mx)*

Se evaluó el efecto prebiótico del almidón resistente (AR) de plátano cuadrado (*Musa balbisiana* Colla) y de la fibra dietética de naranja empleando un sistema modelo del colon proximal humano. Se comparó con inulina y almidón de trigo. Se evaluaron diferentes concentraciones de AR: harina integral de plátano (27.45%), AR₂ (58.86%), AR₃ (9.79%), harina de trigo (1.00%), así como fibra dietética: harina de naranja (39,52%) y pectina de naranja (17.20%). Se utilizó un modelo de colon proximal humano alimentado tres veces al día con 64,0% de carbohidratos, 35.0% de proteínas, 1.0% de grasa y 1.0 g de la sustancia a evaluar. Se obtuvo una disminución de enterobacterias, coliformes y bacteroides con la adición del almidón resistente y la fibra de naranja, así como una estimulación en el crecimiento de las bacterias lácticas y bifidobacterias, acentuado a partir de las 12 h de fermentación. En cuanto a la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), la concentración de ácido acético fue mayor en todos los sustratos, mientras que las concentraciones de propiónico y butírico se mostraron en muy pequeñas cantidades, a excepción de la harina de trigo. No se obtuvo correlación entre la concentración de AR y la estimulación del crecimiento microbiano y la producción de AGCC. La presencia de AGCC en harina y pectina de naranja fue mayormente ácido acético. El almidón de plátano verde y la fibra de naranja estimulan selectivamente el crecimiento de bacterias benéficas *in vitro*, así como la producción de ácido acético.

S6-P14

**Producción de biomasa probiótica
en sustratos agroindustriales**

*Jiménez-Vera R, Magaña-Contreras A, González-Cortés N,
Alor-Chávez M, Chab-García CL, Zetina-Moreno ZK*

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tenosique, México

AC: *Jiménez-Vera R (roman.jimenez@damr.ujat.mx)*

Los probióticos son usados en una gran variedad de productos, incluyendo farmacéuticos, alimentos para humanos y animales, así también como promotores de la salud y la inocuidad alimentaria; su efecto benéfico en salud humana y animal, así como en la inocuidad alimentaria está confirmado. Por otra parte, existe una gran variedad de sustratos agroindustriales no diversificados, con usos muy tradicionales, abundantes y disponibles en la región del Trópico Húmedo. En este trabajo se evaluó el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii* en jugo de caña de azúcar, agua de coco, jugo de naranja, suero de queso y caldo MRS, como referencia. Se incubaron a 37 °C durante 24 h, sin agitación. El crecimiento se cuantificó mediante cultivo en superficie modificado utilizando agar MRS incubado a 37 °C durante 72 h en anaerobiosis. La concentración del probiótico estuvo asociada a la concentración del sustrato, no se obtuvo diferencia entre los sustratos y la concentración estuvo por debajo del caldo MRS. La mayor concentración de probiótico se obtuvo a las 6 h de cultivo. La refrigeración resultó ser el mejor método de conservación y las cepas probióticas mantuvieron su efecto sobre bacterias patógenas. Los resultados obtenidos proporcionan alternativas para el aprovechamiento de recursos regionales en la producción de probióticos a bajo costo. Se proporciona valor agregado a los productos de la agroindustria y se contribuye a aumentar la diversificación de productos regionales.

S6-P15**Crecimiento de *Lactobacillus casei shirota* y *Lactobacillus jonhsonii* en harina de semillas de noni**

Magaña Contreras A, Jiménez Vera R, González Cortés N

UJAT, Tenosique, México

AC: Magaña Contreras A (chelomagana@hotmail.com)

El fruto de noni es empleado en la medicina tradicional de Polinesia para afecciones como alergia, artritis, asma, cáncer, diabetes, depresión, debilidad física, desórdenes menstruales, obesidad, estrés e inflamación. En la extracción del jugo se genera hasta un 60% de semillas, que pueden ser procesadas en harina. En este trabajo se evaluó la harina de semillas como fuente de carbono para bacterias probióticas. Las semillas se obtuvieron de frutos maduros, se lavaron y secaron a 60 °C. Se molieron y tamizaron en malla 80. Se utilizaron cepas probióticas de *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus jonhsonii*. Para el cultivo se utilizó caldo MRS-libre de glucosa con la harina de semilla al 2.5%. Se comparó el crecimiento de los probióticos en caldo MRS. El crecimiento de *L. casei* a las tres horas fue menor que *L. jonsonii*, sin embargo, a las nueve horas, no se encontró diferencia en el crecimiento de ambos probióticos. Uno de los principales componentes de la semilla de noni es la fibra, se ha reportado el crecimiento de bacterias lácticas en otras fuentes de fibra como fuente de carbono; entre ellas se encuentra la fibra de naranja y plátano, que estimulan el desarrollo de especies de *Lactobacillus*. Las semillas de noni pueden ser utilizadas en forma de harina para el crecimiento de bacterias probióticas. Aún falta probar el efecto selectivo en la estimulación de bacterias benéficas y su efecto en bacterias patógenas.

S6-P16

Use of immobilized cells in repeated fermentation cycles for an efficient biotechnological production of an alternative sweetener - Xylitol

Sarrouh B, Silvério da Silva S

Escola de Engenharia de Lorena-USP, Lorena, Brazil

AC: Sarrouh B (bsarrouh@yahoo.es)

Xylitol is a valuable pentitol and has specific health claims in the world market. It is suitable for diabetes, recommended for oral health. On an industrial scale, xylitol is currently produced through chemical reduction of xylose. The chemical process for production of xylitol is expensive because of the high temperature and pressure required for hydrogenation of xylose. Furthermore, extensive steps for separation and purification add to the cost. Alternatively biotechnological production of xylitol could be of economic interest and attractive, as crude hemicellulosic hydrolysate can be used as potential substrates, instead of pure xylose, to reduce the cost of production. However, the concentrations, yields and production rates obtained from fermentation media consisting in lignocellulosic hydrolysate are still the bottlenecks of a large-scale process, although they can be improved by selecting the right fermentation system, operation mode and cultivation conditions. Immobilized cell systems have been traditionally considered as an alternative for increasing the process overall productivity and minimizing production costs. In order to improve xylitol batch production on sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate, in this work, 5 repeated fermentation cycles were carried out in a three-phase fluidized-bed bioreactor (FBR) using immobilized *Candida guilliermondii* FTI 20,037 cells in Ca-alginate beads. According to obtained results, it was found that the immobilized cells could be reused successfully for 5 batch cycles with average xylitol yield (Y_p/s) of 0.69 ± 0.034 g/L and average volumetric productivity (Q_p) of 0.43 ± 0.14 g/L.h in the bioreactor for 360 h of consecutive fermentation.

S6-P17**Evaluation of the therapeutic action of a vaginal ovule that contains a probiotic strain of *Lactobacillus* spp. Compared with metronidazol therapy**

Castro E, Jara S, Palma V, González M, Madariaga J, Mardones X, Bórquez R

Universidad de Concepción Concepción, Chile

AC: CASTRO E (ercastro@udec.cl)

The vaginosis (BV) characterized by the overpopulation of anaerobic bacteria might be common and resistant to elective medicines. The capability of restoring the vaginal microflora of a *L. acidophilus* LVP31 strain was evaluated compared with oral MTZ administration. Random, double blind and masked clinic test of 100 pregnant women with consent inform were incorporated to prenatal control before 20 weeks of pregnancy. To each one a BV diagnostic was made with Nugent *et al.* Criteria (1991). 50 Pregnant women received Metronidazol (500 mg each 12 hours / 7 days) and placebo in ovules (1 for 7 days), and the other 50 women received an ovule that contains a strain LPV31 of *Lactobacillus acidophilus* and an oral placebo in tablets. Checks were performed in the following way: basal (day 0), 7, 14, 30, 45, and 60 days. A clinic, microbiological, cithological and inmunological evaluation was made. The inoculated strain was able to stay in the vaginal microbiota up to two month, and restored completely 48/50 of the women with BV. It was also observed a positive evolution in the cytological samples. From women who received MTZ, 44/50 restored completely their vaginal state. We have a vaginal probiotics preparation with potential therapeutical action of the BV.

Research financed by FONIS project SA06I20003.

S6-P18

Efecto de la administración de un inóculo microbiano sobre la incidencia de diarreas y ganancia de peso en terneros Holstein

Cabra SM¹, Aldana C¹, Ospina CA¹, Carvajal F², Cardozo JA¹, Rodriguez F¹

¹CORPOICA, Mosquera, Colombia

²Productos Naturales de la Sabana S.A., Alquería, Cajicá, Colombia

AC: Carvajal F (fcarvajal@alqueria.com.co)

Un inóculo microbiano compuesto por varias especies bacterianas se administró diariamente por vía oral a 20 terneras Holstein para evaluar su capacidad para disminuir la incidencia de diarreas y mejorar la ganancia de peso corporal. Los tratamientos incluyeron un control absoluto que no recibió el inóculo microbiano. El ensayo se realizó en el municipio de Cajicá, Cundinamarca (Colombia) a 2 580 m.s.n.m. en época de lluvias con temperaturas que oscilaron entre los 4 y los 25 °C. En el grupo tratado con el inóculo microbiano la incidencia de diarreas fue del 10%, mientras que en el control fue del 30%. Las ganancias de peso en el grupo tratado fue de 265 g /d mientras que en el grupo control fue de 220 g/d. Muestras de contenido ruminal que fueron obtenidas por vía oro-esofágica mostraron diferencias entre el tratamiento y el control a nivel de color, textura y contenido de fibra. No se encontraron diferencias significativas en parámetros hematológicos entre animales tratados y no tratados.

S6-P19**Microorganismos productores de biofilm aislados de industrias alimentarias**

Dávila Costa MDL, Anduni GJ, Gusils C, Ruíz M, Cárdenas G

Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Las Talitas, Argentina

AC: *Gusils C (microbiologia@eeaoc.org.ar)*

El crecimiento microbiano en forma de biofilm está adquiriendo mayores repercusiones en diferentes áreas, como por ejemplo en industrias. El objetivo de este trabajo fue estudiar microorganismos productores de biofilm de industrias alimentarias.

Para el aislamiento se visitaron industrias (citrícolas, ingenios) de Tucumán-Argentina. Se seleccionaron bacterias productoras de biofilm, analizando su producción en diferentes superficies (acero inoxidable, hierro, goma y poliestireno) y combinaciones bacterianas (dobles, triples y cuádruple). Se estudió el efecto inhibitorio de hipoclorito de sodio, ácido málico, ácido láctico, ultrasil y dimetilditiocarbamato-etilenbisditiocarbamato (D-E) sobre las bacterias seleccionadas, sus combinaciones y sobre el crecimiento de una de ellas en estado planctónico.

Se aislaron 50 microorganismos y se seleccionaron cuatro (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* spp., *Citrobacter* spp. y *Klebsiella* spp.) por su mayor capacidad relativa de formación de biofilm (CRFB). En los ensayos para estudiar la CRFB en diferentes superficies, se observó que el desarrollo dependía de la superficie como también del microorganismo. En acero inoxidable las bacterias mostraron una baja CRFB comparadas con las otras superficies, excepto *Citrobacter* que presentó menor CRFB en metal y goma. En los ensayos de interacción, la producción en ciertas combinaciones estuvo beneficiada, obteniéndose valores mayores en comparación con las bacterias por sí solas. En otros casos este efecto fue contrario, ya que ciertas interacciones mostraron una menor CRFB. La sustancia D-E presentó un mayor efecto inhibitorio con respecto a los otros antimicrobianos, sin embargo el efecto del hipoclorito de sodio sobre las combinaciones bacterianas y sobre *Klebsiella* en estado planctónico fue mayor.

S6-P20

Microorganismos productores de exopolisacáridos en la industria azucarera

Anduni GJ, Gusils C, Ruíz M, Cárdenas G

Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Las Talitas, Argentina

AC: *Ruíz M (calidad@eeaoc.org.ar)*

Si bien son conocidos los problemas ocasionados por los microorganismos productores de exopolisacáridos (EPS) en la industria azucarera, aún no han sido controlados apropiadamente. Los objetivos fueron estudiar la producción de EPS por microorganismos aislados de jugos de caña de azúcar y evaluar el efecto de antimicrobianos usados en la industria azucarera.

Se realizó un monitoreo microbiológico en la etapa de clarificación de ingenios azucareros de la región, y se seleccionaron microorganismos productores de EPS empleando un medio enriquecido con sacarosa, test de lugol y filancia. Se estudió el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción de EPS. Se ensayó el efecto de antimicrobianos (amonio cuaternario, órgano sulfuroso, hipoclorito de sodio y dimetilditiocarbamato-etilenbisditiocarbamato) empleados en la industria azucarera tucumana.

Se aislaron bacterias productoras de EPS distintas a *Leuconostoc mesenteroides*. *Enterobacter* spp. fue la de mayor producción de EPS (350.5 mg/L). De las temperaturas ensayadas, solo a 10 °C se produce una disminución del crecimiento y producción de EPS por *Enterobacter* spp. En cuanto a la actividad de los compuestos antimicrobianos empleados en la industria azucarera sobre los microorganismos presentes en el jugo de caña, observamos que las concentraciones empleadas en las industrias no provocan una disminución significativa de la carga microbiana, pero si se logró empleando las concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas (CIM-CBM) de tales compuestos. Se debería tener en cuenta las condiciones ambientales y las concentraciones y tipos de compuestos antimicrobianos empleados para lograr un eficaz control de los microorganismos productores de exopolisacáridos

S6-P21**Estudio de la morfología y microflora intestinal durante la administración de cepas probióticas a cerdos en fase de cría**

Ross GR¹, Olszewski R¹, Gusils C², Holgado S³, González S¹

¹CERELA-CONICET, San Miguel de Tucumán, Argentina

²Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres-CONICET, Las Talitas, Argentina

³Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia-UNT, San Miguel de Tucumán, Argentina

AC: ROSS G (*romiross23@yahoo.com.ar*)

El empleo de antibióticos en ganadería ha generado la aparición de cepas resistentes. Por esto, se buscan alternativas para mejorar la producción animal y controlar las enfermedades infecciosas. La microflora intestinal es un ecosistema complejo y dinámico: provee productos esenciales al huésped, forma una barrera contra patógenos y juega un rol importante en la morfología intestinal y el desarrollo de inmunidad. Nuestro objetivo fue evaluar la morfología y flora intestinal tras la administración de cepas probióticas a cerdos en fase de cría.

Se distribuyeron 20 cerdos de 35 días de edad, en 2 grupos: control y tratamiento (suplementado diariamente con una suspensión probiótica, 10⁸ UFC/mL). Semanalmente se realizaron: 1) hisopados anales para el estudio de la flora intestinal, empleando medios diferenciales-selectivos agarizados: LBS (Lactobacilos), Mc Conkey (enterobacterias), SSA (*Salmonella-Shigella*), HyL (hongos y levaduras), BHI en condiciones anaeróbicas (anaerobios), PCA (mesófilos aerobios); 2) estudios histológicos (H-E) de intestinos delgado y grueso.

Los resultados obtenidos mostraron variaciones significativas intragrupos de la flora microbiana. Además, solo se observó una disminución significativa en el recuento de enterobacterias en el grupo tratamiento con respecto al control, a partir de los 28 días de ensayo. La alimentación probiótica contribuiría a impedir un sobrecrecimiento de bacterias Gram negativas. Por técnicas histológicas se observaron estructuras morfológicas conservadas en el grupo tratamiento a diferencia de lo ocurrido en el grupo control. Los resultados permitieron concluir que la dosis probiótica administrada a cerdos mejoró la morfología intestinal de los animales tratados sin alterar el equilibrio normal de la flora microbiana.

S6-P22

Efecto inhibitorio *in vivo* de bacterias lácticas probióticas aisladas de cerdos frente a *Salmonella typhimurium*

Ross GR¹, Gauffin Cano MP¹, Gusils C², González S¹

¹CERELA-CONICET, San Miguel de Tucumán, Argentina

²Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres-CONICET, Las Talitas, Argentina

AC: ROSS G (romiross23@yahoo.com.ar)

La industria agropecuaria busca prevenir pérdidas económicas por enfermedades infecciosas, como también evitar la proliferación de cepas resistentes por uso indiscriminado de antibióticos. Los alimentos probióticos contienen microorganismos capaces de equilibrar la flora intestinal e inhibir bacterias nocivas. A partir de cerdos sanos se seleccionaron 3 bacterias lácticas (BAL) por sus propiedades probióticas *in vitro* (adhesión, resistencia a condiciones gastrointestinales, inhibición de patógenos). El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto inhibitorio, *in vivo*, de BAL seleccionadas frente a *Salmonella typhimurium*.

Se administró diariamente durante 5 días, a dos grupos de ratones (control y tratamiento) agua y suspensión de BAL (10^7 ufc/mL), respectivamente. Posteriormente los animales de los dos grupos fueron infectados con *Salmonella typhimurium* (10^8 ufc/mL). A los 5 y 7 días post-infección se sacrificaron ratones para extraer en condiciones asépticas bazo e hígado, analizando la presencia de enterobacterias y bacterias aerobias y anaerobias totales, debido al efecto de translocación.

No se detectó el desarrollo microbiano en muestras de bazo e hígado obtenidas de ratones del grupo tratamiento a los 5 días posteriores a la infección con *Salmonella*, a diferencia de lo observado en el grupo control. A los 7 días post-infección el recuento de microorganismos en las muestras tratamiento fue significativamente menor a las del grupo control. El porcentaje de morbilidad de animales fue menor en el grupo tratamiento. Los resultados permitieron concluir que la alimentación probiótica tuvo un efecto preventivo a la infección por *Salmonella typhimurium*.

S6-P23**Influencia de la combinación de dos fuente de levadura (levadura viva y levadura enriquecida con minerales orgánicos) sobre el comportamiento productivo de vaquillas de engorda alimentadas con dietas altas en energía**

Plascencia A, Alvarado-Fabela D, Valdés-García Y, Robles-Estrada J, Serrano-Ponce J

Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México

AC: *Plascencia A (aplas_99@yahoo.com)*

Cuarenta y ocho vaquillas (371 ± 7 kg) se utilizaron en un diseño de bloques completos al azar en una prueba de 33 días con el fin de evaluar la influencia de la adición de diferentes niveles de una combinación de levadura viva (*Saccharomyces cerevisiae* N.cepa 7907) y una levadura enriquecida con minerales orgánicos sobre comportamiento productivo. Los tratamientos fueron: 1) Dieta basal alta en energía (1.45 Mcal/kg de ENg) sin levadura y 2) la misma dieta basal adicionada con una mezcla en partes iguales de dos fuentes de levadura (cultivo de levadura Ganadero-Plus y una levadura enriquecida con minerales orgánicos: Beef-8-Ways, Biotecap®, México, DF, México) para una dosis final de 10 (L-10), 20 (L-20) o 30 g/cabeza/ día. Las UFC consumida/día por los animales fue de 5.5×10^{10} , 1.10×10^{11} y 1.65×10^{11} para L-10, L20 y L-30 respectivamente. El incremento del nivel de levadura en la dieta incrementó (efecto lineal, $P < 0.02$) el peso final. De igual manera, mejoró (efecto lineal, $P = 0.01$) la ganancia diaria, la eficiencia en ganancia y la conversión alimenticia. La EN aparente de la dieta fue mayor ($P < 0.01$) y la retención de energía por unidad de MS fue menor ($P < 0.01$) a medida que se aumentó el nivel de levadura en la dieta. La combinación de levadura viva con levadura enriquecida con minerales orgánicos adicionada a dietas altas en energía para vaquillas de engorda incrementan el consumo de MS, la tasa de ganancia, la eficiencia en corral y la EN de la dieta.

S6-P24

Influencia de la administración de leches fermentadas con bacterias lácticas sobre la secreción de leptina sérica y su relación con la protección contra infecciones entéricas en ratones sometidos a restricción calórica

Gauffin Cano P¹, Abeijón Mukdsi C², González S¹

¹CERELA-CONICET, San Miguel de Tucumán, Argentina

²Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia- Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina

AC: Gauffin Cano P (pgauffin@cerela.org.ar)

Existe escasa información acerca de la influencia de las bacterias lácticas (BL) sobre la secreción de la leptina en huéspedes sometidos a restricción calórica leve (RCL). Nuestros objetivos fueron determinar en un modelo experimental de RCL la influencia de la administración de leches fermentadas con BL sobre la protección contra *Salmonella typhimurium*, y su relación con la secreción de leptina y parámetros inmunológicos.

Para ello, ratones suizos adultos fueron sometidos a RCL durante 90 días y renutridos durante 7 días con leche de oveja (LO), posteriormente se les administró, durante 5 días LO fermentada (LOF) con 10⁸ ufc/mL de *Lactobacillus casei* CRL 431 y 10⁷ y 10⁶ ufc/mL de *Lactobacillus rhamnosus* ETC14. Los grupos fueron desafiados con *S. typhimurium*; y sacrificados a los 5 y 7 días post-infección. Se determinaron: leptina sérica, número de células IgA+ en cortes histológicos de intestino delgado y número de bacterias viables en hígado y bazo (Log ufc/g de órgano). Las diferentes LOF indujeron una similar protección frente a la infección. Observamos mayores niveles de leptina a los 5 días post-infección con *L. casei* CRL 431 y 10⁷ *L. rhamnosus* ETC14 comparados con el control RCL. El número de células IgA+ incrementaron con *L. casei* CRL 431 y 10⁶ *L. rhamnosus* ETC14.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos sugerir que la administración de LOF con las bacterias estudiadas induce protección frente a *S. typhimurium*. Dicha protección depende de la dosis de administración, y podría ser parcialmente mediada por el incremento de células IgA+ y de leptina sérica.

S6-P25**An optimized procedure for genetic sugarcane transformation via microprojectile bombardment**

Banguela A, Rodríguez-Carcasses R, Sunchiz M, Menéndez C, Hernández L

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de la Habana, Cuba

AC: Banguela A (alexander.banguela@cigb.edu.cu)

Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) is a gramineous crop highly recalcitrant to be genetically modified via *Agrobacterium tumefaciens*. In this work, we have established a procedure for sugarcane transformation by microprojectile bombardment using embryogenic calli as starting material. The employ of the green-fluorescent protein (GFP) as a reporter marker allowed early detection of transient transformation events and optimization of the bombardment conditions. The neomycin phosphotransferase gene (*nptII*) under the control of the Ubi-1 maize promoter was used to select stable transformants. For optimal recovery of transgenic plantlets, geneticin concentration was increased from 20 mg/L during callus growth to 25 mg/L for the shooting and rooting steps. Antibiotic-resistant plantlets were transferred to soil and grown for months. Southern blot and PCR analysis confirmed the transgene presence in the genome of the mother plant and their sprouts. Due to its elevated sucrose accumulation, sugarcane emerges as an ideal crop for high-yield transgenic production of prebiotic oligosaccharides like FOS, GOS, and XOS.

S6-P26

High levan accumulation in transgenic tobacco expressing the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase gene (*lsdA*)

Banguela A, Arrieta JG, Rodríguez-Carcasses R, Menéndez C, Trujillo LE, Hernández L

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de la Habana, Cuba

AC: *Banguela A (alexander.banguela@cigb.edu.cu)*

Fructans are sucrose derived sugars consisting of two up to more than a hundred thousand fructose units. In nature, fructan synthesis occurs in a broad range of microorganisms and a limited number of plant species mostly adapted to temperate and arid climates. In these plants, fructans are synthesized and stored in the vacuole by the concerted action of at least two fructosyltransferases. Plant fructans have different structures and rarely exceed a polymerization degree (DP) of 100 fructose units. Levansucrase (LsdA) from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* synthesizes high-DP levan (β 2,6 linked polyfructan; DP > 10000) directly from sucrose. Here, we investigated the effects of the constitutive expression of the *lsdA* gene in transgenic tobacco, a plant that naturally does not produce fructans and lacks enzymes capable to degrade levan. *LsdA* was fused to the N-terminal pre-propeptide of the onion sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase to achieve targeting to the cell vacuole. The tobacco transformants yielded different fructan levels. The size and structure of the polyfructan extracted from transgenic leaves resembled the levan produced by the bacterium. The levan content in leaves increased gradually with age causing a rigid texture and bleaching phenotype. In the clone with the metabolizing polymer reached to represent 70% of-highest *LsdA* activity, the non leaves dry biomass; flowering was delayed and seeds were unable to germinate. Transgenic plants accumulating levan to levels below 20% showed slightly bleached leaves of unaltered size, normal flowers and viable seeds. Such a behavior remained stable in F2 plants.

S6-P27**Aislamiento y caracterización de levaduras nativas productoras de mezcal**

Esparza Ibarra EL, Cortes Hermosillo JJA, Valdez Cepeda RD, Cabral Arellano FJ

Universidad Autónoma De Zacatecas, Guadalupe, México

AC: *Esparza Ibarra E (edgarzac@gmail.com)*

El mezcal es una bebida alcohólica obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras. La Denominación de Origen Mezcal, comprende 6 Estados de Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas y Durango, a 11 Municipios del Estado de Tamaulipas y a 1 municipio del Estado de Guanajuato. Además, existe un Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal que vigila el cumplimiento de la norma para su producción. Por otro lado, se tiene la creencia popular, que el mezcal tiene un efecto tónico y afrodisíaco, aseguran que el hábito de consumirlo, con moderación, prolonga la vida sexual del individuo y la vida misma.

Zacatecas tiene una antigua tradición mezcalera, sin embargo la producción de mezcal en las zonas productoras se ve afectada por problemas como la fermentación, en la cual se emplean levaduras comerciales que generan además de etanol, otros compuestos en cantidad considerable de metanol y alcoholes superiores que alteran las características y la calidad del producto. De ahí el objetivo de aislar cepas productoras de mezcal de buena calidad.

Se propagaron las cepas nativas en 20 L de mieles del cocimiento de Agave azul tequilana y se sometió a fermentación con distintas cepas de levadura aislada. Se destilaron los mostos y se rectificaron en los alambiques. Se midieron la producción de metanol, alcoholes superiores, aldehidos y esterés, por cromatografía de gases y se compararon.

S6-P28

**Selection of probiotic bacteria:
their immunostimulatory and growth effects
in *Litopenaeus vannamei***

Arenal A, Franco R, Martín L, Sánchez I, Santiesteban D, Marín M, Sotolongo J

CIGB, Camagüey, Cuba

AC: Arenal A (amilcar.arenal@cigb.edu.cu)

The use of probiotics in aquaculture is proving to be highly effective in improving disease resistance, nutrition and/or growth of cultured organisms. The objective of this work was to obtain probiotic bacterial strains with immunostimulatory qualities for shrimp. A total of 600 strains were isolated from the hepatopancreas of healthy shrimp (*L. vannamei*) (15 ± 2 g) collected in Santa Cruz del Sur, Camagüey, Cuba. The probiotic effect *in vitro* was evaluated using the agar diffusion technique. Two strains showed inhibitory effects against *Vibrio harveyi*. *In vivo* probiotic effect of these strains was tested in larvae and juveniles animals. The total haemocytes and lectin titre were higher in the animals treated with the probiotics groups than the shrimp controls. It was also observed that the enzymatic activities of peroxidase and phenoloxidase were stimulated in the probiotics groups respect to the control group. The total of colony unit forming in a vibrio medium was decreased after the treatment with these strains. It was also detected that both strains improve the growth and larvae quality in *L. vannamei*. The microorganisms tested in this study therefore have tremendous potential as probiotics for commercially produced *L. vannamei*.

S6-P29**Efecto de la dieta probiótica en la flora intestinal de caprinos**

Apás AL¹, Arena ME¹, González S²

¹Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, San Miguel de Tucumán, Argentina

²CERELA-CONICET, San Miguel de Tucumán, Argentina

AC: González S (sgonzal@cerela.org.ar)

Estudiamos el efecto de una combinación de 4 cepas probióticas caprinas (*Lactobacillus* L48, Bifidobacteria, Enterococos y *Lactobacillus* 19) administradas en un suplemento dietario sobre la flora intestinal de cabras recién destetadas. El suplemento dietario fue preparado a partir de un ensilado de 30 días del despunte de caña, desecho sólido de la industria azucarera.

Tanto el ensilado probiótico (EP) como el ensilado control (EC) fermentado solo por la flora nativa, fueron administrados 200 g /individuo a cabras hembras de 45-55 días de vida. Los lotes se componen de 5 cabras cada uno. Los períodos de administración de probióticos fueron de 7 días, y fueron seguidos por un período similar de días de descanso, repitiendo tres veces esta secuencia de alimentación.

La administración de EP incrementa en más de 1.5 ciclos logarítmicos, la flora láctica; en 1.30 log los enterococos, y en más de 2 log las bifidobacterias, indicando un incremento de flora intestinal benéfica. Los hongos, levaduras y las Enterobacterias disminuyen significativamente (3, 3 y 2 log, respectivamente) por la ingesta de los probióticos. Todos estos cambios son observables a partir del día 17 y se acentúan con el tiempo.

Los datos indican que los probióticos administrados favorecen el establecimiento de flora beneficiosa en el tracto intestinal, cambio que se refleja en una diferencia estadística de la microflora intestinal.

S6-P30

Fluorescence study of galactose specific lectin-like receptors involved in the flocculation of wine yeast

Sosa OA, Farías ME

CERELA - CONICET, San Miguel de Tucumán, Argentina

AC: Farías M (mfarias@cerela.org.ar)

The lectin-like theory suggests that yeast flocculation is mediated by an aggregating lectinic factor. *Kloeckera apiculata* mc1, a non-*Saccharomyces* yeast isolated from grape berries, expresses a flocculent phenotype mediated by galactose-specific lectins and stabilized by Ca²⁺. Glucose showed to be an activator of the flocculent phenotype of *Kloeckera apiculata* mc1. In this study we examined the suitability of neoglycoprotein fluorescent probe (BSA-galactose-FITC) to quantify the number of galactose specific lectins on the surface of *K. apiculata* mc1 and to evaluate the effect of glucose on the density of these specific receptors. Free and bound probe was determined by spectrofluorometric method and the amount of fixed probe was calculated as follow: fixed probe (μg) = (total probe – free probe)/total probe. Data of fluorescence assay were analyzed by Scatchard method to estimate the number of lectin sites per cell.

The «lectin-like» receptors on the surface of flocculent yeast specifically bound BSA-FITC-gal probe, showing saturation kinetic of binding. The number of lectinic sites was higher as increased the glucose concentrations. At 24 h of incubation was approximately 1.5-fold higher to cells grown with 20 g/L glucose than the yeasts grown with 2 g/L glucose. This study with fluorescent probe constitutes a direct confirmation of the existence protein (lectin) on the cell wall of *K. apiculata* mc1 that specifically interacts with the galactose residues on the neighboring cells. Self-flocculation induction by glucose seems to involve «*de novo*» lectin synthesis.

S6-P31**Partial characterization of the inhibitory compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae***

Mendoza LM, Farías ME

CERELA - CONICET, San Miguel de Tucumán, Argentina

AC: Farías M (mfarias@cerela.org.ar)

Malolactic fermentation is carried out mainly by *Oenococcus oeni* and plays an important role in winemaking. The antagonism of *O. oeni* by *Saccharomyces cerevisiae* could be due to inhibitory compounds produced by the wine yeast such as ethanol, SO₂, medium chain fatty acids and antibacterial proteins/peptides. In previous studies we determined by the double-layer plate method that *S. cerevisiae* mc2 wine strain showed a strong inhibitory activity on the growth of *Oenococcus oeni* X₂L and *Lactobacillus hilgardii* 5w. Also, neither ethanol nor SO₂ seem to be the only factors responsible for the inhibitory yeast activity. The aim of this work was to characterize the nature of the other metabolites produced by *S. cerevisiae* with inhibitory activity on wine bacteria. *S. cerevisiae* was cultured in grape juice medium for 6 days at 25 °C and the supernatant was used as fermented medium. Unfermented grape juice medium was used as control.

When *O. oeni* and *L. hilgardii* were sequentially inoculated in the media fermented by wine yeast, showed lower growth rate and final cell population in regards to control medium. The inhibitory compounds produced by *S. cerevisiae* were sensitive to the heat and protease treatments, suggesting that the inhibition on lactic acid bacteria could be due to proteinaceous compounds. The inhibitory fraction containing compounds larger than 3 kDa exhibited a typical saturation kinetics of bacterial inhibition. The inhibitory effect exerted by *S. cerevisiae* mc2 on bacterial growth could be due to a synergistic effect between fermentation metabolites and proteic factors produced by the yeast.

S6-P32

Síntesis de galacto-oligosacáridos (GOS) con β -galactosidasa inmovilizada en soportes amino-epoxilados

Huerta Sánchez LM, Marín P, Illanes A

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

AC: *Huerta Sánchez L (nestamart25@hotmail.com)*

Los galacto-oligosacáridos (GOS) pueden ser producidos enzimáticamente con β -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) a partir de lactosa como sustrato y han sido clasificados como ingredientes alimenticios prebióticos, adquiriendo su producción un alto interés industrial. Dicha enzima, empleada comercialmente por su capacidad de hidrolizar lactosa en leche y productos lácteos, bajo condiciones adecuadas de reacción puede catalizar la reacción de síntesis de GOS de diferente tamaño por transgalactosilación. Estudios previos muestran que la conversión de lactosa en GOS puede ser 20 a 30% más baja con enzima inmovilizada que con enzima en solución, lo que representaría una desventaja que debería ser compensada con la reutilización del catalizador.

Se empleó una β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y la inmovilización se llevó a cabo en un soporte heterofuncional amino-epoxilado (Resindion SRL), en tampón fosfato a pH 7, en tampón bicarbonato pH 9.2 y glicina 3 M. Las condiciones de síntesis de GOS fueron: 50 °C, pH 4.5, concentración de lactosa 20% p/v; razón actividad enzimática/sustrato: 400 U/g. Bajo estas condiciones se obtuvo un porcentaje máximo de GOS de 21.0 % p/p, en el primer ciclo de síntesis y de 20.3% p/p en el segundo ciclo, demostrándose la factibilidad de reutilización del biocatalizador; con la enzima en solución en similares condiciones de reacción el porcentaje producido fue de 27.1% p/p. Actualmente se está determinando el número de ciclos de uso del biocatalizador de modo de evaluar comparativamente la productividad global del proceso.

S6-P33**Obtención de proteína a partir de cultivos mixtos con subproducto de plátano**

García Sánchez LK, Mejía Enciso BE

Tecnológico de Colima, Villa de Álvarez, México

AC: Mejía Enciso B (karinagarcia83@hotmail.com)

Las proteínas para consumo se obtienen principalmente de algunos vegetales. La producción de proteína de alto valor siempre será un proyecto de alto interés en cualquier país, como fuente de alimento tanto para los humanos como para animales de granja, y por ello reviste trascendental importancia desde el punto de vista sustentable. El objetivo de esta investigación fue el aprovechamiento del desperdicio de plátano (*Musa paradisiaca* L.), como sustrato para producción de proteína a través de cultivos mixtos de microorganismos (*Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Saccharomyces* spp.). El estudio se basó en adicionar diferentes concentraciones de plátano como medio de cultivo. Se experimentó con seis diferentes concentraciones: 10, 14.5, 18, 20, 25, 35%, a través de un proceso de fermentación aerobio. Además se corroboró bioquímicamente la mejor concentración de plátano metabolizada por los microorganismos utilizados como sustrato mediante la determinación de la constante de Michaelis-Menten. El resultado más significativo que se obtuvo de la concentración de biomasa celular fue de 35% al obtener una producción de 99 g/L, de biomasa con un K_s de 33.8986% que corresponde a una μ_{max} de 1.508751gr/h, comparado con la concentración del 10% que fue la menor (0.173g/L) de biomasa durante 5 h de fermentación. El aprovechamiento del desperdicio del plátano con la actividad de los microorganismos mixtos, es una buena alternativa para la producción de biomasa y que puede ser una alternativa como alimento complementario para el ganado vacuno y porcino.

S6-P34

**Calcium alginate immobilization of 1SST-expressing
Pichia pastoris cells and scaled-up 1-kestose
production from sucrose**

*Pérez Cruz ER¹, Martínez D¹, Sobrino A¹, Trujillo LE²,
Menéndez C², Rodríguez I³, Arrieta JG², Hernández L²*

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Sancti Spíritus, Sancti Spíritus,
Cuba

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), La Habana, Cuba

³Facultad Química- Farmacia, Universidad Central de las Villas, Santa Clara,
Cuba

AC: Pérez Cruz E (enrique.perez@cigb.edu.cu)

Pichia pastoris cells expressing a plant sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) were immobilized in calcium alginate beads and assayed for 1-kestose production from sucrose. Dropping a cell suspension (300 g wet biomass per litre) into 2% (w/v) sodium alginate resulted in beads with average 1-SST activity of 0.31 units. The biocatalyzer reaction in a 5-L bioreactor was optimum at pH 5.5, temperature 30 °C, initial sucrose concentration 600 g/L, agitation speed 100 rpm, and biocatalyzer:substrate rate of 0.16:1 (w/w). Under these conditions the highest 1-kestose yield reached 320 g/L. The biocatalyzer was stably operated in repetitive batches for 30 days with only 20% activity loss. Scale-up of the biocatalyzer reaction to 50 L was conducted in a stirred tank following criteria of constant impeller tip speed (NDi) and power per unit volume of liquid (P/V). FOS yields in scaled-up reactions were comparable to those achieved using the 5-L prototype.

S6-P35**Efecto de la administración de *Lactobacillus fermentum* etc1 sobre actividad feruloil esterasa intestinal en ratones**

Abeijon Mukdsi MC¹, Gauffin Cano MP¹, Holgado S², Medina RB³, González S¹

¹CERELA-CONICET, San Miguel de Tucumán, Argentina

²Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia- UNT, San Miguel de Tucumán, Argentina

³Fac. Cs. de la Salud-UNSTA, San Miguel de Tucumán, Argentina

AC: MEDINA R (rmedina@cerela.org.ar)

Las cinamil esterases (CE) son enzimas que hidrolizan ésteres hidroxycinamatos presentes en alimentos de origen vegetal, liberando ácidos hidroxycinámicos con propiedades antioxidantes y anticarcinogénicas, tales como el ácido ferúlico (AF). La actividad CE de la microflora intestinal es crítica para la biodisponibilidad de AF. El objetivo fue evaluar actividad feruloil esterasa (FE) a nivel intestinal en ratones alimentados con *L. fermentum* ETC1. Los animales fueron alimentados con las dosis 10⁷ y 10⁹ ufc/mL/día en el agua de bebida y sacrificados a los 2, 5, 7 y 10 días. La actividad FE se determinó en contenido y mucosa de intestino delgado y grueso (CD, MD, CG, MG, respectivamente) por incubación en PBS pH 7 + metilferulato 1 mM. El AF liberado se cuantificó por HPLC. Se evaluó influencia de la alimentación en el peso y estructura intestinal de los animales.

Se observó aumento de la actividad FE respecto al grupo control de bioterio en CG, MD y MG a 5, 7 y 10 días. En los ratones tratados el incremento de actividad FE fue mayor en MD que en MG. A los 7 días de alimentación con la dosis 10⁷ se observó en CG y MD una actividad FE 3.6 veces y 2.65 veces mayor que en el grupo control, respectivamente. No se observó diferencia significativa en el peso ni alteraciones en la estructura intestinal de los animales tratados.

Los resultados obtenidos demostraron que la alimentación con *L. fermentum* ETC1 incrementa la actividad FE a nivel intestinal, favoreciendo la biodisponibilidad de compuestos antioxidantes.

SIMPOSIO 7 / SYMPOSIUM 7

**Control Fitosanitario con Herramientas
Biotecnológicas/
*Control of Crop Pests with Biotechnology Tools***

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S7-1**Resistance management of transgenic insect resistant crops: ecological factors**

Wright DJ¹, Raymond B²

¹Department of Life Sciences, Imperial College London, London, United Kingdom

²Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford, United Kingdom

AC: *Wright D (d.wright@imperial.ac.uk)*

From their introduction in 1996, the GM crops grown with traits for insecticide resistance have been predominantly maize and cotton varieties expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins for the control of larval stages of a few key lepidopteran pest species. Resistance management strategies have been refined with the life history of such pests in mind. With the introduction from 2003 of Cry3, Cry34 and Cry35 toxins for coleopteran pests of maize and with an increasing range of GM crops and other *Bt* toxins (*e.g.* Vip3) being commercialised, a much wider range of insect pest species and populations will become exposed to selection. Here, the influence of ecological factors on the evolution and management of insect resistance to GM crops will be considered.

S7-2

Learning from insect – *Bt* interaction using functional genomic tools – Basic insights for the rational design of «SMART» insecticides

Ayra-Pardo C

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Ayra-Pardo C (camilo.ayra@cigb.edu.cu)

Insect's pathogen *Bacillus thuringiensis* kills their host by a mechanism still not well understood. This spore-forming bacterium produces insecticidal crystal (Cry) proteins that become lethal weapons when are ingested by susceptible insects. For decades, the mechanism of insect killing has been assumed to be Cry-mediated lysis of the gut epithelial cells, which leads to starvation or *B. thuringiensis* septicemia. Some authors suggest the assumption midgut cells lyse after being punched by «Cry holes» is oversimplified. Rather, it appears cells have sophisticated mechanisms and signal-transduction pathways to respond to such attack. Recent papers describing alternative experimental approaches have revealed a cellular response possibly involving multiple metabolic and regulatory pathways elicited in the host towards Cry intoxication. Whether or not *B. thuringiensis* is responsible for septicemic death of insects is also under revision. The complex nature of insect-*Bt* interaction could be unravelled when key genes involved in pathogenesis and host-defense processes, as well as, the interaction among them, have been known. In the post-genomic era, integrating genomics, transcriptomics and proteomics combined with gene function analyses could help to advance in this issue. Then, «SMART» insecticides would emerge to either target host mechanisms responsible for defensive barriers or boost *B. thuringiensis* virulence factors.

S7-3**Moth, beetle and mosquito toxins of *Bacillus thuringiensis* and their cognate receptors**

Ibrahim M, Griko N, Sun J, Bulla Jr. LA

Dep. of Molecular and Cell Biology, Univ. Texas at Dallas, Richardson and
Biological Targets, Inc., Texas, USA

AC: Bulla, Jr. L (bulla@utdallas.edu)

Bacillus thuringiensis (*Bt*) Cry toxins exert lethal action on certain orders of insects, many of which are agricultural pests and vectors of human and animal disease. Specific toxins include Cry1Ab for the moth *Manduca sexta*, Cry3A for the beetle *Tenebrio molitor* and Cry4B for the mosquito *Anopheles gambiae*, among others. Likewise, corresponding cadherin receptors for the three toxins have been discovered in the midgut epithelium of these particular insects. Toxin action is a dynamic process that involves univalent binding of the individual Cry toxins to a specific area within the receptors of the three insects. Consensus alignment of amino acid sequences that constitute this area reveals strong conservation of secondary structural elements. Particularly, there are stretches of amino acids within the N- and C-terminal residues of the binding region of the three receptors that are the most highly conserved. These sequences represent signatures that mark the toxin-binding function in the three receptors. Predicted three-dimensional models of the toxin binding motifs display the N- and C-termini delimiting a single contiguous surface between the two termini. The interface varies from receptor to receptor and this feature, along with structural differences among the three Cry toxins, most likely, renders insect host specificity to *Bt*.

S7-4**Improved recombinant bacterial larvicides****Federici BA**

Department of Entomology and Interdepartmental Programs in Genetics and Molecular Biology University, Riverside, USA

AC: Federici B (brian.federici@ucr.edu)

An urgent need exists for new agents to control mosquito vectors of disease, especially for the mosquitoes that transmit the etiologic agents of malaria, filariasis, and Dengue Fever, as well as the other viral diseases of vertebrates. Mosquito larvicides based on the bacteria, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) or *B. sphaericus* (Bs), are effective in many habitats, but use is limited by their high cost. Moreover, mosquito resistance evolves rapidly to Bs where used intensively. The efficacy of these bacteria is due, respectively, to a binary protein (BsBin) in Bs, and four proteins in Bti, Cry4A, Cry4B, Cry11A, and Cyt1A. In addition to these commercialized larvicidal bacteria, there are many other wild type strains that produce potent mosquitocidal proteins. My laboratory focuses on the molecular basis of gene expression in these bacteria, and use of knowledge obtained from these studies to develop highly improved recombinant bacterial strains through the use of recombinant DNA technology. We currently use strong bacterial promoters and a 5' mRNA stabilizing sequence to synthesize high levels of various proteins in combination. Recent developments include the genetic synthesis of two new highly potent strains of bacilli that are much more effective than the wild type bacteria used in commercial larvicides. For example, a recombinant strain that produces the normal components of Bti along with high levels of the BsBin protein, ranges, depending on the species, from ten to fifteen-fold more toxic to larvae of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens quinquefasciatus* than commercial larvicides.

S7-5**Insecticidal toxins from *Photorhabdus*: comparative genomics and Rapid Virulence Annotation (RVA)**

*Ffrench-Constant R¹, Hinchliffe S¹, Hares M¹, Dowling A¹,
Waterfield N², Vlisidou I², Sánchez Contreras M²*

¹School of Biological Sciences, University of Exeter in Cornwall, Falmouth, United Kingdom

²Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, Bath, United Kingdom

AC: *ffrench-Constant R* (*r.ffrench-constant@exeter.ac.uk*)

The genomes of bacteria in the genus *Photorhabdus* encode numerous novel toxins including members of the Toxin complex (Tc) family, Makes Caterpillars Floppy (Mcf) toxins, PirAB toxins and many others. Following the recent completion of two complete genome sequences, one from *P. luminescens* and one from *P. asymbiotica*, we will describe the comparative genomics of toxin encoding genes in these two very different pathogens. We will also discuss what we know about the mode of action of these different toxin classes. Finally, we will describe novel massively parallel screens to perform functional annotation of novel toxin genes in bacteria. We have termed this approach Rapid Virulence Annotation or RVA and its applications to bacteria other than *Photorhabdus* will be discussed.

S7-6

Novel Cry toxins and α -amylase inhibitor mutant genes and their potential for insect control

Grossi-de-Sa MF

EMBRAPA – Genetic Resources and Biotechnology and Universidade Catolica de Brasilia- DF, Brazil

AC: fatimasa@cenargen.embrapa.br

Nowadays, it is estimated that plant insect-pests and diseases destroy as much as 45% of the world's crop. In some cases, the losses can be particularly high, due to the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) insect pest attack. This insect causes severe damage in cotton floral buds and fruits and its control is difficult due to the endophytic larvae habit. Plant genetic transformation with exogenous genes encoding entomotoxic factors is an interesting strategy to be used in the control of this important insect-pest. Efforts have been focused on studies of new insecticidal proteins. On this aim, alpha amylase inhibitors α -AI-1 and α -AI-2, two α -AIs isoforms isolated from common and wild bean, respectively and *cry8Ha1* *Bt* toxin, with no expressive effects against *A. grandis* were submitted to DNA shuffling molecular evolution technique. *Cry8Ha1* library produced 10^5 variants. The different mutant Cry proteins were bioassayed against the insect pest and variants with high level activity were obtained. One of the most entomotoxic mutants, Cry8Ha5, was selected, showing up to 90% of mortality in the presence of small quantity of the toxin. In parallel, a library of phage-expressed containing 10^7 α AI variants produced by DNA shuffling of α AI-1 and α AI-2 genes was screened against *A. grandis* amylase (AGA) and high effective mutants were obtained, reaching 80% of AGA inhibition. These mutants have been used in pyramidal constructions to transform cotton plants to confer resistance to *A. grandis*.

Supported by EMBRAPA, CNPq, CAPES, FACUAL, FIALGO, FUNDEAGRO.

S7-7**Desarrollo de insecticidas bacterianos para la protección agrícola y el control de vectores**

Benintende G, Sauka D, Monella R, Cozzi J

Bioinsumos Microbianos IMYZA INTA, Castelar, Argentina

AC: *Benintende G (gbenintende@cnia.inta.gov.ar)*

La producción regional de bioinsecticidas capaces de competir en eficiencia y calidad con los productos disponibles en el mercado internacional, podría reducir fuertemente sus costos, generando un importante desarrollo de las industrias locales de la fermentación y un mejor aprovechamiento de algunos de los subproductos de la agroindustria regional. Mediante la conjunción de proyectos dirigidos a la selección de cepas con mayor patogenicidad sobre las mundialmente utilizadas, así como al desarrollo de formulaciones competitivas que garanticen la estabilidad, facilidad de dispersión, eficacia y residualidad del producto, se favorecería su adopción en programas de manejo integrado de plagas y vectores, o en sistemas de producción agropecuaria orgánica. Con esos objetivos iniciamos en nuestros laboratorios hace más de una década, estudios sobre la bacteria *Bacillus thuringiensis* como herramienta biotecnológica para la protección agrícola y el control de vectores. Los estudios de producción de la biomasa activa bacteriana se realizaron hasta fermentadores experimentales y piloto, incluyendo el desarrollo y optimización de medios nutritivos líquidos y el ajuste de los parámetros del proceso fermentativo durante el escalado. Se estudiaron diferentes formulaciones de la biomasa activa, las que fueron evaluadas en cuanto a sus propiedades físico-químicas y estabilidad bajo diferentes condiciones ambientales. Los bioinsecticidas destinados a la protección agrícola se evaluaron en ensayos realizados en zonas de producción de diferentes cultivos, representando diversas situaciones agroclimáticas. Los mosquitocidas se ensayaron en condiciones naturales de exposición solar. El aislamiento de cepas nativas de *B. thuringiensis* permite seleccionar estirpes más eficientes para el desarrollo de los bioinsecticidas.

S7-8

Actividad biológica de proteínas Cry recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de primer instar de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae)

Lopez Pazos SA, Ceron Salamanca JA

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia Bogotá, Bogotá D.C., Colombia

AC: Lopez Pazos S (salopezp@unal.edu.co)

El café es el cultivo más importante de Colombia en donde 16 departamentos producen el grano, aproximadamente 860 000 hectáreas. La broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* (Coleóptera: Scolytidae) es el mayor problema entomológico en la caficultura, debido a su hábito de atacar la cereza del café. En nuestro país afecta la totalidad del área cultivada, y puede implicar pérdidas en los rendimientos por cosecha entre el 10 y 80%. Esta plaga tiene la capacidad de disminuir las cualidades físicas y organolépticas del grano, y afecta la inocuidad de la bebida. La bacteria *Bacillus thuringiensis* ha venido utilizándose como una opción importante en el manejo de insectos plaga, y en la producción de plantas resistentes al ataque de estos. Tiene alta especificidad contra los insectos susceptibles y es inocuo para el medio ambiente. Se han reportado varias toxinas de esta bacteria con actividad contra insectos del orden Coleóptera, destacándose las proteínas Cry1B y Cry3. Con base en esto se determinó la actividad biológica de estas toxinas sobre larvas de primer instar de *H. hampei*. Los genes *cry1B* y *cry3* se clonaron en *Escherichia coli* para la expresión de las proteínas recombinantes. Para el bioensayo se diseñó una dieta artificial IBUN donde se logró el mantenimiento del insecto. Se determinó un porcentaje de mortalidad de hasta 30% para ambas toxinas con concentraciones entre 1 000 y 10 000 ng/cm². Los resultados permiten sentar una base para la evaluación de otras toxinas anticoleópteras y diseño de nuevas proteínas insecticidas.

S7-9**A novel *Bacillus thuringiensis* strain pathogenic to *Helicoverpa armigera***

Thakur K

Dr. Panjabrao Deshmukh Krishi Vidyapeeth, Akola, Nagpur, India

AC: Thakur K (kuldeept2001@yahoo.com)

Bacillus thuringiensis commonly known as *Bt* is very active against *Helicoverpa armigera*, a polyphagous pest. Twenty one isolates were isolated from soil and one from dead larvae. These isolates were compared with standard strain of *Bt* (k) obtained from Ohio State University, USA. Bioassay studies using artificial diet against *H. armigera* was carried out. Ten isolates were found pathogenic in varying degree, of which seven isolates produced not only more biomass but also more protein than the standard strain (4D1). Three isolates viz. 5AM3, 5BN1 and 5I1 had protein mol.wt. of 66 and 132 kDa which was at par to standard strain.

In Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA) test, isolate 5BN1 recorded maximum (1.626) optical density followed by 5AM3 (1.407) which was three fold more than the standard strain 4D1 (0.564) and all isolates exhibited polyclonal antibodies. In a Radial Immunodiffusion test, there was complete fusion between antigen and antiserum in 5BN1 that indicates close proximity to be one serovar. Isolates 5AM3 was distinct in not showing fusion with antisera of other isolates and was noticed to be highly toxic to *H. armigera*. Thereby indicating a novel effective strain of *Bacillus thuringiensis*.

S7-10

Colecta, identificación y multiplicación de virus entomopatógenos en el género *Spodoptera* presentes en el cultivo del maíz

Vargas Leandro JA, Coto Valverde E, Duran Román L

Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica

AC: *Vargas Leandro J (joral_12@hotmail.com)*

El objetivo de este trabajo fue realizar la colecta, identificación y multiplicación de virus entomopatógenos presentes en larvas del género *Spodoptera* en el cultivo del maíz, así como la realización de pruebas de efectividad en el laboratorio del agente viral sobre su hospedante mantenido bajo dieta artificial.

Se realizaron colectas en campo de las larvas las cuales fueron llevadas al Laboratorio de Biocontroladores en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, en donde se emplearon para establecer un pie de cría de hospederos vivos.

El virus fue aislado de larvas infectadas encontradas en campo y almacenado en congelación. Se realizó una sesión de microscopía electrónica para identificar cuerpos de inclusión.

La efectividad del virus fue probada en el laboratorio inoculando la dieta artificial, con el fin determinar la dosis recomendada para el control biológico de esta plaga, abriendo paso a la formulación y producción industrial del virus para su aplicación en la agricultura.

S7-11**Identificación de polimorfismos en los genes *cry1aa*, *1ab*, *1ac* y *cry1b* en aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* por LSSP-PCR**

López Pazos A, Orozco M, Hernández Fernández J, Bernal Villegas J

Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia

AC: Hernández Fernández J (javier.hernandez@utadeo.edu.co)

Se estandarizó la técnica LSSP-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con un único oligonucleótido en condiciones de baja astringencia), para identificar polimorfismos en los genes *cry1Aa*, *1Ab*, *1Ac* y *1B* en aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. Con este propósito se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplificaron una región variable en estos genes. Previamente se identificó el gen *cry1* por PCR en aislamientos nativos provenientes del Centro y Caribe Colombiano. Los productos de PCR de estos aislamientos, junto con los de las cepas de referencia *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 y *B. thuringiensis aizawai* HD137, se analizaron por LSSP-PCR y los patrones electroforéticos obtenidos se compararon cualitativamente, utilizando el programa ImageJ. Con este análisis, y empleando el coeficiente de similitud de Dice se construyó un dendrograma mediante el algoritmo UPGMA. Este análisis permitió identificar en los aislamientos nativos BtGC120 (para el gen *cry1B*) y BtGC130 (para el gen *cry1Ab*) perfiles de LSSP-PCR marcadamente diferentes con respecto a los presentados por las cepas de referencia. Las secuencias de fragmentos de ambos genes *cry1* mostraron una identidad de 91% para el posible nuevo gen *cry1Ab* y 93% con el candidato a gen *cry1B*. Los aislamientos nativos BtGC130 y BtGC120 se evaluaron biológicamente contra larvas de primer instar de los insectos-plaga *Tecia solanivora* y *Spodoptera frugiperda*, obteniéndose una CL50 de 1.298 µg y 1.896 ng de proteína por cm², respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que la LSSP-PCR es una técnica que permite identificar variantes de las secuencias de los genes *cry1* de *B. thuringiensis*.

S7-12

Detection of putative novel *cry* genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* isolates

Salehi Jouzani G¹, Jahangiri R¹, Nazarian A¹, Alamisaeeed K²

¹Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

²Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural and Natural Resources University of Ramin, Ahvaz, Iran

AC: Salehi Jouzani G (gsalehi@abrii.ac.ir)

In this research about 70 isolates of *Bt* were collected from the soil of different agricultural habitats of Iran and identified using morphological and molecular techniques. The presence and frequency of *cry*, *cyt* and *vip* genes and also presence of new genes in these isolates were investigated. For this purpose, about 110 universal and specific primers were designed and synthesized. These primers allowed us to detect about 380 known *cry*, *cyt* and *vip* genes in the native *Bt* isolates. The native isolates showed high diversity in *cry*, *cyt* and *vip* genes contains. The isolates contained between 15 to 40 different *cry*, *cyt* and *vip* genes. Most of the genes profiles observed in this research were for the first time and were not reported in previous international works. Furthermore, 30 isolates, when were assayed for *cry1C*, *cry5*, *cry6*, *cry9*, *cry10*, *cry11*, *cry18* and *cry24* genes, showed different size bands from that were expected. These results showed that these isolates may contain novel *cry* gene. PCR reactions for these isolates and genes were repeated, and PCR products were cloned and sequenced. The obtained sequences were compared with *cry* genes sequences in NCBI and other data banks. One sequence obtained in the eight isolates for *cry18* gene primers showed no similarity to *cry18* but showed about 70 and 80% similarity to *vip3V* and *cry1Da* genes, respectively. Efforts for isolation and cloning of whole sequence of this novel gene, identification and detection of other putative novel *cry* genes in the collection will be continued.

S7-13**Improving the efficiency of plant pesticidal proteins in a multitrophic context-The model case of plant cystatins**

Dominique Michaud, Marie-Claire Goulet, Juan Vorster & Conrad Cloutier

Département de phytologie, Université Laval, Québec (Québec) Canada G1V 0A6

A number of protein engineering approaches involving structure/function models have been proposed over the years to improve the pesticidal effects of plant defense proteins against herbivorous pests, leading in several cases to the production of significantly improved protein variants. Here we discuss, using cysteine protease inhibitors of the cystatin superfamily as a model, the potential of evolutionary models as a complement to these approaches, allowing for the development of improved proteins in a broader, multitrophic context taking into account not only the target herbivore, but also the host plant itself and non-target 'service providers' of the ecosystem. Plant cystatins, similar to other defense proteins, include hypervariable, positively selected amino acid sites impacting their biological activity [Kiggundu *et al.* Plant J 2006;48:403–413; Goulet *et al.* Plant Physiol 2008;146:1010-1019]. Here we illustrate, using: (i) statistical and structural models for the detection of positive selection among plant cystatins; (ii) 30 single mutants of the tomato cystatin *S/CYS8*, and (iii) the major cysteine proteases of a plant–herbivore–predator tritrophic system, the potential of site-directed mutagenesis at positively selected amino acid sites for the generation of cystatin variants with improved inhibitory potency and specificity towards herbivorous insect digestive proteases. Some mutants identified as being improved against the target herbivore proteases also exhibited weaker activity against host plant leaf cysteine proteases and against the digestive cysteine proteases of an insect predator showing potential for biological control.

S7-14

Anhydrobiotic cells of the biocontrol agent *Tsukamurella paurometabola* C-924: Stability of formulated powders

Hernández A

CIGB Camagüey, Camagüey, Cuba

AC: Hernández A (armando.hernandez@cigb.edu.cu)

The nematocidal agent *Tsukamurella paurometabola* C-924 was desiccated by freeze-drying and spray-drying technologies. Freeze-drying was used to evaluate the desiccation tolerance of strain C-924 by using different additives such as mannitol, microcrystalline cellulose, and sucrose. The survival rate was higher (60%) when sucrose was employed at 10% (w/w). From these results, spray-drying experiments were carried out using sucrose as a protective agent. At outlet temperature 62 °C, survival rates between 12 and 85% were reached with sucrose up to 10% (w/w). The accelerated stability test of the powders showed that the best storage condition was at 4 °C under vacuum.

On the other hand, changes in the culture conditions allowed obtaining anhydrobiotic cells stable for 2 years at 4 °C. The desiccated cells of *T. paurometabola* C-924 showed to be biologically active after rehydration when field trials were conducted. In addition, a new methodology was developed to evaluate and predict the anhydrobiosis state of desiccated bacterial cells.

S7-15**Uso del bionemática HeberNem
en cultivos vegetales y banano**

Mena J, Smith E, Pimentel E, Mesa L, Armas R, Marín M, Hernández A, Borroto C

CIGB, La Habana, Cuba

AC: Mena J (jesus.mena@cigb.edu.cu)

La bacteria *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924, en una formulación líquida (HeberNem-L), se registró como Nematicida Biológico con el Permiso Nro. 001/2007 (del Órgano de Registro Nacional de Sanidad Vegetal), Tomo 4, Folio 1364. El objetivo de este trabajo es mostrar los resultados del uso de HeberNem en distintos sistemas productivos. El área tratada con HeberNem desde abril de 2004, en que se inició su comercialización nacional, hasta diciembre de 2006 en cultivos protegidos (hortalizas) fue de 75.42 ha. En el 2007 el área total tratada en los cultivos protegidos con HeberNem fue de 51.6 ha en el territorio nacional. Se demostró la inserción de este producto en los sistemas productivos a través del Manejo Integrado de Plagas (MIP) donde la Efectividad Técnica (% ET) de HeberNem en el control de nemátodos fue superior a 70% en todas las áreas donde se cumplieron los requisitos para su uso y manejo. También se presentan resultados favorables en sistemas de cultivos semiprottegidos (lechuga) y en el banano. Otros resultados demuestran que HeberNem estimula el desarrollo de los cultivos, ya que optimiza el aprovechamiento de la materia orgánica por las plantas, al favorecer la asimilación del nitrógeno y el fósforo.

S7-16

RNA interference as a tool for tomato crop protection against TYLCV

Fuentes A, Ramos P, Callard D, Sánchez Y, Oliva O, Rodríguez R, Tiel K, Ruíz Y, Doreste V, Borroto C, Pujol M

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Fuentes A (alejandro.fuentes@cigb.edu.cu)

Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) is the most devastating begomovirus affecting tomato production in the tropics and subtropics. Among the strategies to diminish damages caused by TYLCV the cultivation of resistant tomato varieties is thought to be the most effective way. However, the resistant genotypes developed until today through introgression of resistance from wild species into domesticated tomato, besides other disadvantages of this technology, still support the TYLCV replication leading to the virus spread to susceptible plants and appearance of novel virus strains through recombination events. In this way, the development of immune tomato plants would overcome the above mentioned constraints of resistant but still TYLCV- replicating germplasm. Due to the indispensable role of the replication associated gene (*c1*) in the multiplication of the virus, this gene was the target chosen in this work in order to attempt the development of immunity to TYLCV in transgenic tomato plants. A hairpin RNA construction designed to produce interfering RNA against the replication associated gene (*c1*) of the TYLCV was used to obtain transgenic tomato plants. Data on several lines and generations of immune tomato plants against TYLCV obtained using this RNAi technology approach, leading to unaffected tomato yield in experimental plots under very intensive infestation of TYLCV-viruliferous whiteflies, is provided in this report.

S7-17**Changes in Chemical Toxicity due to GMHT Canola**

Smyth S¹, Gusta M¹, Khachatourians G¹, Phillips P¹, Castle D², Ries N³

¹University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada

²University of Ottawa, Ottawa, Canada

³University of Victoria, Victoria, Canada

AC: Smyth S (sjs064@mail.usask.ca)

The adoption of genetically modified herbicide tolerant (GMHT) canola has been nothing short of phenomenal. First introduced for commercial production in 1997, GMHT canola now accounts for 98% of canola production in Western Canada. The wide and rapid adoption of this innovative crop has resulted in substantial economic and environmental benefits for producers.

Pesticide exposure to producers and the environment has been a concern to governments, environmental organizations as well as chemical companies. The innovation of GMHT canola has resulted in producers using more benign chemicals to control weeds. The three most common production systems are Clearfield®, Liberty Link™ and Roundup Ready™ which utilize Odyssey®, Liberty® and Roundup respectively. These chemicals have been classified by the World Health Organization as either Type 3 or 4, meaning that they are either slightly hazardous or non-hazardous.

This paper examines the changes in chemical toxicity to producers and the environment resulting from the adoption of GMHT canola. These changes have been manifested through changes in herbicide selection, application rate, acres treated and timing of application. The paper will identify the key chemicals and application rates utilized by producers prior to the use of GMHT canola, which will provide a benchmark for comparison to post GMHT canola production. Information has been gathered for this paper through a series of producer surveys. This database provides a comprehensive view of shifts in chemical use by producers for over a 15 year period.

S7-18

Over-expression of ketocarotenoids in tagetes flowers to produce astaxanthin

Bridg H, Flachmann R, Matter S, Schopfer C, Wenderoth I, Eisenreich R

Analytic Jena, Jena, Germany

AC: *Bridg H (hannia.bridg@gmail.com)*

Various biosynthetic products, such as, for example, carotenoids, but also proteins, are prepared in cells by means of natural metabolic processes and are used in many branches of industry, including the foodstuffs, feedstuffs, cosmetic, feed, food and pharmaceutical industries. Their production on the large-scale in some cases takes place by means of biotechnological processes using microorganisms.

Carotenoids are synthesized de novo in bacteria, algae, fungi and plants. In recent years, it has increasingly been attempted also to utilize plants as production organisms for fine chemicals, in particular for vitamins and carotenoids.

A natural mixture of the carotenoids lutein, zeaxanthin and violaxanthin is extracted, for example, from the flowers of marigold plants (*Tagetes* plants) as «oleoresin» used as an ingredient of food supplements and in the feed sector. On account of their color-imparting properties, the ketocarotenoids and in particular astaxanthin are used as pigmenting aids in animal nutrition, in particular in trout, salmon and shrimp farming. An economical biotechnological process for the production of natural, biosynthetic products and in particular carotenoids is therefore of great importance.

We describe the carotenoid biosynthesis in *Tagetes* plants and disclose how genetically modified plants could be produced in order to obtain various carotenoid profiles in the petals based on D-amino acid selection. Finally it is necessary to overexpress some biosynthesis genes and to suppress others. The generated plants may be used for the production of carotenoids, especially of astaxanthin.

SIMPOSIO 7 / SYMPOSIUM 7

**Control Fitosanitario con Herramientas
Biotecnológicas/ *Control of Crop Pests with
Biotechnology Tools***

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S7-P1

Antagonistic activity against *Pyricularia grisea* and phytostimulation in rice crop of native *Pseudomonas putida* strains identified by polyphasic taxonomy

Acebo-Guerrero Y¹, Rives N², Rojas-Flores T¹, Almaguer-Chávez M¹, Hernández-Rodríguez A¹

¹Facultad de Biología, Universidad de la Habana, C. Habana, Cuba

²Instituto de Investigaciones del Arroz, La Habana, Cuba

AC: *Acebo-Guerrero Y* (*yane_acebo@yahoo.com*)

The application of microbial inoculants in agronomically important crops has been an ecological alternative to improve crop yield and to preserve the environment. The obtention and characterization of native strains associated to several crops and potentially efficient to promote plant growth and to biocontrol the phytopathogens is a key step to the development of microbial inoculants. This research was carried out to characterize strains of *Pseudomonas putida*, isolated from rice (*Oryza sativa* L. cv. J-104) as phytostimulators and antagonistic agents against *Pyricularia grisea*. The strains were identified by polyphasic taxonomy, using API20NE identification kit and REP-PCR, as reported by Aranda-Olmedo *et al.* (2002). *In vitro* experiments were carried out to detect the production of indolic compounds, siderophores and to assess the phytostimulating effect of the strains in 12-days-old rice plants sown in MS. The results showed the ability of the strains to produce IAA-like metabolites (45.8 to 56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and siderophores. The strains were also capable of promoting plant growth, standing out the strains AJ9, AJ14, AJ20 and AJ18 for the best performance. This results show from a practical approach the potentialities of these strains to be used as inoculants in rice crop.

S7-P2**Estudio del crecimiento y la viabilidad de la cepa C924 con el empleo del fortificante para plantas «Aminoplus»**

Wong Padilla I, Mena Campos J

CIGB Camagüey, Camagüey, Cuba

AC: Wong Padilla I (idania.wong@cigb.edu.cu)

El bionemático HeberNem^{MR} que tiene como componente activo a la bacteria *Tsukamurella paurometabolum* C924, requiere de contenidos medios a altos de materia orgánica para garantizar su efectividad técnica. Para el caso de suelos con bajo contenido de materia orgánica es necesario evaluar el uso de productos que suplan el déficit de la misma. Un ejemplo de ello es el fortificante de plantas Aminoplus, que es un concentrado de aminoácidos utilizado en suelos pobres. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar el comportamiento del crecimiento y la viabilidad de la cepa C924 en presencia de Aminoplus y su posible aplicación conjunta en los cultivos tratados con el bionemático HeberNem. Para ello se conformó un medio de cultivo basado en sales M9 con adiciones de 0.1 y 0.2% (v/v) de Aminoplus, realizándose la dinámica de crecimiento, mediante determinaciones de la densidad óptica del cultivo y la dinámica de células viables, por la siembra del cultivo sobre placas de Agar Triptona Soya.

En ambos ensayos se demuestra que el Aminoplus es un promotor del crecimiento y de la viabilidad de la cepa C924, además sus componentes contribuyen al desarrollo de su actividad biológica, lo cual se demuestra con la producción de sulfuro de hidrógeno durante su fase exponencial del crecimiento.

S7-P3

Detección de *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 por PCR

Wong Padilla I, Pimentel Vázquez E, Mena Campos J

CIGB Camagüey, Camagüey, Cuba

AC: Wong Padilla I (idania.wong@cigb.edu.cu)

La bacteria *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 que forma parte del producto bionematicida Hebernem^{MR}, fue descrita y caracterizada por su acción frente a nemátodos. Durante los ciclos de aplicación de Hebernem se necesita determinar la presencia de la cepa C-924 en el suelo y en las distintas partes de los cultivos tratados. Para ello disponemos de un método de selección por siembra sobre placas de un medio selectivo, el cual presenta la desventaja de ser menos específico que el método de reacción en cadena de la polimerasa PCR.

En este trabajo describimos un ensayo de PCR para la detección de la *Tsukamurella paurometabola* C-924 en muestras de suelo, raíces carnosas, follaje y fruto de las plantas tratadas con HeberNem^{MR}, posterior a las metodologías empleadas para la ruptura celular con perlas de vidrio y por maceración en nitrógeno líquido, así como la extracción y purificación de ADN. Se utiliza un par de oligos diseñados para amplificar un fragmento de la región intergénica 16S-23S del ARN ribosomal de esta especie, lográndose un límite de detección de 10^2 ufc g^{-1} de muestra, sin necesidad de emplear reactivos de alto costo.

S7-P4**Expression of sugarcane ethylene Responsive factor SodERF3 in transgenic rice results in increased salt tolerance *in vitro***

Armas R¹, Valdivia O¹, Abreu D¹, Delgado M¹, Trujillo LE²

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Sancti Spiritus, Cuba

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

AC: Armas R (raul.armas@cigb.edu.cu)

Soil salinity affects large terrestrial areas of the world. Cuba has one million hectares with this disadvantage and a similar extension with tendency to it; the need to produce salt-tolerant crops is evident. Generation of transgenic plants to introduce novel genes or to modify expression levels of the existing genes is one of the main approaches used to improve salt tolerance. SodERF, a sugarcane cDNA that encodes a 201-aminoacid DNA-binding protein that acts as a transcriptional regulator of the ethylene responsive factor (ERF) super-family, was previously characterized and its ectopic expression in tobacco were found to display increased salt and drought tolerance (Trujillo *et al.*, Plant Cell Physiol 2008;49(4):512-525). Here we describe the generation of transgenic rice plants expressing SodERF3 cDNA under the control of an improved version of the 35S promoter. Only 4 out of 28 transgenic rice lines grown *in vitro* for a week under salinity stress were able to increase its fresh weight between 10 to 25% while its non-transgenic counterpart clearly decreased it. PCR and southern blot demonstrated the integration of SodERF3 cDNA into de rice genome.

S7-P5

Effective β -lactam antibiotics for *Agrobacterium tumefaciens* suppression in *indica* rice calli

Pérez M, Abreu D, Delgado M

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Sancti Spiritus, Cuba

AC: Pérez M (maylin.perez@cigb.edu.cu)

Establishment of high efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation protocols requires the total elimination of agrobacteria in transformed tissues. It is very important the selection of the suitable antibiotics that do not inhibit growth, organogenesis or embryogenesis of plant tissues, at effective concentrations for suppression of *Agrobacterium*. In this work we evaluated the antibacterial activities of eight β -lactam antibiotics against *A. tumefaciens* strain EHA105 in rice embryogenic calli, and their phytotoxicity to callus tissues. For detection of persisting *Agrobacterium* during callus culture and regeneration, homogenates of infected calli were spread over LB agar plates. The number of persisting *Agrobacterium* was expressed as colony forming units per gram of calli. *Agrobacterium* growth was completely suppressed at a concentration of 250 mg/L of all the antibiotics tested, except for ampicillin. In the ampicillin treatment, persistent *Agrobacterium* were detected in all concentrations assayed. It was noted a similar tendency of increasing the calli fresh weight with 100 mg/L and 250 mg/L of all antibiotic proved. The use of 500 mg/L caused diminishing of callus growth. Callus growth could be antibiotic concentration-dependent. In regeneration stage, about 80% of calli formed shoots in a month when 100 mg/L or 250 mg/L of β -lactams were used. A lesser percentage of calli forming shoots was obtained in presence of ampicillin. Our results propose seven β -lactams, stable, soluble and easily accessible, as alternatives for suppressing *A. tumefaciens* in *indica* rice calli with minimal phytotoxic effects.

S7-P6**Formulaciones del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, organismo controlador de plagas agrícolas**

Urtubia Henríquez I, France A, Gerding M

INIA Quilamapu, Chillán, Chile

AC: Urtubia Henríquez I (iurtubia@inia.cl)

El uso de hongos entomopatógenos (HEP) es una alternativa eficaz en el control de plagas agrícolas, en el desarrollo de una agricultura sustentable que preserve los recursos naturales y el medio ambiente. Sin embargo, se hace necesario contar con formulaciones que permitan reducir la pérdida de viabilidad y aumentar su permanencia en el suelo. En este estudio se elaboraron formulaciones granulares tipo pellet en base a alginato de sodio, de conidias del HEP *Beauveria bassiana* cepa B-323 perteneciente a la colección del Centro Tecnológico de Control Biológico de INIA Quilamapu y que controla Burrito de la vid (*Naupactus xantographus*), utilizándose tres tipos de sustrato. Los formulados se evaluaron en cuanto a viabilidad a 25 °C (expresado como índice de germinación; IG) y comportamiento en tres series de suelo.

Los formulados elaborados con derivados de cereal y sustrato lignocelulósico registraron los más altos valores de IG con respecto a los elaborados con caolín. Después de 20 días de aplicados los formulados en los diferentes tipos de suelo, en todos se registró un incremento en las ufc de *Beauveria*, aproximadamente el doble en el caso de la serie Quella y Mirador y 10 veces para la serie Arenales.

Los formulados que contienen fibra y nutrientes aumentan la sobrevivencia del HEP y se incrementa la carga de hongo post aplicación en tres series distintas de suelo, lo que nos lleva en la práctica a aumentar la posibilidad de un control efectivo de la plaga.

S7-P7

Orobanche related patent overview in tobacco: new product development

Hernández Y, Pita M, Geada D, Nuñez A, Spengler I, Gonzalez T, Valerino A

Instituto de Investigaciones del Tabaco, La Habana, Cuba

AC: Hernández Y (yate@iitabaco.co.cu)

Orobanche ramosa, L is a parasitic plant of several crops, being tobacco one of the most affected. In tobacco, agricultural yield and organoleptic quality losses are estimated in 50% and 100% respectively. *O. ramosa* has a multiplication index of two millions of seeds by one set of offspring which can remain in fields, completely viables around 12 or 15 years. As consequence it is almost impossible its control by traditional crops rotation being the most effective treatment, the parasite soon elimination before seed appearance or synthetic herbicides. Nowadays alternative controls are proposed from the current knowledge about secondary metabolism of crops that could have an allelopathic negative effect over orobanche. Nevertheless vegetal species with potentialities to affect the orobanche growth are almost unknown, reason why many researchs are conducted with metabolites producing species of general inhibitory growing effects on different crops. In this sense the Tobacco Research Institute develops a project concerning the phytochemistry and allelopathic activity of *Lantana trifolia* L. where molecules with inhibitory activity over model crops have been obtained to formulate a final preparation in order to eliminate the orobanche in fields. That is why the present work was focused in the patent search about the description and use of such products or its formulations. The patent search did not show neither results of the use of this specie to inhibit orobanche growth not results of products derived of it. This work also demonstrated the patentability of our project results to set a strategy for future works.

S7-P8**Genetic transformation of guava (*Psidium guajava* L.) through *Agrobacterium tumefaciens***

Peralta N¹, Morán R², Concepción O³, Nápoles L³,
Usatorres B², Pérez A³, Rodríguez M⁴, Trujillo R³

¹Faculty of Chemistry, University of Camagüey, Camagüey, Cuba

²Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Camagüey, Cuba

³Center of Bioplants, Ciego de Ávila, Cuba

⁴Center for Genetic Engineering and Biotechnology, C. Habana, Cuba

AC: Peralta N (rolando.moran@cigb.edu.cu)

Obtainment of a protocol for guava (*Psidium guajava* L.) cultivar Enana Roja Cubana genetic transformation through *Agrobacterium tumefaciens* is reported in this work. Commercial plasmid pCambia 3301 was used as plant transformation vector. The methodology for propagation and *in vitro* shoot regeneration described by Nápoles (2003) and Concepción *et al.* was considered as a starting point. The effect of Cefotaxime on guava *in vitro* tissues and over the control of *Agrobacterium* growth was studied. Other parameters such as the effect of co-culture vegetable material-bacterium and the effect of herbicide phosphinotricin as selection agent at different moments of application on guava tissues were determined. Shoots resistant to selection conditions were PCR tested to detect the integration of foreign DNA. It was determined that 400 mg.L⁻¹ of cefotaxime is able to control the *A. tumefaciens* growth on the infected vegetable tissue without affecting shoot regeneration. It was established that a 24 h period of co-culture of vegetable material-bacterium allowed both the transgene insertion, confirmed by histochemical GUS assay, as well as shoot regeneration on the infected tissue. Vegetable tissue morphological damages were increased and shoot regeneration was deeply affected as consequences of longer co-culture periods. Selection of putative transformed tissues was performed from infected leaves regenerated on propagation medium supplemented with 1.5 mg.L⁻¹ of phosphinotricin. By PCR developed from DNA extracted from shoots resistant to selection conditions, a 492 bp fragment belonging to bar gene was amplified. It confirmed that the proposed protocol allowed the genetic modification of guava.

S7-P9

Microesferas de quitosana para la liberación sostenida de agroquímicos

Pérez J¹, Martínez A², Coll Y¹, Pérez M¹, Coll F¹, Pérez CS³, Peniche C⁴

¹Centro de Estudios de Productos Naturales (CEPN), Facultad de Química, Universidad de la Habana, C. Habana, Cuba

²Laboratorio de Polímeros del Instituto de Materiales y Reactivos de Electrónica, Universidad de La Habana, Cuba

³Departamento de Química-Física, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba

⁴Centro de Biomateriales, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Pérez J (javierp@fq.uh.cu)

Los brasinoesteroides (AB) son fito-hormonas antiestrés que inducen la tolerancia de muchos cultivos frente a condiciones abióticas adversas como salinidad, sequía y condiciones extremas de temperatura. Estas fito-hormonas también incrementan la productividad de los cultivos, son considerados promotores del crecimiento vegetal y sus análogos sintéticos se emplean como agroquímicos. Un problema que se presenta al aplicar estos AB a las plantas es que son metabolizados rápidamente, reduciendo sus potenciales efectos beneficiosos y son necesarias las aplicaciones periódicas que encarecen y dificultan la aplicación de los mismos. En el presente trabajo se obtienen y caracterizan microesferas de quitosana cargadas con AB de reportada actividad (DI-31, S-7) y monoésteres de ácidos dicarboxílicos de diosgenina (compuesto modelo) para la liberación controlada de estos agroquímicos; presentándose los perfiles de liberación de los mismos. Se encapsula en quitosana, pues la misma es un polímero biodegradable, biocompatible, no tóxico y de reportada actividad germicida, fungicida y estimuladora de la germinación de semillas. Además, está ampliamente documentado el empleo de quitosana en la obtención de sistemas de liberación controlada de fármacos en la industria médico-farmacéutica.

S7-P10**Functional analysis of a novel trypsin gene from *Spodoptera frugiperda* using RNAi silencing**

Rodríguez-Cabrera L, Trujillo-Bacallao D, Fernández-Parlá Y, Téllez-Rodríguez P, Morán-Bertot I, Pérez-Riverol A, Borrás-Hidalgo O, Ayra-Pardo C

Centros de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus y La Habana, Cuba

AC: *Ayra-Pardo C (camilo.ayra@cigb.edu.cu)*

A novel trypsin gene from the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) was cloned. The enzyme, referred to as Sft6, was previously identified as down-regulated in third-instar larvae early after the ingestion of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 toxin [Toxicon 2008;51(4):681-692]. Sft6 cDNA sequence was compared with other sequences in available databases, SPODOBASE included, by using BLASTX/BLASTN algorithms. Phylogenetic reconstruction was performed using the CLUSTALX program. Expression analysis by Reverse-Transcriptase PCR revealed that Sft6 was present in all insect stages but the onset of pupation. This suggests a possible role of this enzyme in general metabolism occurring in the gut during most of the entire life cycle of this insect. Functional analysis of Sft6 was accomplished *in vivo* in *S. frugiperda* by RNA interference. Reduced transcript levels were evidenced by quantitative Real-Time PCR analyses. Both, trypsin activity in the gut juice and susceptibility to Cry1Ca1 protoxin of wild-type and Sft6-silenced larvae were investigated. This is the first report of gene functional analysis in generalist insect *S. frugiperda*. The results and the perspective of this approach to reveal targets for new insecticides are discussed.

S7-P11

A new approach to identify *Bacillus thuringiensis* virulence genes involved in the septicemic death of insects during pathogenesis

Rodríguez-Cabrera L, Trujillo-Bacallao D, Pérez-Riverol A, Ramos Gómez Y, Morán Bertot I, Ponce-Castillo M, Téllez-Rodríguez P, Ayra-Pardo C

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Habana, Cuba

AC: Ayra-Pardo C (camilo.ayra@cigb.edu.cu)

Insect's pathogen *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) produces parasporal crystals mainly comprised of Cry d-endotoxins. Once insects ingest spores-crystals mixes, Cry toxins cause destruction of midgut cells and insects die by septicemia. To induce septicemic death, bacteria must be able to enter and multiply in the hemolymph, but some discrepancies exist about *Bt* cells ability to grow and reproduce in the hemocoel. In order to identify *Btk* HD1 virulence factors involved in hemocoel colonization, the process was *in vitro* simulated by growing *Bt* cells in the presence and the absence of hemolymph from last-instar *Spodoptera frugiperda* larvae. The effect of hemolymph on *Btk* HD1 cytosolic, membrane and extracellular proteome was investigated by SDS-10% PAGE gels. Besides, the infection rate was compared *in vivo* by injecting treated and untreated cells into the insect larvae. Differentially expressed *Btk* HD1 genes following hemolymph treatment were isolated by subtractive suppression hybridization. After differential screening by membrane-based hybridization, cDNA fragments corresponding to 88 ESTs were sequenced and analyzed in databases using BLASTN/BLASTX algorithms. A repertoire of ESTs with homology to known bacterial virulence genes, not previously described in *Bt*, was found. The regulation of a subset of these genes was further investigated. The results and their implications for *Bt* pathogenesis are discussed.

S7-P12**Manejo de callas (*Zantedeschia sp*)
en sistemas de inmersión temporal (sit)**

Sánchez Velasco J, Romero H, Daquinta M, Capote I

Universidad de Machala, Machala, Ecuador

AC: Sánchez Velasco J (jacksaenz100@yahoo.com)

Las Callas (*Zantedeschia sp*) son plantas de la familia Araceae de gran interés como plantas ornamentales en maceteros y como flores de corte. Por lo que resulta de gran interés comercial la propagación *in vitro* de las nuevas variedades obtenidas. La reproducción tradicional de calla es por sus tubérculos. El objetivo del presente trabajo fue propagación en diferentes formas del cultivo *in vitro* de tres variedades (Treasure, Magistec Red y Golden Affiar) de esta especie.

Se evaluaron distintos niveles de BAP (0, 1, 2, 3 y 4 mg/L) para el establecimiento de las yemas brotadas de los tubérculos, bajo condiciones de luz y oscuridad, así como el manejo de las explantes para la proliferación de los brotes. Se evaluaron tres formas diferentes de cultivo en la multiplicación de esta especie; tradicional (semisólido), líquido en movimiento y Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), la utilización de distintos tiempos de inmersión en los SIT, el efecto de diferentes dosis de Paclobutrazol (PBZ) y el efecto del Acido Giberélico.

Se estableció *in vitro* las tres variedades de Callas a partir de yemas brotadas de los tubérculos, en medio cultivo MS (1962) con 2 mg/L de BAP en estado semisólido y bajo condiciones de oscuridad. Se mejoró la tasa de multiplicación y la calidad de los brotes mediante la utilización del SIT. La aclimatización de los brotes de Callas se realiza en un sustrato compuesto de zeolita cachaza (1:1) en condiciones de casa de cultivo, con un sistema de riego por microjet.

S7-P13

Aislamiento y evaluación de la biodiversidad de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de manejo integrado de la Polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidóptera: Gelechiidae) en Colombia

Ramírez L, Bolívar B, Echeverri A, Ramírez N, Fuentes LS, Jiménez J, Hernández J

Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia

AC: Hernandez J (javier.hernandez@utadeo.edu.co)

Se obtuvieron 44 muestras de suelo de los departamentos de Cundinamarca (4), Huila (2), Boyacá (8), Santander (6) y 24 de la Ciénaga Grande de Santa Marta en los municipios de Susa, Chía, Garzón, Sutamarchan, Villa de Leiva, Ráquira y Santa Sofía, Betulia, Mesa de los Santos y Piedecuesta. Las muestras se recolectaron en cultivos en invernadero, recogiendo 5 submuestras de cada suelo, que se mezclaron para conformar una única muestra. A partir de estas muestras se aislaron 236 cepas nativas esporuladas que se caracterizaron por microscopía. Se observaron cristales ovoides (59%), bipiramidales (48%) y amorfos (25%). Se extrajo ADN total y plasmídico a 196 aislados. Para la identificación de los genes *cry* presentes, se obtuvieron 16 cepas de referencia. Se estandarizaron las PCR y Multiplex-PCR para la detección de distintos genes *cry* utilizando primers generales y específicos. La aplicación de estas metodologías a 110 aislamientos mostró 74 cepas positivas para *cry1*. También, 39 cepas fueron positivas para genes *cry2*, 29 para *cry3* y 29 para *cry4*. Se identificaron cepas hasta con 6 genes *cry* diferentes. Se estandarizo la cría del insecto plaga *Tuta absoluta* en condiciones de casa de malla. Igualmente se realizó un bioensayo con los productos comerciales Dipel, Xentary y Turilab sobre larvas de segundo instar de *T. absoluta*. Dipel mostró 100% de mortalidad de las larvas, sugiriendo que *Bt* puede ser un excelente biocontrolador de este insecto plaga.

S7-P14**Establecimiento de una cría de *Hypsipyla grandella* Z. (Lepidoptera: Pyralidae) y actividad insecticida de cuatro toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis***

Morán-Díaz L¹, Trujillo-Bacallao D², Fernández-Parlá Y², Ponce-Castillo M², Crespo JA¹, Ayra-Pardo C²

¹Instituto de Investigaciones del Tabaco, La Habana, Cuba

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Ayra-Pardo C (camilo.ayra@cigb.edu.cu)

El tabaco es uno de los renglones exportables más importantes de Cuba. Su cultivo se extiende a todo lo largo y ancho del país. Para el envase del producto final se utiliza la madera del cedro (*Cedrela odorata*), ya que le aporta al tabaco un bouquet especial, que distingue al Habano. *Hypsipyla grandella* es la principal plaga del cedro en el hemisferio occidental, donde causa importantes daños a la calidad de la madera. Con vistas a poder establecer una estrategia para el control integrado de esta plaga forestal, es importante conocer la susceptibilidad de este insecto frente a las toxinas insecticidas Cry de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis*.

En este trabajo, se describe una metodología para la obtención de una cría de *H. grandella*, de ciclo completo, en condiciones artificiales. Se ensayaron diferentes medios nutritivos para la cría del insecto en condiciones de humedad relativa 80% y fotoperíodo de 16 h luz: 8 h oscuridad, a 28 ± 0.1 °C de temperatura. Para los bioensayos se utilizaron las toxinas recombinantes de *B. thuringiensis* Cry1Ac1, Cry1Ca1, Cry1Fa1 y Cry9Aa1, obtenidas a partir de *Escherichia coli*. Se utilizó el método de porcentaje de inhibición del crecimiento para el análisis preliminar de la actividad insecticida de estas toxinas. Los resultados obtenidos y sus implicaciones para el control de *H. grandella* se discuten en el presente trabajo.

S7-P15

Evaluation of *Bacillus thuringiensis* strains and their mutants

Thakur K, Thakur K

Dr. Panjabrao Deshmukh Krishi Vidyapeeth, Akola, Nagpur, India

AC: Thakur K (kuldeept2001@yahoo.com)

Bacillus thuringiensis Berliner is used worldwide as biological pest control product against *Lepidoptera* insects and more commonly against *Helicoverpa armigera*, which is an important pest on cotton, pigeonpea, green gram and chickpea. With this perview the present investigation was carried out to study pathological aspects of the local *Bt* isolates besides cultural, physiological, serological, characterization of protein, mutagenic effect, toxicological studies of mutants, plasmid separation and toxicity studies.

Based on the pathogenic nature, 9 local isolates were selected for further studies along with standard 4D1. The shape of colonies were from round to concentric for all the isolates on four media and as regards to margin of colonies, it was wavy to irregular in all isolates on all media.

Bt isolate 5I1 recorded highest 8.33 pH followed by 5Y2 (8.30) and standard 4D1 (8.17) on Luria broth medium at 96 h. As regards to electrical conductivity in general with all the isolates in all media, EC ranged from 1 to 102 dSm⁻¹. Zouari broth recorded more electrical conductivity for all the isolates followed by modified G medium

Five *Bt* isolates viz. 5AM3 (465.9 mg/L), recorded more total crude production protein and maximum biomass (858 mg/L) than the standard strain 4D1 (179.8 mg/L) and biomass (668 mg/L).

S7-P16**Field trials and molecular evidences confirm the insecticide activity of Cry3A toxin expressed in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) plants against *Cylas formicarius elegantulus***

Morán R¹, Alvarez I¹, Usatorres B¹, Somonte D¹, Casas S¹, Verde Y¹, Rodríguez M², Morales A³, Lima M³, Castellón MDC³

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Camagüey, Cuba

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, C. Habana, Cuba

³Institute of Tropical Roots Researches (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara, Cuba

AC: Morán R (rolando.moran@cigb.edu.cu)

Sweet potato weevil (*Cylas formicarius elegantulus*) is the single most devastating pest of the sweet potato worldwide (Wang and Kays, 2002; Stathers et al., 2003). Our previous results have shown that *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* Cry3A toxin expression in transgenic sweet potato plants has protected them from weevil attack (Moran et al., 1998). Results obtained in field trials with transgenic clones expressing the insecticide toxin are reported in this work. Plants belonging to three different transgenic sweet potato lines each time and two untransformed varieties as controls were challenged with natural sweet potato weevil infestation under field conditions. Experiments followed a random block design with three replicates per clone. Two hundred plants from each group were assessed. Tuber damages were evaluated one hundred and twenty days after planting, using a traditional methodology of Cuban farming practice. Statistical comparisons of tuber affectation values allowed selection of the best resultant clones. Due to the high number of plants used in the experiments, yields of commercial tubers were also evaluated. Molecular methods to detect transgene presence and integration, as well as toxin expression quantification by a DAS ELISA system were carried out. As it could be expected, there was correspondence between toxin expression and resistance to weevil attack. This is the first report of field trials with enough number of transgenic sweet potato plants per clone to evaluate the insecticide capacity against the main crop pest.

S7-P17

Expresión de proteasas extracelulares en el cultivo de alta densidad del microorganismo con actividad bionematicida, *Tsukamurella paurometabola* C924

González N, Wong I, Pimentel E, Zamora J, Salazar E, Mena J

CIGB Camagüey, Camagüey, Cuba

AC: González N (nemecio.gonzalez@cigb.edu.cu)

En el presente trabajo se determinó la etapa de mayor expresión de las proteasas extracelulares de la bacteria *Tsukamurella paurometabola*, C924, agente activo del bionematicida HeberNem. El estudio se realizó en un cultivo de alta densidad, ajustando los datos experimentales a modelos de crecimiento diauxico combinado con el de Luedekin Piret de formación de producto. Durante la etapa de crecimiento en aminoácidos libres no se detectó la expresión de proteasas al medio de cultivo. La expresión de las proteasas se fue incrementando en la segunda mitad de la fase de crecimiento en sacarosa. Estos resultados demuestran que el microorganismo excreta las proteasas en ausencia de aminoácidos libres debido a la necesidad de hidrolizar otras proteínas excretadas y las derivadas del debrís celular en la fase avanzada del cultivo de alta densidad. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo mixto de formación de producto. Estos resultados permitirán maximizar la producción de las proteasas con el objetivo de aumentar la actividad biológica del bionematicida HeberNem.

S7-P18**Ensayos preliminares para la transformación genética de *Musa* (AAB) con *Agrobacterium tumefaciens***

Sánchez N, Carlos G, Colmenares M

La Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

AC: Sanchez N (nohiris_86@hotmail.com; nohi.sanchez@gmail.com)

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferentes factores sobre la transformación genética en suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* (AAB) Plátano Hartón Gigante, mediada por *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 y el plásmido pCAMBIA 1304.

Entre los factores evaluados se incluyeron: 1. Dosis letal del antibiótico Higromicina como agente de selección, 2. La aplicación de fuerza centrífuga previo al co-cultivo, 3. Concentración de Acetosiringona (AS), 4. Tiempo de co-cultivo y 5. Densidad del inóculo bacteriano sobre la transformación genética, estimando el porcentaje de agregados celulares con expresión del gen para la β -glucoronidasa (GUS).

Como resultado se obtuvo que la dosis letal del antibiótico Higromicina para la selección de SCE en la fase de maduración y germinación de los embriones es de 15 mg/L. Respecto al factor de centrifugación se determinó que la aplicación de una fuerza centrífuga de 800 rcf mejora la interacción célula vegetal-bacteria lo que aumenta la eficiencia de la transformación genética. Este pretratamiento con centrifugación previo al co-cultivo resulto ser más eficiente bajo las condiciones de inducción de la bacteria con 100 μ M de AS a una D.O.600 = 1 y un tiempo de co-cultivo de 72 h, con lo cual se obtuvo un 89.6% de agregados celulares con expresión de glucoronidasa luego de 18 días del co-cultivo, en comparación al método de incubación estacionaria que presento un 52.3% de expresión para el mismo tiempo.

S7-P19

Caracterización fenotípica de rizobacterias asociadas a los cultivos

Fernández Santisteban MT¹, González T², Goire I², Hernández A², Rives N²

¹Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba

²ICIDCA, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: *Fernández Santisteban M* (maritere.fernandez@icidca.edu.cu)

La problemática ambiental contemporánea ha generado la necesidad de sustituir los fertilizantes químicos por productos biológicos, como un aporte fundamental no solo a la disminución de los costos en la agricultura, sino al desarrollo de una agricultura orgánica y sostenible. En este sentido, el aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo es una alternativa para el desarrollo de inoculantes para la agricultura, y sus genes ofrecen una perspectiva promisoría con vistas al mejoramiento de microorganismos que no tienen esta capacidad. En este trabajo se realizó la caracterización cualitativa de 22 cepas de rizobacterias aisladas de arroz y papaya en cuanto a su capacidad de solubilizar fósforo orgánico e inorgánico, así como su resistencia al telurito de potasio (K_2TeO_3), un marcador de selección no antibiótico para microorganismos recombinantes con posibilidades de ser liberados al medio ambiente. Se construyeron dos plásmidos para la integración cromosomal de genes relacionados con la solubilización de fósforo en bacterias: del operón PQQ de *Klebsiella pneumoniae* (solubilización de fósforo mineral) y del gen *phyL* de *Bacillus licheniformis* (solubilización del fósforo orgánico a partir de fitatos). Ambas construcciones fueron transformadas en *E. coli* CC118 *lpir*, detectándose la expresión de los plásmidos recombinantes y de las enzimas activas. El estudio de los fenotipos permitió seleccionar ocho cepas con alta capacidad de solubilización de fósforo mineral. Además, cuatro cepas mostraron características adecuadas para ser transformadas con los vectores creados en este trabajo, con vistas a incrementar su valor como promotoras del crecimiento vegetal e implementar su uso como biofertilizantes.

S7-P20**Fermentación aerobia de la paja de cebada en la producción de *Pleurotus ostreatus* para mejorar el proceso de producción de empresas productoras de setas de la región**

González Cortés N¹, Montes de Oca Mata G², Peralta González F³, Jiménez Vera R³

¹Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, México

²ECOL A. C, Xalapa, México

³DAMR-UJAT, Tenosique, México

AC: González cortés N (ngcbiotec@hotmail.com)

El cultivo de *Pleurotus* ssp. es un proceso biotecnológico que consiste en transformar los residuos agroindustriales en un alimento altamente nutritivo. El cultivo sobre sustratos fermentados es un método adaptado del cultivo de champiñón, este método es utilizado por las grandes empresas productoras, quienes han obtenido buenos rendimientos en la producción y un índice muy bajo de contaminación por mohos antagonistas. Debido a la diversidad de sustratos, los procesos de fermentaciones implantadas son diferentes y aun se necesita conocer mejor los factores involucrados en la obtención de dichos sustratos selectivos para el cultivo de *Pleurotus*. El objetivo del presente estudio fue analizar en diferentes tiempos de fermentación la paja de cebada, la microflora presente en el sustrato, la composición química del mismo, la presencia de mohos antagonistas del género *Thichoderma* y la producción de setas. El estudio se realizó en el Instituto de Ecología A. C. de Xalapa, Veracruz, México durante 2007. Los resultados mostraron diferencia significativa (0.05) en la eficiencia biológica, obteniéndose la máxima producción con 70% de rendimiento, cuando el sustrato se fermentó durante 7 días. Además, en ese período se observó que el sustrato fermentado limita el crecimiento de microorganismos del grupo *Bacillus* y *Actinomycetes* de tipo termófilo, que son capaces de degradar la celulosa y la lignina. Por otra parte, *Pleurotus* degradó mayor cantidad de celulosa y hemicelulosa al término de la incubación para la formación de los primordios. Sin duda, estos resultados contribuyen a mejorar el sistema de producción de las empresas productoras de setas de la región.

S7-P21

Control fitosanitario con extractos crudos de *Magnolia dealbata* y *Magnolia schiedeana*: opciones para el aprovechamiento biotecnológico de dos especies endémicas de México

Ramírez Reyes TI¹, Luna-Rodríguez M², Noa-Carrazana JC¹, Cano Medina T¹, Díaz Fleischer F¹, Sánchez Velásquez LR¹, Flores Estévez N¹

¹Inbioteca, Xalapa, México

²LATEX, U.V., Xalapa, México

AC: Flores Estévez N (nflores@uv.mx)

Estudios químicos y farmacológicos en especies del género *Magnolia* han reportado la presencia de componentes del metabolismo secundario, exhibiendo una utilidad biomédica, así como una actividad biológica, ya sea como agentes antifúngicos, antimicrobianos e insecticidas. *Magnolia schiedeana* y *Magnolia dealbata* son dos especies endémicas de México con problemas de extinción, según la NOM-ECOL-059-94. Este trabajo muestra la actividad biológica en ensayos preliminares de extractos crudos (etanólicos, hexánicos y de acetato de etilo) provenientes de diferentes órganos vegetales (corteza, hoja, flor, semilla) y diferentes estadios de madurez fisiológica en modelos bacterianos, fúngicos de importancia fitopatógena y la plaga agrícola de la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens*. Se discuten resultados obtenidos a partir de los extractos obtenidos de la especie *M. schiedeana* y *Magnolia dealbata* en cuanto a actividad inhibitoria en contra de las bacterias *Pectobacterium chrysanthemi*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Curtubacterium flaccumfaciens*, *Pseudomona cichorii* (a7, a2), *Curtubacterium flacumfaciens* y *Xanthomonas vesicatoria*, así como en el crecimiento de los hongos: *Fusarium rosium*, *F. moniliforme*, *Curvularia lunata*, *Geotrichum* spp. y *Alternaria* spp. y dosis letal media en el control *Anastrepha ludens*. Los experimentos realizados sientan las bases para estudios posteriores a nivel biofarmacológico-molecular destinado a revalorizar estos recursos fitogenéticos amenazados a través de la inclusión en un programa biotecnológico donde se aproveche el potencial agrícola e industrial de la acción de sus bioproductos. El proyecto agradece a los Fondos Mixtos Gobierno del estado de Veracruz, CONACYT, México a través del proyecto no 37502 y el apoyo de Beca Doctoral COANCYT No. 214331.

S7-P22**Transient overexpression of *gus* reporter gene in transgenic plants expressing the *p19* TBSV suppressor gene**

Callard D, Sánchez Y, González T, Wood M, Santana E, Fuentes AD, Ramos PL, Ruiz Y, Simón M

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Callard D (danay.callard@cigb.edu.cu)

Efficient plant gene expression methods are needed for multiple applications. However, heterologous gene expression in transgenic plants, particularly in case of certain proteins or non-well characterized genes, is not always straightforward. For this reason, approaches providing tools for the efficient expression of foreign genes in plants are of great interest.

Transient expression of silencing suppressor genes by *Agrobacterium tumefaciens* infiltration has been demonstrated to be a quick and effective way to increase the expression of heterologous genes in plants. Following this line, in this report we present information on the development of transgenic *Nicotiana* plants stably expressing the P19 TBSV suppressor gene and their behavior in transient expression of the GUS reporter. A 7 fold increase in expression of GUS was obtained in plants carrying the P19 TBSV suppressor gene as compared with GUS expression in suppressor-free plants.

S7-P23

Caracterización y selección de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* nativos de Argentina con potencialidad elevada para el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas destinadas para el control de *Aedes aegypti*

Monella R, Sauka D, Basile J, Benintende G

Bioinsumos Microbianos IMYZA INTA, Castelar, Argentina

AC: Monella R (rmonella@cnia.inta.gov.ar)

Los objetivos de este trabajo fueron la caracterización y selección de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* nativos de Argentina con toxicidad alta para larvas de *Aedes aegypti*, que demuestren potencialidad para el desarrollo de nuevos productos destinados al control de este vector de enfermedades. Se analizaron 264 aislamientos pertenecientes al cepario del IMYZA-INTA, obtenidos de muestras de suelo, filoplano, residuos de molienda de granos, aguas y telarañas provenientes de diferentes regiones de nuestro país. En el estudio se empleó la cepa de referencia *B. thuringiensis* svar. *israelensis* IPS82 como control positivo. Se realizaron en una primera instancia ensayos biológicos de toxicidad cualitativos utilizando veinte larvas de *A. aegypti* de cuarto estadio temprano por ensayo. La mortalidad se registró luego de 24 horas de incubación a 28 °C. Posteriormente se analizaron las proteínas de sus cristales mediante SDS-PAGE. Se empleó también PCR-múltiplex para detectar los genes *cry4Aa* y *cry4Ba*, una PCR simple para *cry10Aa* y distintas PCR simples con análisis de restricción (RFLP) para detectar *cry11*, *cyt1* y *cyt2*. Finalmente, se realizaron bioensayos cuantitativos con complejos esporacristal de cuatro aislamientos utilizando larvas de *A. aegypti*. Los cuatro mostraron alta toxicidad expresada como valores de CL50 en ng/mL. Tres de estos aislamientos presentaron un perfil electroforético de PCR basada en secuencias palindrómicas extragénicas repetidas (REP) idéntico a la cepa de referencia, sugiriendo su posible clasificación dentro del svar. *israelensis*. El aislamiento INTA H41-1 presentó un perfil similar pero no idéntico al de la cepa IPS82, sugiriendo una posible genovariante del svar. *israelensis*.

S7-P24**Transferencia y consumo de oxígeno en el cultivo de alta densidad del microorganismo con actividad bionematicida *Tsukamurella paurometabola* C924**

González Fernández N, Zamora J, Ramos L, Pérez E, Pérez C, Salazar E, Narciandi E, Mayo O

CIGB Camagüey, Camagüey, Cuba

AC: *González Fernández N (nemecio.gonzalez@cigb.edu.cu)*

En el presente trabajo se evalúa la transferencia y el consumo de oxígeno para establecer un cultivo de alta densidad de la bacteria *Tsukamurella paurometabola*, C924, agente activo del bionematicida HeberNem. Se determinó la influencia de la agitación y la aireación en el coeficiente de transferencia de oxígeno (KLa). Se obtuvo una velocidad específica de consumo de oxígeno igual a 12.53 mg de O₂ g⁻¹ células secas h⁻¹, empleando el método de modelación del proceso. A presión atmosférica con las condiciones de agitación y aireación determinadas se pueden obtener 94 g L⁻¹ de biomasa seca sin limitación de oxígeno. Mediante la ley de Henry se determinó que se pueden obtener 150 g L⁻¹ de biomasa seca a 1.5 bar de presión, sin inhibición por oxígeno. Esta estrategia se corroboró a escala productiva de 200 L. Se obtuvo 139 ± 8 g L⁻¹ de biomasa seca al final del cultivo. El estudio de la transferencia y el consumo de oxígeno posibilitó establecer un cultivo de alta densidad del microorganismo *Tsukamurella paurometabola*, C924 sin limitaciones de este sustrato.

S7-P25

Chromatographic characterization of *Burkholderia cepacia* cell-free culture medium that improves seed germination rate and seedling growth in maize (*Zea mize*) and rice (*Oryza sativa*)

Hernández-Rodríguez A¹, Acebo-Guerrero Y¹, Heydrich-Pérez M¹, Diallo B², El Jaziri M², Vandeputte O²

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba

²Laboratoire de Biotechnologie Vegetale, Universite Libre de Bruxelles (ULB), Gosselies, Belgium

AC: *Hernández-Rodríguez A (anniahernandez@yahoo.es)*

Burkholderia cepacia has been shown to play an active role as plant growth promoting bacteria (PGPB). In this study we used a native strain of *B. cepacia* isolated from rice rhizosphere and identified by polyphasic taxonomy, to assess the ability of cell-free *B. cepacia* conditioned culture medium (CFCM) to improve early developmental stages of two agronomically important crops, maize and rice. We showed that the speed up of seed germination as well as seedling growth was significantly improved by pre-treatment of seeds for 45 min in *B. cepacia* CFCM. Chromatographic fractionation and further analysis by HPLC and TLC revealed that *B. cepacia* CFCM is a complex mixture of different classes of metabolites including, among others, salicylic acid (SA), indole-3-acetic acid (IAA) and several unidentified phenolic compounds. IAA is probably involved in germination rate as well as in seedling growth promotion. However, the impressive root system development we observed in CFCM-treated seedlings seems not to be due to the result of IAA alone but rather to several synergistic groups of components.

S7-P26**Caracterización y evaluación de la actividad biológica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis***

Baró Robaina Y, Carreras B, Márquez ME, Fernández- Larrea O, Borges G, Fernández E, Almaguer L

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Baró Robaina Y (ybaro@inisav.cu)

El grupo de desarrollo de bioplaguicidas del INISAV cuenta con una colección de cepas nativas de *B. thuringiensis*, algunas se han introducido en los Programas de Manejo Integrado de Plagas con altas potencialidades para el control de plagas en cultivos de importancia económica. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar y evaluar la actividad biológica de cepas de *B. thuringiensis* promisorias en el control de insectos y organismos plaga. Se caracterizó la morfología de los cristales parasporales mediante microscopía electrónica y se determinó la composición de proteínas Cry por electroforesis SDS-PAGE, además se analizó por PCR la presencia de genes-exotoxina. La actividad biológica β cry. Se determinó por HPLC la presencia de de las cepas se evaluó frente a los lepidópteros *Spodoptera frugiperda* y *Anticarsia gemmatalis*, frente al ácaro *Tetranychus tumidus* y contra el nemátodo *Meloidogyne incognita*. Los resultados mostraron que predominó la morfología bipiramidal, aunque se observó además la presencia de cristales de forma cúbica. El patrón de proteínas Cry obtenido correspondió con el estándar internacional de *B. thuringiensis* var. kurstaki cepa HD1, en el mismo se observan dos bandas bien definidas correspondientes a la proteína Cry 1 (130 kDa) y Cry 2 (70 kDa). En todas las cepas estudiadas fue predominante la frecuencia de genes *cry 1*. La evaluación de la actividad biológica mostró que las cepas son efectivas para el control de los organismos ensayados.

S7-P27

First report of *Tomato Chlorosis Virus* infecting tomato in single and mixed infections with *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* in Cuba

Martínez-Zubiaur Y¹, Fiallo-Olivé E², Carrillo-Tripp J³, Rivera-Bustamante R³

¹Dir. Protección de Plantas. CENSA, Habana, Cuba

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

³Depto. Ing. Genética. Cinvestav-Irapuato, Irapuato, Gto. , México

⁴AC: Martínez-Zubiaur Y (elvirafiallo@fbio.uh.cu)

Whitefly-transmitted viruses have caused severe losses in tomato crops (*Solanum lycopersicum*) in Cuba. During 2006-07, tomato greenhouses across Eastern Cuba presented high levels of *Bemisia tabaci* (B biotype) infestation. Some plants also showed some symptoms different to the ones induced by *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL(CU)): interveinal chlorosis and severe mosaic yellowing seldom combined with brittleness. Total nucleic acids were extracted from several samples and analyzed by PCR using TYLCV-specific primers (5'CTGAATGTTTGGATGGAAATGTGC3' and 5'GCTCGTAAGTTTCCTCAACGGAC3'), resulting in 38 % of positive samples. Similarly, a RT-PCR analysis for *Tomato chlorosis virus* (ToCV) using generic (HS-11/HS-12) and specific primers (ToC-5/ToC-6) was carried out (1). Sequence analysis of the RT-PCR products (463 bp) confirmed the presence of ToCV in Cuba. The fragment had 97-98% identity with isolates from Spain (DQ136146), Florida (AY903448) and Reunion Island, France (AJ968396). Cloned TYLCV and ToCV amplicons were used as probes in dot-blot hybridization assays. Out of 31 double-analyzed field samples, ToCV was detected in 24 cases (77.4%): 16 as single and 8 as mixed infections with TYLCV. These results represent the first report of ToCV and the mix TYLCV/ToCV in Cuba.

S7-P28**Binucleate *Rhizoctonia* native isolates against root rot causing pathogens in *Capsicum annuum***

Del Real-Monroy M, Alvarado-Gutiérrez A, Pescador-Flores BD, Jiménez-Bremont JF, Rodríguez-Kessler M, Arias S, Rodríguez-Guerra R, Fraire-Velázquez S

Universidad Autónoma de Zacatecas, Guadalupe, México

AC: Fraire-Velázquez S (sfraire@prodigy.net.mx)

Root rot in chili pepper is still considered a devastating disease in this crop. Biocontrol constitutes an attractive alternative because of increasing concerns for environmental protection. Binucleate *Rhizoctonia* isolates has been reported as biocontrol agents against root rot causing pathogens of *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* and *Phytophthora* genera in several crops, and it is assumed that some avirulent isolates also activate systemic acquired resistance (SAR) in plants.

In 154 isolates of *Rhizoctonia solani* native of central states of Mexico obtained from root of chili pepper and common bean plants, 49 are binucleated, 2 with avirulent behavior on chili pepper plantlets and also protects against *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici* in greenhouse and *in vitro* assays. A library of 123 clones of genes induced in root of chili pepper plantlets in interaction with an avirulent binucleate *Rhizoctonia* isolate was obtained by suppression subtractive hybridization, 83.5% of genes come from the plant genome, 10% involved in metabolism functions, 16% are signal transduction genes, 13% control of gene expression, 24% are defense genes and 20% are unknown proteins.

Binucleate *Rhizoctonia* colonize root tissue penetrating by the natural fissures on the topography of the epidermis and grow intracellularly in the exodermis without necrosis on the root tissue; whereas *F. oxysporum* and *F. solani* as expected, show degradation and breaking of cell wall on the epidermis cells, profuse growth and necrosis inside the cortex zone. From the defense induced genes, it is suggested this fungus isolate activates SAR response in chili pepper plants.

S7-P29

Antagonismo *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra hongos causantes de la pudrición de la raíz del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Durango, México

Reséndiz-Arvizu VH¹, Lira-Méndez K¹, Rosales-Serna R², Mayek-Pérez N¹, González-Prieto JM¹

¹Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Reynosa, México

² INIFAP, Campo Experimental Valle del Guadiana, Durango, México

AC: *González-Prieto J (jmgonzalezp@ipn.mx)*

La pudrición de la raíz es una de las principales enfermedades que afectan al cultivo del frijol en el estado de Durango, disminuyendo el rendimiento a la cosecha y las utilidades del productor. Algunas especies del género *Trichoderma* poseen capacidad para controlar hongos fitopatógenos. Aislamientos de *Trichoderma* spp. nativos de la región productora de frijol de «Los llanos» del estado de Durango, México, así como hongos fitopatógenos obtenidos de raíces de frijol con síntomas de pudrición de la misma región, fueron caracterizados molecularmente. Las especies de *Trichoderma* identificadas fueron *T. harzianum*, *T. virens* y *T. asperellum*, mientras que los fitopatógenos encontrados fueron *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Alternaria tenuissima*. A partir de cultivos monoconidiales se determinaron las tasas de crecimiento y las pruebas de antagonismo de las cepas fúngicas *in vitro*. Mediante cultivos duales en placas de PDA se evaluó la capacidad de las especies de *Trichoderma* para antagonizar a los fitopatógenos descritos. Para ello se seleccionaron aislamientos de *Trichoderma* con índices de crecimiento contrastante. Los aislamientos antagonísticos evidenciaron diferentes grados de actividad dependiendo del fitopatógeno confrontado. La especie que mostró un control eficiente sobre la mayoría los fitopatógenos fue *T. harzianum*. Se encontró baja correlación entre las tasas de crecimiento y la capacidad antagonística de los aislamientos de *Trichoderma*. Lo anterior sugiere la posibilidad de utilizar combinaciones de cepas antagonísticas para controlar de una forma más efectiva a los hongos implicados en la pudrición de la raíz del frijol.

S7-P30**Efecto de la densidad celular en la multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* (AAB) cv. Plátano «Hartón»**

Porras Mejía DJ, Giménez Alvarado C, Colmenares Esqueda M

Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

AC: *Porras Mejía D (josabet44@hotmail.com)*

Las suspensiones celulares embriogénicas (SCE) constituyen un sistema experimental muy valioso. Actualmente no existe un protocolo eficiente para establecer SCE en *Musa* (AAB) cv. Plátano «Hartón». Con el objetivo de determinar el efecto de la densidad celular inicial en la etapa de multiplicación de las SCE de *Musa* (AAB) cv. Plátano «Hartón», se establecieron suspensiones a partir de callos embriogénicos. Se ajustaron los inóculos iniciales de las SCE al 1%; 1.5%; 2%; 2.5% y 3% de volumen celular sedimentado (VCS), tomando tres unidades experimentales con réplicas a los diferentes VCS para determinar la cinética de crecimiento mediante masa fresca (MF) y masa seca (MS). Las curvas mostraron los siguientes resultados para el quinto día de evaluación: MF, al 1% y 1.5% de VCS 17.12 mg y 17.49 mg respectivamente, para 2% de VCS 32.5 mg, al 2.5% y 3% de VCS 21.95 mg y 22.63 mg para cada VCS. Y MS, al 1% y 1.5% 6.08 mg y 5.38 mg para cada VCS, al 2% 16.9 mg y para los VCS de 2.5% y 3% 6.75 mg y 8.81 mg respectivamente. Indicando una diferencia significativa de $p \leq 0.005$ en las curvas al 2% de VCS. Al evaluar el desarrollo, maduración y germinación de las SCE; se observó la mayor diferenciación de embriones (183 por 1 mL de SCE) al 2% de VCS, los cuales formaron plantas de aspecto normal. Los resultados indican que un VCS 2% favorece significativamente la multiplicación de SCE de *Musa* (AAB) cv. Plátano «Hartón».

S7-P31

Proteomic analysis of transgenics pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] plants

*Yabor Cabrera L¹, Castillejo MA², Echevarría S², Valle B¹,
Lorenzo JC¹, Hernández M¹, Jorrín J²*

¹Centro de Bioplasmas, Ciego de Ávila, Cuba

²Universidad de Córdoba, Córdoba, España

AC: *Yabor Cabrera L* (lyabor@bioplasmas.cu)

Pineapple is one of the most important tropical fruit and therefore intensive genetic improvement programs are being carried out in many countries, including Cuba. Our research team has previously introduced the *bar* gene, along with *chitinase* and *ap24* genes, into the pineapple genome. Gene recombinant technologies supply agriculture product with great vitality. But the public perception of genetically modified crops can not be ignored. The present study is focused on the evaluation of the biochemical changes caused by transformation. Transformed and non-transformed plantlets were compared. Statistical significant changes were recorded in levels of malondialdehyde, other aldehydes, chlorophyll (a, b, total), phenolics (free and cell wall-linked) and proteins. Two-dimensional gel electrophoresis and western analysis has been used to address the *in vivo* proteomic changes in transgenic pineapple plants exposed to Finale sublethal doses harvested after 0, 24, 48, 72 hours and 7 days. Results indicate that pineapple genetic transformation caused several side effects at the biochemical level during early stages of plant hardening. These changes can promote ulterior modifications such as: 1) in the tolerance to stress because levels of malondialdehyde and other aldehyde were different between transformed and non-transformed plantlets, 2) in the efficiency of photosynthesis as levels of chlorophyll pigments varied and 3) in the fruit quality as contents of free phenolics were modified. The image comparison and statistic analysis performed showed changes in protein profiles. About 18 differential spots in transgenic plants were analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF).

S7-P32**Caracterización de aislamientos argentinos de *Bacillus thuringiensis* y su empleo potencial en el desarrollo de herramientas biotecnológicas para el control de lepidópteros plaga**

Sauka D, Basile J, Rodríguez S, Sbaraglini ML, Monella R, Benintende G

Bioinsumos Microbianos IMYZA INTA, Castelar, Argentina

AC: Sauka D (dsauka@cnia.inta.gov.ar)

En este trabajo se presenta la caracterización de aislamientos argentinos de *B. thuringiensis* pertenecientes al IMYZA-INTA y se establecen bases para su empleo potencial en el desarrollo de nuevos bioinsecticidas para el control de lepidópteros plaga. De los 251 aislamientos de *B. thuringiensis* utilizados en este estudio, 191 contenían al menos un gen *cry* «anti-lepidóptero», de los cuales 76 fueron «únicos». Estos fueron caracterizados mediante REP-PCR, y se indagó sobre la presencia de genes *vip3A* y de otros factores de virulencia inespecíficos. Se hallaron 9 perfiles de genes *cry* diferentes, siendo el *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ia*, *cry2Aa* y *cry2Ab*; y el *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1Ia*, *cry2Aa* y *cry2Ab* los que entre ambos agruparon el 79% de los aislamientos seleccionados. No se detectaron aislamientos con genes *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1F*, *cry1G*, *cry1Ic*, *cry1Id*, *cry1Ie*, *cry2Ac* ni *cry2Ad*. Se identificaron genes *vip3Aa* en 73 de estos aislamientos nativos (96.0%). No se han encontrado genes *vip3Ab*, *vip3Ad*, *vip3Ae* ni *vip3Af*. La mayoría de los aislamientos (90.8%) presentaron en su genoma los tres genes que codifican factores de virulencia inespecíficos. El 5.3% de los mismos no presentaron el gen *pipIc*, otro 2.6% el *plc*, mientras que el 1.3% de los restantes careció del *sph*. Se evidenció que el 89.5% de los aislamientos presentó movilidad, el 100.0% actividad hemolítica en agar sangre, y el 92.1% actividad lecitinasa a la 24 h, llegando a 100.0% a las 48 h. Por otra parte, se identificaron algunos aislamientos con actividad tóxica moderada a alta para larvas neonatas de *Epinotia aporema* (*Lepidoptera*).

S7-P33

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

Capdesuñer Y¹, Matros A², Witzel K², Wölf A², Hernández M¹, Mock HP²

¹Lab. de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplasmas - Universidad de Ciego de Ávila (UNICA) , Ciego de Ávila, Cuba

²Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany

AC: *Capdesuñer Y* (ycapdesuner@bioplasmas.cu)

The effect of elevated CO₂ concentrations and nitrogen supply on the levels of primary metabolites and protein expression was investigated in leaves of *Arabidopsis* plants grown in MS-medium. The resources allocation in response to nutrients conditions were analysed in plants grown in different concentrations of ammonium nitrate (0.25, 5, 20 mM) in MS-medium under two conditions of CO₂ (350 and 1,000 ppm). An accumulation of carbohydrates, especially starch, under elevated CO₂ and low N (0.25 mM) was also observed accompanied by morphological changes. The synthesis of aminoacids was more dependent of nitrogen supply, the majority decreased in low N. The synthesis of proteins showed a similar behaviour of aminoacids, the total soluble proteins decreased in low N. A proteomic analysis of the CO₂ influence in rosettes of *Arabidopsis* revealed 8 spots altered with CO₂ treatment, four spots identified were related with Photosynthesis, Glycolysis, stress response and signal transduction. Rubisco activase was highly upregulated under high CO₂. The influence of NH₄NO₃ was more significant on protein expression, 34 spots were altered with the treatments and 10 spots were identified. Proteins related with nitrogen and sulphur metabolism were downregulated, under low N conditions, as NIR1 ferredoxin-nitrate reductase, GGT1(Alanine-2-oxoglutarate aminotransferase, disulfide oxidoreductase and others in correspondence with the decrease of the aminoacids related as glutamine, alanine, and serine. The large subunit of Rubisco decreased in low concentration of N (0.25 mM). Proteins identified and related with stress response were upregulated in low N concentration than in high N (*i.e.*, HSP 70).

S7-P34**Single-chain variable fragment (scFv) antibodies from phage-display libraries to manage mycotoxin contaminations**

Franconi R, Nobili C, Massa S, Sanguineti S, Illiano E

ENEA CR Casaccia, BAS BIOTEC GEN, Rome, Italy

AC: *Franconi R (franconi@casaccia.enea.it)*

Most mycotoxins are classified by IARC as potential carcinogens. In the developing world, climatic and crop storage conditions conduce to continual exposure to low level mycotoxin ingestion, that has been suggested to lead to endemically impaired immunity and increased susceptibility to infections (*i.e.* malaria, HIV/AIDS). Low-cost, high quality antibodies specific to mycotoxins are strongly needed for the establishment of efficient and affordable analytical systems (*i.e.* ELISA, biosensors, lateral-flow).

The aim of our work is to obtain recombinant antibodies in the single-chain variable fragment format (scFv) specific to Ochratoxin A (OTA), Aflatoxin M1 (A-M1), Deoxynivalenol (DON) and the thricothecene mycotoxin T-2 from 'phage display' libraries. This technology allows soluble antibodies to be derived at high yields and inexpensively. A synthetic 'phage display' library («F8 library»), from which scFvs with high stability and affinity had already been isolated towards different targets, was initially used. After biopanning, clones with specific binding to mycotoxin-BSA conjugates were purified for further biochemical characterization, mainly to check binding to free, unconjugated mycotoxins. To have a greater chance of selecting antibodies with the affinity required for detection of haptens in competitive assays, we built 'phage display' libraries from mice immunized with the different mycotoxin-BSA conjugates. Biopanings are being performed.

Mycotoxin-specific antibodies from these repertoires might be used for the establishment of strong quality control systems in exported or national production food and feedstuffs as well as in plant-derived products (*i.e.* biopharmaceuticals).

S7-P35

Biodiversidad de genes *cry* insecticidas en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas del ecosistema de manglar

Echeverri Franco AM, Bolívar Peña BA, Hernández Fernández JA

Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia

AC: Hernandez Fernandez J (javier.hernandez@utadeo.edu.co)

Bacillus thuringiensis (*Bt*), bacteria entomopatógena, que lidera el mercado mundial de bioplaguicidas, ha traído la atención de innumerables investigaciones con el fin de hallar nuevas cepas con toxicidades y espectros de acción más amplios. Este es el primer reporte de aislamiento de cepas de *Bt* en el ecosistema de manglar en América, el cual se caracteriza por una amplia diversidad en la abundancia y composición microbiana. El objetivo del presente estudio fue aislar y caracterizar bacilos esporulados procedentes de muestras de suelo del sector «Boca de la Barra» en la Ciénaga Grande de Santa Marta, Caribe colombiano, a nivel microscópico y molecular identificando con primers generales genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, y *cry4* activos contra insectos lepidópteros, coleópteros y dípteros. Y con primers específicos para la familia *cry1* los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ba*, *cry1Ca* y *cry1Da*. Ciento quince aislamientos de bacilos esporulados fueron aislados, en los que se observaron cristales con forma y tamaños variables, predominando el patrón circular con 67.7%, bipiramidal con 23.1%, cuadrangular con 7.25% y amorfo con 1.19%. La caracterización molecular reveló una gran diversidad de las cepas de *Bt* estudiadas en el ecosistema de manglar obteniendo un 67.7% con al menos un gen *cry*, y 38.4% con más de un gen por cepa. Se encontraron los cuatro tipos de genes estudiados: *cry2* (40.4%), *cry3* (34.3 %), *cry1* (27.3%) y *cry4* (27.3%). Se encontró que el gen *cry1Aa* era el más frecuente en 20 aislamientos y el menos frecuente *cry1Ac* con un aislamiento y adicionalmente se observaron 11 perfiles distintos en los 63 bacilos evaluados. Estos resultados muestran que el ecosistema de manglar presenta una opción interesante para futuros estudios de *Bt*.

S7-P36**Biolistic-mediated system to obtain fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants**

Aragão FJL

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, W5 Norte, 700770-900, Brasília, DF, Brazil.

AC: *Aragão FJL* (aragao@cenargen.embrapa.br)

Over the last 20 years, several attempts have been made towards the achievement transgenic soybean plants. It has been possible to obtain transgenic events by utilizing the *Agrobacterium*-system to transform cotyledonary nodes, and the biolistic process to bombard the apical meristems of embryonic axes and other explants. However, most protocols so far published, have failed to reproducibility, simplicity to conduct, high efficiency and variety-independency transformation. The combination of: a) genes which codify herbicide-active polipeptides, and b) a short multiple-shooting induction protocol, have allowed the development of a simple and routine system to obtain transgenic plants at a high frequency and variety independent. The apical meristematic region of mature embryonic axes were excised, and bombarded with the plasmid DNA. The bombarded embryonic axes were transferred to the culture medium containing MS basal salts, sucrose, cytokinin and the selective agent. After three to five weeks in culture, putative transgenic shoots were excised and transferred to the greenhouse. The plants were allowed to set seeds and progeny analyses were performed. Four elite commercial soybean varieties (Doko RC; BR16; Celeste and Conquista) were transformed. The frequency of transformation (number of transgenic plants/number of bombarded embryonic axes) varied from 5-20%, depending on the cultivar. Virtually no chimeras were observed. We have used this protocol effectively to generate a soybean line presenting reduction of up to 94.5% of phytate (InsP6) content and a transgenic elite plant tolerant to imidazolinone herbicides that was integrated in a breeding program, making a viable option available to soybean producers worldwide.

SIMPOSIO 8 / *SYMPOSIUM 8*

**Producción de Farmacéuticos en Plantas/
*PLant Made Pharmaceuticals***

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S8-1**On the analytics of plant glycoprotein N-glycosylation that support plant engineering for the expression of glycotherapeutics with mammalian-like glycosylation**

Cremata JA, Lerouge P, Bardor M, Seveno M, Cabrera G, Triguero A, Rudd PM, Harvey DJ

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Cremata J (jose.cremata@cigb.edu.cu)

The development of convenient biochemical strategies for the identification of plant N-glycan profiles has been driven by the recent emergence of plants as expression system of therapeutic proteins. Qualitative and quantitative analysis of the N-glycan profiling from plant demonstrated that extraction of proteins from plant material is a crucial step to guarantee reliable N-glycan extraction after deglycosylation with PNGase A. Coupling to 2-aminobenzamide afford an oligosaccharide preparation that is suitable for an accurate evaluation of their N-glycan population by mass spectrometry and/or HPLC in combination with exoglycosidase digestions. The high sensibility of this analytical approach allows the profiling to be carried out on minute amounts of material (a few leaves). We also demonstrate that CID mass spectrometry in negative mode of N-glycans harbouring $\alpha(1,3)$ - or $\alpha(1,6)$ -fucose residue on the proximal GlcNAc lead to specific fragmentation patterns thus allowing the discrimination of plant N-glycans from those arising from mammalian contaminations.

S8-2**Glycoengineering of pharmaceutical proteins using targeted expression in the plant secretory pathway**

Gomord V¹, D'Aoust M-A², Vezina L², Faye L¹

¹CNRS-Université de Rouen, France

² Medicago Inc, Quebec, Canadá

AC: Faye L (Loic.Faye@crihan.fr)

While N-glycan synthesis in the endoplasmic reticulum (ER) is conserved in plants and mammals, N-glycan maturation in the Golgi apparatus is plant-specific and results in differences in the oligosaccharide structures attached to glycoproteins between plants and mammals. In the prospect of using plants as alternative hosts to mammalian cell lines for the production of therapeutic glycoproteins, significant progresses have been made towards optimization of protein N-glycosylation in plants.

To date, most efforts to optimize the N-glycosylation pathway have focused on the knock out of genes that code for plant-specific glycosyltransferases together with the knock in of genes catalyzing the synthesis, transport and addition of human sugars.

We are currently taking advantage of a large panel of signals available for targeting of proteins in the membranes of the plant secretory pathway to engineer N-glycosylation of plant-made pharmaceuticals (PMPs). This strategy, relying on the simultaneous transient co-expression of a PMP and chimaeric maturation enzymes, has recently allowed high yield production of antibodies with human-like N-glycans in tobacco plants. Interestingly, this method is not limited to glycoengineering and will be amenable to the control of a broader range of post-translational modifications on PMPs.

S8-3**Possible future bedside application of new plant-derived therapeutic vaccines against HPV-associated cancers**

Franconi R, Massa S, Mett V, Dalla Vedova L, Paolini F, Venuti A, Yusibov V

ENEA CR Casaccia, BAS BIOTEC GEN, Rome, Italy

AC: Franconi R (franconi@casaccia.enea.it)

Human papillomavirus (HPV) prophylactic vaccines (GARDASIL and Cervarix) have given new perspectives on cervical cancer prevention, but they are currently unaffordable in developing countries, where they would likely have greatest benefit. In fact, IARC predictions on the number of cervical cancer cases by 2020 in Africa, Latin America and Asia are of an increase of 50–55%. Hence, research should be addressed to therapeutic vaccines (targeting infected individuals) based on technologies that combine vaccine stability, cost-effectiveness and safety.

To these purposes, we explored the anti-cancer activity of a *Nicotiana benthamiana*-produced vaccine based on a non-transforming E7 protein of HPV-16 (a well documented candidate for therapeutic HPV vaccines) fused to β -1,3-1,4-glucanase of *Clostridium thermocellum* (LicKM-E7GGG). The purified target antigen was evaluated for its therapeutic potential in a mouse model. The vaccine induced E7-specific cytotoxic T-cell responses inhibiting tumor development following challenge with an E7-expressing tumor cell line. Further, in a heterologous prime-boost regimen (one of the most effective schedule for anti-cancer vaccines), priming with an E7GGG-fusion DNA vaccine (E7GGG-PVXCP) and then boosting with the plant-purified LicKM-E7GGG resulted in 100% tumor rejection. Moreover, dramatic tumor regressions were observed when the vaccine was administered according to a «late vaccination» schedule to mice with fully established tumors.

Data from these studies indicate that effective therapeutic vaccines, able to cure established experimental tumours, can be accomplished exploiting the potential of plant production and/or heterologous administration schedules for future bedside application of HPV-related human therapeutic vaccines.

S8-4**Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants**

J Conley A¹, J Joensuu J², Menassa R², Brandle JE²

¹Department of Biology, University of Western Ontario, London, Canadá

²Southern Crop Protection and Food Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, London, Canada

AC: *J Conley A (conleya@agr.gc.ca)*

The demand for recombinant proteins for medical and industrial use is expanding rapidly and plants are now recognized as an efficient, inexpensive means of production. Although the accumulation of recombinant proteins in transgenic plants can be low, we have previously demonstrated that fusions with an elastin-like polypeptide (ELP) tag can significantly enhance the accumulation of a range of different recombinant proteins in plant leaves. ELPs are biopolymers with a repeating pentapeptide sequence (VGVPG)_n that are valuable for bioseparation, acting as thermally responsive tags for the non-chromatographic purification of recombinant proteins. To determine the optimal ELP size various ELP tags were fused to erythropoietin, interleukin-10, green fluorescent protein, and a single chain antibody fragment and then transiently expressed in tobacco leaves. Our data suggests that smaller ELP tags result in higher accumulation levels of their respective fusion partners, whereas purification works better with larger ELP tags. To elucidate ELP's mechanism of action for increasing recombinant protein accumulation and to determine the utility of ELP in various intracellular compartments. Interestingly, secreted GFP-ELP fusions form large ER-derived protein bodies, which may exclude the recombinant protein from normal physiological turnover. As well, pull-down assays and bimolecular fluorescence complementation demonstrated that ELP interacts with the ER chaperone BiP, possibly enhancing the folding of target proteins. Thus, BiP/ELP interactions and the formation of protein bodies may be responsible for the positive effect on recombinant protein accumulation. The implications of these results for the production, purification and biological activity of recombinant proteins will be discussed.

S8-5**Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication**

Sainsbury F, Lomonosoff GP

John Innes Centre, Norwich, United Kingdom

AC: Sainsbury F (frank.sainsbury@bbsrc.ac.uk)

To date, the most efficient vectors for over-expression of heterologous proteins in plants are based on RNA virus-derived replicons. A system based on a disabled version of *Cowpea mosaic virus* (CPMV) RNA-2 has been developed, which overcomes limitations on insert size and introduces biocontainment. This system involves positioning a gene of interest between the 5' leader sequence and 3' UTR of RNA-2, thereby emulating a presumably stable mRNA for efficient translation. Thus far the sequence of the 5' leader has been preserved to maintain the ability of the modified RNA-2 to be replicated by RNA-1. However, high-level expression may be achieved in the absence of RNA-1-derived replication functions using *Agrobacterium*-mediated transient transformation. To investigate those features of the 5' UTR necessary for efficient translation, and improve the utility of vectors based on deleted versions of RNA-2, we have addressed the role of two AUG codons found within the 5' leader sequence. Deletion of an in-frame start codon upstream of the main translation initiation site led to a massive increase in foreign protein accumulation. This system, based on the hyper-translatable 5' leader (CPMV-*HT*), was used to express a full size IgG and a self-assembling virus-like particle, to greater than 0.325 and 1.0 g/kg of fresh weight tissue, respectively, in just 6 days. A series of binary vectors was constructed that allow the modular assembly of CPMV-*HT* components, thereby simplifying the use of what is the most efficient vehicle for extremely high-level expression in plants without viral replication.

S8-6**Trafficking, degradation and purification of recombinant IL-10 protein in plants**

Menassa R¹, Angelo K¹, Andrew C², Adil A², Jussi J¹, Jim B¹

¹Agriculture and Agri-Food Canada, London, Canadá

²University of Western Ontario, London, Canadá

AC: *Menassa R (menassar@agr.gc.ca)*

Many therapeutic proteins have been expressed in plants with varying levels of accumulation. Two major challenges for economical production of recombinant proteins include inadequate accumulation levels and the lack of efficient purification methods. Our research has focused on addressing these issues using the human interleukin-10 protein (IL-10) which has been proposed for the treatment of several autoimmune diseases. It is a labile protein with a half-life *in vivo* of 30 minutes, requiring post-translational modifications and assembly. We have previously shown that plant recombinant IL-10 is biologically active and is therapeutic when administered orally in a mouse model of colitis. However, IL-10 does not accumulate in plants to levels that would allow human clinical trials to be conducted. We have approached this problem from several angles, including a cell biology approach to its trafficking in plant cells with GFP fusions, a biochemistry approach to determine the turnover rate and mechanism of IL-10 degradation, a protein chemistry approach to determine post-translational modifications and processing sites, and a biotechnological approach to improve accumulation levels of IL-10 in plants and to allow for easy purification of the recombinant protein. Through these approaches we have enhanced expression levels of IL-10 by up to 60 fold, and determined that unexpected trafficking to the vacuole may play a role in its turnover. Further, we identified several isoforms of IL-10 which migrate at different pI values from 7.5 to 9. These results and their implications for the production of recombinant proteins in plants will be discussed.

S8-7**Expression of pharmaceutical protein genes
in transgenic plants**

Aragão FJL

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, W5 Norte, 700770-900,
Brasília, DF, Brazil

AC: *Aragao FJL (aragao@cenargen.embrapa.br)*

Transgenic plants permit the expression of biochemical complex proteins that can not be produced in a safe and/or economically viable way in microorganisms, eukaryotic culture cells or secreted by transgenic animal's glands. Its potential has been confirmed by the incipient commercial success of such production systems, based on genetic transformation of a broad range of plant species, resulting in efficient production of more than 100 different heterologous polypeptides. Plant-based bioreactors present a series of advantages when compared with other production systems, especially whenever economy, easy-hand manipulation and biosafety are concerned, besides some homogeneity, yield-production and stability limitations. Soybean plants represent a promissory system for the production of molecular pharming proteins as they present high agronomical productivity, short cycle and photoperiod sensitivity and are naturally protein seed accumulators. We obtained transgenic soybean lines containing the human growth hormone (hGH) gene under control of the tissue-specific *Phaseolus vulgaris* β -phaseolin promoter and the α -coixin cotyledonary protein body signal peptide from *Coix lacrima-jobi* L. Transgenic plants were able to accumulate 0.8% (of total protein) hGH content in dry seeds. Additionally, we have generated plants expressing proinsulin targeted to the subcellular protein bodies, anti tumoral antigen Tn (a typically pre-tumoral marker commonly overexpressed in breast cancer cells) scFvDIR83D4 gene. Protein targeting to cotyledonary protein bodies and recombinant protein localization were confirmed with ultrastructural immunocytochemistry assays of five year room temperature stored transgenic seeds, suggesting that the molecular strategy adopted is recommended for long time stable heterologous protein accumulation.

SIMPOSIO 8 / *SYMPOSIUM 8*

**Producción de Fármacos en Plantas/
*Plant Made Pharmaceuticals***

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S8-P1**Novel method for the identification of N-terminal end for plant-derived proteins**

Sánchez A, Ramos Y, Solano Y, González LJ, Besada V, Betancourt L, Gil J, Rodríguez M, Pujol M, Padrón G

CIGB, Havana city, Cuba

AC: Ramos Y (yassel.ramos@cigb.edu.cu)

Expression of recombinant proteins in transgenic plants has emerged in the last few years as an attractive alternative platform, drawing the attention from the academic and industrial sectors. However, due to its novelty, the detailed characterization of proteins obtained by this technology to ensure they resemble their counterparts produced in other expression systems is an important requisite.

The verification of the amino termini of proteins is commonly demanded for research purposes and regulatory agencies as part of the quality control for recombinant proteins. In the last decades, mass spectrometry for protein analysis has emerged as the ideal tools for the simultaneous characterization of all peptides derived from a protein hydrolysis. However the simple inspection of the signals obtained from a peptide mixture in a MS spectrum do not allow the straightforward identification of the peptide corresponding to the extreme N-terminal.

We report here a method for the identification of amino-terminal peptides of in-gel digested light chain from a plant-derived antibody isolated by SDS-PAGE. The primary amino groups of the gel-entrapped protein are blocked with normal acetic or succinic anhydride, and the protein is digested with a high-specificity protease. The generated peptides are treated with an equimolar mixture of normal and deuterated acetic anhydride. Upon mass spectrometric analysis internal peptides display a complex isotopic ion distribution while the N-terminal peptide shows a normal isotopic ion distribution. This procedure becomes a useful tool for the biochemical characterization of plant-expressed proteins.

S8-P2**Expression of Phospholipase A2 from *Agkistrodon halys blomhoffi* in *Nicotiana bentamiana* plants**

Karbovskiy L

National Taras Shevchenko University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

AC: Karbovskiy L (Lenya2005@ukr.net)

Phospholipase A2 are Ca²⁺-requiring esterases that specifically catalyze hydrolysis of the fatty acid ester bond at position 2 of 1,2-diacyl-3-sn-phosphoglycerides and play a central role in lipid metabolism. We have expressed phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffi* in *Nicotiana bentamiana* plants. Phospholipase A2 full-length cDNA was cloned by RT-PCR from the total RNA extracted from the snake venom gland. Then the gene was cloned into pBIN19 vector and delivered into plant cells by agroinjection. Highest level of recombinant protein accumulation was detected in leaves 4 days after agroinfiltration. Analysis indicated that the expressed protein cross-reacted with the antibody against the native enzyme and hydrolyze phospholipase A2 chromogenic substrate.

S8-P3**Taking advantage of Rubisco large subunit gene regulation signals for heterologous genes expression in tobacco plastid.**

Cabrera Y, Valdivia O, Barceló MT, González A, Armas R

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Sancti Spiritus, Cuba;

AC: Cabrera Y (yeosvany.cabrera@cigb.edu.cu)

Here we describe the construction of novel plastid transformation vector, pVTP. This vector targets foreign genes after the ribosome-binding site of the *rbcL* gene, which encodes the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxy/oxygenase into the large single copy of tobacco plastid genome. Once the foreign genes are inserted into plastid DNA, the *rbcL* coding region is shifted to a distant position from its promoter and the natural monocistronic is became to artificial operon with three genes. The reporter *uidA* is located down stream of *rbcL* promoter followed by the spectinomycin resistance selection marker *aadA*. This vector design exploits the native regulation signal of *rbcL* gene to control the new inserted genes in tobacco plastome. pVTP vector was highly efficient for *N. tabacum* chloroplast transformation by biolistic method. Southern blot confirmed that heterologous gene integration was correct and stable; the transformant chloroplasts were as competent as wild type at *in vitro* conditions allowing homoplasmic state of modified ptDNA copies at first and second rounds of culture under selection pressure. We obtained very high expression level of the reporter *uidA* gene (9-12% of total soluble protein) and the thrombolytic streptokinase (2%) when they were regulated by the promoter and the 5' and 3' UTR of *rbcL* gene, but the gene integration let to drastic shutdown of *rbcL* gene and the transplastomic tobacco plants were unable to grow on soil. The suitability of recombinant protein production using tobacco transgenic plant transformed with pVTP vector and cultured *in vitro* is discussed.

S8-P4**Caracterización físico-química y actividad antimicrobiana del extracto acuoso del tallo *Spondias mombin* L. (jobo)**

Pérez Portero Y, Suárez López F, Rodríguez Leblanch E, Camacho Pozo M, Aguilar Navarro B, González Pérez M

Departamento de Biología Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

AC: *Pérez Portero Y (yalinapn@cnt.uo.edu.cu)*

Cuba es un país que cuenta con una rica tradición en el uso de las plantas medicinales y promueve por tanto estas investigaciones. Especies pertenecientes a la familia botánica Anacardiaceae presentan evidencias de actividad antimicrobiana frente a cepas de interés clínico y es el caso de *Spondias mombin* L frente a *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* (Cotilla *et al.*, 2003). Sin embargo, los estudios que fundamenten su posible utilización aun son insuficientes y es objetivo de esta investigación realizar la caracterización físico-química y evaluar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de la corteza del tallo de la planta *Spondias mombin* L. (Jobo). El material vegetal se utilizó fresco y se colectó en el mes de junio del 2008, en la caracterización físico-química se midieron parámetros como la densidad relativa, la viscosidad, el pH, además del tamizaje fitoquímico según Ochoa *et al.*, (2000); la actividad antimicrobiana se realizó por el método de difusión en agar (Bauer, 1966) los microorganismos proceden del cepario del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Los parámetros caracterizados evidencian la similitud del extracto con el agua lo cual favorece su utilización, cualitativamente se comprobó la presencia de Saponinas, Taninos y Fenoles, Cumarinas, Alcaloides y sustancias grasas; muchas de éstos presentan actividad antimicrobiana. Mostró actividad antimicrobiana frente a dos bacterias Gram positivas (*E. faecalis* y *S. aureus*) no ocurrió frente a las bacterias Gram negativas y la levadura.

S8-P5**Anthraquinones from *in vitro* root culture of *Morinda royoc* L**

Borroto J¹, Coll J², Rivas M¹, Concepción O¹, Tandrón Y², Hernández M¹, Trujillo R¹

¹Centro de Bioplantas, Ciego de Ávila, Cuba

²Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, España

AC: Borroto J (jborroto@bioplantas.cu)

Anthraquinones (AQs), an important group of secondary metabolites, have been reported to exhibit antibacterial, antifungal, antituberculosis, anticancer, antiviral, and antioxidant activities. *Morinda royoc* L. (Rubiaceae) known in Cuba as garañón, is used to make a product with stimulating, revitalizing and anti-stress activity that also increases the libido, and is also used as a diet supplement. Due to inconveniences of field growing of *M. royoc*, the development of alternative methods to produce AQs *in vitro* is essential. In this work we aimed to obtain or improve AQ production in *in vitro* root cultures of *M. royoc* by their concentration/mass increase in the plant material or release to the culture medium. We assessed the effect of 1) indole-3-acetic acid (IAA) (0-22.8 μ M), 2) culture duration (15-75 days) and 3) subculture number (0-4) on *M. royoc* root cultures which were grown in shakers in the dark. Three different parameters were measured: a) intracellular and b) extracellular AQ concentration as well as c) root fresh weight (FW). An increase of intracellular AQ content up to 4.5 mg.g⁻¹ of fresh mass, after 30 days of culture in a medium 5.7 μ M of IAA was achieved. Isolation and identification of seven AQs from *M. royoc* L. roots is described, one of them being reported for the first time for this species. The structures of isolated compounds were determined from ¹H-NMR data. We are currently carrying out genetic transformation of *Morinda royoc* L. with *Agrobacterium rhizogenes* to increase the *in vitro* anthraquinones production.

S8-P6**Stable expression of pharmaceutical antibodies in progenies of transgenic plants**

Soto Córdova J, Rodríguez M, Pérez L, Ayala M, Gaviñondo JV, Pérez M, Ramos O, Tiel K, Oliva O, Simón M, Borroto C, Pujol M

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba

AC: *Rodríguez M (meilyn.rodriguez@cigb.edu.cu)*

Several studies have demonstrated the potential of plants as a system for efficient production of recombinant proteins. However, there are many factors that affect recombinant protein yields in transgenic plants, genetic stability among them. The general approach is to ensure adequate gene expression and protein stability by appropriate subcellular targeting. Transgene expression for molecular farming in plants is often driven by strongest available constitutive promoters. In this work, we report the genetic stability analysis of the expression of two monoclonal antibodies in progenies of transgenic tobacco plants. These tobacco lines were generated using the constitutive CaMV 35S promoter, the sporamin prepeptide and KDEL retention signal in both antibody chains. The stability of the transgenes was demonstrated by protein accumulation levels in the progenies from the transgenic tobacco clones assessed. All analyzed generations from transgenic tobacco plants produce active antibodies, as confirmed from their positive recognition of the corresponding antigens by immunodetection. These results confirm that potential limitations of transgenic plants for the production of plant-made pharmaceuticals regarding expression stability could be properly addressed. Besides, these analyses provide substantial descriptive information and methods to document transgenic events intended for potential large-scale production.

S8-P7**Transgenic plants produce biological active aglycosylated antibody against the Human Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R)**

Rodríguez M¹, Pérez L¹, Gavilondo JV¹, Ayala M¹, González EM¹, Cremata JA¹, Soto J¹, Pérez M¹, Ramos O¹, Hernández A¹, Álvarez A¹, Cabrera G¹, Mateo C², Borroto C¹, Pujol M¹

¹Center for Genetic Engineering and Biotechnology, P.O. Box 6162, Havana 10600, Cuba

²Center of Molecular Immunology, P.O. Box 16040, Havana 11600, Cuba

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: *Rodríguez M* (meilyn.rodriguez@cigb.edu.cu)

Transgenic plants are considered as a new promising production system for recombinant pharmaceuticals proteins. They offer many potential benefits in terms of investment, scalability and safety as compared to microbial fermentation and mammalian cell-based platforms. Plant biomass production can be simply increased until virtually unlimited scale, and results comparatively attractive even if the growing conditions are sophisticated with the most advanced crop production technologies. Because of the huge demand and the constraints of the standard production platforms of monoclonal antibodies, its expression in plants has been the subject of a lot attention from the industrial and academic sectors.

Nimotuzumab (hR3) is a humanized monoclonal antibody developed at the Center of Molecular Immunology in Cuba. This antibody binds to the extracellular region of human epidermal growth factor receptor (EGF-R), which results in a blockade of ligand binding and receptor activation. Epidermal growth factor receptor is a key target in the development of cancer therapeutics and for that reason Nimotuzumab is currently successfully undergoing clinical evaluation for cancer therapy in Cuba and other countries.

In these work we report results from studies on an aglycosylated recombinant version of the hR3 antibody, produced in transgenic plants. The plantibody version of hR3 showed comparable antiproliferative effects in tumours that over express human EGF-R, comparable to Nimotuzumab. Our results demonstrate the feasibility of the production of biologically active hR3 antibody in the transgenic plants.

S8-P8**Prolonged stability of the plantibody HB-01 directed against the hepatitis B surface antigen in cryoconserved tobacco leaves**

Ferro W, Guevara Y, Valdés R, Geada D, Padilla S, Conde A, Álvarez T, González T, Medina Y

CIGB, Habana, Cuba

AC: *Ferro W (william.ferro@cigb.edu.cu)*

The antibody production in transgenic plants is considered a promising technology for producing proteins for human uses. Since 1983, several recombinant antibodies have been expressed in important agronomic species of plants. However, to date no evaluation has been published about antibody stability within plant tissues under cryoconservation conditions. The current report presents an experimental approach on the plantibody HB-01 (PHB-01) stability in frozen tobacco leaves to give scientific evidences of stability of this kind of molecules to a prolonged low temperature exposure in this biological source. As conclusions, the PHB-01 is stable in tobacco leaves at -20 °C during 90 days, the recovery of the PHB-01 was not affected by any irreversible physical and chemical change produced in the tobacco leaves after this time of cryoconservation and the amount of total soluble proteins in the clarified extract decreased with the increment of the storage time under these conditions, which allow overcoming problems associated to detrimental climate conditions and optimize purification capabilities.

S8-P9**Development of *Nicotiana tabacum* lines
for non-smoking use**

García H¹, Oliva O², Canales E², Enríquez G², Simón M², Castro MDC¹,
Rodríguez M², Díaz A¹, Soto J², Ramos PL²

¹Instituto de Investigaciones del Tabaco, San Antonio de los Baños, Cuba

²CIGB, Havana, Cuba

AC: Ramos P (pedro.ramos@cigb.edu.cu)

For many years, *Nicotiana tabacum* breeding has been directed to maximize the properties related to its smoking use, such as quality, resistance to pests and diseases, as well as the agronomic performance. In parallel, by the second half of the last century *N. tabacum* use for other purposes than smoking started to be proposed, and, consequently, these potential became the subject of several investigations.

More recently, due to its convenience for tissue culture and good behavior in the introduction of genes by genetic engineering, *Nicotiana* spp. have been frequently used for plant molecular biology studies and as a host for the expression of recombinant molecules. However, breeding of *Nicotiana* spp. aimed to the genetic improvement of non-smoking features have not been intensively exploited so far.

The research work presented here describes the screening and identification of *N. tabacum* varieties with potential for non-smoking use, which were selected for a breeding program in order to combine several of these attractive features. As a result, several lines highly resistant to major tobacco diseases, showing high plasticity for year-round cultivation, very well adapted to growing in greenhouses, and with a great biomass production and protein content were obtained.

S8-P10**Functional study of cell wall proteins: production of the At1g28290 protein in plant cell and in bacteria**

Cisneros LDR, Jamet E, Chávez MDC

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México

AC: *Cisneros L (liliana_cisneros_castillo@yahoo.com)*

The plant cell wall is a complex network made of compounds forming together a structure that constitutes a dynamic interface between the plant cell and its environment. Plant cell wall composition and structure are regulated during development and in response to biotic and abiotic stresses. A main process during plant development is cell elongation in which proteins can play an important role. Cells of *Arabidopsis thaliana* etiolated hypocotyls are an interesting model to study this elongation because their size increases quickly during their growth in the dark. An O-glycoprotein encoded by At1g28290 was found to be abundant in cell walls of elongating hypocotyls. This protein named AtAGP31 has several structural domains like an N-terminal signal peptide allowing its secretion, a Pro-rich O-glycosylated central domain, and a C-terminal domain named PAC comprising 6 Cys residues. In order to characterize the structure of AtAGP31 in details and to understand its biological function, this work produced several constructs allowing the production of two proteins in cell suspension cultures of tobacco: At1g28290c and At1g28290ps+PAC; and one protein in bacteria: At1g28290PAC. The recombinant proteins also contain C-terminal tags facilitating biochemical work like a 6x His tag (purification by affinity chromatography) and a V5 epitope (recognition by antibodies). Tobacco cells have been stably transformed and are presently screened for the presence of transgenes. Bacteria have been stably transformed and showed the production of the required protein. Optimal conditions for production of the protein have been established. Large-scale production of the protein is under way.

S8-P11**Depth filtration for recovery of an IgG monoclonal antibody from transgenic tobacco plant**

Limonta Fernández M, Duemmer E, Castañeda J

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Limonta Fernández M (miladys.limonta@cigb.edu.cu)

The large scale production of monoclonal antibodies presents a challenge for a cost effective downstream purification processes. To date, advances in downstream processing have not kept pace and have resulted in process bottlenecks. Because downstream constitutes 50–80% of all manufacturing costs, it is critical to optimize the purification for the highest productivity. The principal goal of this study is the substitution of a centrifugation step by a depth filtration operation to separate cell debris within a purification process of a monoclonal antibody (Mab) from tobacco. The goal of the depth filter unit operation is to protect the subsequent sterile grade membrane filtration (0.2 μm) from blockage.

Sartoclear® P depth filters is used for cell clarification applications. Within such depth filtration step, particles are retained by mechanical and adsorptive mechanisms. To determine the most appropriate depth filter for the application described above, different depth filters were tested at scale down level (Sartoclear® P Cap, AF = 25 cm²). Within this testing depth filter capacity as well as depth filter effluent absorbance was determined.

Results shows that the capacity of the Sartoclear® PB1 for the present application is approximately $C = 40 \text{ L/m}^2$. After the filtration trials the used capsules were sliced. The whole inner cavity of the used Sartoclear® PB1 capsule was filled with tobacco residue. This denotes that the capacity of the Sartoclear® PB1 capsule is limited by the inner cavity, as the retained tobacco residue forms a filter cake layer.

S8-P12**rProtein A sepharose fast flow stability in PHB-01 purification from tobacco extracts**

Geadá D, Ferro W, Álvarez T, Medina Y, Guevara Y, Valdés R, Padilla S, Mendoza O, Gómez L, González T

Instituto de Investigaciones del Tabaco, San Antonio de los Baños, Cuba

AC: *Geadá D (deborah@iitabaco.co.cu)*

Most of plantibody purification protocols are based on chromatographic methods using, mainly Protein A or G affinity matrixes. This kind of matrixes have been successfully employed for the purification of antibodies from ascitic fluid or cell culture supernatants, especially at first steps of a purification procedure due to its benefits in terms of purity and concentration of the eluted samples. In spite of the existence of cell components that can interact with the matrix and might cause its blockade, its stabilities are well documented for over 100 purification cycles. By the contrary, in plant extracts the use of these affinity matrixes, at the first steps of purification process, have been characterized by frequently blocking, low plantibody recoveries, low stability in terms of purification cycles and difficult handling. That is why, their use has been denied for some authors and the protocols had changed to non-affinity chromatographic or non-chromatographic methods. According to our judgment these matrixes use is subordinate to a proper extract clarification to achieve good results on recoveries, purity and stability (purification cycles). In this work it was investigated whether rProtein A-Sepharose Fast Flow matrix is stable during 50 cycles for PHB-01 purification from tobacco extracts. The average PHB-01-recovery was around 80%. The results show significant differences among groups (10 cycles each) for PHB-01-recovery ($p=0.0028^*$), adsorption capacity ($p=0.0052^*$) and elution capacity ($p=0.0144^*$), but from an analysis of these results and PHB-01 purity measured by SDS-PAGE it was concluded that matrix was stable during 50 purification cycles.

S8-P13**Purification methods of recombinant protein expressed in plants: as easy as it seems to be?**

Geda D, Valdés R, Ferro W

Instituto de Investigaciones del Tabaco, San Antonio de los Baños, Cuba

AC: *Geda D (deborah@iitabaco.co.cu)*

Purification process for recombinant protein expressed in plant can be divided in the next steps: vegetal tissue isolation, tissue fractionation, size particle reduction, extraction in aqueous phase, clarification and purification. Many researchers group the first four steps in operations like harvest of the plant or plant organ where the protein is expressed, selection of the material to be process, milling operations (dry or wet) and recovery of the aqueous extract of these operations, leaving as the only previous step before purification the extract clarification, generally by means of centrifugation steps. Nonetheless, recent reports support different ideas, which enrich and in some part denied the generalization made before about the model of steps for a purification process. For example: the oil-bodies technology for the purification of recombinant proteins, aqueous two phase extraction systems and the mandatory insertion of semi-purification steps for some crop extracts obtainment. Besides according to our experience is possible to affirm that success in plant-expressed recombinant proteins production requires studies in several essential aspects before their purification design such as: molecule stability in vegetal extract at drastic conditions, buffer composition, pH, vegetal disintegration techniques and extract chemical composition, among others. In this work we discussed some of these aspects and its impact in purification design using tobacco as a model of the expression system.

S8-P14***In vitro* regeneration of Cuban soybean variety
INCASOY-36**

Soto N, Ferreira A, Delgado C, Oliva O, Enríquez GA

Centro Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Soto N (natacha.soto@cigb.edu.cu)

The domain of a suitable methodology for genetic transformation of Cuban soybean (*Glycine max*) varieties could make possible the introduction of new agronomics characters and facilitate the expression of pharmaceutical molecules in this culture. However, the application of the genetic engineering methods for introduction of recombinant genes into soybean encountered poor regeneration and transformation efficiency for this plant. The objective of the present work is to establish an efficient regeneration protocol that could serve as start point to the transformation of Cuban varieties of soybean. For this purpose, we used different kind of explants. Embryos and cotyledonal nodes of mature seeds were the explants of choice to promote regeneration under specific culture conditions. We have evaluated the effect of different concentrations of BAP and the combination of BAP with IBA, as well as the stage of the explante to be taken for regeneration. The evaluation of the solidifying agent on callus proliferation and shoot regeneration was performed. The experimental data indicated that the frequency of shoots formation from cotyledonal nodes was higher in explants of 6 and 7 development days and achieved near 91-95%. It was observed also, a regeneration frequency of 86.3% from embryos.

S8-P15**Plantibody HB-01 extraction step optimization using different biomass-buffer proportion and pH**

Geada López D, Ferro W, Valdés R, Guevara Y, Álvarez T, Issac Y, Lescaille Y, González T, Wood M

Instituto de Investigaciones del Tabaco, San Antonio de los Baños, Cuba

AC: *Geada López D (deborah@iitabaco.co.cu)*

PHB-01 purification from tobacco plant biomass is concentrated in three stages: extraction, semipurification and chromatographic purification. Up to date, the greatest improvement efforts have been done in two last stages by its impact in cost, quality and vegetal contaminants elimination (purification factor). Nevertheless, the influence of different parameters in the extraction step on PHB-01 recovery, in order to achieve higher recoveries from initial steps, has not yet deeply studied. In this sense, previous studies concerning the influence of the extraction buffer composition showed that it has little influence on PHB-01 recovery in the extraction step. According to published literature, pH and extraction buffer/biomass ratio are indeed relevant to regulate total quantity of extracted soluble proteins but these were not considered due to the possible antibody denaturalization and high dilution of the molecule in the extract. In this work, we focused on the influence of these parameters as well as buffer composition on PHB-01 recovery. The evaluated parameters were pH (7.8, 5.9, 4.0), extraction buffer/biomass relation (0.4, 5.9, 10 mL/g) and the composition (PBS/ascorbic acid and Sodium citrate/citric acid/ascorbic acid). According to results the extraction with PBS/ascorbic acid a ratio of 5.2 and 10 mL/g biomass and pH 5.9 allowed an increase of 6 fold in PHB-01 recovery in the extraction step respect the current method, likewise it allowed a selective extraction of IgG respect total soluble proteins. As consequence this results make possible a productivity increase, which is useful taking account the low expression level of PHB-01 in these plants.

S8-P16**Approach on the expression of the recombinant antibody against the Hepatitis B surface antigen in tobacco plastid**

Barceló MT¹, Cabrera Artilés Y¹, Valdivia O¹, González A¹, Armas R¹, Ayala M²

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus, Sancti Spíritus, Cuba

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

AC: *Cabrera Artilés Y* (yeosvany.cabrera@cigb.edu.cu)

Recombinant monoclonal antibody targeted to major surface antigen of Hepatitis B virus (CB Hep.1) has been successfully synthesized in nuclear transgenic tobacco plants, although increased expression levels would make plant-expression of this antibody even more attractive. Plastids (chloroplasts) possess an enormous capacity to synthesize and accumulate foreign proteins. In order to increase the expression levels we explored the feasibility of plastid transformation technology to produce tobacco plants expressing CB Hep.1. We inserted antibody chain genes into *rbcl* and *accD* intergenic region of tobacco plastid DNA as a polycistronic unit. Generated transplastomic tobacco plants were homoplasmic but CB Hep.1 expression was undetectable by ELISA even when messenger RNA levels were higher than nuclear transformed plants. It indicates inefficient translation of antibody encoding sequences by organelle protein synthesis machinery. As alternative, we worked with less complex single chain antibody fragment of CB Hep.1 and similar results were obtained in tobacco transplastomic lines. Only when the first 47 residues of LpdA protein of *Neisseria meningitidis*, which have been shown to increase the expression of recombinant proteins in *E. coli*, were used as N-terminal tag to scFv CB Hep.1, the expression levels of this chimerical protein reached up to 2% of total soluble proteins. The increasing of scFv CB Hep.1 levels suggest a possible analogous effect of LpdA N-terminal sequence in prokaryotic descendant plastid, but the fusion abolished the biological activity of the antibody fragment.

S8-P17**Expression in seeds of a monoclonal antibody against the Hepatitis B surface antigen (anti-HBsAg)**

Rodríguez M¹, García N², Abreu D¹, Ramos O¹, Soto J¹, Pérez M¹, Tiel K¹, Armas R¹, Simón M¹, Oliva O¹, Ayala M¹, Gavilondo JV¹, Pujol M¹

¹ Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), P.O.Box 6162, Havana 10600, Cuba

² Faculty of Biology, University of Havana, 25 # 465, Vedado, Cuba

Recent advances in molecular biology and genetic engineering have provided efficient tools for gene expression in plants. The advantages of using plants as bioreactors include the absence of pathogens that affect humans and the production of a lot of biomass in short periods of time. To investigate the potential of seeds for production of recombinant proteins, we prepared a construct for the expression of a full monoclonal antibody against the Hepatitis B surface antigen (HBsAg). The Heavy and Light antibody chains were cloned into a constitutive plant expression vector which contains a B1 glutelin promoter and the cauliflower mosaic virus 35S terminator. Two subcellular signal sequences were used to accumulate the antibody in vacuole and endoplasmic reticulum organelles, respectively. Transgenic seeds from rice (*Oryza sativa* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) express biologically active the anti-HBsAg antibody

SIMPOSIO 9 / SYMPOSIUM 9

**Oportunidades de Negocios
en la Agro-biotecnología/
*AG-Biotechnology. Business Opportunities***

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S9-1**To have or not to have intellectual property, that is the question (*for better negotiation of biotechnology projects*). The Hamlet dilemma applied to project negotiation at the CIGB**

Raíces M¹, Silva R¹, Gil M¹, Acevedo B¹, García M¹, Martínez D¹, López Mola E¹, Selman M², Vázquez M², González S², Ubieta R²

¹Business and Project Development Department, CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

²Patent Department at CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: *Raíces M* (manuel.raices@cigb.edu.cu)

Support project negotiation by holding a solid intellectual property is becoming a key issue able to help research centers to fair business positioning once sitting in front of potential international partners. The Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB) has developed an integrate strategy for the right selection of projects open for international partnership that take into account intellectual property as a key element for positive selection together with other criteria as potential market to impact and scientific positioning of our teams compared with the international state of the art, all analyzed and shortly summarized in printed documents easy to read and wide visible at the CIGB business web site (<http://gndp.cigb.edu.cu>). This selective analysis is done in each specific project available for partnership. Some of our experiences and results are shared in this lecture

S9-2**Algae, Micro and Macro: from Food to Fuel»**

Benemann J

Benemann Associates. Institute for Environmental Management, Inc.
3434 Tice Creek Dr. No.1, Walnut Creek, CA 94595, USA

AC: *Benemann J (jbenemann@aol.com)*

Microalgae and Seaweeds (macroalgae) are presently produced commercially for high value products, mostly nutritional supplements for microalgae and food and chemicals from macroalgae. Microalgae are mass cultured in open ponds, in most cases with CO₂ fertilization in so-called high rate-ponds. Cultivation in closed photobioreactors has been extensively studied and some commercial facilities built, but these systems are not scalable and cannot compete with open ponds. Macroalgae are mostly cultivated near shore in somewhat sheltered areas, using various attachment and containment systems for different seaweed species. Some seaweeds are grown commercially in on shore ponds-the competitiveness of this technology remains to be established. Currently the production of seaweeds is in the order of 1 million tons globally, with bulk selling prices averaging about \$1,000/ton, while the global production of microalgae is only about 10,000 ton, with selling prices above \$10,000/ton dry weight. From this current base, the potential for greatly expanding algae mass cultivation can be considered. Conceptual processes have been proposed for both open ocean farming of seaweeds and large-scale open pond microalgae cultivation, mostly for biofuels production, often claiming novel applications of biotechnology. However, it is more plausible that practical applications will first come from evolutionary developments in algae technology and products, moving from specialty to larger volume products, in animal, particularly aquaculture, feeds. Although most applications are likely to be with saltwater, microalgae also have applications in fresh and brackish waters, in particular in wastewater treatment and nitrogen fertilizer production. Climate and other factors make Cuba an excellent location for algae macro- and micro-production.

S9-3**Animal Health Industry and Biotechnology opportunities****Bufala G**

Licensing & Acquisitions. Corporate Development. Virbac. France

AC: Bufala G (gbufala@virbac.fr)

The Animal Health Pharmaceutical Industry is looking for specific and tailor made developments in the field of Biotechnology .

Major objectives are:

- solving vaccine manufacturing constraints by avoiding processes with potential safety concerns for both the target animals and the environment
- supplying quick and reliable diagnostic tools in conjunction with marker vaccines
- finding affordable solutions for vaccinating against multiple infectious agents or against several pathogenic serotypes
- offering new therapeutical opportunities such as cytokines and synthetic peptides to an increasingly demanding Companion Animal market

Virbac was in 1982 the first Animal Health company to obtain a Marketing Authorisation for a genetically engineered vaccine , since then Virbac has managed several biotechnology projects in cooperation with public institutions and private companies the outcoming success and failure stories will be described and commented.

S9-4

**Oportunidades de negocio en la Agro-Biotecnología.
Un caso particular: ACUABIO 1 y la acuicultura
en España**

Navarro Echevarria T

Valcarcel & Asociados. Zurbano, 34-4o Derecha, 28010 Madrid, España

AC: Navarro Echevarría T (Tomas@valcarcel-asociados.com)

Resumen no disponible / Abstract not available

SIMPOSIO 10 / *SYMPOSIUM 10*

**Microorganismos para Biofertilización/
*Microorganisms as Biofertilizers***

Resúmenes de Conferencias / *Lecture Abstracts*

S10-1**Microorganisms can contribute to N and P nutrition necessary for agricultural food production.
A transdisciplinary view**

Ortega E, Rodés R, Fernández L

Facultad de Biología, UH, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Ortega E (eortega@fq.uh.cu)

It is necessary to put back the mineral nutrients extracted by crop plants from soils. The most extended practice to do that is by using chemical fertilizers. It has been calculated that world agriculture will use 120 and 60 million metric ton of nitrogen and phosphorus fertilizers in the period 2030-2040. Production and agricultural use of fertilizers have a high economical and environmental cost. Microorganisms (mainly bacteria and fungi) can contribute to plant mineral nutrition with nitrogen fixation, solubilization of soil low soluble phosphates and other process. Symbiosis between plants and nitrogen fixing bacteria, and between plants and mycorrhizal fungi, together with other less known like endophytic bacteria, are not thoroughly studied neither used in agricultural practice. A transdisciplinary praxis with participation of experts in agronomy, physiology, genetic, microbiology, chemistry, informatics, etc, with an compromised and dialectic way of thinking could make a significant contribution of Cuban Sciences to food production for our people. Examples, data and scientific evidences will be shown in order to induce a reflective and creative discussion.

S10-2**Phase variation in wild type and mutant strains of *Azospirillum brasilense***

Lerner A, Valverde A, Okon Y, Burdman S

Hebrew University, Rehovot, Israel

AC: Lerner A (anatlerner@hotmail.com)

Bacteria have developed mechanisms of phase variation to cope with environmental changes such as those existing in the soil rhizosphere. In phase variation the expression of a given gene is either in ON or OFF mode, which is usually reversible. This is a random event which occurs at high frequency and involves changes in the DNA. *Azospirillum* comprises free-living, nitrogen fixing, plant growth promoting rhizobacteria, which live in close association with plant roots. By secreting plant growth promoting substances azospirilla affect the morphology and physiology of the inoculated plant roots. The bacterial-plant interaction involves bacterial surface elements such as capsular polysaccharide (CPS), exopolysaccharide (EPS) and lipopolysacchride (LPS). Phase variants of *Azospirillum lipoferum* have been already described. In this research, phase variants of *A. brasilense* strain Sp7 were retrieved after exposure to different environmental stresses. The different variants were collected randomly and phenotypically characterized. Some of the variants gained cell aggregation abilities; some produced pink or yellowish pigments; and others overproduced exopolysaccharides. Using DNA fingerprinting methods, such as PFGE, REP-, ERIC-, BOX- and MBO-REP- PCR and analysis of EPS composition we analyzed the various variants. PFGE of *A. brasilense* Sp7 variant chromosomal DNAs revealed no differences in band pattern. However, REP-, ERIC-, BOX- and MBO-REP- PCR analysis revealed two distinct clusters. These clusters were clearly divided according to their cell aggregation abilities. In addition, Sp7 mutants and their phase variants were also tested and DNA rearrangements were also observed among them.

S10-3**Avances en el manejo efectivo de la simbiosis micorrízica en agrosistemas tropicales**

*Rivera R¹, Ruiz L², Sánchez C³, Riera M⁴, Fernández K¹,
Hernández-Zardón A¹, Plana R¹*

¹INCA, La Habana, Cuba

²IIRT, La Habana, Cuba

³Estación de Café, Jibacoa, Cuba

⁴Centro Universitario, Guantánamo, Cuba

AC: Rivera R (*rrivera@inca.edu.cu*)

En Cuba, en los últimos 10 años, se han logrado avances importantes en el conocimiento de los factores que determinan un manejo efectivo de la simbiosis micorrízica vía inoculación de cepas eficientes, en el desarrollo de productos que se aplican en bajas dosis y en sus vías de aplicación, todo lo cual ha permitido la utilización de estos a escala productiva en un grupo de importante de cultivos, suelos y modos de producción, de ninguna forma restringido a condiciones de marginalidad. Se presentan los principales componentes de este manejo relacionados con: la inoculación de los cultivos con cepas adecuadas por grupos de suelos, la baja especificidad cepa-cultivo, la influencia del suministro de fertilizantes minerales u orgánicos sobre la efectividad de la simbiosis, la aplicación conjunta con otros biofertilizantes, el manejo en secuencias de cultivos, entre otros. Se muestran resultados de campañas de validación de los biofertilizantes micorrízicos en diversos agrosistemas con incrementos en rendimientos entre 15 y 40%. La aplicación de los inoculantes micorrízicos vía recubrimiento se integra exitosamente con la maquinaria agrícola en sistemas de producción para grandes extensiones, así como en aplicaciones manuales para condiciones de agricultura de pequeñas extensiones. Se mencionan algunas de las principales tareas actuales, entre las que se encuentran la caracterización de cepas nativas, seguimiento y permanencia de las cepas inoculadas e interacción con las cepas nativas y otros microorganismos por tipo de suelo; el manejo en agrosistemas perennes; y el desarrollo y manejo de nuevos productos

S10-4**RIZOFOS, inoculante bacteriano para los cultivos de trigo y maíz**

Bach T

Instituto de Suelos, La Habana, Cuba

AC: Bach T (tbach@rizobacter.com.ar)

El Rizofos es un biofertilizante desarrollado entre el Instituto de Suelos de Cuba y la Empresa Rizobacter Argentina S.A. con bacterias específicamente seleccionadas de la especie *Pseudomonas fluorescens*. Las características exhibidas por estas bacterias, en estudios *in vitro*, revelan su procedencia rizosférica al poner de manifiesto muchas de las habilidades reconocidas a las PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*).

La aplicación de este producto estimula el crecimiento de los cultivos por la capacidad que tiene la bacteria de liberar sustancias biológicamente activas que le permiten participar en diferentes eventos metabólicos. En tal sentido, se estudió y evaluó en condiciones de laboratorio la eficiencia solubilizadora de fosfatos minerales y orgánicos (Pikovskaya, 1948; Gómez-Guiñán, 2004). Además, se determinó, utilizando las metodologías descritas por XII RELARE 2004, la capacidad de producir ácido indolacético (AIA), compuestos sideróforos, ACC deaminasa y β -1,3-glucanasa.

Actualmente, los productos Rizofos Liq Trigo y Rizofos Liq Maíz se comercializan en formulaciones líquidas, acompañados de un protector que permite la adherencia y supervivencia de la bacteria sobre las semillas. Las evaluaciones realizadas en numerosos ensayos a campo en condiciones de producción, permiten concluir que la aplicación de estos productos en las dosis recomendadas aumentan alrededor de 250-300 kg.ha⁻¹ y 600-800 kg.ha⁻¹ los rendimientos de los cultivos de trigo y maíz, respectivamente.

S10-5**The state of the art and perspectives of biofertilization in gramineous crops**

Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Wong-Villarreal A, Martínez-Aguilar L

Centro de Ciencias Genómicas, Cuernavaca, México

AC: Caballero-Mellado J (jesuscab@ccg.unam.mx)

Rhizobacteria are able to exert beneficial effects on plants and grain yield through various mechanisms, but their use as biofertilizers for gramineous crops is rather limited worldwide. Several countries in Latin America increased interest in the application of *Azospirillum* inoculants during the last few years. For instance, in Mexico, a large field-inoculation program (around 600,000 ha) for cereals, mainly maize, was carried out in 1999 through the Ministry of Agriculture Research Institute (INIFAP) in collaboration with the Nitrogen Fixation Research Center (presently Center for Genomic Sciences-UNAM). Due to positive results in 1999, the farmers demand for the biofertilizer reached about 1.5 million ha in 2000. During both years, the inoculation with *Azospirillum* showed consistent average yield increases of 29% in cereal crops under different levels of N and P fertilizers, soils and climatic conditions. Presently, a private company in Mexico sells a product for maize and other cereals, and its application has reached over 300,000 ha showing annual increases in maize. Companies in Uruguay and Argentina are developing products based on *Azospirillum* species. Some Latin-American countries in collaboration with European partners undergo research programs for biofertilizers application. Our research team at UNAM has identified novel N²-fixing *Burkholderia* species associated with important crop plants. These bacteria exhibit desired abilities such as nitrogen fixation, insoluble inorganic phosphates solubilization, production of phytohormones, and ACC deaminase activity. Studies on the use these species as biofertilizers for gramineous crops are in progress.

S10-6**Promotion of plant seed germination and seedling growth by Reclafil™, a microbial biofertilizer**

Ibrahim M, Bulla LA

Biological Targets, Inc., Univ of Texas, Texas, USA

AC: Ibrahim M (labulla@biologicaltargets.com)

Reclafil™ is a 100% organic product that contains a pure culture of a unique, natural soil bacterium that produces distinctive polysaccharides. It improves the physical structure of soil by binding fine particles to form stable aggregates that have better water- and nutrient-holding capacities. Reclafil™ enriches biodiversity, provides a natural environment with increased surface area onto which more water molecules can adhere and improves soil structure overall. The formation of stable soil aggregates also creates gaps and pores for air and water movement into and through the soil and promotes plant growth by providing channels for root growth and seed germination. Reclafil™ has been tested with a variety of plants, including maize, pinto beans and Bermuda grass. When seeds of all three plants were cultivated in soil amended with Reclafil™, seed germination rates increased by approximately 20% and seedling growth increased by more than 200% as determined by leaf or shoot size, stem radius and root mass and volume. Furthermore, Reclafil™ dramatically increased the harvest rate of lettuce salad heads in a commercial organic farm operation. The positive effect of Reclafil™ is attributed to its capacity to provide improved organic texture of soil and to support its physical structure, thus providing a biologically-sustained environment in the soil.

S10-7**Fructan metabolism in the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus***

Menéndez C, Arrieta JG, Trujillo LE, Ramírez R, Banguela A, Hernández L

CIGB, Ciudad Habana, Cuba

AC: Menéndez C (carmen.menendez@cigb.edu.cu)

The nitrogen fixer *Gluconacetobacter diazotrophicus* depends on a secreted levansucrase (LsdA) to utilize plant sucrose. During sucrose transformation, LsdA releases glucose as the assimilable energy source and synthesizes the polyfructan levan, which may be hydrolyzed under starving conditions by the action of a fructose-releasing exolevanase (LsdB). The *lsdA* and *lsdB* genes form an operon. The first gene is expressed constitutively, but *lsdB* transcription is induced at relatively low fructose concentrations and repressed by glucose. LsdA and LsdB are transferred to the periplasm by the signal-peptide-dependent Sec system, while the type II protein secretory machinery is required for the enzymes translocation across the outer membrane. The type II operon encodes twelve components with an unusual gene organization. Although the *lsdA-B* and type II operons are functionally connected neighbors in the *G. diazotrophicus* chromosome, they appear to have a different evolutionary history. We will discuss a tentative role of the levansucrase-levanase system for the bacterium endophytic interaction with the host plant and its ability to temporarily survive in the soil.

S10-8**RIZOBACTER ARGENTINA S.A. Empresa líder en el mundo de la biotecnología agrícola****Yapur R**

Rizobacter Argentina SA., Buenos Aires, Argentina

AC: *Yapur R (ryapur@rizobacter.com.ar)*

Rizobacter Argentina S.A., empresa fundada hace 31 años se dedicó, desde sus inicios, a la biotecnología aplicada a través de comercialización de inoculantes para soja y leguminosas forrajeras. Se desempeña en el mercado argentino cubriendo más de un 30% del área sembrada con soja y exporta sus productos a distintos países de Latinoamérica, Estados Unidos y China.

Desde hace 10 años está incursionando, a través de un convenio con el Instituto de Suelos de Cuba, en la investigación y desarrollo de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, específicamente con bacterias del género *Pseudomonas* para ser aplicadas a distintos cultivos como trigo, maíz y caña de azúcar. Este hecho abre un mercado potencial de incalculable valor, no solo por facilitar el desarrollo de alimentos para Argentina y el mundo, sino también porque puede apoyar el desarrollo de los biocombustibles, como alternativa de fuentes energéticas.

El contacto permanente y el intercambio tecnológico constante con los principales centros de investigación y desarrollo nacionales e internacionales, hace que la empresa opere con un sistema de gestión de calidad, avalado por la certificación de la norma internacional ISO 9001:2000, un riguroso esquema de controles preventivos, complementado con su laboratorio de aseguramiento de calidad dotado de la más alta tecnología disponible.

SIMPOSIO 10 / SYMPOSIUM 10

**Microorganismos para Biofertilización/
*Microorganisms as Biofertilizers***

Resúmenes de Carteles / *Poster Abstracts*

S10-P1**Fructose-inducible transcription and signal-peptide-dependent secretion of exolevanase (LsdB) in *Gluconacetobacter diazotrophicus***

Menéndez C, Banguela A, Hernández L

CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Menéndez C (carmen.menendez@cigb.edu.cu)

The endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* converts sucrose into the $\beta(2,6)$ -linked polyfructan levan by the action of a constitutively expressed levansucrase (LsdA, EC 2.4.1.10). Downstream of *lsdA*, a second gene encodes a fructose-releasing exolevanase (LsdB, EC 3.2.1.65). In this study, transcriptional analysis by reverse transcriptase-PCR demonstrated that the two genes constitute an operon. Contrary to *lsdA*, the transcription of *lsdB* was dependent on carbon source availability. Cell growth on fructose concentrations below 33 mM induced the formation of the bicistronic mRNA. Fructose activation of *lsdB* transcription was inhibited by glucose indicating the incidence of a dual transcriptional control mechanism governed by carbon catabolite repression. Protein sequencing revealed that LsdB is synthesized as a precursor protein with an N-terminal signal peptide which is cleaved off during transport to the periplasm. *G. diazotrophicus* mutants defective in the downstream type II secretion operon failed to transfer the folded periplasmic LsdB across the outer membrane.

S10-P2**Interaction between the nematocidal bacterium *Tsukamurella paurometabola* C924 and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus fasciculatum* and *Glomus clarum* in lettuce (*Lactuca sativa* L.) rhizosphere**

Marín M, Mena J, Franco R, Pimentel E, Sánchez I

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Camagüey, Cuba

AC: Marín M (marieta.marin@cigb.edu.cu)

The study of fungal-bacterial interactions in soils is not only interesting from a basic point of view but has also yielded findings of societal and economical relevance, such as in the application of biological controls of plant diseases. This study evaluated the effect of *Tsukamurella paurometabola* C924, a bacterium with nematocidal action isolated from banana rhizosphere, as single inoculant or combined with arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus fasciculatum* and *Glomus clarum* in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Controls included non-bacteria non-AM fungi, and each AM fungi specie alone. Five replicates were used. AM fungi did not show any influence neither in *T. paurometabola* C 924 UFC counts in soil, nor over its phenotypic nematocidal characters. On the other hand the bacterium stimulated AM colonization for both fungi species as well as early infection. Combined inoculation improved significantly fresh weight of plants as compared with the microorganisms singly or the non inoculated control. It is concluded that *T. paurometabola* C 924 interaction with *G. fasciculatum* or *G. clarum* promotes plant growth and these microorganisms can be used for combined inoculations in agriculture.

S10-P3**Isolation and identification of native arbuscular mycorrhizal fungi in polluted soils by heavy metals**

Zarei M¹, Salehi Jouzani G¹, Saleh Rastin N², Khayam Nekouie SM², Savaghebi G¹, Buscot F³, Akbari S²

¹Department of Soil Science Engineering, University College of Agriculture and Natural Resources, Uni, Karaj, Iran

²Department of Microbial Biotechnology and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran

³UFZ Center for Environmental Research, Department of Soil Ecology, Halle, Germany

AC: Salehi Jouzani G (gsalehi@abrii.ac.ir)

In order to study the variations in spore abundance, root colonization parameters and morphological and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and their relationships with the properties of soils that were naturally polluted with different levels of heavy metals, 35 plots in the Anguran Zn and Pb mining region were selected. The ITS-rDNA of AMF in root DNA extracts of some native plants at different levels of both heavy metals (HMs), amplified with the primer pair LSU-Glom1/SSU-Glom1 as specific primer for AMF and ITS4/ITS5 as general primers in the first and second reactions of PCR (nested PCR), respectively. *Glomus*, including *Glomus mosseae*, *G. intraradices* and *G. versiforme*, was the dominant genus in all plots. *G. mosseae* was the taxon most commonly observed in different plots, with higher spore density and relative abundance at high level of HMs pollution. Correspondence analyses showed that with the increase in HMs contamination, the number of AMF sequence types colonizing the roots decreased.

S10-P4**Caracterización y selección de cepas de *Bacillus* para la promoción del crecimiento en el cultivo del arroz**

Rojas MM, Tejera B, Larrea JA, Heydrich M

Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba

AC: Rojas M (marcia@fbio.uh.cu)

El presente trabajo muestra el aislamiento y la caracterización de bacterias del género *Bacillus* provenientes de la rizosfera del cultivo del arroz (*Oryza sativa*) variedad J-104 utilizando el modelo microcosmos. Se realizaron, además, aislamientos directos del suelo que se encontraba cultivado con la variedad LP-5. Se llevó a cabo la caracterización fisiológica de los aislados en cuanto a la producción de compuestos indólicos, metabolitos del tipo sideróforos, la capacidad de solubilización de fosfatos y la determinación cualitativa de la fijación de nitrógeno. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se seleccionaron a través de un análisis de conglomerado (*cluster*) los aislados más promisorios. Las cepas seleccionadas se conservaron en el cepario del Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Biología, con vistas a la determinación *in vivo* de sus potencialidades como promotoras del crecimiento vegetal en este cultivo agrícola.

S10-P5**La biofertilización de cereales: una alternativa económica y ambiental para la agricultura de Cuba**

Bécquer CJ¹, Salas B¹, Álvarez O¹, Ramos Y¹, Quintana M¹, Ávila U¹, Palmero LA¹, Nápoles JA¹, Ulloa L¹, Archambault D²

¹Estación Experimental de Pastos y Forrajes, Sancti Spíritus, Cuba

²Alberta Research Council, Vegreville, Canadá

AC: *Bécquer C (becquer@pastos.yayabo.inf.cu)*

Se realizaron dos experimentos de inoculación en invernadero y tres en fase de campo para evaluar los parámetros agroproductivos de trigo y maíz (invernadero y campo); así como de sorgo (campo), inoculados con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (rizobios), procedentes de ecosistemas ganaderos de Cuba con el fin de seleccionar las cepas más promisorias para su aplicación en la práctica agrícola. Para todos los experimentos se utilizaron cepas comerciales y cepas nativas cubanas. Los experimentos de campo fueron conclusivos ya que en estos se seleccionaron aquellas cepas que pueden ser incluidas en la práctica agrícola de Cuba, en condiciones edafoclimáticas similares a las utilizadas en los experimentos. Se utilizaron variedades cubanas y canadienses de trigo y de maíz en dependencia de las condiciones experimentales y una variedad cubana de sorgo. Se aplicaron materiales y métodos en invernadero y campo según metodologías preestablecidas internacionalmente, así como un diseño experimental y análisis estadísticos apropiados. Se concluye que tanto en los experimentos de invernadero y de campo, en trigo y maíz; y de campo, en sorgo, se destacaron los tratamientos más eficientes sobre las variables estudiadas, donde sobresalieron aquellos tratamientos inoculados con cepas nativas cubanas, las cuales son recomendadas para su aplicación en la práctica agrícola del territorio. Se constató en esta investigación, además, un ahorro de divisas libremente convertible por la utilización mínima de fertilizantes industriales, así como el potencial de mejoramiento o conservación del medio ambiente, al utilizar productos biológicos sanos en la nutrición de las plantas.

S10-P6**Promoción de crecimiento en maíz por aislados de bacterias metolitróficas**

Martínez Montiel N¹, Bustillos Cristales R¹, Sánchez Saavedra A²,
Téllez Torres G², Ramírez Fuentes LE¹

¹CICM-ICUAP, BUAP, Puebla, México

²Escuela de Biología, BUAP, Puebla, México

AC: Martínez Montiel N (nancy_mtzm@hotmail.com)

Entre los resultados de las interacciones de bacterias benéficas asociadas a plantas recurrentemente se ha observado la promoción del crecimiento vegetal. La inoculación de estos cultivos produce distintos efectos en el hospedero como incremento en el crecimiento; resistencia a condiciones ambientales adversas; y reducción de la incidencia a enfermedades. Estos efectos se han observado en interacciones entre distintos grupos vegetales con muy diversos taxones bacterianos, entre los que destacan las bacterias metilotróficas con su característica principal de utilizar metanol como fuente de carbono y energía, para lo cual requieren una enzima llamada metanol deshidrogenasa (MDH) que codifica el gen *mxoF*. Las metilotróficas son ubicuas en la naturaleza, tienen la capacidad de colonizar una amplia variedad de cultivos, su presencia puede ser benéfica para la planta por la producción de ácido indol acético (IAA), citocininas, vitamina B12 o la fijación biológica de nitrógeno entre otros mecanismos de promoción de crecimiento. Varios aislados de bacterias metilotróficas obtenidos previamente de las regiones epífita, endófito y rizosférica de las plantas *Echinocactus platyacanthus*, *Pseudomonas fluorescens* (cactáceas) fueron probados como promotores de crecimiento inoculándolos en maíz «criollo», estos fueron preliminarmente identificados como metilótrofos por la presencia del gen *mxoF* en su genoma. De los resultados de la inoculación se obtuvieron diferentes cepas que favorecieron ciertos parámetros como la altura o el diámetro de la corona, de manera particular destacan dos cepas que mostraron resultados estadísticamente significativos mayores a los del control, estos fueron aislados e identificados por su secuencia como *Curtobacterium* sp. y *Lysinibacillus sphaericus*.

S10-P7**Influencia de algunos factores edáficos sobre la eficiencia de inoculantes en soya**

Nápoles García MC¹, Gómez G², Varela M¹, Cabrera JC¹,
González-Anta G¹, Ferreira A², Nogueras F², Cricco J²

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas, Cuba

²Empresa Rizobacter-Argentina, Pergamino, Argentina

AC: Nápoles García M (tere@inca.edu.cu)

La producción de soya en el cono sur es responsable de aproximadamente 50% de la producción mundial de esta oleaginosa y se desarrolla en ambientes edafoclimáticos muy diversos desde el sur de la región pampeana en Argentina hasta la región del Cerrado en Brasil. Es reconocida que la alta demanda de nitrógeno del cultivo es mayoritariamente cubierta a partir del proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico mediante la simbiosis entre la leguminosa y los rizobios. La eficiencia de este proceso está condicionada por diversos factores, fundamentalmente por el papel que desempeña cada uno de los participantes en esta interacción: el suelo, la planta y el microorganismo. En este trabajo se evalúa el efecto que ejercen algunos factores del suelo como el pH, contenido de fósforo disponible, contenido de materia orgánica, nitratos y población de *Bradyrhizobium*, así como dos inóculos que difieren en el contenido de factores de nodulación, sobre los rendimientos del cultivo de soya en diferentes regiones de Argentina. Se evaluó la calidad de los inoculantes empleados mediante la determinación del contenido de factores de nodulación y su posterior efecto sobre los rendimientos del cultivo. Un análisis cruzado de estos factores demostró que aunque todos inciden, solo el pH, la población de *Bradyrhizobium* existente y la calidad del inoculante empleado ejercen un efecto significativo sobre los rendimientos. Las plantas crecidas sobre suelos con pH ácido y una escasa población de bacterias, que fueron inoculadas con un alto contenido de factores Nod, mostraron mayores rendimientos.

S10-P8**Phenotype characterization of *Azospirillum brasilense* SP7 ABC transporter (WZM) mutant**

Lerner A, Okon Y, Burdman S

Hebrew University, Rehovot, Israel

AC: Lerner A (anatlerner@hotmail.com)

Azospirilla are free-living, nitrogen fixer, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) that live in close association with plant roots. These bacteria are able to exert beneficial effects on plant growth and yield of many crops of agronomic importance. Plant growth promoting substances produced by the bacteria seems to be at least partially responsible for these effects. *Azospirillum* cells are surrounded by a thick, dense, and tightly cell-bound layer of capsular polysaccharide (CPS) and by an outer lighter exopolysaccharide (EPS) layer bound to the cell. The EPS is involved in the attachment of *Azospirillum* to the plant root. Several genes involved in the *Azospirillum brasilense*-plant root interaction are carried on a 90 MDa plasmid called p90. p90 carries also genes involved in motility, adsorption to roots, colony morphology and genes belonging to the glycosyl- or mannosyl transferase, sugar dehydratase families and genes involved in the ABC transporter-dependent pathway (*wzm* and *wzt*). These ATP binding cassette (ABC) superfamily transporters (or traffic ATPases) are frequently involved in the translocation of complex carbohydrates across the cytoplasmic membrane. An *A. brasilense wzm* mutant was generated and its phenotype in comparison with the wild type strain Sp7 was evaluated. The *wzm* mutant was more resistance to heat, osmotic shock, osmotic pressure, desiccation and starvation but was more sensitive to elevated levels on NaCl, UV radiation and hydrogen peroxide. Differences in sensitivity to antibiotics and growth on different carbon sources were observed between the two strains. The *wzm* mutants also exhibited changes in cell morphology and motility.

S10-P9**Caracterización molecular de la comunidad de hongos formadores de ectomicorrizas para el establecimiento de inóculos en plantaciones de *Abies religiosa***

Ramos-Fernández A, Noa Carrazana JC, Flores-Estévez N, Andrade-Torres A, Jácome-Camacho JD

Universidad Veracruzana, INBIOTECA, Xalapa, México

AC: Noa Carrazana J (jnoa@uv.mx)

El bosque de *Abies religiosa* comúnmente llamado oyamel en el Cofre de Perote, Veracruz, México, suma un total de 1 145 ha distribuidas en forma discontinua, donde se presenta entre los 2 800 y 3 600 msnm. Entre las especies de hongos más comunes formadoras de ectomicorriza se encuentran los Basidiomicetos: *Amanitaceae*, *Boletaceae* y *Russulaceae*. Diversos factores afectan el establecimiento de las plantaciones forestales haciendo que los ingresos netos no sean positivos. Entre estos factores se encuentran los inóculos de hongos formadores de ectomicorrizas (HEM), los que en la mayoría de los casos constituyen insumos importados y no aislados, y generados en los propios sitios de orígenes de las especies a plantar. El presente trabajo reúne evidencias taxonómicas, ecológicas y moleculares de la comunidad HEM del Cofre de Perote, Veracruz, México y sugiere el uso de la Colección de Referencia del Laboratorio de Organismos Simbióticos del INBIOTECA, como fuente de inóculo para el establecimiento de plantaciones y la regeneración natural. Los resultados de la caracterización molecular de las especies estudiadas a través ADNr nos permite determinar con efectividad que especies se asocian al oyamel y tener un mayor entendimiento de las relaciones entre estas especies. Así como de disponer de métodos analíticos para asegurar la presencia de inóculos de ectomicorrizas en paquetes biotecnológicos propios del país. El grupo de trabajo agradece a los Fondos SEP-CONACYT, México, a través del proyecto No.61530.

ÍNDICE DE AUTORES / AUTHOR INDEX

A

- ABABACAR N, 238
ABAD MÁRQUEZ Z, 54, 75
ABAD Z, 71, 72
ABADÍA B, 159
ABEIJÓN MUKDSI C, 253, 264
ABELED0 MA, 179
ABREU D, 288, 289, 346
ACEBO-GUERRERO Y, 285, 309
ACEVEDO AM, 141
ACEVEDO B, 348
ACOSTA A, 104, 109
ACOSTA J, 42, 43, 48, 58, 73, 74
ACOSTA M, 206
ACHADE C, 206
ADIL A, 327
AGUDO L, 130
ÁGUILA A, 125
ÁGUILA JC, 48, 73
AGUILAR FIGUEREDO A, 147, 156, 158
AGUILAR NAVARRO B, 333
AGUILAR-HERNÁNDEZ S, 235
AGUILERA-MUÑOZ F, 61, 68
AKBARI S, 364
ALAMISAEED K, 277
ALAYÓN S, 91
ALDANA C, 226, 247
ALFONSO D, 221
ALFONSO P, 106, 113, 157, 179
ALFONSO P, 86
ALMAGUER L, 310
ALMAGUER-CHÁVEZ M, 285
ALOR-CHÁVEZ M, 243
ALVARADO Y, 206
ALVARADO-FABELA D, 252
ALVARADO-GUTIÉRREZ A, 312
ÁLVAREZ A, 336
ÁLVAREZ I, 300
ÁLVAREZ M, 80
ÁLVAREZ O, 366
ÁLVAREZ T, 337, 341, 344
AMADDEO D, 175
ANDRADE-TORRES A, 370
ANDREW C, 327
ANDUNI GJ, 248, 249
ANGELO K, 327
APÁS AL, 258
ARAGÃO FJL, 320, 328
ARCE HERNÁNDEZ LL, 165, 176
ARCHAMBAULT D, 366
ARENA ME, 258
ARENA ORTIZ ML, 82
ARENAL A, 54, 60, 67, 69, 71, 72, 75,
225, 257
ARIAS S, 312
ARMAS R, 280, 288, 332, 345, 346
ARRIETA JG, 221, 240, 255, 263, 359
ARZOLA M, 206
ASCANIO E, 91
ASCUNSE DEL SOL G, 237
ASTOU D, 238
ASTUYA VILLALON A, 70
ÁVILA ALBA T, 210, 212
ÁVILA T, 209
ÁVILA U, 366
AYALA M, 335, 336, 345, 346
AYRA C, 216

AYRA-PARDO C, 172, 178, 180, 267,
294, 295, 298

B

B AGUILAR M, 64
 BACALLAO MARRERO E, 121
 BACH T, 356
 BALTRUSCHAT H, 190
 BANGUELA A, 254, 255, 359, 362
 BARCELÓ MT, 332, 345
 BARCELÓ PÉREZ V, 163
 BARDOR M, 322
 BARÓ ROBAINA Y, 310
 BARRERA M, 113, 114, 134, 157
 BARRERA M, 86
 BARRERA VALLE M, 103, 129
 BASILE J, 307, 316
 BASULTO R, 54
 BÉCQUER CJ, 366
 BECHARA G, 105
 BECHARA GH, 85
 BEIRO O, 173, 174
 BENAVIDES E, 84
 BENEMANN J, 349
 BENEZER-BENEZER, 204
 BENINTEDE G, 272, 307, 316
 BERNAL A, 154
 BERNAL VILLEGAS J, 276
 BESADA V, 43, 48, 58, 96, 330
 BETANCOURT A, 134
 BETANCOURT L, 330
 BIRCH P, 183
 BLANCO R, 114
 BOCOURT SALABARRÍA R, 231, 241

BOLÍVAR B, 297
 BOLÍVAR PEÑA BA, 319
 BORGES G, 310
 BÓRQUEZ R, 246
 BORRÁS O, 208
 BORRÁS-HIDALGO O, 178, 189, 198, 215,
216, 217, 218, 294
 BORRELL A, 42
 BORROTO C, 54, 60, 109, 142,
280, 281, 335, 336
 BORROTO I, 42
 BORROTO J, 334
 BORROTO NORDELO C, 110, 172, 178, 180
 BRANDLE J, 88
 BRANDLE JE, 325
 BREM G, 152
 BRIDG H, 283
 BRIZUELA MA, 225, 240
 BROWN K, 88
 BUENO G, 225
 BUFALA G, 350
 BULLA JR. LA, 268
 BULLA LA, 358
 BURDMAN S, 185, 354, 369
 BURROLA E, 239
 BUSCOT F, 364
 BUSTILLOS CRISTALES R, 367

C

CABALLERO A, 141, 142
 CABALLERO-MELLADO J, 357
 CABEZAS A, 112, 143
 CABRA SM, 226, 247
 CABRAL ARELLANO FJ, 201, 203, 256
 CABRERA ARTILES Y, 345

- CABRERA G, 322, 336
CABRERA JC, 214, 368
CABRERA Y, 332
CALERO R, 137
CALLARD D, 205, 281, 306
CAMACHO POZO M, 333
CAMPO PIPAON E, 160
CAMPS D, 225
CANALES E, 200, 215, 338
CANO MEDINA T, 305
CAPDESUÑER Y, 317
CAPO V, 120
CAPOTE I, 296
CARBALLO O, 173, 174
CÁRDENAS G, 248, 249
CÁRDENAS Y, 124, 125
CARDOZO CERQUERA JA, 136
CARDOZO J, 159
CARDOZO JA, 135, 247
CARLOS G, 302
CARMENATE GERMÁN IH, 176
CARO VELARDE F, 197
CARPIO Y, 42, 43, 45, 48,
58, 73, 76, 138
CARRASCO VELAR R, 137
CARRERAS B, 310
CARRERO R, 140
CARRETO JJ, 133
CARRILLO FARNÉS O, 63
CARRILLO-TRIPP J, 311
CARVAJAL F, 226, 247
CASAS S, 300
CASTAÑEDA J, 340
CASTAÑEDA JM, 173, 174
CASTELL S, 86
CASTELLÓN MDC, 300
CASTILLEJO MA, 315
CASTILLO CAMPO LF, 46
CASTILLO Y, 239
CASTLE D, 282
CASTRO E, 246
CASTRO M, 95
CASTRO MDC, 338
CASTRO-MERCADO E, 204
CERDA LF, 236
CERON SALAMANCA JA, 273
CÉSPEDES C, 45
CÉSPEDES M, 209, 210, 212
CIABATTI I, 175
CISNEROS LDR, 339
CLAURE T, 209
CLAVIJO A, 88
CLOUTIER C, 278
COLAS CHÁVEZ M, 121
COLMENARES ESQUEDA M, 314
COLMENARES M, 302
COLL F, 208, 214, 293
COLL J, 334
COLL Y, 208, 293
COMPANIONI B, 206
CONCEPCIÓN O, 292, 334
CONCHA J, 230
CONDE A, 337
CONLEY A, 88
CONSTANZA N, 109
CONTRERAS D, 127
CONTRERAS MC, 236
CORAL MEDINA AR, 135, 136
COREA DE LA ROSA A, 121
CORONA B, 115, 138

CORONA-CRUZ A, 242
 CORRALES F, 125
 CORREA H, 234
 CORTÉS HERMOSILLO JJA, 201, 203, 256
 COTO VALVERDE E, 275
 COZZI J, 272
 CREMATA JA, 149, 322, 336
 CRESPO JA, 298
 CRESPO ROMERO JA, 198
 CRICCO J, 368
 CHAB-GARCÍA CL, 243
 CHACÓN CHACÓN O, 198
 CHACÓN J, 91
 CHACÓN O, 208, 215, 216, 218
 CHÁVEZ CALVILLO G, 82
 CHÁVEZ MA, 96
 CHÁVEZ MDC, 339
 CHIAPPETTA L, 168
 CHIONG M, 101, 106, 112, 154

D

D'AOUST M-A, 323
 DALLA VEDOVA L, 324
 DAMAS T, 45
 DAQUINTA M, 296
 DÁVILA COSTA MDL, 248
 DE ANDRADE G, 105
 DE LA TORRE D, 71
 DE LA VEGA OLIVAS J, 144
 DEL PRETE F, 66
 DEL REAL-MONROY M, 312
 DEL TORO Y, 127
 DEL VECCHIO R, 105
 DELGADO C, 343
 DELGADO G, 225

DELGADO I, 80
 DELGADO M, 288, 289
 DENIS GARCÍA R, 160
 DENIS R, 154
 DIALLO B, 309
 DÍAZ A, 338
 DÍAZ ARCHER D, 110
 DÍAZ DE ARCE H, 118, 119, 141, 142
 DÍAZ DE ARCE LANDA H, 90
 DÍAZ F, 64
 DÍAZ FLEISCHER F, 305
 DÍAZ J, 96
 DIAZ M, 74
 DÍAZ SOLARES M, 195
 DÍAZ Y, 72
 DÍAZ-ARCHER D, 157
 DIOSDADO E, 214
 DOMÍNGUEZ A, 202
 DOMÍNGUEZ I, 177
 DOMÍNGUEZ Y, 173, 174
 DORESTE V, 281
 DOWLING A, 270
 DU PLESSIS B, 126
 DUEMMER E, 340
 DUPLAT L, 166
 DURAN ROMÁN L, 275
 DURÁN S, 91

E

ECHIVARRÍA S, 315
 ECHEVERRI A, 297
 ECHEVERRI FRANCO AM, 319
 ECHEVERRIA P, 59
 EISENREICH R, 283
 EL JAZIRI M, 309

EMAM M, 123
ENGELS M, 129
ENRÍQUEZ G, 216, 338
ENRÍQUEZ GA, 343
ERENTAL A, 199
ESCALANTE-ROMERO E, 235
ESCALIER P, 233
ESPARZA IBARRA EL, 201, 203, 256
ESPINOSA G, 76
ESTEVE NUEZ T, 169
ESTRADA GARCÍA MP, 177
ESTRADA MP, 42, 43, 44, 48, 52, 54, 55,
58, 60, 62, 73, 74, 75, 76

F

F SALAMONE D, 148
FARIÁS ME, 259, 260
FARNÓS O, 101, 102, 105,
106, 113, 143
FAYE L, 323
FEDERICI BA, 269
FERNÁNDEZ E, 101, 102, 106, 113,
143, 310, 355, 353
FERNÁNDEZ-LARREA O, 310
FERNÁNDEZ M, 130
FERNÁNDEZ MARTÍN R, 148
FERNÁNDEZ MT, 233
FERNÁNDEZ SANTISTEBAN MT, 303
FERNÁNDEZ-PARLÁ Y, 294, 298
FERREIRA A, 343, 368
FERRO W, 337, 341, 342, 344
FRENCH-CONSTANT R, 270
FIALLO-OLIVÉ E, 207, 311
FIGUEROA E, 77, 79
FIGUEROA VALVERDE J, 49, 50

FLACHMANN R, 283
FLORES AC, 236
FLORES BERRIOS E, 197
FLORES ESTÉVEZ N, 196, 305, 370
FLORIO J, 130
FODOR J, 190
FOLCH VILCHES H, 49
FORTE MIRANDA CR, 65
FRAGA A, 139
FRAGA J, 120
FRAGA MURGADO F, 97
FRAGA R, 173, 174, 233
FRAIRE-VELÁZQUEZ S, 312
FRANCE A, 290
FRANCO R, 60, 67, 69, 257, 363
FRANCONI R, 318, 324
FRIAS JR, 59
FRÍAS LEPOUREAUX MT, 90
FRÍAS MT, 86, 118
FRISCINA A, 168
FUENTES A, 205, 281
FUENTES AD, 306
FUENTES ALFONSO L, 202
FUENTES D, 154
FUENTES E, 80
FUENTES LS, 297
FUMERO DURÁN JE, 133
FUNDORA SÁNCHEZ O, 160
FUSCO C, 175

G

GADEA R, 91
GALINDO J, 239
GALLARDO C, 53
GALLARDO-ESCÁRATE C, 61, 68, 70

- GANCEDO C, 96
GANDOLFF DOVO LCE, 176
GARCÉS K, 59
GARCÉS R, 59
GARCÍA FUMERO AJ, 121
GARCÍA H, 200, 215, 338
GARCÍA M, 348
GARCÍA MUÑIZ E, 172, 177
GARCÍA N, 346
GARCÍA P, 202
GARCÍA R, 161
GARCÍA SÁNCHEZ LK, 262
GARCÍA SANTOS L, 163
GARCÍA SANTOS LL, 176
GARCÍA-GARIBAY M, 242
GARCÍA-MUÑIZ E, 179
GARCÍA-PINEDA E, 204
GARRIDO NICOT Y, 128
GARRIDO Y, 125
GASPAR R, 196
GAUFFIN CANO MP, 251, 264
GAUFFIN CANO P, 253
GAVILONDO JV, 335, 336, 346
GAXIOLA CORTES G, 82
GAXIOLA G, 63
GEADA D, 291, 337, 341, 342
GEADA LÓPEZ D, 344
GERDING M, 290
GHISLAIN M, 191
GIBBONS A, 148
GIL DF, 96, 102
GIL J, 330
GIL M, 348
GIMÉNEZ ALVARADO C, 314
GODÍNEZ O, 133
GOIRE I, 303
GOLLAS-GALVÁN T, 76
GÓMEZ G, 368
GÓMEZ L, 341
GOMORD V, 323
GONZÁLEZ A, 155, 332, 345
GONZÁLEZ AI, 202
GONZÁLEZ ALFARO K, 78
GONZÁLEZ CORTÉS N, 244, 304
GONZÁLEZ D, 142
GONZÁLEZ E, 216
GONZÁLEZ EM, 106, 336
GONZÁLEZ FERNÁNDEZ N, 308
GONZÁLEZ HRM, 120
GONZALEZ I, 45
GONZÁLEZ L, 194
GONZÁLEZ LJ, 330
GONZÁLEZ M, 246
GONZÁLEZ MARTÍNEZ S, 97
GONZÁLEZ MC, 217
GONZÁLEZ N, 100, 111, 239, 301
GONZÁLEZ O, 42, 55, 58
GONZÁLEZ PÉREZ M, 333
GONZÁLEZ POSE A, 99, 103, 110
GONZÁLEZ R, 54, 71, 72, 75
GONZÁLEZ S, 140, 202, 250, 251,
253, 258, 264, 348
GONZÁLEZ SF, 236
GONZÁLEZ SN, 227
GONZALEZ T, 291, 303, 306,
337, 341, 344
GONZÁLEZ V, 45
GONZÁLEZ Y, 96, 102
GONZÁLEZ-ANTA G, 368
GONZÁLEZ-CORTÉS N, 222, 235, 243

GONZÁLEZ-PRIETO JM, 313
GOULET M-C, 278
GREISER-WILKE I, 89
GRIKO N, 268
GROSS A, 193
GROSSI-DE-Sa MF, 271
GUERRA T, 127
GUERRERO-GERMÁN P, 94
GUEVARA Y, 337, 341, 344
GUSILS C, 248, 249, 250, 251
GUSTA M, 282

H

HAMMOND-KOSACK K, 188
HANSON J, 224
HANSSON M, 224
HARES M, 270
HARRACH BD, 190
HARVEY DJ, 149, 322
HAUSSMANN BIELEFED D, 49, 50
HELGUERA Y, 58
HERNÁNDEZ A, 279, 280, 303, 336
HERNÁNDEZ F, 111
HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ J, 276
HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ JA, 227, 319
HERNÁNDEZ GR, 113
HERNÁNDEZ I, 218
HERNÁNDEZ J, 297
HERNÁNDEZ L, 220, 221, 232, 240, 254,
255, 263, 359, 362
HERNÁNDEZ M, 315, 317, 334
HERNÁNDEZ PÉREZ R, 196
HERNÁNDEZ RM, 214
HERNÁNDEZ Y, 115, 116, 291
HERNÁNDEZ-LÓPEZ J, 76

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ A, 285, 309
HERNÁNDEZ-ZARDÓN A, 355
HERRERA F, 43, 45, 48, 55,
58, 73, 74, 111
HERRERA MIYARES F, 177
HERRERA VERA P, 160
HEYDRICH M, 365
HEYDRICH-PÉREZ M, 309
HINCHLIFFE S, 270
HOLGADO S, 250, 264
HOLGADO S, 264
HORMAZA JV, 232
HUERTA SÁNCHEZ LM, 261

I

IBRAHIM M, 268, 358
ILLANES A, 261
ILLIANO E, 318
INFANTE D, 200
ISSAC Y, 344
IZQUIERDO TERÁN DIS, 176

J

J CONLEY A, 325
J JOENSUU J, 325
JÁCOME-CAMACHO JD, 370
JAHANGIRI R, 277
JALALI A, 123
JALALI AH, 98
JAMET E, 339
JARA S, 246
JIM B, 327
JIMÉNEZ J, 297
JIMÉNEZ VERA R, 244, 304

JIMÉNEZ-BREMONT JF, 312
 JIMÉNEZ-VERA R, 222, 235, 242, 243
 JOENSUU J, 88
 JOGLAR M, 91, 102, 106, 107, 108, 143
 JONES J, 182
 JORDAN T, 193
 JORRÍN J, 315
 JUÁREZ ALCARAZ A, 81
 JUSSI J, 327

K

KAMBER T, 193
 KAMERLING J, 149
 KARBOVSKYI L, 331
 KAUSEL KAMP G, 49, 50
 KELLER B, 193
 KEREM Z, 187
 KHACHATOURIANS G, 282
 KHALED W, 151
 KHAYAM NEKOU EI SM, 167
 KHAYAM NEKOU IE SM, 364
 KOGEL K-H, 190
 KREUZALER P, 151

L

LACOMME, 188
 LAFARGA-DE LA CRUZ F, 61, 68
 LAGO-LESTÓN A, 47
 LANGELLOTTI AL, 66
 LAROZE L, 230
 LARREA JA, 365
 LAT SOUK T, 238
 LAURENCIO SILVA M, 231, 237, 241
 LAVIELLE DM, 117

LAVIELLE J, 234
 LEE C, 134
 LEIVA M, 206
 LEÓN ARCIA K, 128
 LEÓN JA, 225
 LEÓN K, 58
 LERNER A, 354, 369
 LEROUGE P, 322
 LESCAILLE Y, 344
 LEVY M, 186, 199
 LI W, 151
 LIMA M, 300
 LIMONTA FERNÁNDEZ M, 340
 LINACERO R, 214
 LIRA-MÉNDEZ K, 313
 LIZAMA UC G, 82
 LOBOS E, 116
 LOMBARDI D, 66
 LOMONOSSOFF GP, 326
 LÓPEZ A, 140
 LÓPEZ CÁNOVAS L, 128
 LÓPEZ E, 95, 109
 LÓPEZ FUMERO LG, 165, 176
 LÓPEZ MG, 223
 LÓPEZ MOLA E, 348
 LÓPEZ PAZOS A, 276
 LOPEZ PAZOS SA, 273
 LÓPEZ Y, 122, 124, 173, 174,
 216, 217, 218
 LÓPEZ-CANÓVAS L, 122, 124, 125
 LORENZO HERNÁNDEZ M, 163
 LORENZO JC, 315
 LORENZO M, 234
 LORENZO ROCHE F, 139
 LÓRIGA E, 173, 174

LOZADA YL, 116
LUC L, 238
LUGO GONZÁLEZ JM, 43
LUGO JM, 58, 62
LUNA-RODRÍGUEZ M, 305
LUZZATTO T, 187
LLEONARD R, 138
LLITERAS E, 154

M

M CAMPS D, 117
MACHADO H, 107, 108, 109, 112, 113
MACHUCA SÁNCHEZ ML, 197
MADARIAGA J, 246
MAGAÑA CONTRERAS A, 244, 222,
235, 243
MANSUR M, 96, 102
MARCHESI U, 175 GATTO F, 175
MARDONES X, 246
MARÍA DEL CARMEN OS, 213
MARÍN M, 257, 280, 363
MARÍN P, 261
MÁRQUEZ ME, 310
MARRERO Y, 239
MARTÍN E, 239
MARTÍN L, 60, 67, 69, 257
MARTÍN L, 67, 69
MARTÍNEZ A, 233, 293
MARTÍNEZ D, 221, 263, 348
MARTÍNEZ E, 73, 74
MARTÍNEZ GARCÍA D, 232
MARTÍNEZ L, 100
MARTÍNEZ MC, 195
MARTÍNEZ MONTIEL N, 367
MARTINEZ R, 45, 60, 75
MARTÍNEZ RODRÍGUEZ R, 177
MARTÍNEZ RUÍZ DMC, 176
MARTÍNEZ S, 115, 116
MARTÍNEZ S, 138
MARTÍNEZ W, 205
MARTÍNEZ Y, 45
MARTÍNEZ-AGUILAR L, 357
MARTÍNEZ-ZUBIAUR Y, 207, 311
MASSA S, 318, 324
MASULLO P, 66
MATA P, 196
MATEO C, 336
MATROS A, 317
MATTER S, 283
MAURA PÉREZ R, 147, 156, 158
MAURA R, 155, 157
MAYEK-PÉREZ N, 313
MAYO O, 308
MEDINA RB, 264
MEDINA Y, 337, 341
MEDRANO G, 191
MEJIA ENCISO BE, 262
MENA CAMPOS J, 286, 287
MENA J, 280, 301, 363
MENASSA R, 88, 325, 327
MÉNDEZ L, 101, 106, 113, 114
MÉNDEZ PÉREZ L, 143
MENDOZA I, 54, 75
MENDOZA LM, 260
MENDOZA O, 341
MENÉNDEZ C, 221, 254, 255,
263, 359, 362
MENÉNDEZ DE SAN PEDRO LÓPEZ L, 165, 176
MERINO LÓPEZ A, 121
MERINO O, 77, 79

MESA A, 202
MESA L, 280
METRAUX J, 182
METT V, 324
MICHAUD D, 278
MILIAN FLORIDO G, 231, 241
MILLARES N, 45
MNL M, 132
MOCK HP, 317
MOENNIG V, 89
MOJENA SUÁREZ K, 121
MOLINA A, 80
MOLINA GUERRA A, 237
MOLINA S, 200
MONELLA R, 272, 307, 316
MONROY Ó, 242
MONSAN P, 233
MONTERO C, 91, 101, 107,
112, 113, 145
MONTERO Y, 232
MONTES DE OCA MATA G, 304
MONTES N, 139
MONTESINO SEGUÍ R, 149
MONTESINOS-CISNEROS RM, 94
MORALES A, 43, 55, 58, 300
MORALES R, 42, 43, 45, 48,
55, 58, 73, 74
MORALES ROJAS A, 177
MORÁN BERTOT I, 295
MORÁN R, 292, 300
MORÁN VALDIVIA R, 178
MORÁN-BERTOT I, 172, 178, 180, 294
MORÁN-DÍAZ L, 298
MOREIRA A, 100
MORERA Y, 62
MORRIS S, 170

MORRONI M, 168
MOSQUEDA-JUÁREZ H, 222
MOULIS C, 233
MOYA K, 209
MUIÑO B, 198
MUÑOZ-MÁRQUEZ ME, 131

N

NACIFE V, 132
NÁPOLES GARCÍA MC, 368
NÁPOLES JA, 366
NÁPOLES L, 292
NARANJO FELICIANO D, 137
NARANJO P, 86
NARCIANDI E, 308
NAVARRO C, 80
NAVARRO ECHEVARRIA T, 351
NAVARRO M, 45
NAVON N, 185
NAZARIAN A, 277
NEIRA BERMÚDEZ E, 227
NEOH K, 151
NGOEPE E, 126
NIKBAKHT BRUJENI G, 98, 123
NIÑO CÁRDENAS AI, 135, 136
NIUBO E, 125
NOA CARRAZANA JC, 196, 370,
NOA-CARRAZANA JC, 305
NOBILI C, 318
NODA GÓMEZ J, 110
NODA J, 142
NOGUERAS F, 368
NORDELO A, 205
NUÑEZ A, 291
NUTTALL P, 92

O

OJEDA OJEDA N, 50
OKON Y, 354, 369
OLANO RUIZ E, 177
OLAVARRIA CONTRERAS , 50V
OLISZEWSKI R, 250
OLIVA A, 75
OLIVA O, 281, 335, 338, 343, 346
OLIVA-BARBÓN O, 172
OLIVER C, 151
ONOFRE-LEMUS J, 357
ORAMAS N, 157
OROZCO M, 276
ORTEGA E, 353
ORTIZ N, 59
OSFOORI R, 167
OSPINA CA, 226, 247

P

PADILLA S, 337, 341
PADRÓN G, 330
PADRÓN S, 74
PALMA V, 246
PALMERO LA, 366
PAOLA BZ, 213
PAOLINI F, 324
PARADES HONORATO M, 50
PARRA-PÉREZ JJ, 222
PASTOR CHIRINO DL, 163, 165
PATERNÒ A, 175
PEDROSO JM, 117
PEDROSO M, 234
PENICHE C, 293
PERALTA GONZÁLEZ F, 304

PERALTA N, 292
PERERA CL, 142
PEREYRA BONNET F, 148
PÉREZ A, 117, 292
PÉREZ C, 100, 308
PÉREZ CÁRDENAS LBJ, 176
PÉREZ CRUZ ER, 232, 263
PÉREZ CS, 293
PÉREZ D, 112, 145
PÉREZ E, 100, 221, 308
PÉREZ ER, 240
PÉREZ H, 225, 240
PÉREZ J, 293
PÉREZ JE, 139
PÉREZ L, 335, 336
PÉREZ LARA E, 200
PÉREZ LJ, 118, 119, 141
PÉREZ M, 96, 289, 293, 335, 336, 346
PÉREZ N, 217
PÉREZ PÉREZ D, 105
PÉREZ PORTERO Y, 333
PÉREZ QUINTANA M, 237, 241
PÉREZ REYTOR DC, 177
PÉREZ RODRÍGUEZ LJ, 90
PÉREZ S, 114
PÉREZ-RIVEROL A, 294, 295
PERONE-MILLAR C, 61
PERSAUD I, 206
PESCADOR-FLORES BD, 312
PESTANA Y, 74
PETEIRA B, 214
PHILLIPS P, 282
PILOTO JL, 225
PIMENTEL E, 54, 60, 71, 72,
75, 280, 301, 363

PIMENTEL R, 75, 100
 PIMENTEL VÁZQUEZ E, 287
 PINO B, 214
 PIÑERO GONZÁLEZ J, 63
 PIPAON E, 161
 PITA M, 291
 PLA DE SOLÀ-MORALES M, 169
 PLANA R, 355
 PLASCENCIA A, 252
 PLUMA B, 140
 PONCE-CASTILLO M, 178, 295, 298
 PONCE-RIVAS E, 47, 64, 131
 PORRAS MEJÍA DJ, 314
 PORTAL GONZÁLEZ N, 206
 PORTIELES R, 216
 PRIETO CARRATALÁ Y, 147, 156
 PRIETO SOSA DMP, 176
 PRIETO Y, 155
 PUJOL FERRER M, 178
 PUJOL M, 205, 215, 216, 218, 281,
 330, 335, 336, 346

Q

QUARCHIONI C, 175
 QUERCI M, 164
 QUINTANA M, 366
 QUIÑONEZ M, 207

R

RABBANI M, 98
 RABÍ BRAVO O, 180
 RAHMANI F, 224
 RAÍCES M, 348
 RAMÍREZ FUENTES LE, 367

RAMÍREZ L, 297
 RAMÍREZ M, 120
 RAMÍREZ N, 297
 RAMÍREZ NÚÑEZ Y, 72
 RAMÍREZ R, 221, 240, 359
 RAMÍREZ REYES TI, 305
 RAMÍREZ Y, 54, 71, 75
 RAMOS B, 155
 RAMOS GÓMEZ Y, 295
 RAMOS L, 42, 308
 RAMOS O, 335, 336, 346
 RAMOS P, 281
 RAMOS PL, 205, 306, 338
 RAMOS SERRANO B, 147, 156, 158
 RAMOS Y, 330, 366
 RAMOS-FERNÁNDEZ A, 370
 RAYMOND B, 266
 REDONDO M, 109
 RELOVA D, 134
 REMAUD-SIMEON M, 233
 RENINGHAUS B, 126
 RESÉNDIZ-ARVIZU VH, 313
 REYES A, 80, 174
 REYES BL, 236
 REYES LÓPEZ I, 121
 RIERA M, 355
 RIES N, 282
 RIFFO E, 59
 RISOPATRÓN J, 77, 79
 RITSEMA T, 220
 RIVAS M, 334
 RIVERA C, 191
 RIVERA R, 355
 RIVERA S, 130
 RIVERA-BUSTAMANTE R, 311

- RIVERÓN AM, 122, 124, 125
RIVERÓN ROJAS AM, 128
RIVES N, 285, 303
RIVES N, 303
ROBLES-ESTRADA J, 252
ROCHE A, 45
RODÉS R, 353
RODRIGUEZ A, 43, 58
RODRÍGUEZ BL, 122
RODRIGUEZ CLAVIJO SY, 166
RODRÍGUEZ DUEÑAS J, 165
RODRÍGUEZ E, 101, 106, 134, 157
RODRÍGUEZ F, 226, 239, 247
RODRÍGUEZ LEBLANCH E, 333
RODRÍGUEZ M, 217, 292, 300, 330,
335, 336, 338, 346
RODRÍGUEZ MALLON A, 55
RODRÍGUEZ MEDINA M, 129
RODRÍGUEZ MP, 86, 106, 157
RODRÍGUEZ N, 161, 179
RODRÍGUEZ R, 205, 216, 218, 281
RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ E, 99
RODRÍGUEZ S, 239, 316
RODRIGUEZ T, 62
RODRÍGUEZ VILLAMIZAR F, 166
RODRÍGUEZ W, 124
RODRÍGUEZ-ACOSTA E, 180
RODRÍGUEZ-CABRERA L, 178, 294, 295
RODRÍGUEZ-CARCASSES R, 254, 255
RODRÍGUEZ-GUERRA R, 312
RODRÍGUEZ-KESSLER M, 312
RODRÍGUEZ-MOLTÓ MP, 179
RODRÍGUEZ-RAMOS T, 76
ROJAS ARIAS AC, 211
ROJAS MM, 365
ROJAS-FLORES T, 285
ROMERO H, 296
ROMERO ZUÑIGA A, 50
RON J, 130
RONDÓN CASTILLO AJ, 231, 241
ROQUE B, 206
ROSALES-SERNA R, 313
ROSAS VÁZQUEZ C, 63
ROSENBERG T, 185
ROSS GR, 250, 251
ROYLE L, 149
RUDD P, 149
RUDD PM, 322
RUEDA F, 159
RUEDA FL, 136
RUÍZ L, 355
RUÍZ M, 248, 249
RUÍZ ML, 202
RUÍZ O, 73, 74, 239
RUÍZ Y, 205, 281, 306
RUSTÉRUCCI C, 195
- S**
- SABETA C, 126
SAINSBURY F, 326
SAÍZ Y, 174
SALAS B, 366
SALAZAR E, 104, 301, 308
SALEH RASTIN N, 364
SALEHI JOUZANI G, 167, 277, 364
SALINAS D, 100
SAMANIEGO FERNÁNDEZ LM, 231
SÁNCHEZ A, 42, 43, 48, 58, 330
SÁNCHEZ C, 355
SÁNCHEZ CONTRERAS M, 270

- SÁNCHEZ D, 107, 112, 113, 143, 145
SÁNCHEZ I, 257, 363
SÁNCHEZ J, 130
SÁNCHEZ L, 234
SÁNCHEZ N, 302
SÁNCHEZ O, 114, 141, 142, 143,
149, 155, 157, 161, 179
SÁNCHEZ PRIETO A, 121
SÁNCHEZ RAMOS O, 86, 99, 103, 110,
147, 156, 158
SÁNCHEZ SAAVEDRA A, 367
SÁNCHEZ VELASCO J, 296
SÁNCHEZ VELÁSQUEZ LR, 305
SÁNCHEZ Y, 205, 281, 306
SÁNCHEZ-CASTREJÓN E, 64
SANG H, 150
SANGUINETI S, 318
SANSONE G, 66
SANTANA E, 86, 141, 306
SANTANA RODRÍGUEZ E, 114, 142,
155, 157, 179
SANTIESTEBAN D, 60, 67, 69, 257
SANTISTEBAN, Y 42
SANTOS R, 206
SARDIÑAS M, 100
SARROUH B, 245
SAUKA D, 272, 307, 316
SAUME DE SABATÉ E, 95
SAVAGHEBI G, 364
SBARAGLINI ML, 316
SCHENK P, 184
SCHOPFER C, 283
SCHUURMANS J, 224
SECOMBES C, 51
SEGURA R, 100
SELMAN M, 348
SERRANO P, 225
SERRANO-PONCE J, 252
SEVENO M, 322
SILVA A, 130
SILVA LARRAÑAGA YK, 198
SILVA R, 348
SILVÉRIO DA SILVA S, 245
SIMÓN M, 306, 335, 338, 346
SLEBE CONCHA F, 49, 50
SMEEKENS S, 220, 224
SMITH E, 280
SMITH RAMOS A, 97
SMYTH S, 282
SOBRINO A, 232, 263
SOLANO Y, 330
SOLER HC, 117
SOLER ROGER DM, 234
SOMONTE D, 300
SOSA A, 155
SOSA ESPINOSA AE, 172, 177, 179, 180
SOSA OA, 259
SOTO CÓRDOVA J, 335
SOTO J, 336, 338, 346
SOTO N, 343
SOTOLONGO J, 60, 67, 69, 257
SPENGLER I, 291
SPILLANE C, 170
SPRINGER SPENGLER A, 97
STINGL J, 151
SUÁREZ L, 141, 155
SUÁREZ LÓPEZ F, 333
SUÁREZ M, 102, 105, 106, 107, 112,
114, 143, 145, 179
SUÁREZ ROMERO ME, 163

SUN J, 268

SUNCHIZ M, 254

T

TADJBAKSH H, 98, 123

TAMASUKAS R, 130

TAMIR-ARIEL D, 185

TANDRÓN Y, 334

TEJEDA-MANSIR A, 94

TEJERA B, 365

TÉLLEZ TORRES G, 367

TELLEZ-RODRÍGUEZ P, 172, 180,
294, 295

TEPFER M, 168

TERAUCHI R, 183

TEVENDALE M, 151

THAKUR K, 274, 299

THOMPSON J, 168

THOMPSON KD, 56

TIEL K, 281, 335, 346

TOLEDO ALONSO JR, 110

TOLEDO JR, 86, 101, 113, 149, 157

TORRES E, 87, 108, 114, 142

TORRES L, 122

TORTOLÓ K, 225

TRIGUERO A, 322

TRUJILLO J, 173, 174

TRUJILLO LE, 221, 240, 255,
263, 288, 359

TRUJILLO R, 292, 334

TRUJILLO-BACALLAO D, 172, 180, 294,
295, 298

TURTURO C, 168

U

UBIETA R, 348

UFFO O, 104, 115, 138

ULLOA L, 366

URIBE A, 70

URTUBIA HENRÍQUEZ I, 290

USATORRES B, 292, 300

V

VALDEBENITO I, 77, 79

VALDEBENITO ISLER I, 78

VALDÉS J, 74

VALDÉS R, 337, 341, 342, 344

VALDÉS-GARCÍA Y, 252

VALDEZ CEPEDA RD, 201, 203, 256

VALDÉZ J, 73

VALDIVIA O, 288, 332, 345

VALENZUELA MUÑOZ V, 70

VALERINO A, 291

VALIENTE PA, 137

VALVERDE A, 354

VALLE B, 315

VAN DER MEER J, 44

VANDEPUTTE O, 309

VARELA M, 368

VARGAS HERNÁNDEZ M, 145

VARGAS LEANDRO JA, 275

VARGAS M, 105, 112

VÁZQUEZ A, 214

VÁZQUEZ M, 232, 348

VÁZQUEZ S, 104

VEGA A, 142

VEGA E, 86

VEGA REDONDO A, 110

VEGA RODRÍGUEZ N, 160
VENÉREO A, 155
VENÉREO SÁNCHEZ A, 99, 103, 110
VENUTI A, 324
VERA MI, 80
VERA P, 161
VERDE Y, 300
VERDERA HERNÁNDEZ J, 163
VERGARA L, 59
VERGINELLI D, 175
VEZINA L, 323
VINJOY M, 45
VITIELLO V, 66
VLISIDOU I, 270
VORSTER J, 278

W

WATERFIELD N, 270
WATSON C, 151
WENDEROTH I, 283
WITZEL K, 317
WÖLF A, 317
WONG I, 301

WONG PADILLA I, 286, 287
WONG-VILLARREAL A, 357
WOOD M, 306, 344
WRIGHT DJ, 266

Y

YABOR CABRERA L, 315
YAFE H, 186
YAPUR R, 360
YARDEN O, 199
YEDIDIA I, 187
YOO D, 134
YUSIBOV V, 324

Z

ZACARIAS R, 105
ZAMORA H, 211
ZAMORA J, 100, 111, 301, 308
ZAMORA Y, 149
ZAREI M, 364
ZETINA-MORENO ZK, 243
ZULU G, 126
ZUNIGA HANSEN ME, 230