

## Contents

- First meeting of the PROMUSA working groups' convenors ..... p. I
- 2<sup>nd</sup> International Symposium on the Molecular and Cellular Biology of Banana ..... p. II
- Abstracts of presentations ..... p. II
- Genomics ..... p. II
  - Gene expression in transgenic plants ..... p. V
  - Intellectual property and genetically modified organisms ..... p. VII
  - Plant pathology and disease resistance ..... p. VII
  - Biodiversity and evolution ..... p. XIII
  - Biochemistry and fruit ripening ..... p. XV

## What is PROMUSA ?

The Global Programme for *Musa* Improvement (PROMUSA) is a broad-based programme which aims at involving all the major players in *Musa* improvement. It was developed as a means to link the work carried out towards addressing the problems of export banana producers, with those initiatives directed towards improving banana and plantain production at the subsistence and smallholder level. The global programme builds upon existing achievements and is based upon ongoing research initiatives. PROMUSA is therefore a mechanism to further maximize the outputs and accelerate the impact of the overall *Musa* improvement effort. The programme is an innovative mechanism to bring together research carried out both within and outside the CGIAR, creating new partnerships between National Agricultural Research Systems (NARS) and research institutes in both developing and developed countries. The formation of such partnerships will also contribute to strengthening the capacity of NARS to conduct *Musa*-related research.

The major thrust of PROMUSA is to develop a wide range of improved banana varieties from which growers worldwide can select those most suited to their needs. The programme brings together conventional breeding based on hybridization techniques with genetic engineering and biotechnological breeding approaches. This broad-based genetic improvement effort is supported by research being carried out on specific pests and diseases within the various PROMUSA working groups. An efficient mechanism for evaluating new varieties produced within the framework of PROMUSA is also an essential component of the programme.



# PROMUSA

A global Programme for *Musa* Improvement

## First meeting of the PROMUSA working groups' convenors

A first meeting of the convenors of the PROMUSA working groups was held in Montpellier on 18-20 April. Up-to-date news of the activities of each of the five groups were shared and it was agreed that the Genetic improvement working group should continue to operate through two subgroups and not divide into two independent groups as had been proposed.

A formulation for two levels of participation in the working groups has been conceived:

- those who are interested in receiving information in order to develop research in general, and
- those whose participation is more proactive and involved in the development of priority areas of research in the group.

The convenors will have the responsibility to familiarize themselves with the work of participants and identify those who are most active, and to stimulate information-sharing and the use of the list server. Working group members will be encouraged to send regular updates on publications, meetings, training events and to collaborate in writing project proposals. The PROMUSA secretariat will assist in proposal-writing by making available information on donors, proposal-writing guidelines, background information on banana and plantain production and by assisting in editing and English, if necessary. The responsibilities of INIBAP's regional coordinators in stimulating participation from all banana-growing regions was emphasized, and the responsibilities of the secretariat in assisting the convenors were also consolidated.

A database of PROMUSA participants will be set up, using and linking to the INIBAP databases, BRIS and MUSALIT. The scope of the database will be relatively broad and participants will be asked to provide information on:

- Materials, tools and methods available for distribution
- Availability of biological materials and conditions to obtain them
- Information about current collaborative activities and novel collaborative areas
- Current training activities, and also areas of expertise and facilities for training.

Changes were suggested for the PROMUSA Web site. Each working group will have its own page containing information on:

- Members (with a link to the proposed database above)
- Research priorities
- Any relevant databases on aspects of research (e.g. Foc database)
- Protocols and methodologies available (with contact details)
- Useful publications: fact sheets, technical guidelines, handouts (Word or PDF versions)
- Links to other relevant homepages

It was also proposed that posters be prepared for scientific meetings, both on PROMUSA in general and on the work of the different working groups. The individual benefits of the global PROMUSA meetings and working group meetings were discussed. Future global meetings should invariably be scheduled back-to-back with another major scientific meeting. The following schedule has been tentatively suggested:

- Nematology working group (24-25 May 2001) after the International Symposium on Nematology meeting in South Africa (21-23 May 2001)
- Sigatoka working group (March 2002) in Latin America back-to-back with an International symposium on banana leaf spot diseases

- Genetic improvement working group + Breeding strategies meeting on banana after the 3rd International Symposium on Molecular and Cellular Biology on Banana in Leuven, Belgium (September/October 2002)

- Fusarium working group meeting is to be decided - suggestions welcome
  - Virology working groups meeting is to be defined - suggestions welcome
- It is also suggested that global meetings should take place every three years, to allow

more time for working groups to meet independently and make significant progress.

The next PROMUSA meeting would therefore take place in 2003 and may possibly be held back-to-back with an International *Musa* Congress.

## 2<sup>nd</sup> International Symposium on the Molecular and Cellular Biology of Banana

The inaugural Symposium on the Molecular and Cellular Biology of Banana held in March 1999 in Ithaca, New York, USA, was organized by the Boyce Thompson Institute for Plant Research. The concept was to open a forum for all people involved in molecular and cellular biology to have an opportunity to meet and exchange information about their research activities. The meeting was a resounding success, and it was therefore suggested to continue the concept under the auspices of PROMUSA.

The 2<sup>nd</sup> International symposium on the Molecular and Cellular Biology of Banana held 29 October-3 November 2000 in Byron Bay, Australia, was organized by the Queensland University of Technology (QUT) with the local collaboration of CRCTPP (Cooperative Research Center for Tropical Plant Pathology) and QDPI

(Queensland Department of Primary Industries). The local organizing committee also received major assistance internationally from INIBAP, Zeneca and DNAP (DNA Plant Technology Corporation, USA). This second symposium allowed participants from both developing and developed countries to present their research activities, covering a broad range of subject areas.

The symposium was structured around the following sessions: genomics; gene expression in transgenic plants; plant pathology and disease resistance; intellectual property and genetically modified organisms; biodiversity and evolution; and biochemistry and fruit ripening. Thanks to the support received from the participating institutions, international scientists were invited to attend and addressed keynotes on

"Genomics and banana" (Colin Bird, Zeneca) and "Intellectual property and GMOs" (Dianne Nicoll, University of Tasmania). Participants from the CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization) Plant Industry also delivered keynotes introducing the sessions on gene expression in transgenic plants (Peter Waterhouse), plant pathology and disease resistance (Jeff Ellis), and biochemistry and fruit ripening (Simon Robinson).

With 50 papers presented and 60 participants from 17 countries attending the symposium, this event ranks among the most important scientific fora on *Musa*.

As an additional contribution, INIBAP publishes hereunder a special PROMUSA supplement containing the abstracts of presentations made at the symposium.

### Abstracts of presentations

#### Genomics

##### Induction, detection and use of aneuploids for genetic studies in *Musa* spp.

N.S. Roux<sup>1</sup>, A. Toloza<sup>1</sup>, J. Dolezel<sup>2</sup> and F.J. Zapata-Arias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plant Breeding Unit, FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Seibersdorf, Austria; <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, Olomouc, Czech Republic.

Polyploid and aneuploid banana plants were obtained after gamma radiation and colchicine treatments. Variation in chromosome number was also observed in plants regenerated via organogenesis or somatic embryogenesis from tissue cultures, which were not exposed to any mutagenic treatment. Regenerated off-type plants were analyzed by flow cytometry as described by Dolezel *et al.* (1997) to estimate their ploidy levels and to check sensitiv-

ity of the method to detect aneuploidy in *Musa*. Chicken red blood cell (CRBC) nuclei were used as internal reference standard and the DNA index was calculated by comparing peak positions of CRBC nuclei and nuclei of the sample. At a triploid level, the minimal difference between euploid (3x) and aneuploid plant (3x ± 1) should be approximately 3%. Thus, all plants with DNA index differing by more than 1.5 % from the index established for control (3x) plants were considered aneuploid. The results obtained by flow cytometry were verified by chromosome counting in meristem root-tip cells (Dolezel *et al.* 1998). The results indicated that flow cytometry was sensitive enough to detect aneuploidy in *Musa*. However, detection of aneuploidy with ± 1 chromosome accuracy required high-resolution analyses with coefficient of variation of DNA peaks lower than 2%. The advantage of flow cytometric assay was that abnormalities in DNA content could be detected at an early stage of plant growth, and also during *in vitro* culture. Moreover, flow cytometry enabled detection of mixoploidy. Thus, in several cases

differences in ploidy levels between leaf tissue and root tissue of the same plant were detected. Aneuploids have been particularly useful in genetic studies of many plant species such as maize, tomato, tobacco and wheat (Khush 1973). Following the work of Sears, the collection of aneuploid lines has been made possible to define the relationship between chromosomes of hexaploid wheat in terms of their origin and function (Law *et al.* 1987). In *Musa* spp., aneuploids are relatively frequent and viable in triploid clones. Being sterile, their value for genetic analyses is limited. Nevertheless, they could be very useful for physical mapping and to link genetic and physical maps using already available molecular markers.

#### References

- Dolezel J., M. Lysak, I. Van den Houwe, M. Dolezelova & N. Roux. 1997. Use of flow cytometry for rapid ploidy determination in *Musa* species. *InfoMusa* 6:6-9.
- Dolezel J., M. Dolezelova, N. Roux & I. Van den Houwe. 1998. A novel method to prepare slides for

high resolution chromosome studies in *Musa* spp.  
*InfoMusa* 7:3-4.

Khush G.S. 1973. Cytogenetics of aneuploids.

Academic Press, New York, USA.

Law C.N., J.W. Snape & A.J. Worland. 1987.

Aneuploidy in wheat and its uses in genetic analysis.

Pp. 71-108 in *Wheat breeding: its scientific basis*

(F.G.H. Lupton, ed.). Chapman & Hall, London.

#### Acknowledgements

We thank Ms Ines Van den Houwe (INIBAP) for providing the vegetative clones of *Musa* and Mr Rony Swennen (K.U. Leuven) for providing *Musa* embryogenic cell suspensions. This work was supported by a Joint FAO/IAEA/GDIC (Belgian General Direction for International Cooperation) Coordinated Research Project. The study was undertaken as part of the Global Programme for *Musa* Improvement (PROMUSA).

#### Molecular cytogenetic and cytometric analysis of *Musa* genomes

J. Dolezel, M. Valárik, J. Vrána, M. Dolezelová, J. Safár, M. Lysák, and H. Simková

Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry,  
Institute of Experimental Botany, Olomouc, Czech Republic.

The application of flow cytometry and molecular cytogenetics stimulated progress in understanding of *Musa* genome at nuclear and chromosomal level. Flow cytometric analysis was found a convenient method for estimation of nuclear DNA content in *Musa* (Dolezel *et al.* 1994) and has been used for ploidy verification in existing germplasm collections, characterization of newly collected materials, and evaluation of karyological stability *in vitro*. Due to its high throughput, the method may be easily incorporated into existing breeding programmes. Samples can be sent to laboratories equipped with a flow cytometer, as only a small amount of plant tissue is needed. The method also permits determination of the size of nuclear genome. It was found that *Musa* genomes are small with the B genome being smaller compared to the A genome (Lysák *et al.* 1999). The development of procedures for reliable and rapid detection of aneuploidy and for chromosome flow sorting remains a major challenge. Given the small size and poor morphological differentiation of *Musa* chromosomes (Dolezel *et al.* 1998), molecular cytogenetics holds major promise for karyotype analysis and the study of chromosome organization. While genomic *in situ* hybridization is suitable for determination of genomic constitution in hybrids (D'Hont *et al.* 2000), fluorescent *in situ* hybridization (FISH) permits physical mapping of DNA sequences to chromosomes. Several classes of repetitive DNA se-

quences, including ribosomal RNA genes, retrotransposon and BSV sequences have already been localized to *Musa* chromosomes (Balint-Kurti *et al.* 2000, Dolezelová *et al.* 1998, Harper *et al.* 1999). More DNA sequences need to be isolated and mapped to unravel the molecular structure of chromosomes and to establish mechanisms of genome differentiation in *Musa*. Identification of individual chromosomes using physically mapped DNA sequences will allow analysis of their behaviour and segregation during evolution and in breeding programmes. Physically mapped single- and low-copy DNA sequences will provide anchor sites needed to integrate physical and genetic maps.

#### References

- Balint-Kurti P.J., S.K. Clendennen, M. Dolezelová, M. Valárik, J. Dolezel, P.R. Beetham & G.D. May. 2000. Identification and chromosomal localization of the *monkey* retrotransposon in *Musa* sp. *Mol. Gen. Genet.* 263:908-915.
- D'Hont A., A. Paget-Goy, J. Escoute & F. Carreel. 2000. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 100:177-183.
- Dolezel J., M. Dolezelová & F.J. Novák. 1994. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biol. Plant.* 36:351-357.
- Dolezel J., M. Dolezelová, N. Roux & I. Van den Houwe. 1998. A novel method to prepare slides for high resolution chromosome studies in *Musa* spp. *InfoMusa* 7:3-4.
- Dolezelová M., M. Valárik, R. Swennen, J.P. Horry & J. Dolezel. 1998. Physical mapping of the 18S-25S and 5S ribosomal RNA genes in diploid bananas. *Biol. Plant.* 41:497-505.
- Harper G., J. Osuji, J.S.P. Heslop-Harrison & R. Hull. 1999. Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: Molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255:207-213.
- Lysák M.A., M. Dolezelová, J.P. Horry, R. Swennen & J. Dolezel. 1999. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theor. Appl. Genet.* 98:1344-1350.

#### Acknowledgements

The study was undertaken as a part of the Global Programme for *Musa* Improvement (PROMUSA) and was supported by Research Contract No. 8145/RB from the International Atomic Energy Agency.

#### Markers for determining genomic integrity: somaclonal variants in bananas as a model system

C.A. Cullis<sup>1</sup>, K. Kunert<sup>2</sup> and B. Okole<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Case Western Reserve University and NovoMark Technologies LLC, Cleveland, Ohio 44106, USA; <sup>2</sup>Botany

Department, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, Pretoria 0002, South Africa; <sup>3</sup>African Biotechnologies (PTY) LTD, Tzaneen 0850, South Africa.

Somaclonal variation has long been recognized as a by-product of the propagation of plant cells through one or more cycles of disorganized cell growth. Most of the transformation processes used in the generation of transgenic plants include at least one step where cultured cells are grown and then plants are subsequently regenerated. Therefore all of the individuals that are transgenic and have arisen by this method have the potential to contain some of this variation, even in the absence of any visible mutation. Many genomic alterations in transgenic plants have already been demonstrated using RAPDs and AFLPs. In spite of the observation that similar polymorphisms repeatedly arise, none of the variants have proved useful as predictors of the level of genomic variation that has taken place. The well-documented off-types arising from tissue culture of bananas have been used as a model system to identify the regions of the genome that may be especially susceptible to change and to develop markers to determine the extent of that change. Representational difference analysis was used to isolate genomic differences between two sets of normal and variant banana cultivars – between Williams and a masada/chlorotic off-type, and a normal Curare Eno individual and a dwarf off-type (the latter pair supplied by Dr R. Swennen). In both instances difference clones were identified. Many of the sequences were common to both sets of difference products, in spite of the fact that they were different aberrant phenotypes. One of the difference products identified was a minisatellite sequence that also appeared to be labile in date palms. These results add more evidence for the presence of a labile segment of the genome that is preferentially modified during the generation of somaclonal variants. These difference products are being further characterized with a view to developing a series of markers that can be used to identify early genomic changes and also as diagnostics for specific phenotypes arising in the tissue culture process.

#### Identification of AFLP and ISSR markers associated with dwarf somaclonal variants in Cavendish banana

T.R. Benatti<sup>1</sup>, S.A.C.D. Souza<sup>1</sup>, J.A. Scarpare<sup>2</sup> Filho, P.C. Santos<sup>3</sup>; A. Tulmann Neto<sup>1</sup>, E.A. Kido<sup>1</sup> and A. Figueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, CP 96, Piracicaba, SP, 13400-970, Brazil;

<sup>2</sup>ESALQ-USP (Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz», Universidade de São Paulo), Brazil; <sup>3</sup>UNESP

(Universidade Nacional do Estado de São Paulo), Ilha Solteira, Brazil. E-mail: figueira@cena.usp.br

Somaclonal variation is a common feature of some micropropagated banana cultivars, caused by undetermined reasons. Early detection of variants is desirable for commercial micropropagation or to establish methods to increase variability for breeding. Molecular markers offer a great potential to detect and to disclose causes of somaclonal variation. The objective of this study was to test Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) assays, using polyacrylamide gels and silver staining, comparing a Cavendish cultivar "Nanicão Jangada" with its somaclonal dwarf variant. Twelve ISSR primers were tested, and two (16.6%) presented 3 polymorphic fragment present only in the dwarf variant. All AFLP primer combinations from kit AFLP System I (Life Technologies, Rockville, MD, USA) were tested, amplifying a total of 1665 bands. Each primer combination amplified an average of 26.4 fragments, ranging from 7 to 44 bands. Forty-three polymorphic fragments (2.6%) were identified, with 19 (1.1%) present only in the dwarf variant. Polymorphic fragments were stable between assays. Methylation-sensitive AFLP assay, based on the differential ability of a pair of isoschizomers to restrict methylated cytosine, was also tested. A combination of 24 primers were used to amplify DNA from both genotypes. An average of 24.8 fragments were amplified from *HpaII*-treated DNAs and 22.1 from *MspI*-treated, comparable to the regular AFLP. Twelve polymorphic bands (2.1%) were present only in "Nanicão Jangada" in *HpaII*-digested, while eight fragments (1.6%) were polymorphic for *MspI*-treated. Only three polymorphisms (0.5%) might have derived from differences in methylation. Other dwarf variants are being tested using the same primer combinations, and polymorphic fragments will be cloned and sequenced.

#### **Application of the amplified fragment length polymorphism (AFLP) and the methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) techniques for the detection of DNA polymorphisms and changes in DNA methylation in micropropagated bananas**

A. James, V. Herrera, L. Peraza and S. Peraza  
*Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 #130, Colonia Churburna de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, Mexico.*

The effect of the explant source on DNA polymorphisms and changes in methylation in the leaves of micropropagated *Musa* AAA 'Grande Naine' was investigated. Explants were derived from either the young male floral apices or suckers, and shoot cultures induced

from these explants were micropropagated for five subcultures. As controls for MSAP analysis (Xiong *et al.* 1999), equivalent leaf tissue was taken from ten conventionally propagated plants. Ten combinations of primers were used for AFLP analysis and eight primers for the MSAP analysis. No significant differences were found between either kind of explants using AFLP or in MSAP in leaf tissue of plants derived from conventional propagation. However, when compared to the explants, the micropropagated plants derived from them had significantly more DNA polymorphisms. In addition, we found that the explant source had a significant influence on the extent of AFLP DNA polymorphisms in regenerants. Inflorescence-derived regenerants gave the highest variation of 6.36% compared to sucker-derived regenerants which gave 3.96% polymorphisms.

A total of 107 (23%) out of 465 bands were found to be cytosine-methylated in micropropagated plants, whilst in conventionally propagated plants 18% of the bands were found to be cytosine-methylated. There was no significant difference in the extent of DNA methylation polymorphisms between inflorescence-derived micropropagated plants (3%) and sucker-derived plants (1.7%). Most of the polymorphic bands were of high molecular weight (above 700 bp) and were hyper-methylated. This was also the case for most of the hyper-methylated bands common to all micropropagated plants but which were not methylated in conventionally propagated plants. A correlation was found between some plants with AFLP polymorphisms and plants with methylation polymorphisms.

Thus the banana micropropagation process was found to generate significant genetic and possibly epigenetic changes in micropropagated 'Grande Naine' banana plants. The question as to whether the hypermethylation found in all regenerants is developmentally-related or a consequence of the tissue culture environment *per se* remains to be answered. The correlations found between AFLP and MSAP polymorphisms provide indirect evidence that hyper-methylation may induce base changes, perhaps by deamination (Kaeppeler *et al.* 2000). All the regenerants are presently being grown to maturity in our experimental plantation in Yucatan so that a phenotypic characterization will be possible.

#### **References**

- Kaeppeler S., H.F. Kaeppeler & Y. Rhee. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43:179-188.
- Xiong L.Z., C.G. Xu, S. Maroof & Q. Zhang. 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a

methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol. Gen. Genet.* 261:439-466.

#### **Banana streak badnavirus sequences in *Musa***

G. Harper<sup>1</sup>, T. Schwarzacher<sup>2</sup>, C. Hansen<sup>2</sup>, P. Heslop-Harrison<sup>2</sup> and R. Hull<sup>1</sup>

<sup>1</sup>John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, United Kingdom; <sup>2</sup>Department of Biology, University of Leicester, Leicester LE1 7RH, United Kingdom.

Molecular and cytogenetic data show unequivocal evidence of the integration of banana streak badnavirus (BSV) sequences into the genome of *Musa* plantain Obino l'Ewai (AAB) and these sequences are essentially identical to that of an episomal virus causing infection in *Musa* (Harper *et al.* 1999, Ndowora *et al.* 1999). There are two loci, differing in copy number of BSV sequence in Obino l'Ewai and, for at least one of them, the integrated sequence structure is rearranged with respect to the virus sequence. Significant BSV infections are detected in certain B genome containing *Musa* germplasm during meiosis or tissue culture and the circumstantial evidence points to episomal BSV infection arising from the activation or mobilization of integrated BSV sequences. A model involving recombination has been proposed that links integrated sequence to the generation of replicative forms of the virus (Ndowora *et al.* 1999). This phenomenon has major implications for *Musa* pathology, improvement, germplasm movement and quarantine.

The BSV integration phenomenon has parallels in two other cases, the pararetroviruses Petunia vein-clearing virus (PVCV) (Richert-Pöggeler and Shepherd 1997) and Tobacco vein-clearing virus (TVCV) (Lockhart *et al.* 2000). Episomal PVCV is found in *Petunia hybrida* and appears following environmental stress such as nutrient deficiency and episomal TVCV is found in the hybrid *Nicotiana edwardsonii* after changes in daylength. Integrated viral sequences essentially identical to the episomal virus sequences are found at high copy number in both the hybrid species. As is the case for *Musa* and BSV, the virus sequences are integrated into only one of the parental genomes of the hybrid, although episomal virus is not detectable in that parent. This suggests that the other parental genome plays a part in the "activation" of the virus sequences in the hybrid.

Fragments of a tobacco pararetrovirus-like (TPVL) sequence have been found in genomic DNA of *Nicotiana* sp. (Jakowitsch *et al.* 1999). We have shown that pararetrovirus sequences probably comprise an important and widespread component of plant genomes including Gymnosperms and Angiosperms. Their pres-

ence may have consequences for gene silencing and genome evolution. As yet there is no evidence that these sequences give rise to novel viral symptoms, as suggested for related integrated pararetroviral sequences.

We are examining the nature and genomic context of integrated BSV sequences in Obino l'Ewai and in other *Musa*. A moderately repeated sequence, which flanks the integrated BSV sequence in Obino l'Ewai (*MusaOL*) is concentrated with varying copy number near the centromeres of most chromosomes of both the A and B genome of *Musa*. The low numbers of BSV-related integrans per genome indicates that BSV integration occurred after the amplification and distribution of *MusaOL* sequences and hence is most likely a recent event.

#### References

- Harper G., J.O. Osuji, J.S. Heslop-Harrison & R. Hull. 1999. Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255:207-213.
- Ndowora T., G. Dahal, D. LaFleur, G. Harper, R. Hull, N. Olszewski & B. Lockhart. 1999. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 255:214-220.
- Richert-Pöggeler K.R. & R.J. Shephard. 1997. Petunia vein clearing virus: a plant pararetrovirus with the core sequences for an integrase function. *Virology* 236:137-146.
- Lockhart B.E., J. Menke, G. Dahal & N. E. Olszewski. 2000. Characterization and genomic analysis of tobacco vein-clearing virus, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. *J. Gen. Virol.* 81:1579-1585.
- Jakowitsch J., M.F. Mette, J. van der Winden, M.A. Matzke and A.J.M. Matzke. 1999. Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96(23):13241-13246.

### Is banana streak virus strain OL the only activateable virus integrant in the *Musa* genome?

A.D.W. Geering<sup>1</sup>, J.N. Parry<sup>1</sup>, L. Zhang<sup>2</sup>, N.E. Olszewski<sup>3</sup>, B.E.L. Lockhart<sup>2</sup> and J.E. Thomas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Queensland Horticulture Institute, Department of Primary Industries, 80 Meiers Road, Indooroopilly, QLD 4068, Australia; <sup>2,3</sup>Departments of Plant Pathology and Plant Biology, respectively, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota 55108, USA.

In 1999, there were severe outbreaks of banana streak virus (BSV) in plantings of the IRFA 909, 910 and 914 hybrids at separate locations in New South Wales and Queens-

land. These new hybrids, originating from the CIRAD *Musa* breeding programme, were under evaluation for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* for 12-18 months prior to symptom expression. These plants tested negative for BSV-Onne by immunocapture- (IC-) PCR. However, IRFA 909 and 910 did test positive for BSV-Goldfinger by IC-PCR. The badnavirus from IRFA 914 was unlike any previously examined. We have named this virus isolate BSV-IM. Using degenerate PCR primers, we amplified DNA of BSV-IM, and using sequence of the DNA fragment, designed virus-specific primers. Using this new PCR assay, we have shown that IRFA 909 and 910 were infected with both BSV-Goldfinger and BSV-IM. In repeated assays over time, IRFA 914 has only ever tested positive for BSV-IM, and not BSV-GF. We have also found BSV-IM infecting an IRFA 914 plant in New Caledonia.

We purified virus from IRFA 910, and have obtained DNA clones representing the whole genome of BSV-IM. We have completed sequencing this virus and initial sequence analyses suggest that the BSV-IM is a distinct virus species. When proteins encoded by ORFs I, II and III of BSV-OL (GenBank Accession AJ002234) and BSV-IM were compared, the sequence identities were 60.5, 42.3 and 64.3%, respectively. We have considered the possibility that BSV-IM has arisen from integrated virus sequences. Our virus clones hybridized to *EcoRI* and *HindIII* digested DNA of two diploid B parents of the IRFA hybrid lines, but failed to hybridize to similarly digested DNA from cvs. Obino l'Ewai Calcutta 4 and several AAA cultivars. The virus clones also hybridized to uncut genomic DNA of both diploid B parents. Both diploid B parents have never shown symptoms of BSV infection, and have tested negative for BSV infection by immunosorbent electron microscopy of concentrated leaf extracts. The hybridization patterns observed are not consistent with those expected with episomal virus DNA. These results suggest that BSV-IM has arisen via activation of integrated sequences.

We have also examined the possibility that other strains of BSV are also integrated into the *Musa* genome. Using probes to the complete genome of BSV-Mys (Geering *et al.* 2000), we observed complex hybridization patterns with *EcoRI* and *HindIII* digested DNA from three diploid B bananas, as well as from cvs. Obino l'Ewai (AAB group), Goldfinger (AAAB group) and Pisang Ceylan (AAB group), suggesting that sequence of BSV-Mys is integrated. Likewise, when probed with a 1.3 kb BSV-GF probe (Geering *et al.* 2000), a ca. 20 kb *HindIII* fragment was detected in

DNA from two diploid B bananas, as well as from cvs. Obino l'Ewai, Goldfinger and Pisang Ceylan, suggesting that sequence of BSV-GF is also integrated. No hybridization was observed between either the BSV-Mys or BSV-GF probes and DNA from a range of AA and AAA cultivars, suggesting that the integrated DNA is linked to B genome of cultivated *Musa*.

#### Reference

- Geering A.D.W., L.A. McMichael, R.G. Dietzgen & J.E. Thomas. 2000. Genetic diversity among Banana streak virus isolates from Australia. *Phytopathology* 90:921-927.

### Gene expression in transgenic plants

#### Agrobacterium-mediated transformation for the generation of transgenic banana (*Musa* spp.)

J.B. Pérez Hernández<sup>1\*</sup>, R. Swennen<sup>1</sup>, V. Galán Saúco<sup>2</sup> and L. Sági<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium; <sup>2</sup>Department of Tropical Fruits, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna, Spain. (\*Current address: Department of Tropical Fruits, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna, Spain).

A systematic evaluation of the successive steps in the natural *Agrobacterium*-plant interaction resulted in the elaboration of an efficient transformation protocol for banana. Chemotaxis and physical attachment of bacterial cells were observed in different cells and tissues of various banana cultivars (Pérez Hernández *et al.* 1999). Transient reporter gene expression was demonstrated in several tissues cocultivated with *vir*-induced *Agrobacterium* and the highest frequencies were found in embryogenic cell suspension cultures. Stable transformation was obtained after selection on geneticin- or Basta-containing medium. In total, more than 600 transgenic plants were regenerated in five independent experiments, and more than 90% of them expressed the introduced genes (*gfp* or *gusA*). Molecular characterization revealed a simple integration pattern in most transgenic plants. Transgenic plants containing the gene encoding the Ace-AMP1 antimicrobial peptide (Cammue *et al.*) were screened with a leaf disc bioassay and candidate plants with increased fungus tolerance were identified (Pérez Hernández 2000).

#### References

- Pérez Hernández J. B., S. Remy, V. Galán Saúco, R. Swennen & L. Sági. 1999. Chemotactic movement and attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to single cells and tissues of banana. *Journal of Plant Physiology* 155:245-250.

Cammue B.P.A., K. Thevissen, M. Hendricks, K. Eggermont, I.J. Goderis, P. Proost, J. Van Damme, R.W. Osborn, F. Guerbet, J.-C. Kader & W.F. Broekaert. 1995. A potent antimicrobial protein from onion (*Allium cepa* L.) seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiology* 109:445-455.

Pérez Hernández J.B. 2000. Development and application of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation to increase fungus-resistance in banana (*Musa* spp.). PhD Thesis. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.

### A novel PCR-based method for the characterization of transgene insertion in transgenic plants

J.B. Pérez Hernández<sup>a</sup>, R. Swennen and L. Sági

Laboratory of Tropical Crop Improvement, *Katholieke Universiteit Leuven*, Belgium. <sup>a</sup>Current address: Department of Tropical Fruits, *Instituto Canario de Investigaciones Agrarias*, La Laguna, Spain).

An anchored-PCR (APCR) method was developed which allows a fast molecular characterization of transgenic plants generated via *Agrobacterium*-mediated transformation. Genomic DNA fragments obtained by digestion with restriction enzymes are specifically amplified with a T-DNA-specific primer in combination with an adaptor-specific primer. The incorporation of suppression PCR conditions (Siebert *et al.* 1995) resulted in a significant improvement and allowed the one-step amplification of specific APCR fragments. Southern hybridization of T-DNA border-specific probes to the APCR fragments revealed that they were indeed correctly amplified from the transgene(s). The APCR analysis of a tester set of 20 transgenic banana plants demonstrated that about 70% of them contained one or two transgene insertions, which compares favourably with the transgene insertion pattern in plants obtained via microparticle bombardment (Becker *et al.* 2000). The technique also allowed the fine structure of the integrated transgene(s) to be revealed: correct as well as truncated insertions were observed, and plants containing vector backbone sequences could be identified. In addition, transgenic plants representing identical transformation events were easily recognized. Finally, nucleotide sequence analysis of cloned APCR fragments fully confirmed the above findings (Pérez Hernández 2000).

#### References

- Siebert P.D., A. Chenchik, D.E. Kellogg, K.A. Lukyanov & S.A. Lukyanov. 1995. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research* 23:1087-1088.
- Becker D.K., B. Dugdale., M.K. Smith, R.M. Harding & J.L. Dale. 2000. Genetic

transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv "Grand Nain" via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 19:229-234.

Pérez Hernández J.B. 2000. Development and application of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation to increase fungus-resistance in banana (*Musa* spp.). PhD Thesis. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.

### Virus and plant-derived promoters for transgene expression in banana

S.R. Hermann, B. Dugdale, O.K. Becker, R.M. Harding and J.L. Dale

Centre for Molecular Biotechnology, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane QLD 4001, Australia.

Promoter regions derived from banana bunchy top virus (BBTV) satellite components (S1 and S2) and banana actin genes have been isolated and characterized in transgenic banana plants. The BBTV S1 and S2 promoters directed vascular-associated reporter gene expression in both dicots and monocots. In banana, the activity of these promoters was significantly increased by the inclusion of monocot-derived introns. Actin gene candidates and their associated 5' upstream sequences were isolated from a variety of plant sources, including banana, using a novel ligation-mediated PCR approach for amplifying flanking sequences. Expression levels and the tissue specificity of one particular banana actin gene (*ACT1*) were further characterized. Northern analysis suggested banana *ACT1* is expressed in both reproductive and vegetative tissues. In transgenic banana plants, the *ACT1* promoter directed strong reporter gene expression in both leaves and roots. Truncations of the *ACT1* promoter indicated all the necessary regulatory elements required for high level (2-fold greater than CaMV 35S) near constitutive expression are located within 1.2 kb of the *ACT1* ATG.

### Better bananas - the biotech way

P. Balint-Kurti, E. Firoozabady, Y. Moy, J. Mercier, R. Fong, L. Wong and N. Gutterson

DNAP (DNA Plant Technology Corporation), 6701 San Pablo Avenue, Oakland, Ca. 94608-1239, USA. E-mail: balint-kurti@dnap.com

At DNAP, our efforts in banana are focused on black Sigatoka resistance, with emphasis at the early stages of variety development on understanding expression characteristics of candidate gene expression signals. Using the chimeric *uidA* gene constructs to assess promoter function, we have been able to identify several promoters with relatively strong activity in leaf, fruit and root tissue. These activities seem to be maintained over several vegeta-

tive generations in the field. Two of these promoters have also been used in experiments to delay fruit ripening by inhibiting fruit-specific ethylene synthesis using sense suppression. Transgenic plants have been assessed in field trials in Costa Rica and southern Mexico and several lines have been shown to have significant delays in fruit ripening over multiple generations. A ~23 base RNA fragment diagnostic of the gene silencing phenomenon has been identified in these suppressed lines.

Transgenic lines expressing five putative disease resistance genes are currently undergoing field-testing in Costa Rica. Transformants expressing 11 more putative disease resistance genes or combinations of genes are at various stages of preparation. We are also using a leaf piece assay to assess some of our transgenics in house. The symptoms produced in this assay are similar to those seen in the field in terms of appearance, timing and cultivar specificity.

### Biotechnological approaches for banana improvement

T.R. Ganapathi, P. Suprasanna, V.M. Kulkarni, Apratim Chakrabarti and V.A. Bapat

Plant Cell Culture Technology Section, Nuclear Agriculture and Biotechnology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai 400 085, India.

Bananas and plantains are the fourth most important food crop and staple food crop for millions of people in the developing world. India is the largest producer of banana in the world. In this country, banana is the second most important fruit crop and is grown on 0.4 million ha with a production of 10 million tons. Conventional method of breeding is complicated due to the triploid nature and only a few diploid clones produce viable pollen. Improvement for disease resistance and productivity requires the use of biotechnological tools. Our group is engaged in tissue culture, somatic embryogenesis, synthetic seeds, *in vitro* mutagenesis and selection, DNA fingerprinting and *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Thirty cultivars/wild species have been conserved and propagated *in vitro*. Tissue culture-raised plants planted at multilocations exhibited increased yield, early maturity and more uniform production cycle. *In vitro* cultures were gamma-irradiated and field evaluation of the irradiated population resulted in certain promising variants. Isolated variants and parent cultivars were analyzed in the field, and at molecular level using RAPDs.

Protocols have been developed for somatic embryogenesis using shoot tip sections in cv. Rasthali (AAB) and male flower buds in cv. Shrimanti (AAA). Embryogenic cell cultures

have been successfully established and maintained by regular subcultures for the past two years (in Rasthali). High frequency conversion of somatic embryos to plants has been achieved and the somatic embryo-derived plants are being field-evaluated.

*Agrobacterium*-mediated transformation using embryogenic cell cultures of cv. Rasthali has been standardized and is now routinely used for gene transfer. Currently, we are working with an anti-microbial peptide, msi99 (a synthetic homologue of Magainin). Studies have shown that this peptide effectively inhibits the growth of *Fusarium oxysporum*, the causal agent of Fusarium wilt. Rasthali, a highly susceptible cultivar, has been transformed with msi99 and transgenic plants have been regenerated.

---

## Intellectual property and genetically modified organisms

### Keynote

#### D. Nicoll

Centre for Law and Genetics, Law School, University of Tasmania, GPO Box 252-89, Hobart, Tas 7001, Australia.

It is probably fair to say that patenting will now usually be in the mind of the genetics researcher for a number of reasons, including:

1. the changing nature of academic science, in particular the need for accountability in economic terms;
2. the nature of biotechnological research: expensive, time-consuming and easily copied; and
3. the increasing involvement of the private sector in the research phase.

The most influential international treaty on intellectual property (IP) rights is the Agreement on Trade Related Aspects of Intellectual Property Rights, or TRIPs, which is an annexure to the WTO Agreement. If a country wants to trade it has to have TRIPs-compatible IP law. Article 27 sets out the following patent law requirements:

- 27.1: Patents are mandatory for any inventions in all fields of technology. The elements of novelty, inventive step (non-obviousness) and industrial applicability (utility) must be satisfied.
- 27.2: Inventions may be excluded to prevent commercial exploitation of the invention to protect ordre public or morality, including protecting human, animal or plant life or health and avoiding serious prejudice to the environment.
- 27.3: Other inventions that may be excluded include: a) diagnostic, therapeutic and surgical methods for the treatment of

humans or animals; b) plants and animals, but not microorganisms; c) biological processes for producing plants and animals, but not technical processes. Plant varieties must be protected in one way or another.

(For full text of the Agreement, see WTO Website: [http://www.wto.org/english/tratop\\_e/trips\\_e/t\\_agm3c\\_e.htm](http://www.wto.org/english/tratop_e/trips_e/t_agm3c_e.htm))

The patentability of living organisms was uncertain prior to the decision of the US Supreme Court in *Diamond v Chakrabarty* 447 US 303 (1980). The Court decided that living organisms could be patented by a slim majority (5 to 4). If the decision had gone the other way it may well have led to a decrease in investment in the biotechnology industry.

Case law in the USA and in Europe indicates that the limitations on patentability of biotechnological inventions are not yet fully defined.

1. Courts have interpreted patent legislation to include living organisms.
2. Ordre public/morality arguments are only likely to succeed in the most extreme cases.
3. US Courts are attempting to meet some of the issues associated with broad patent claims.

Article 27 of TRIPs allows member countries some flexibility in deciding which types of biotechnological inventions should be patentable. This, together with the scope for varied interpretation of national IP legislation by national courts, gives individual countries some leeway to provide the level of IP protection that they deem to be acceptable, within the framework of their own cultural, moral and legal norms (trade barriers aside).

Institutions and global programmes, like INIBAP and PROMUSA, have an important role to play in IP management. In particular, they have the capacity to influence decisions about the acquisition of material that may be used to create patentable inventions and the transfer of technology using that material.

---

## Plant pathology and disease resistance

### The molecular biology of banana bunchy top virus

R.M. Harding, B. Dugdale, G.J. Hafner, C.L. Horser, R. Wanitchakorn and J.L. Dale

Centre for Molecular Biotechnology, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane QLD 4001, Australia. (Current address: CSIRO Plant Industry, Canberra, ACT, 2601, Australia).

Banana bunchy top disease, caused by banana bunchy top nanovirus (BBTV), is considered the most important virus disease affect-

ing banana. The disease is found in almost all banana-growing regions of the world except the Caribbean and the Americas. In the 1920s, bunchy top was the major limiting factor to banana production in Australia. The disease has since been controlled in Australia through the implementation of strict phytosanitary control measures backed up by strict government legislation. Our group has been characterizing this virus for the past 10 years in an effort to develop transgenic virus resistance and to further exploit the virus.

BBTV was initially thought to be caused by a luteovirus based on symptoms, persistent aphid transmission and dsRNA profiles. However, it is now known that BBTV is an isometric virus with a genome comprising at least six different components of circular single-stranded DNA (BBTV DNA-1 to -6) ranging in size from 1018 to 1111 nucleotides. Each DNA component shares a common genome organization including (i) one major gene in the virion sense (except DNA-1 which contains two genes) with an associated polyadenylation signal, (ii) a conserved major common region (CR-M) and stem-loop region (CR-SL), and (iii) a potential TATA box located 3' of the stem-loop. The CR-M is located 5' of the CR-SL and comprises approximately 92 nt with at least 72% homology amongst the DNA components (except for DNA-1 which has a 26 nt deletion). The CR-M is believed to be involved in replication, where it is thought to act as a binding site for an endogenous -80 nt DNA primer. The CR-SL comprises 69 nt with at least 62% homology between components. It incorporates a stem-loop structure which contains a 10 bp stem (14 nt conserved) and an 11 nt loop (9 nt conserved). Based on the sequence analysis of DNA-1, -3 and -5, there are two distinct groups of BBTV isolates, the South Pacific group (Australia, Burundi, Egypt, Fiji, India, Tonga and Samoa) and the Asian group (Philippines, Taiwan, Vietnam). These two groups differ by ~10% over the entire nucleotide sequence and by ~30% within the CR-M.

The major gene of DNA-1 contains motifs associated with rolling circle replication and dNTP binding and encodes a replication initiation (Rep) protein. This Rep protein has been shown to possess site-specific nickase and ligase activity (cleaves between nt 7 and 8 of the stem-loop). The function of the internal gene of DNA-1 is currently unknown. DNA-3 encodes the coat protein while the gene product of DNA-5 has been shown to possess retinoblastoma-binding activity and is thought to be a cell-cycle protein responsible for switching infected cells into S-phase to facilitate virus replication. DNA-4 and -6 appear to encode proteins associated with



cell-to-cell movement and nuclear shuttling, respectively. The function of DNA-2 remains unclear.

BBTV has recently been classified in the genus *Nanovirus* – viruses with isometric virions which are phloem limited and possess a multicomponent, circular, single-stranded DNA genome. Other members of this genus include subterranean clover stunt virus (SCSV), faba bean necrotic yellows virus (FBNYV), milk vetch dwarf virus (MDV) and possible coconut foliar decay virus (CFDV).

BBTV DNA-1 to -6 are considered integral to the BBTV genome since these components are consistently associated with all BBTV infections worldwide. Several additional BBTV-associated DNA components have also been isolated from various BBTV infections. Like BBTV DNA-1, these additional components appear to encode Rep proteins. However, they differ from BBTV DNA-1 in several respects, including:

- genome organization – in general, the CR-M and CR-SL are absent, and the TATA box is located 5' of the stem-loop; and
- they have a limited geographical distribution – they are almost exclusively restricted to the Asian group of BBTV.

We have been examining the replication of BBTV to determine (i) the integral components of the BBTV genome, (ii) which component encodes the "master" Rep, and (iii) the role of the BBTV DNA-1 internal gene. These studies have involved the bombardment of Bluggoe embryogenic cell suspensions with cloned 1.1mers of the different BBTV DNA components either singly or in combination. DNA was extracted from the cells at 0, 4 and 8 days post-bombardment and analyzed with component-specific probes for replicative intermediates. These studies have shown that DNA-1 encodes the "master" viral Rep protein and represents the minimal replicative unit of BBTV since this component, and not the additional Rep-encoding components, is capable of self-replication as well as directing the replication of the other integral BBTV genomic components. We also showed that the internal gene of DNA-1 is not essential for replication but enhances replication in *cis* (possibly analogous to the REn protein of begomoviruses). Finally, we have identified potential Rep-binding sites (iterons) on the BBTV genome which appear to be similar to those of the begomoviruses. The results of this study have suggested the possibility of two groups of nanoviruses: (i) BBTV – which infects monocots and contains an internal gene in the "master" Rep, and (ii) FBNYV, MDV and SCSV – all infect dicots and do not possess an internal gene in the "master" Rep.

## The epidemiology of banana bunchy top virus in Vietnam

K. Bell<sup>1</sup>, P.A. Revill<sup>2</sup>, H.V. Cuong<sup>3</sup>, V.T. Man<sup>4</sup> and J.L. Dale<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Seowon Building, 4th Floor, 57 Garak-Dong, Songpa-Gu, Seoul, South Korea 138-160; <sup>2</sup>Centre for Molecular Biotechnology, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane QLD 4001, Australia; <sup>3</sup>Department of Plant Pathology, Hanoi Agricultural University, Gia Lam, Hanoi, Vietnam.

Banana bunchy top virus (BBTV) causes the most serious viral disease of bananas worldwide. Banana bunchy top disease almost destroyed the banana industry in Australia in the early 1920s, and similar epidemics have occurred in other countries throughout the world. BBTV was first identified in Vietnam in 1968, and is endemic throughout the country. However the epidemiology of BBTV in Vietnam appears to be quite different to that observed in other countries, as it does not cause serious epidemics, and appears to move more slowly through a crop. BBTV is transmitted by the aphid *Pentalonia nigronervosa*, or through infected plant suckers and corms, and typically moves rapidly through a crop. However, in Vietnam it is not unusual to find older BBTV-infected plants adjacent to healthy plants, with banana aphids feeding on all plants. In addition, we have not observed typical BBTV symptoms on the local cultivar Chuoi tay. It is unknown whether Chuoi tay is a host for BBTV, or whether it is resistant to BBTV infection. To improve our understanding of BBTV epidemiology in Vietnam, we investigated a number of factors: (1) we investigated the level of sequence variability of DNA-1, the master rep-encoding component, and showed that sequence variability of BBTV in Vietnam is higher than previously recorded in Asia. We also observed that sequences separated into northern and southern Vietnamese isolates, depending on their origin in Vietnam; (2) we identified a new putative satellite DNA component endemic to Vietnam. Finally, we screened Chuoi tay plants from throughout Vietnam for BBTV, but did not detect virus in any plants using PCR and/or Southern hybridization. This suggests that Chuoi tay may be resistant to BBTV in Vietnam, which could be one of the factors influencing the epidemiology of banana bunchy top disease in Vietnam.

## Viruses and *Musa* germplasm

J.E. Thomas, C.F. Gambley, A.D.W. Geering, L.A. McMichael, J.N. Parry and M. Sharman

Queensland Horticulture Institute, Department of Primary Industries, 80 Meiers Road, Indooroopilly, QLD 4068, Australia.

Commercially important *Musa* spp. include edible bananas and plantains (mostly hybrids of *M. acuminata* and/or *M. balbisiana*) and the

fibre crop *Musa textilis*. Six viruses have been characterized from *Musa* to date (Jones 2000), but additional, uncharacterized viruses have also been recognized.

Banana bunchy top virus (BBTV) has 18-20 nm isometric virions and a multicomponent ssDNA genome. It is transmitted in the persistent manner by the banana aphid *Pentalonia nigronervosa* and has a scattered distribution in Africa and the Asia-Pacific region. Cucumber mosaic virus (CMV) has 29 nm isometric virions and a tripartite ssRNA genome. It is transmitted in the non-persistent manner by a number of aphid species, and has a widespread international distribution. Banana bract mosaic virus (BBrMV) and Abaca mosaic virus (AbaMV) both have filamentous virions, a ssRNA genome and are transmitted in the non-persistent manner by a number of aphid species. AbaMV has only been recorded from the Philippines, while BBrMV has a scattered distribution in the Asia-Pacific region. Banana streak virus (BSV) has bacilliform virions (30 x 130 nm) containing a dsDNA genome, and has a worldwide distribution.

The filamentous virions of Banana mild mosaic virus (BanMMV) contain a ssRNA genome of 7353 nt, encoding five ORFs. Although related to carlaviruses, foveaviruses and potexviruses, the genome organization and phylogenetic relationships of BanMMV place it apart from all previously described virus taxa (Gambley and Thomas, *in press*). The virus occurs in a wide range of *Musa* genotypes and has a worldwide distribution. The virus often occurs as symptomless infections and mixed infections with other viruses, though its mode of transmission is not known. Its economic impact is unknown.

Serological and PCR-based diagnostic assays are available for all the characterized viruses of *Musa*, but BSV still presents challenges. With BSV, symptoms can be prominent, but occur sporadically. Considerable sequence diversity has been found in BSV, and five of these isolates (BSV-OL, BSV-Mys, BSV-GF, BSV-IM and BSV-Lac) are probably sufficiently distinct to be considered separate viruses (Geering *et al.* 2000, A.D.W. Geering, N.E. Olszewski, B.E.L. Lockhart and J.E. Thomas, unpublished). Immunocapture (IC) assays are required to differentiate episomal and integrated BSV sequences. IC-PCR with microplate detection has been developed for all the characterized viruses of banana. A multiplex assay for BBrMV, BBTV and CMV has been published (Sharman *et al.* 2000). Assays for BanMMV and all known strains of BSV (multiplex) have also been developed (M. Sharman, A.D.W. Geering, J.N. Parry and J.E. Thomas, unpublished). These assays are



used in conjunction with ELISA and ISEM for routine virus indexing.

All viruses of *Musa* are transmitted through vegetative propagules, including *in vitro* plantlets, and this has implications for the health of planting material, the conduct of breeding and transformation programmes and the transfer of germplasm. Virus-free planting material is a major factor in field control of these pathogens and, additionally, several of these viruses have limited distributions. Few studies have been conducted on the transmission of banana viruses through tissue culture. Several studies have shown that, through normal subculturing, a proportion of virus-free meristems arise from initially BBTv-infected clones. This process appears to be accelerated somewhat at elevated temperatures, and plants derived from these meristems remain virus-free (Thomas *et al.* 1995, and references therein). Recently, the reverse situation has occurred with BSV. Virus infections have been detected in progeny of hybrids from breeding programmes, where there was no evidence of virus infection in the parent lines. This has been shown to be due to «activation» or «release» of BSV sequences that are integrated into the *Musa* genome (Hull *et al.* 2000). Recent evidence suggests that several additional strains of BSV may be integrated into different components of the hybrid *Musa* genome (A.D.W. Geering, N.E. Olszewski, B.E.L. Lockhart and J.E. Thomas, unpublished).

The INIBAP Transit Centre at K.U. Leuven houses the world's largest *in vitro Musa* germplasm collection comprising over 1100 accessions. These accessions are being indexed for viruses at three international Virus Indexing Centres (CIRAD, Montpellier, PPRI, Pretoria, and QDPI, Brisbane), and only accessions testing negative for known viruses are released. BanMMV and BSV are the most frequently detected viruses, probably due to frequent latent infection, and the additional factor of BSV integration. BBTv and BBrMV have not been detected in the collection.

#### References

- Gambley C.F. & J.E. Thomas. 2001. Molecular characterisation of Banana mild mosaic virus, a new filamentous virus in *Musa* spp. Archives of Virology (in press).
- Geering A.D.W., L.A. McMichael, R.G. Dietzgen & J.E. Thomas. 2000. Genetic diversity among Banana streak virus isolates from Australia. Phytopathology 90:921-927.
- Hull R., G. Harper & B. Lockhart. 2000. Viral sequences integrated into plant genomes. Trends in Plant Science 5(9):362-365.
- Jones D.R. (ed.) 2000. Diseases caused by viruses. Pp. 241-293 in Diseases of banana, abacá and

enset. CABI Publishing, Wallingford, UK/New York, USA.

- Sharman M., J.E. Thomas & R.G. Dietzgen. 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. Journal of Virological Methods 89:75-88.
- Thomas J.E., M.K. Smith, Kessling, A.F. & S.D. Hamill. 1995. Inconsistent transmission of banana bunchy top virus in micropropagated bananas and its implication for germplasm screening. Australian Journal of Agricultural Research 46:663-671.

### Elimination of banana and plantain (*Musa* spp.) viral diseases by cryopreservation

B. Helliot<sup>1</sup>, B. Panis<sup>2</sup>, A. Locicero<sup>1</sup>, K. Reyniers<sup>2</sup>, R. Swennen<sup>2</sup> and P. Lepoivre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plant Pathology Unit, Gembloux Agricultural University, 5030 Gembloux, Belgium. Email: helliot.b@fsagx.ac.be; <sup>2</sup>Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven, 3001 Leuven, Belgium.

Cryopreservation is becoming a routine *in vitro* technique which overcomes the serious limitations encountered by the traditional germplasm conservation strategies used in field, seed and *in vitro* culture collections. The conservation at ultra-low temperatures, usually at -196°C which is the temperature of liquid nitrogen, allows a long-term and contamination-free storage of plant genetic resources. Recently, Brison and collaborators (1997) have demonstrated that cryopreservation could be used, in addition to germplasm conservation, to eliminate viruses from *in vitro* plum shoots infected with plum pox virus with an eradication rate of up to 50%. The possibility of applying a short (few hours) cryopreservation treatment instead of a long (few weeks) heat treatment would be highly promising.

We previously reported on the successful cryopreservation of proliferating meristems of different accessions of banana, one of the most important staple food crops of the world (Panis *et al.* 2000). Bananas, which belong to the *Musa* genus, are found in about 120 countries, mainly tropical and subtropical, on five continents and provide subsistence to millions of people. However, banana plants are threatened by different biotic agents such as bacteria, fungi or viruses, like cucumber mosaic virus (CMV), banana bunchy top virus (BBTV), banana streak virus (BSV), banana bract mosaic virus (BBrMV) and banana mild mosaic virus (BaMMV).

In the framework of an INIBAP project entitled "Development of *in vitro* culture techniques for the elimination of banana and plantain (*Musa* spp.) viral diseases", we aimed to evaluate the effect of cryotherapy on the sanitary state of plant material in comparison with traditional methods such as meristem culture. For this purpose, cryo-

preservation was performed on meristematic clumps excised from highly proliferating meristem cultures by the vitrification procedure using the PVS-2 solution (Sakai *et al.* 1990).

Our results show that eradication rates after cryopreservation of highly proliferating meristems reach 39% (32 plants out of 83 tested plants) and 94% (31 plants out of 33 tested plants) for CMV and BSV respectively. In comparison, eradication rates obtained by culture of meristems excised from highly proliferating meristems reached 11% and 63% for CMV and BSV respectively.

Ultrastructural study of highly proliferating meristems performed after a 1-week *in vitro* culture following cryopreservation showed that cryotherapy acts as a micro-scalpel. Small areas of living cells located in the meristematic dome and at the base of the primordia survive the cryopreservation procedure, while more differentiated cells, distant to the apical dome are killed. Associated with an uneven distribution of viral particles in the meristem, this could explain the efficiency of cryopreservation. The specific localization of viral particles within the meristem is now under investigation. We hope to gain a better understanding of the variations in observed eradication rates according to the virus and according to the therapy.

#### References

- Brison M., M.T. de Boucaud, A. Pierronnet & F. Dosba. 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a *cv Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. Plant Science 123(1-2):189-196.
- Panis B., H. Schoofs, N.T. Thinh & R. Swennen. 2000. Cryopreservation of proliferating meristem cultures of banana. Pp. 238-243 in Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and applications (F. Engelmann & H. Takagi, eds.). Japanese International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Sakai A., S. Kobayashi & I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Rep. 9:30-33.

### A DNA-based diagnostic test for 'tropical' race 4 of *Fusarium* wilt of banana

S. Bentley, N. Moore, J. Pattimore, J. Anderson and K. Pegg

CRCTPP (Cooperative Research Center for Tropical Plant Pathology), University of Queensland, Level 5, John Hines Bldg St Lucia, Brisbane QLD 4072, Australia.

*Fusarium* wilt of banana is a significant problem to the Australian banana industry. The

fungus which causes the disease, *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (*Foc*), is a highly diverse pathogen. At present, only a limited portion of the global diversity of *Foc* has been found in Australia. Thirty-three different vegetative compatibility groups (VCGs) and genotypes of *Foc* have been identified globally, of which nine occur in Australia. Nearly all of the diversity within *Foc* has been identified in Asia, and our proximity to Southeast Asia presents considerable risk of introduction of new strains of *Foc*, and in particular further introductions of the Cavendish-competent strain 'tropical' race 4. 'Tropical' race 4 is widespread throughout Indonesia and Malaysia, and has recently been detected in Irian Jaya. Several outbreaks of the 'tropical' race 4 strain of *Fusarium* wilt have already occurred in the Northern Territory, and so far these have been contained by quarantine measures. This strain of *Fusarium* wilt poses a threat to the major Cavendish production areas in north Queensland, which are presently free from all Cavendish-competent strains of the pathogen.

We are currently developing a DNA-based diagnostic test that is specific for the 'tropical' race 4 strain of *Foc*. We have thoroughly analyzed genetic diversity within *Foc* from the genus to the strain-specific taxon levels using total genomic fingerprinting methods such as DNA Amplification Fingerprinting (DAF) and other PCR-based methods such as restriction fragment length polymorphism (RFLP) and sequence analysis of the ribosomal (r) DNA. We have identified DNA sequence information that is unique to the 'tropical' race 4 strain of *Foc* and designed PCR primers that specifically amplify DNA only from the 'tropical' race 4 strain. Database searches of DNA sequence information published in Genbank have indicated that there are no matches for these primers with any other organism, but we are currently completing the laboratory screening of the specificity of these primers. We will then adapt our laboratory PCR conditions for amplification of *Foc* DNA directly from infected plants and infested soil. The diagnostic test will then require validation and field-testing, prior to release to industry and/or commercial laboratories.

We are also developing a DNA-based identification system that will allow the accurate characterization of all the strains of *Foc* that occur in Australia. This diagnostic system will allow the detection and identification of *Foc* directly from banana planting material and soil. This system will be useful for screening fields for the presence of *Foc* races prior to planting, screening rhizomes or suckers used for planting material, identifying isolates of *Foc* from infected plant tissue or infested soil, and will

also be a useful research tool to study the biology and ecology of *Foc*.

### Isolation of potential disease resistance genes from banana

K.M. Taylor, J.A. McMahon,  
R.M. Harding and J.L. Dale

Centre for Molecular Biotechnology, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane QLD 4001, Australia. E-mail: K0.taylor@qut.edu.au

Bananas are susceptible to a wide range of diseases, of which *Fusarium* wilt and black and yellow Sigatoka are among the most devastating. Although most commercially grown dessert bananas are susceptible to these fungal pathogens, resistance has been identified in wild banana cultivars. A novel approach to identify the resistance genes (R genes) which confer these resistance traits is to amplify genomic banana DNA using degenerate primers designed to class 3 R genes. This approach has been used successfully on lettuce, soybean, rice and maize but to date no banana R gene candidates (RGCs) have been published.

We have used degenerate primers to amplify five independent RGC sequences from banana, all of which show homology to previously characterized R genes. The five sequences were isolated from both resistant and susceptible cultivars and were present in low copy numbers. In addition, all five sequences were amplified from RNA, indicating that they were transcribed. When the DNA and RNA sequences from resistant and susceptible cultivars were compared, variability was observed between the five RGC sequences (<53% homology) and within each RGC (97-100% homology). Amplification of RGC flanking sequences revealed a 5' leucine zipper (LZ) domain and a 3' leucine rich repeat (LRR) domain, which is consistent with class 3 R genes.

### Banana streak virus promoters are highly active in transgenic banana and other monocot and dicot plants

T. Remans<sup>1</sup>, L. Sági<sup>4</sup>, A.R. Elliott<sup>5</sup>,  
R.G. Dietzgen<sup>3</sup>, R. Swennen<sup>4</sup>, P. Ebert<sup>1</sup>,  
C.P.L. Groff<sup>6</sup>, J.M. Manners<sup>2,5</sup> and P.M. Schenk<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, The University of Queensland, Brisbane QLD 4072 Australia; <sup>2</sup>CRCTPP (Cooperative Research Center for Tropical Plant Pathology), University of Queensland, Level 5, John Hines Bldg St Lucia, Brisbane QLD 4072, Australia; <sup>3</sup>QDPI, Queensland Agricultural Biotechnology Centre, The University of Queensland, St. Lucia, QLD 4072, Australia; <sup>4</sup>Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium; <sup>5</sup>CSIRO Plant Industries, Long Pocket Laboratories, 120 Meiers Road, Indooroopilly, QLD 4068, Australia. E-mail for correspondence: remans@biosci.uq.edu.au

Genetic engineering of plants has proven to be a useful method for the introduction of

new desirable traits that are reflected in altered phenotypes, for example enhanced disease resistance. Regulatory sequences or promoters are required to drive efficient expression of the introduced gene in transgenic plants. Viral promoters, such as the 35S promoter of cauliflower mosaic virus, CaMV (Kay *et al.* 1987), have been frequently used for constitutive expression of transgenes in many crops. To obtain strong promoters that are suitable for high-level gene expression in transgenic banana, we have analyzed three novel promoter sequences from Australian banana streak badnavirus (BSV) isolates. These were evaluated in different transient and stable transformation assays using reporter genes encoding the green fluorescent protein (GFP) and B-glucuronidase (GUS) reporter enzymes (Schenk *et al.* 2001). In these experiments, 1322 bp (Cv), 2105 bp (My) and 1297 bp (Go) DNA fragments surrounding the transcription initiation site of the Cavendish, Mysore and Goldfinger BSV isolates (Geering *et al.* 2000) were analyzed for transcription-promoting activity.

Using transient expression assays, the Cv, My and Go fragments were all shown to have promoter activity in a wide range of plant species including monocots (banana, maize, barley, millet, sorghum), dicots (tobacco, canola, sunflower, *Nicotiana benthamiana*, tipu tree), gymnosperm (*Pinus radiata*) and fern (*Nephrolepis cordifolia*) (table 1).

GUS reporter enzyme activity was analyzed in transgenic *in vitro*-grown banana plants (cultivar Three Hand Planty) transformed with the Cv or My promoter constructs. Longitudinal and cross sections of roots, corms, pseudostems and leaves revealed blue staining in all cell types analyzed (for colour photos, visit <http://www.uq.edu.au/~uqtrem>). The strongest expression was observed in the corm and the vascular tissue. In roots, a high staining intensity was observed in vascular tissue and emerging side roots. Quantitative GUS activity levels for plants containing the My promoter constructs were higher in leaf, root and corm tissue compared to plants harbouring maize ubiquitin promoter constructs (Table 1). In glasshouse grown banana plants, the My promoter showed higher activities than the maize ubiquitin and cauliflower mosaic virus 35S promoters (Table 1). The Cv promoter showed activities that were similar to (root and corm) or higher than (leaf) those of the maize ubiquitin promoter in *in vitro*-grown banana plants, but which were significantly reduced in larger glasshouse-grown plants (Table 1). This may be related to silencing associated with the integrated BSV sequence (Ndowora *et al.* 1999, Harper *et al.* 1999) in Three Hand Planty (AAB

genome) plants. As the integrated BSV sequence is thought to be associated with the B-genome, it would be interesting to see if the Cv promoter is more active in AAA-type banana plants.

GFP levels in leaves and stems of transgenic sugarcane plants harbouring a Cv promoter/GFP gene fusion were fluorometrically quantified (Remans *et al.* 1999) and found to be comparable to GFP levels in plants harbouring a maize ubiquitin promoter construct (Table 1). The expression of both the Cv and maize ubiquitin promoter remained also high in ratoon plants of sugarcane. The My promoter was active in young plants but GFP expression was not observed in mature plants. Strong Go promoter activity was observed in transgenic sugarcane callus, but there was no GFP expression in the regenerated shoots. The Cv and My promoters were also active in transgenic *in vitro*-grown tobacco plants, but this activity was lost when these plants were grown to adult stage in the glasshouse (Table 1).

The promoters from banana streak virus represent useful tools for the high-level expression of foreign genes in both monocot and dicot transgenic plants that could be used interchangeably with the CaMV 35S or maize ubiquitin promoters.

## References

- Geering A.D.W., L.A. McMichael, R.G. Dietzgen & J.E. Thomas. 2000. Genetic diversity among Banana streak virus isolates from Australia. *Phytopathology* 90:921-927.
- Harper G., J.O. Osuji, J.S. Heslop-Harrison & R. Hull. 1999. Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255:207-213.
- Kay R., A. Chan, M. Daly & J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236:1299-1302.
- Ndowora T., G. Dahal, D. LaFleur, G. Harper, R. Hull, N.E. Olszewski & B. Lockhart. 1999. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 255:214-220.
- Remans T., P.M. Schenk, J.M. Manners, C.P.L. Grof & A.R. Elliott. 1999. A protocol for the fluorometric quantification of mGFP5-ER and sGFP(S65T) in transgenic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 17(4):385-395.
- Schenk P.M., T. Remans, L. Sági, A.R. Elliott, R.G. Dietzgen, R. Swennen, P. Ebert, C.P.L. Grof & J.M. Manners. 2001. Promoters for pregenomic RNA of banana streak badnavirus are

active for transgene expression in monocot and dicot plants. *Plant Molecular Biology (submitted)*.

## “CIEN BTA-03”, a new somaclonal variant resistant to yellow Sigatoka: biochemical, genetic and molecular characterization and agronomic studies

E. de García<sup>1</sup>, C. Giménez<sup>1</sup>, M. del Carmen Vidal<sup>1</sup>, G. Palacios<sup>1</sup> and O. Haddad<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Central de Venezuela, Apartado 80970, Caracas 1080, Venezuela (E-mail: egarcia@reacciun.ve); <sup>2</sup>Instituto de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.

In 1996, Trujillo and de García obtained a somaclonal variant resistant to yellow Sigatoka by induction of adventitious shoots from the triploid clone Williams, subgroup Cavendish, locally named 'Brasilero', which is susceptible to the disease (Trujillo and de García 1996, Trujillo *et al.* 1999). This somaclonal variant is not only resistant to the disease, but also displays a series of morphological and anatomical characteristics that distinguish it from triploid clones: a) leaf blade 1.4 times thicker than that of clone Williams (Hermoso *et al.* 1997, Trujillo *et al.* 1997); b) lower number of stomata per mm<sup>2</sup> in both upper and lower epidermis (Hermoso *et al.* 1997, Trujillo *et al.* 1997); and c) higher phenol content. This clone was called CIEN BTA-03 (Figure 1).

The aim of this work is to report the data of the biochemical, genetic and molecular characterization of CIEN BTA-03, as well as referring to the evaluation of the resistant behaviour of the variant in the field.

The biochemical studies based on the analysis of the proteins by electrophoresis in denaturing acrylamide SDS-PAGE gels, stained with coomassie blue and scanned in an Imaging Densitometer model GS-690 (Bio-Rad) demonstrated the presence of two polypeptides (14 and 17 kDa) in the Williams clone that are neither observed in the CIEN BTA-03 clone, nor in the Frago 7 (AAAA), both resistant to yellow Sigatoka (Giménez 1998).

Cytogenetic analysis showed that both clones presented mosaic tissues, but with a different chromosome number distribution; 22% of the cells of clone Williams have more than 33 chromosomes and 78% have less than 33 chromosomes. On the contrary, 65% of the cells in the resistant somaclonal variant CIEN BTA-03 have more than 33 chromosomes and 35% have less than 33 (Giménez 1998; Giménez *et al.* 2000).

The flow cytometry analysis demonstrated that somaclone CIEN BTA-03 presents a DNA content similar to or higher than that of clone Frago 7 (Figure 2). The values obtained in the banana/rice mean ratio (B/R index)

**Table 1. Overview of BSV Cv, My and Go promoter activities compared to the CaMV 35S and maize ubiquitin promoters in different plant species. Values representing the highest expressing plant: GUS enzymatic activity (MU) in nmol MU/h/mg protein and GFP accumulation in mg GFP/mg protein.**

	Cv	My	Go	CaMV 35S	Maize ubiquitin
<b>Transgenic plants</b>					
Banana (leaf <i>in vitro</i> )	1076 MU	6299 MU	nt	nt	214 MU
Banana (root+corm <i>in vitro</i> )	2502 MU	10650 MU	nt	nt	2571 MU
Banana (leaf glasshouse)	0 MU	1658 MU	nt	430 MU	418 MU
Sugarcane (leaf glasshouse)	13.1 GFP	< 0.05 GFP	nt	nt	11.6 GFP
Sugarcane (stem glasshouse)	5.57 GFP	nt	nt	nt	0.80 GFP
Tobacco (leaf <i>in vitro</i> )	0.68 GFP	1.35 GFP	nt	1.68 GFP	nt
Tobacco (leaf glasshouse)	< 0.06 GFP	< 0.06 GFP	nt	0.29 GFP	nt
<b>Transient assays</b>					
Maize (sweet corn)	+++	+++	+++	+	+++
Barley	+++	+++	nt	+	nt
Banana	+++	+++	nt	nt	nt
Millet	+++	+++	nt	nt	+++
Sorghum	+++	+++	nt	+	+++
Canola	++	++	++	+++	nt
Tobacco	++	++	nt	+++	nt
Sunflower	++	++	nt	+++	nt
<i>N. benthamiana</i>	++	++	nt	+++	nt
Tipu tree	+++	+++	nt	+++	nt
Pine tree	++	++	nt	++	nt
Fishbone fern	++	++	nt	++	nt

nt = not tested, +++ = strong expression, ++ = moderate to strong expression, + = moderate to weak expression.



Figure 1. Somaclonal variant CIEN BTA-03.

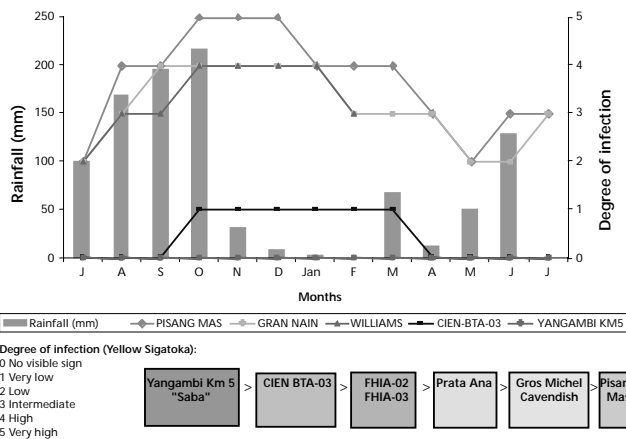


Figure 3. Evaluation of the incidence of yellow Sigatoka on five banana clones growing in a dry forest at 450 m above sea level. Experimental Station Samán Mocho, Carabobo, Venezuela (1999-2000).

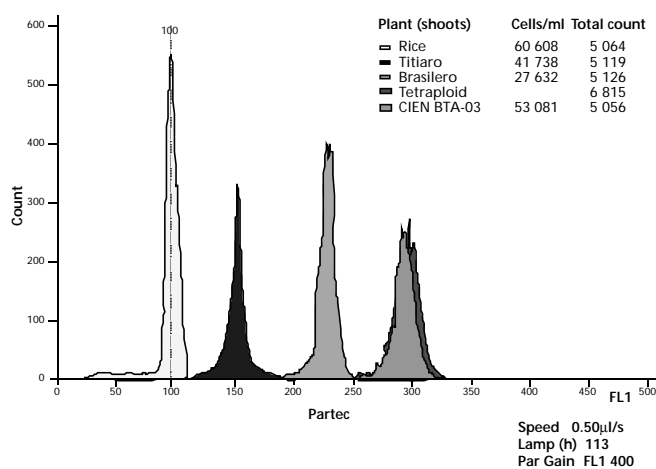


Figure 2. Flow cytometry analysis of four banana clones.

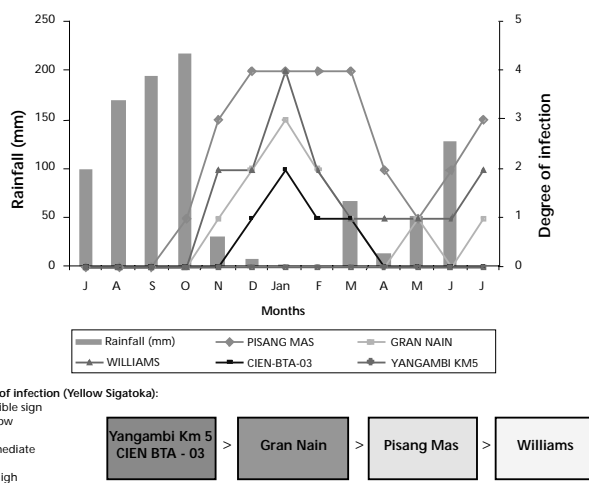


Figure 4. Evaluation of the incidence of black Sigatoka on five banana clones growing in a dry forest at 450 m above sea level. Experimental Station Samán Mocho, Carabobo, Venezuela (1999-2000).

range between 2.92 and 2.99, similar to the tetraploid clone.

Cluster analysis was done using the data obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for CIEN BTA-03 and 16 different genotypes of *Musa* spp. (Giménez 1998, Giménez *et al.* 2000, Vidal and de García 2000). Fifty-six polymorphic bands were used for the cluster analyses using Ward's Unweighted Pair-Group Average (UPGA), and Weighted Pair-Group Average (WPGA) to calculate City-Block (Manhattan) distances. The dendrograms generated by the different methods were identical and showed that CIEN BTA-03 grouped with FHIA-02 (AAAB) and is not closely related to the Cavendish subgroup, to which the parent cultivar William belongs (AAA) (Giménez 1998, Giménez *et al.* 2000).

Field evaluation of the resistant character of CIEN BTA-03 (García *et al.* 2000) shows that this somaclone can be grouped with the

cultivar Yangambi km5, based on its resistance to yellow Sigatoka (Figure 3). This somaclone has proved to be also resistant to black Sigatoka (Figure 4).

The efficiency and productivity indexes of CIEN BTA-03 were compared with the FHIA-01, FHIA-02 and FHIA-03 indexes (García *et al.* 2000). CIEN BTA-03 indexes are very similar in value to FHIA-02 and FHIA-03 indexes (Table 1).

We concluded that we have a new clone resistant to yellow Sigatoka, with a high probability of being also resistant to black Sigatoka, with good agronomic characteristics. It produces a bunch of 34.53 kg and has a productivity index of 0.28 kg per day.

#### Acknowledgements

This research was supported by a grant under contract G-97000700 from the *Consejo Na-*

Table 1. Comparison of the efficiency index and productivity index of four banana clones during the second harvest cycle. Experimental Station Samán Mocho, Carabobo, Venezuela.

Clone/Cultivar	Genome	Flowering to harvest time (days)	Bunch weight (kg)	Efficiency index (days/kg)	Productivity index (Kg/days)
FHIA-01	AAAB	121.67	26.67	4.61	0.22
FHIA-02	AAAB	124.77	31.27	3.99	0.25
FHIA-03	AABB	126.90	36.85	3.47	0.29
CIEN BTA-03	AAAA	121.07	34.53	3.52	0.28

*cional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas* of Venezuela (CONICIT) to Dr Eva de García. The authors are very grateful to Mr Nicolas Roux (Plant Breeding Unit, FAO/IAEA, Seibersdorf, Austria) for the flow cytometry analysis.

## References

- de García E., O. Haddad, M. Dagert & R. Campagnone. 2000. Segundo informe de avance. Proyecto CONICIT G-97000700. 269pp.
- Giménez C. 1998. Características genéticas y moleculares del variante somaclonal de banano (CIEN BTA-03) asociadas al mecanismo de resistencia a la Sigatoka amarilla y su estabilidad genética. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 114pp.
- Giménez C., E. de García, N. Xena de Enrech & I. Blanca. 2001. Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN-BTA-03. *In Vitro Plant* 37(2).
- Hermoso L., H. Lindorf & E. de García. 1997. Anatomía foliar del variante somaclonal CIEN BTA-03 (*Musa* spp.), resistente a la Sigatoka Amarilla. *Anales de Botánica Agrícola*. 4:63-66.
- Trujillo I. & E. de García. 1996. Strategies for obtaining somaclonal variants resistant to yellow Sigatoka (*Mycosphaerella musicola*). *InfoMusa* 5(2):12-13.
- Trujillo I., L. Hermoso & E. de García. 1997. Caracterización estructural de clones de banano: resistentes y no resistentes a la Sigatoka Amarilla. *Anales de Botánica Agrícola*. 4:59-62.
- Trujillo I., E. de García & J.L. Berroterán. 1999. Evaluación de banano obtenidas "in vitro". *Anales de Botánica Agrícola*. 6:29-35.
- Vidal M.C. & E. de García. 2000. Analysis of a *Musa* spp. somaclonal variant resistant to yellow Sigatoka. *Plant Molecular Biology Reports* 18:23-31.

## Biodiversity and evolution

### Characterization of *Musa* germplasm held at INIBAP genebank using STMS-PCR markers

F. Carreel<sup>1</sup>, A. Duarte Vilarinhos<sup>2</sup>, I. Van den Houwe<sup>3</sup> and S. Sharrock<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CIRAD-FLHOR Neufchâteau, Sainte Marie, 97130 Capesterre Belle Eau, Guadeloupe (E-mail: carreel@cirad.fr); <sup>2</sup>CNPMF/EMBRAPA, Cx Postal 007, CEP44380000 Cruz das Almas, Brazil; <sup>3</sup>Katholieke Universiteit Leuven, ITC, Kasteelpark Arenberg 13, 3001 Leuven, Belgium; <sup>4</sup>INIBAP, Parc Scientifique Agropolis II, 34397 Montpellier cedex 5, France.

The International *Musa* Germplasm Collection maintained by INIBAP and hosted by the Catholic University of Leuven (KUL), holds more than 1100 accessions. The objective of

the genebank is to conserve *Musa* diversity for the benefit of the international community and to distribute *Musa* species and cultivars for the purpose of research and development.

The objective of this project is to obtain a molecular characterization of this germplasm in order to facilitate the classification and management of the genebank. Every year since 1998, about 200 individuals have been characterized at CIRAD-FLHOR in Guadeloupe with molecular markers.

Among the different methods available, the choice of sequence-tagged microsatellite site markers (STMS) is justified by numerous advantages: these PCR highly polymorphic codominant markers useable on *in vitro* plantlets are available, and the patterns can be interpreted in terms of genotypes, thus allowing the detection of species-specific alleles or identification of similarities. STMS polymorphism was assayed by non radioactive urea-polyacrylamide gel electrophoresis, a simple transferable method less costly than most other molecular techniques (Lagoda *et al.* 1998a). Patterns and migration procedures on small and large gels were developed and applied depending on the differentiation required among clones. The 10 STMS markers used have a high discrimination potential and are localized independently on the different linkage groups (Lagoda *et al.* 1998b). At least 18 alleles have been identified for each STMS. Some alleles specific to the *schizocarpa*, *balbisiensis* and *Australimusa* genomes were identified which allow the identification of interspecific clones. Most clones revealed different patterns except for clones within subgroups, such as Cavendish. The classification of clones was checked. Over 464 clones were studied, 34 classification errors were identified, classification of 23 clones was completed and 31 non-classified clones were assigned to a group and when possible to a subgroup.

These data help to complete the germplasm morphological database (INIBAP-MGIS), together with the data on ploidy level analysis through flow cytometry (see Dolezel *et al.*, above) and eventually the data on chromosome genomic characterization through GISH (genomic *in situ* hybridization) (D'Hont *et al.* 2000).

## References

- D'Hont A., A. Paget-Goy, J. Escoute & F. Carreel. 2000. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 100:177-183.
- Lagoda P.J.L., D. Dambier, A. Grapin, F.-C. Baurens, C. Lanaud & J.-L. Noyer. 1998a. Nonradioactive sequence-tagged microsatellite site analyses: a

method transferable to the tropics. *Electrophoresis* 19:152-157.

- Lagoda P.J.L., J.-L. Noyer, D. Dambier, F.-C. Baurens, A. Grapin & C. Lanaud. 1998b. Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae. *Molecular Ecology* 7:657-666.

### Molecular studies on *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* and selected local Malaysian species

Yasmin Othman<sup>1</sup>, Norzulaani Khalid<sup>1</sup>, Asif Javed<sup>1</sup>, Mak Chai<sup>1</sup> and Tan Siang Hee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biological Sciences, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia; <sup>2</sup>Genome Centre, Institute Bioscience, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Selangor, Malaysia. E-mail for correspondence: yasmin@gene.um.edu.my

Banana is currently the second largest fruit crop in Peninsular Malaysia and contributes more than RM20 million in export earnings (Jamaluddin 1998).

However, widespread disease problems remain a major constraint to the industry, and require that intensive efforts be made to introduce new resistant cultivars.

The banana programme at the University of Malaya and *Universiti Putra Malaysia* has recently established a molecular breeding group, which will focus on local indigenous species with a major emphasis on the wild banana *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. The programme currently includes an expressed sequence tag (EST) project, STMS analysis, retrotransposon analysis, analysis of potential disease resistance genes and taxonomical studies based on flow cytometry and cytology.

A cDNA library, constructed in a phage vector Itrp1ex2, has been established for EST analysis of *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* genes. Clones from the library are being randomly sequenced and analyzed as part of a long-term banana genomics project. Similarity searches against known sequences deposited in the databases have already revealed identities with genes of known function and with other EST clones. All the sequences obtained will be used to generate a *Musa* EST database to be used for the further understanding and potential exploitation of banana genes.

Retrotransposon analysis has identified Ty 1-copia-like elements in 10 varieties of banana. A database search showed nucleotide identities ranging between 85-97% and predicted amino acid identities of between 57-82% when compared to known RT genes of Ty 1-copia-like retrotransposons. The sequences were subdivided into eight distinct groups similar to the Ty 1-copia retrotransposons found in other plant species such as Tto1 in *Nicotiana tabacum* (Hirochika and Hirochika 1993). Ty 3-gypsy-like retrotransposons have also been isolated with identities ranging from

55-80% when compared to similar elements in the database. The ubiquity and heterogeneity of the Ty 1-copia like and Ty 3-gypsy-like retrotransposons make them a suitable marker for the determination of biodiversity of banana species in Malaysia.

In a separate project, flow cytometry (Dolezel *et al.* 1991) was used to study ploidy and nuclear genome size variation in *Musa* species indigenous to Malaysia, i.e. *Musa acuminata* subspecies, *Musa balbisiana*, *Musa violascens* and *Musa textilis*. No variation was observed in ploidy level, whereas a large amount of variation in the genome size was observed among the different *Musa* species analyzed. Less variability was observed at the intraspecific level within the species *Musa acuminata*. Statistical and cluster analysis of data on genome size related in a grouping agreed well with the generally accepted taxonomic classification of *Musa*.

Studies on disease resistance focus on resistance of local wild bananas to *Fusarium oxysporum*, the major pathogen of banana in Malaysia. The ultimate aim will be the introgression of resistance genes from the wild species into cultivated varieties using approaches integrating genomics and marker-assisted selection.

The overall integrated approach of the programme, with close links to transformation and breeding groups in the country, hopes to contribute to *Musa* improvement programmes both locally and globally.

## References

- Dolezel J. 1991. Flowcytometric analysis of nuclear DNA contents in higher plants. *Phytochem. Analysis* 2:143-154.
- Hirochika H. & R. Hirochika. 1993. Ty 1-copia group retrotransposons as ubiquitous components of plant genomes. *Jpn. J. Genet.* 68:35-46.
- Jamaluddin S.H. 1999. Commercial exploitation of banana diversity in Malaysia. Pp. 45-51 in *Proceedings of the First National Banana Seminar*, 23-25 Nov. 1998, Genting (Z. Wahab *et al.*, eds.).

## Genetic characterization of Brazilian commercial triploid and tetraploid cultivars and wild diploid genotypes using microsatellites

S.A.C.D. Souza<sup>2</sup>, A. Figueira<sup>1</sup>, A. Tulmann Neto<sup>1</sup> and S.O. Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de Sao Paulo, CP 96 Piracicaba, SP, 13400-970, Brazil; <sup>2</sup>ESALQ-USP (Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz», Universidade de Sao Paulo), Brazil; <sup>3</sup>EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Mandioca Fruticultura, Cruz das Almas, BA, Brazil. E-mail: figueira@cena.usp.br

In Brazil, banana cultivars from subgroups "Pome" and "Silk" (AAB) are widely cultivated,

mostly by small growers. The breeding programme of EMBRAPA *Mandioca Fruticultura*, Cruz das Almas, Bahia, Brazil, has developed tetraploid hybrids based on a limited number of triploid commercial selections and wild diploids. Identical cultivars with distinct names (synonymous) and distinct genotypes with similar names (homonymous) might be a common phenomenon, and somatic mutations tend to accumulate in banana. The objectives of this work were to characterize 33 triploid commercial cultivars and tetraploid hybrids, plus 49 wild diploid genotypes from EMBRAPA's breeding programme using microsatellite markers. Primers were purchased from Research Genetics Inc. (Huntsville, AL, USA), and amplified fragments were scored on denaturing polyacrylamide gels stained with silver nitrate. Based on cluster analysis, triploid and tetraploid cultivars grouped according to genome composition (presence of B genome) and to subgroup classification. No difference was detected among cultivars from subgroups "Cavendish" and "Pome". Cultivars with erroneous subgroup classification were identified. Tetraploid selections from the same cross were not identical, and presented expected similarity with maternal triploids. Diploids were highly diverse, with the main parental diploid lines employed to develop tetraploid hybrids being very distinct. Some primers amplified more than one locus suggesting that loci duplication might be common in banana, as previously described in the literature. Genetic distances may be used for selecting future crosses.

## Studies of *Mycosphaerella fijiensis* populations structure and of partial resistance of bananas

C. Abadie<sup>1</sup>, G.-G. Rivas<sup>2</sup>, A. El Hadrami<sup>3</sup>, M.-F. Zapater<sup>3</sup> and J. Carlier<sup>3</sup>

<sup>1</sup>CRBP (Centre régional de recherches sur bananiers et plantains), BP 832, Douala, Cameroon; <sup>2</sup>CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza), 7170, Turrialba, Costa Rica; <sup>3</sup>CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement), TA 40/02, avenue d'Agropolis, 34398 Montpellier, France. E-mail: jean.carlier@cirad.fr

The ascomycete fungus *Mycosphaerella fijiensis* (anamorph *Paracercospora fijiensis*) causes black leaf streak disease (BLS), the most destructive leaf spot disease of bananas (Jones 2000). Knowledge of the extent and distribution of variability within *M. fijiensis* is necessary for breeding and management of BLS resistance. A study of the genetic structure of *M. fijiensis* populations on a global scale showed that individual populations can maintain a high level of genetic diversity and that recombination plays an important role in this pathogen (Carlier *et al.* 1996). Thus partial

but supposed durable resistance should be preferentially used in breeding programmes. The main objectives of this work were to describe the genetic structure of *M. fijiensis* populations at continental and local scales and to evaluate the efficiency and the durability of partial resistance.

To study the population structure of a single pathogenic species, we have first to distinguish this species from close relatives and to determine its distribution. Such a survey, conducted in South and Southeast Asia, led to the discovery of the previously undescribed fungus, *Mycosphaerella eumusae* (anamorph *Septoria eumusae*, Carlier *et al.* 2000). From a taxonomic and phylogenetic study of the ribosomal DNA, we showed that at least nine species, belonging to *Mycosphaerella* or related anamorph genera, can be isolated from banana leaves (Carlier *et al.* unpublished). Considering the presence of all these species, the primers defined in the ITS region (Johanson and Jegger 1993) are not strictly specific to either *M. fijiensis* or *M. musicola*. These results show that a good knowledge of the fungal species complex is necessary to develop diagnostic tools. From the phylogenetic study we developed another tool based on a restriction assay of the ITS region and began looking for new specific primers. Such tools should be useful to determine the distribution and the importance of the different species.

The population structure of *M. fijiensis* at continental and local scales was analyzed from samples collected in Latin American, Caribbean and African countries using eight cleaved amplified polymorphic sequences or CAPS, as molecular markers (Zapater *et al.* unpublished). Within local populations, we found that most of the genetic variability is distributed on a small scale corresponding to the plant scale. In Latin America and the Caribbean zone, the genetic diversity of *M. fijiensis* in Honduras and Costa Rica are relatively high compared to the populations elsewhere, suggesting that the pathogen first entered the zone here. Within both Latin America/Caribbean and African areas, a high level of genetic differentiation was detected between most of the populations analyzed indicating that gene flow is limited (Rivas *et al.* and Carlier *et al.* unpublished). It is likely that the disease, therefore, has spread in the regions through infected plants and/or through restricted dispersion of ascospores. Continued research at a country level will help to specify the relative importance of both means of transmission. Aggressiveness variability was evaluated in two samples collected in Cameroon and the Philippines by inoculation on five partially resistant cultivars using a leaf

pieces assay (El Hadrami *et al.* 1998). This variability was similar for both countries although the level of genetic diversity observed in the Philippines is much higher (Carlier *et al.* 1996). No specific isolate  $\times$  cultivar interactions were detected. Since only susceptible hosts are cultivated in these countries, these results might be explained by the absence of host selection. The potential of pathogen populations to adapt to partial resistance should be analyzed by following their evolution over time in plots of resistant banana genotypes.

To evaluate the efficiency and the durability of partial resistance, three complementary approaches were used: characterization of partial resistance components under controlled conditions, evaluation of the efficiency of these components in the field and population structure analysis of the pathogen. Significant differences between 10 banana genotypes were observed at all stages of the infectious cycle using a leaf pieces assay (El Hadrami 2000). Thus, different components of partial resistance occur at these stages. Epidemiological roles of selected resistance components are currently being studied under field conditions on different plots comprising each a single banana genotype. We are also comparing pathogen population structure between these plots in space and time.

#### References

- Carlier J., M.H. Lebrun, M.F. Zapater, C. Dubois & X. Mourichon. 1996. Genetic structure of the global population of Banana black leaf streak fungus *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 5:499-510.
- Carlier J., M.F. Zapater, F. Lapeyre, D.R. Jones & X. Mourichon. 2000. Septoria leaf spot of banana: a newly discovered disease caused by *Mycosphaerella eumusae* (anamorph *Septoria eumusae*). *Phytopathology* 90: 884-890.
- El Hadrami A., M.F. Zapater, F. Lapeyre, C. Abadie & J. Carlier. 1998. A leaf disk assay to assess partial resistance of banana germplasm and aggressiveness of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease. 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland. BSPP Vol. 2, p.1.1.24.
- El Hadrami A. 2000. Caractérisation de la résistance partielle des bananiers à la maladie des raies noires et évaluation de la variabilité de l'agressivité de l'agent causal, *Mycosphaerella fijiensis*. Thèse d'Université. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. 153pp.
- Johanson A. & M.J. Jegger. 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycological Research* 97:670-674.
- Jones D.R. 2000. Diseases of banana, Abaca and Enset. CABI Publishing, CAB International, UK. 544pp.

### New cytological methods to study old problems in *Musa L.*

**M. Pillay**, M.T.V. Adeleke and A. Tenkouano  
Crop Improvement Division, Plantain and Banana Improvement Project, International Institute of Tropical Agriculture, PMB 008 Nchia-Elemente, Port-Harcourt, Nigeria.

*Musa* breeding is hampered by a number of constraints including a lack of knowledge of chromosome structure, ploidy and causes of sterility. There are no established karyotypes in *Musa* because of its poorly staining small, uniform chromosomes and difficulties in obtaining good spreads. Defining correct ploidy levels and establishing techniques for causes of sterility are necessary in *Musa* breeding. This study describes (i) the use of silver nitrate as a staining agent for *Musa* chromosomes, (ii) a new procedure to examine meiotic chromosomes in *Musa*, (iii) ploidy variation in *Musa* germplasm, and (iv) pollen tube growth in *Musa*. Acetocarmine, the most common stain used in *Musa* cytology, is effective for condensed chromosomes such as those in metaphase, but is ineffective for prophase chromosomes. Silver nitrate is shown to be a useful alternative stain for *Musa* chromosomes. An improved method to examine meiosis in *Musa* is described. The procedure involves dissection of microsporocytes from the anthers, centrifugation to obtain a large number of microsporocytes, digestion with enzymes and treatment of cells with ethanol-acetic acid. Although Giemsa and Leishman's stain were effective for *Musa* chromosomes, silver staining was most effective for the less contracted prophase chromosomes. This technique will be useful to develop pachytene karyotypes, characterize new hybrids, and identify nuclear restitution mechanisms (FDR or SDR). Ploidy and genome composition in some of our *Musa* germplasm showed differences from that of existing data showing the need to better characterize existing germplasm. Finally, a method to observe pollen tube growth in the styles of *Musa* hybrids will be described.

### Biochemistry and fruit ripening

#### Synthetic seeds in banana: a novel propagation and delivery system

T.R. Ganapathi, P. Suprasanna, L. Srinivas and V.A. Bapat

Plant Cell Culture Technology Section, Nuclear Agriculture and Biotechnology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai 400 085, India.

Edible bananas are vegetatively propagated by suckers as viable seeds are not usually produced. New and effective means of propagating bananas would be advantageous over the conventional use of sucker material,

for germplasm maintenance, exchange and also transportation. *In vitro* culture of vegetative meristems or floral apices is the most promising method for mass propagation. The production of synthetic seeds by encapsulating somatic embryos and vegetative propagules is rapidly becoming an applied technique with potential for mass propagation of elite plant species. Synthetic seed technology will have a significant impact on crop production, in both vegetatively propagated and seed-propagated crops. For the vegetatively propagated plants, synthetic seeds would allow direct planting of clonal varieties and may provide a means for maintenance of elite germplasm.

Synthetic seeds have been prepared by encapsulating shoot tips and somatic embryos and their conversion into plantlets has been studied. Shoot tips of cv. Basrai encapsulated in sodium alginate containing different gel matrices regenerated *in vitro* on various substrates. Use of Whites medium resulted in high conversion of encapsulated shoot tips into plantlets. Somatic embryos derived from embryogenic cell cultures of cv. Rasthali were also employed for the preparation of synthetic seeds. The encapsulated embryos converted into plants with varying frequencies on different gel matrices and substrates. Plantlets developed from synthetic seeds have been successfully transferred to soil. Synthetic seeds offer a useful tool since they can be handled like seeds and can be useful for storage, delivery and transportation of banana germplasm.

#### Evaluation of regeneration and transformation systems in *Musa acuminata* var. Pisang Mas (AA) and Pisang Berangan (AAA)

Norzulaani Khalid, Yasmin Othman, Wirakarnain Sani, Mahanom Jalil and Noraziah Juli

Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia.

Fusarium wilt of banana (Panama disease) is native to peninsular Malaysia and has been recorded as a serious threat to the local industry (Thompson and Johnston 1953). However, attempts at improvement by conventional methods have been impeded by the infertile nature of cultivated bananas. For this reason, we are developing tissue culture and transformation protocols for use on our local banana varieties, *Musa acuminata* var. Pisang Mas (AA) and Pisang Berangan (AAA) in our laboratory. Regeneration methods have been attempted from single and naked meristems (scalps), meristematic globules and embryogenic calli. Embryogenic calli were derived



from meristems (Novak *et al.* 1989) and male inflorescences (Escalant *et al.*). The highest number of plants regenerated are from scalps. We are now planting these regenerated plants in the field to test for somaclonal variation. We have observed that the regeneration frequency is higher in Pisang Berangan (AAA) than in Pisang Mas (AA). Cell suspensions of both varieties are also being established. Cell suspensions from male inflorescences developed at a faster rate than those from apical meristems.

Plant transformation using both biolistic and *Agrobacterium* methods were attempted. Scalps and embryogenic calli were shown to be most responsive in the transformation experiments. Histochemical assays were used to optimize transformation parameters and identify suitable explants. Cell suspensions of both varieties will be used for transformation in future.

We are also isolating the antifungal gene from wild banana, *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. According to published data, this species is known to be resistant to Fusarium wilt races 1 and 4 (Vakili 1965).

Innovations for the commercial production of tissue culture plants are also being developed. We have developed a chamber which we call a «steriponics chamber» which merges the principles of tissue culture and aeroponics. The advantages of this chamber include faster plant production, minimum contamination risk and less dependency on labour. This chamber could also be used for physiological and pathogen assessment experiments.

A data tracking system has also been developed to monitor plant production using a bar coding system. The use of this system would allow monitoring of virus-indexed plants

and quality control, and provide the necessary production data.

#### References

- Escalant J.V., C. Teisson, A. Grapin & F. Côte. 1994. Somatic embryogenesis of banana and plantain from young flowers. *InfoMusa* 3(2):4-6.
- Novak F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Conger & Tang Xiolang. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) banana (*Musa* spp.). *Biotech.* 7:154-159.
- Thompson A. and A. Johnston 1953. A host list of plant diseases in Malaya. *Mycological papers* no. 52. CMI, Kew, Surrey, England.
- Vakili N.G. 1965. Fusarium wilt resistance in seedlings and mature plants of *Musa* species. *Phytopathology* 55:135-140.

## Sommaire

Réunion des facilitateurs des groupes de travail de PROMUSA ..... p. I

2<sup>ème</sup> Symposium international sur la biologie moléculaire et cellulaire du bananier ..... p. II

Résumés des communications présentées ..... p. II

• Génomique ..... p. II

• L'expression des gènes chez les plantes transgéniques ..... p. V

• Propriété intellectuelle et organismes génétiquement modifiés ..... p. VII

• Phytopathologie et résistance aux maladies ..... p. VII

• Biodiversité et évolution ..... p. XIII

• Biochimie et maturation des fruits ..... p. XVI

## Qu'est-ce que PROMUSA ?

Le programme mondial pour l'amélioration des bananiers (PROMUSA) est un programme qui cherche à impliquer les principaux acteurs de l'amélioration des bananiers. Il est un moyen de relier le travail mené sur les problèmes des producteurs travaillant pour l'exportation et les initiatives dans le domaine de l'amélioration de la production d'autosubsistance et à petite échelle pour les marchés locaux. Le programme mondial est basé sur les acquis de la recherche et se construit sur les recherches en cours. PROMUSA est donc un mécanisme qui permet de maximiser les résultats et d'accélérer l'impact de l'effort mondial en matière d'amélioration des bananiers. Ce mécanisme novateur, qui permet de catalyser les recherches menées tant à l'intérieur qu'à l'extérieur du GCRAI, favorise la création de nouveaux partenariats entre les Systèmes nationaux de recherche agricole (SNRA) et les instituts de recherche dans les pays développés et dans les pays en voie de développement. La création de tels partenariats contribue aussi à renforcer la capacité des SNRA à conduire des recherches sur les bananiers.

L'une des initiatives majeures de PROMUSA est le développement d'un large éventail de nouveaux hybrides de bananier correspondant aux différentes attentes des petits producteurs du monde entier. Le programme rassemble à la fois les acteurs de l'amélioration conventionnelle, basée sur les techniques d'hybridation et ceux travaillant sur des approches liées au génie génétique et aux biotechnologies. Cet effort en matière d'amélioration génétique s'appuie sur les recherches menées sur des ravageurs et des maladies spécifiques dans le cadre des différents groupes de travail de PROMUSA. Le mécanisme efficace mis en place pour évaluer les nouvelles variétés produites dans le cadre de PROMUSA est une autre composante essentielle du programme.



# PROMUSA

Un programme mondial pour l'amélioration des *Musa*

## Réunion des facilitateurs des groupes de travail de PROMUSA

La première réunion des facilitateurs des groupes de travail de PROMUSA a eu lieu du 18 au 20 avril à Montpellier. Le point a été fait sur les activités des cinq groupes de travail et il a été convenu que le groupe sur l'amélioration génétique continuerait d'opérer sous la forme de deux sous-groupes, plutôt que de se scinder en deux groupes distincts comme cela avait été proposé.

Deux niveaux de participation aux groupes de travail ont été identifiés :

- ceux qui souhaitent recevoir des informations pour contribuer au développement de la recherche en général ;
- ceux qui interviennent plus activement, en participant au développement de la recherche dans les domaines prioritaires définis par le groupe.

Les facilitateurs devront se familiariser avec le travail des participants, identifier ceux d'entre eux qui sont le plus actifs, et stimuler les échanges d'informations et l'utilisation de la liste de messagerie électronique. Ils encourageront les membres des groupes de travail à envoyer régulièrement des informations sur les publications, réunions et formations, et à collaborer à la rédaction des projets. Le secrétariat de PROMUSA contribuera à préparer les projets en fournissant des lignes directrices pour leur rédaction, des informations sur les donateurs, des données de référence sur la production des bananes et plantains, et en apportant au besoin une aide pour la mise en forme rédactionnelle. Il a été souligné que les coordinateurs régionaux de l'INIBAP ont pour responsabilité de susciter des participations de toutes les zones productrices de bananes et que le secrétariat doit appuyer le travail des facilitateurs.

Il a été décidé de créer une base de données sur les membres de PROMUSA, avec des liens vers les bases de données BRIS et MUSALIT de l'INIBAP. Le contenu de cette base de données sera relativement large et il sera demandé aux membres de fournir des informations sur :

- les matériels, outils et méthodes disponibles ;
- les matériels biologiques disponibles et les conditions pour les obtenir ;
- des informations sur les activités de recherche conjointes en cours et sur les nouveaux domaines de collaboration ;
- des informations sur les activités de formation en cours, les domaines de compétence et les infrastructures de formation.

Il a été proposé de remanier le site Web de PROMUSA. Chaque groupe de travail aura sa propre page, donnant des informations sur :

- les membres (avec un lien vers la nouvelle base de données susmentionnée) ;
- les priorités de recherche ;
- toutes les bases de données pertinentes sur les divers aspects de la recherche (par exemple, base de données sur Foc) ;
- les protocoles et méthodologies disponibles (avec les coordonnées des chercheurs ou institutions à contacter) ;
- les publications utiles : fiches techniques, guides techniques, documents de travail (version Word ou PDF) ;
- des liens vers d'autres pages Web en rapport avec le domaine.

Il a également été proposé de préparer des posters pour les réunions scientifiques, au sujet de PROMUSA en général et des activités des différents groupes de travail. Les participants ont discuté des avantages respectifs des réunions mondiales de PROMUSA et des réunions des groupes de travail. A l'avenir, les réunions mondiales devront toujours être programmées immédiatement après une autre réunion scientifique importante. Le calendrier provisoire suivant a été établi :

- groupe de travail sur la nématologie (24-25 mai 2001) après le Symposium international sur la nématologie en Afrique du Sud (21-23 mai 2001) ;
- groupe de travail sur les cercosporioses (mars 2002) en Amérique latine, à la suite du Symposium international sur les affections foliaires des bananiers ;

- groupe de travail sur l'amélioration génétique + réunion sur les stratégies d'amélioration du bananier, à la suite du Troisième symposium international sur la biologie moléculaire et cellulaire du bananier à Louvain, Belgique (septembre/octobre 2002) ;

- groupe de travail sur la fusariose – à décider, les suggestions sont bienvenues ;
  - groupe de travail sur la virologie – à décider, les suggestions sont bienvenues.
- Il a également été proposé d'organiser les réunions mondiales tous les trois ans, ce qui lais-

serait plus de temps aux groupes de travail pour tenir leurs propres réunions spécifiques et progresser dans leurs activités. La prochaine réunion de PROMUSA pourrait donc avoir lieu en 2003, éventuellement à la suite d'un Colloque international sur les bananiers.

## 2<sup>ème</sup> Symposium international sur la biologie moléculaire et cellulaire du bananier

Le Symposium inaugural sur la biologie moléculaire et cellulaire du bananier avait été organisé par le *Boyce Thompson Institute for Plant Research* en mars 1999 à Ithaca (New York, Etats-Unis). L'idée était de créer un forum où tous les acteurs de cette discipline pourraient se rencontrer et échanger des informations sur leurs activités de recherche. Au vu de l'énorme succès de cette réunion, il a été décidé de la rééditer sous l'égide de PROMUSA.

C'est ainsi que le 2<sup>ème</sup> symposium international sur la biologie moléculaire et cellulaire du bananier a eu lieu à Byron Bay (Australie) du 29 octobre au 3 novembre 2000. Il était organisé par la *Queensland University of Technology* (QUT) avec la collaboration locale du CRCTPP (*Cooperative Research Center for Tropical Plant Pathology*) et du QDPI (*Queensland Department of Primary In-*

*dustries*). Le comité d'organisation local a aussi reçu une importante assistance sur le plan international de l'INIBAP, de Zeneca et de la DNAP (*DNA Plant Technology Corporation*, Etats-Unis). Les participants, venus de pays en développement et de pays développés, ont présenté leurs activités de recherche sur une diversité de sujets.

Le symposium était structuré en sessions portant sur les thèmes suivants : génomique ; expression des gènes introduits dans les plantes transgéniques ; phytopathologie et résistance aux maladies ; propriété intellectuelle et organismes génétiquement modifiés ; biodiversité et évolution ; biochimie et maturation des fruits. Des chercheurs internationaux, invités grâce à l'appui reçu des institutions participantes, ont présenté des exposés sur les thèmes "génomique et bananier" (Colin Bird, Zeneca) et "pro-

priété intellectuelle et OGM" (Dianne Nicoll, Université de Tasmanie). Les délégués du CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*) *Plant Industry* ont également fait des présentations en introduction aux sessions sur l'expression des gènes chez les plantes transgéniques (Peter Waterhouse), la phytopathologie et la résistance aux maladies (Jeff Ellis) et la biochimie et la maturation des fruits (Simon Robinson).

Avec 60 délégués venus de 17 pays et un total de 50 communications, ce symposium est à considérer comme l'un des principaux forums scientifiques sur les bananiers.

A titre de contribution additionnelle, l'INIBAP publie ci-après un supplément spécial à PROMUSA regroupant les résumés des présentations faites à cette réunion.

### Résumés des communications présentées

#### Génomique

##### Induction, détection et utilisation des aneuploïdes pour les études génétiques sur *Musa* spp.

N.S. Roux<sup>1</sup>, A. Toloza<sup>1</sup>, J. Dolezel<sup>2</sup> et F.J. Zapata-Arias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plant Breeding Unit, FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Seibersdorf, Autriche; <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, Olomouc, République tchèque.

Des plants de bananiers polyploïdes et aneuploïdes ont été obtenus par traitement aux rayons gamma et à la colchicine. Une variation du nombre de chromosomes a aussi été observée chez des plantes régénérées par organogénèse ou embryogénèse somatique à partir de cultures de tissus, qui n'avaient été exposées à aucun traitement mutagène. On a analysé les plants hors-type régénérés à l'aide de la cytométrie en flux, selon la méthode décrite par Dolezel *et al.* (1997), afin d'estimer leur degré de ploïdie et de déterminer la sensibilité de cette méthode

pour détecter l'aneuploïdie chez *Musa*. Avec des noyaux de globules rouges de poulet (GRP) comme témoin, on a calculé l'indice d'ADN en comparant la position du pic des noyaux de GRP et des noyaux de l'échantillon. Au niveau triploïde, la différence minimale entre un plant euploïde (3x) et un plant aneuploïde (3x ± 1) doit être approximativement de 3 %. Par conséquent, tous les plants présentant un indice d'ADN différant de plus de 1,5 % de l'indice établi pour les plants témoins (3x) ont été considérés comme aneuploïdes. On a vérifié les résultats de l'analyse par cytométrie en flux en comptant les chromosomes dans des cellules de méristèmes apicaux des racines (Dolezel *et al.* 1998). Les résultats obtenus ont montré que la cytométrie en flux était suffisamment sensible pour détecter l'aneuploïdie chez *Musa*. Cependant, pour détecter l'aneuploïdie avec une précision de ± 1 chromosome, il a fallu des analyses à haute résolution avec un coefficient de variation des pics d'ADN inférieur à 2 %. L'avantage de l'analyse par cytométrie en flux est qu'elle permet de détecter les anomalies de teneur en ADN à un stade précoce de la croissance des plants, et aussi pendant la culture *in vitro*. En outre, cette méthode permet de détecter la mixoploïdie. Ainsi, on a, dans plusieurs cas, détecté des différences de degré de ploïdie

entre les tissus foliaires et les tissus racinaires chez un même plant. Les aneuploïdes sont extrêmement utiles pour les études génétiques de nombreuses espèces végétales comme le maïs, la tomate, le tabac et le blé (Khush 1973). A la suite des travaux de Sears, on a pu constituer une collection de lignées aneuploïdes pour définir les relations entre les chromosomes de blé hexaploïde du point de vue de leur origine et de leur fonction (Law *et al.* 1987). Chez *Musa* spp., on rencontre relativement fréquemment des aneuploïdes viables parmi les clones triploïdes. Etant stériles, ils n'offrent qu'un intérêt limité pour les analyses génétiques. Néanmoins, ils peuvent être très utiles pour la cartographie physique et pour établir des relations entre les cartes génétiques et physiques, à l'aide des marqueurs moléculaires déjà disponibles.

#### Références

- Dolezel J., M. Lysak, I. Van den Houwe, M. Dolezelova & N. Roux. 1997. Utilisation de la cytométrie en flux pour la détermination rapide du degré de ploïdie des espèces de *Musa*. *InfoMusa* 6(1):6-9.
- Dolezel J., M. Dolezelova, N. Roux & I. Van den Houwe. 1998. Une nouvelle méthode de préparation de lames pour l'étude à haute résolution des chromosomes chez *Musa*. *InfoMusa* 7(1):3-4.
- Khush G.S. 1973. *Cytogenetics of aneuploids*. Academic Press, New York, USA.

Law C.N., J.W. Snape & A.J. Worland. 1987. Aneuploidy in wheat and its uses in genetic analysis. Pp. 71-108 in *Wheat breeding : its scientific basis* (F.G.H. Lupton, ed.). Chapman & Hall, Londres.

#### Remerciements

Nous remercions Ines Van den Houwe (IN-IBAP) pour les clones végétatifs de *Musa* et Rony Swennen (K.U. Leuven) pour les suspensions cellulaires embryogènes de *Musa*. Cette étude a été financée par un projet de recherche conjoint FAO/AIEA/DGCI (Direction générale de la coopération internationale belge). Elle a été réalisée dans le cadre du Programme mondial pour l'amélioration des *Musa* (PROMUSA).

### Cytogénétique moléculaire et analyse cytométrique des génomes de *Musa*

J. Dolezel, M. Valárik, J. Vrána, M. Dolezelová, J. Safár, M. Lysák et H. Simková

Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, Olomouc, République tchèque.

La cytométrie en flux et la cytogénétique moléculaire ont fait progresser la connaissance du génome de *Musa* aux niveaux nucléaire et chromosomique. L'analyse par cytométrie en flux, méthode pratique et efficace pour estimer la teneur en ADN nucléaire du bananier (Dolezel *et al.* 1994), est utilisée pour vérifier le degré de ploïdie du matériel des collections existantes, caractériser le matériel nouvellement collecté et évaluer la stabilité caryologique *in vitro*. Grâce à son débit élevé, cette méthode peut être facilement intégrée dans les programmes d'amélioration génétique existants. On peut envoyer des échantillons aux laboratoires équipés d'un cytomètre en flux, car il ne faut qu'une petite quantité de tissus végétaux. Cette méthode permet aussi de déterminer la dimension du génome nucléaire. On a constaté que les génomes de *Musa* sont petits, et que le génome B est plus petit que le génome A (Lysák *et al.* 1999). Il reste à mettre au point des protocoles fiables et rapides pour détecter l'aneuploïdie et pour trier les flux de chromosomes. Etant donné la petite taille et la faible différenciation morphologique des chromosomes de *Musa* (Dolezel *et al.* 1998), la cytogénétique moléculaire offre des perspectives très prometteuses pour analyser le caryotype et étudier l'organisation chromosomique. Tandis que l'hybridation *in situ* d'ADN génomique sert à déterminer la constitution génomique des hybrides (D'Hont *et al.* 2000), l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet la cartographie physique des séquences d'ADN des chromosomes. On a déjà localisé dans les chromosomes de *Musa* plusieurs catégories de séquences répétitives d'ADN, parmi lesquelles des gènes d'ARN ribosomal, un rétrotransposon et des séquences

du BSV (Balint-Kurti *et al.* 2000, Dolezelová *et al.* 1998, Harper *et al.* 1999). Il reste à isoler davantage de séquences d'ADN et à les cartographier pour élucider la structure moléculaire des chromosomes et établir les mécanismes de différenciation des génomes de *Musa*. L'identification de chaque chromosome à l'aide des séquences d'ADN cartographiées physiquement permettra d'analyser leur comportement et leur ségrégation pendant leur évolution et dans le cadre des programmes d'amélioration génétique. Les séquences d'ADN à copie unique et à faible nombre de copies cartographiées physiquement fourniront les sites d'ancrage nécessaires pour intégrer les cartes physiques et génétiques.

#### Références

- Balint-Kurti P.J., S.K. Clendennen, M. Dolezelová, M. Valárik, J. Dolezel, P.R. Beetham & G.D. May. 2000. Identification and chromosomal localization of the *monkey* retrotransposon in *Musa* sp. *Mol. Gen. Genet.* 263:908-915.
- D'Hont A., A. Paget-Goy, J. Escoute & F. Carrel. 2000. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 100:177-183.
- Dolezel J., M. Dolezelová & F.J. Novák. 1994. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biol. Plant.* 36:351-357.
- Dolezel J., M. Dolezelová, N. Roux & I. Van den Houwe. 1998. Une nouvelle méthode de préparation de lames pour l'étude à haute résolution des chromosomes chez *Musa*. *InfoMusa* 7(1):3-4.
- Dolezelová M., M. Valárik, R. Swennen, J.P. Horry & J. Dolezel. 1998. Physical mapping of the 18S-25S and 5S ribosomal RNA genes in diploid bananas. *Biol. Plant.* 41:497-505.
- Harper G., J. Osuji, J.S.P. Heslop-Harrison & R. Hull. 1999. Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: Molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255:207-213.
- Lysák M.A., M. Dolezelová, J.P. Horry, R. Swennen & J. Dolezel. 1999. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theor. Appl. Genet.* 98:1344-1350.

#### Remerciements

Cette étude, effectuée dans le cadre du Programme mondial pour l'amélioration des *Musa* (PROMUSA), a été financée par le contrat de recherche n° 8145/RB de l'Agence internationale de l'énergie atomique.

### Marqueurs pour déterminer l'intégrité génomique : des variants somaclonaux de bananiers utilisés comme système modèle

C.A. Cullis<sup>1</sup>, K. Kunert<sup>2</sup> et B. Okole<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Case Western Reserve University and NovoMark Technologies LLC, Cleveland, Ohio 44106, Etats-Unis; <sup>2</sup>Botany Department, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, Pretoria 0002, Afrique du Sud; <sup>3</sup>African Biotechnologies (PTY) LTD, Tzaneen 0850, Afrique du Sud.

Il est depuis longtemps établi que la variation somaclonale est un sous-produit de la multiplication

de cellules végétales subissant un ou plusieurs cycles de croissance cellulaire désordonnée. La plupart des processus de transformation utilisés pour produire des plantes transgéniques comprennent au moins une étape dans laquelle on cultive des cellules pour régénérer ensuite des plantes. Par conséquent, tous les individus transgéniques obtenus par cette méthode peuvent contenir une variation, même en l'absence de toute mutation visible. A l'aide des techniques RAPD et AFLP, on a déjà mis en évidence beaucoup d'altérations génomiques chez des plantes transgéniques. Bien qu'on ait constaté que des polymorphismes similaires se produisent de manière répétée, aucun des variants ne s'est révélé utile pour prédire le niveau de variation génomique qui a eu lieu. Dans cette étude, des hors-types bien connus issus de la culture de tissus de bananiers ont servi de système modèle pour identifier les régions du génome qui sont particulièrement susceptibles de changer et pour développer des marqueurs permettant de déterminer l'ampleur du changement. On a procédé à l'analyse des différences représentatives pour isoler les différences génomiques entre deux paires de cultivars de bananiers normaux et variants – entre Williams et un hors-type masada/chlorotique et entre un individu Curare Enano normal et un hors-type nain (cette dernière paire ayant été fournie par R. Swennen). Dans l'un et l'autre cas, on a identifié des différences entre les clones. Beaucoup de séquences étaient communes aux deux groupes de produits de l'analyse différentielle, en dépit du fait qu'ils correspondaient à des phénotypes aberrants différents. L'un des produits identifiés était une séquence minisatellite qui s'est aussi révélée labile chez le palmier dattier. Ces résultats apportent de nouveaux éléments pour démontrer la présence d'un segment labile du génome qui est modifié de manière préférentielle lors de la production de variants somaclonaux. On est en train de poursuivre la caractérisation des produits de l'analyse différentielle afin de développer une série de marqueurs qui pourront servir à identifier les changements génomiques précoces, et aussi à diagnostiquer les phénotypes spécifiques résultant du processus de culture de tissus.

### Identification de marqueurs AFLP et ISSR associés aux variants somaclonaux nains chez les bananiers Cavendish

T.R. Benatti<sup>1</sup>, S.A.C.D. Souza<sup>1</sup>, J.A. Scarpare<sup>2</sup> Filho, P.C. Santos<sup>3</sup>, A. Tulmann Neto<sup>1</sup>, E.A. Kido<sup>1</sup> et A. Figueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, CP 96, Piracicaba, SP, 13400-970, Brésil;

<sup>2</sup>ESALQ-USP (Escola Superior de Agricultura « Luiz de Queiroz », Universidade de São Paulo), Brésil; <sup>3</sup>UNESP (Universidade Nacional do Estado de São Paulo), Ilha Solteira, Brésil. E-mail : figueira@cena.usp.br

Lors de la production de vitroplants, une variation somaclonale se produit communément chez cer-

tains cultivars de bananiers, pour des raisons indéterminées. Il est souhaitable de pouvoir détecter rapidement ces variants lorsqu'on produit des vitroplants à des fins commerciales ou si l'on veut mettre au point des méthodes pour accroître la variabilité à des fins d'amélioration. Les marqueurs moléculaires offrent un grand potentiel pour détecter la variation somaclonale et en identifier les causes. L'objectif de cette étude était de tester l'analyse AFLP (polymorphisme de longueur des fragments d'amplification) et l'analyse ISSR (amplification intermicrosatellite), avec électrophorèse sur gels de polyacrylamide colorés au nitrate d'argent, pour comparer un cultivar Cavendish "Nanicão Jangada" avec son variant somaclonal nain. Sur 12 amorces ISSR testées, deux (16,6 %) présentaient trois fragments polymorphes qui n'étaient présents que chez le variant nain. On a testé toutes les combinaisons d'amorces AFLP du kit AFLP System I (Life Technologies, Rockville, MD, Etats-Unis) en amplifiant un total de 1665 bandes. Chaque combinaison d'amorces a amplifié en moyenne 26,4 fragments allant de 7 à 44 bandes. On a identifié 43 fragments polymorphes (2,6 %), dont 19 (1,1 %) n'étaient présents que chez le variant nain. Les fragments polymorphes étaient stables d'un essai à un autre. On a également fait un essai AFLP de sensibilité à la méthylation, sur la base de la capacité différentielle d'une paire d'isoschizomères à restreindre la cytosine méthylée. On a utilisé une combinaison de 24 amorces pour amplifier l'ADN des deux génotypes. En moyenne, 24,8 fragments ont été amplifiés à partir des ADN traités avec HpaII et 22,1 à partir des ADN traités avec MspI, ce qui est comparable aux résultats obtenus avec l'AFLP normale. Douze bandes polymorphes (2,1 %) étaient présentes uniquement chez "Nanicão Jangada" dans les produits de la digestion avec HpaII, tandis que huit fragments (1,6 %) étaient polymorphes dans les produits de la digestion avec MspI. Seulement trois polymorphismes (0,5 %) pouvaient provenir de différences de méthylation. D'autres variants nains sont actuellement testés avec les mêmes combinaisons d'amorces, et les fragments polymorphes seront clonés et séquencés.

#### **Application des techniques AFLP (polymorphisme de longueur des fragments d'amplification) et MSAP (polymorphisme de sensibilité à la méthylation) à la détection des polymorphismes de l'ADN et des changements dans la méthylation de l'ADN chez des vitroplants de bananiers**

A. James, V. Herrera, L. Peraza et S. Peraza

Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 #130, Colonia Churuburno de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, Mexique.

On a étudié les effets de l'origine de l'explant sur les polymorphismes de l'ADN et sur les changements intervenant dans la méthylation de

l'ADN dans les feuilles de vitroplants de bananiers "Grande Naine" (*Musa AAA*). Les explants utilisés étaient issus de jeunes apex floraux mâles ou de rejets, et les cultures induites à partir de ces explants ont été repiquées cinq fois. Des tissus foliaires équivalents ont été prélevés sur dix plants multipliés de manière conventionnelle pour servir de témoins pour l'analyse MSAP (Xiong *et al.* 1999). On a utilisé dix combinaisons d'amorces pour l'analyse AFLP et huit amorces pour l'analyse MSAP. On n'a constaté aucune différence significative entre les deux types d'explants avec l'AFLP ou le MSAP dans les tissus foliaires des plants obtenus par multiplication conventionnelle. Cependant, le nombre de polymorphismes de l'ADN était significativement plus élevé chez les vitroplants que chez les explants dont ils étaient dérivés. En outre, il s'est avéré que l'origine de l'explant exerçait une influence significative sur le taux de polymorphismes mis en évidence par l'AFLP, les régénérants dérivés de l'inflorescence présentant une plus forte variation (6,36 %) que ceux dérivés de rejets (3,96 %).

On a constaté la méthylation des cytosines dans un total de 107 bandes sur 465 (23 %) chez les vitroplants, tandis que cette proportion était de 18 % chez les plants multipliés de manière conventionnelle. Il n'y avait aucune différence significative dans le taux de polymorphismes de méthylation de l'ADN entre les vitroplants dérivés de l'inflorescence (3 %) et ceux dérivés de rejets (1,7 %). La plupart des bandes polymorphes étaient hyperméthylées et avaient un poids moléculaire élevé (supérieur à 700 pb). C'était aussi le cas de la plupart des bandes hyperméthylées communes à tous les vitroplants, mais qui n'étaient pas méthylées chez les plants multipliés de manière conventionnelle. On a établi une corrélation entre certains plants présentant des polymorphismes AFLP et des plants présentant des polymorphismes de méthylation.

La micropropagation engendre donc des changements génétiques (et peut-être aussi épigénétiques) importants chez les plants de bananier "Grande Naine" obtenus par cette voie. Il reste à déterminer si l'hyperméthylation observée chez tous les régénérants est liée à leur développement ou si elle est provoquée par les conditions mêmes de la culture de tissus. Les corrélations constatées entre les polymorphismes AFLP et MSAP démontrent indirectement que l'hyperméthylation peut induire des changements dans les bases, peut-être par déamination (Kaepler *et al.* 2000). Nous cultivons actuellement tous les régénérants jusqu'à la maturité dans notre station expérimentale du Yucatan afin de pouvoir procéder à leur caractérisation phénotypique.

#### **Références**

Kaepler S., H.F. Kaepler & Y. Rhee. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43:179-188.

Xiong L.Z., C.G. Xu, S. Maroof & Q. Zhang. 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol. Gen. Genet.* 261:439-466.

#### **Les séquences du badnavirus de la mosaïque en tirets chez *Musa***

G. Harper<sup>1</sup>, T. Schwarzacher<sup>2</sup>, C. Hansen<sup>2</sup>, P. Heslop-Harrison<sup>2</sup> et R. Hull<sup>1</sup>

<sup>1</sup>John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, Royaume-Uni; <sup>2</sup>Department of Biology, University of Leicester, Leicester LE1 7RH, Royaume-Uni.

Les données moléculaires et cytogénétiques démontrent de manière incontestable que des séquences du badnavirus de la mosaïque en tirets du bananier (BSV) sont intégrées dans le génome du bananier plantain Obino l'Ewai (AAB) et que ces séquences sont pour l'essentiel identiques à celles d'un virus épisomal qui provoque une infection chez *Musa* (Harper *et al.* 1999, Ndowora *et al.* 1999). Il existe chez Obino l'Ewai deux locus différant par le nombre de copies des séquences du BSV, et dans au moins l'un d'entre eux, la structure des séquences virales intégrées est réarrangée. Des infections importantes du BSV sont détectées durant la méiose ou la culture de tissus chez certaines variétés contenant le génome B, et les observations tendent à démontrer que l'infection du BSV épisomal est produite par l'activation ou la mobilisation de séquences intégrées du BSV. On a proposé un modèle faisant intervenir une recombinaison, qui établit un lien entre les séquences intégrées et la production de formes répliquatives du virus (Ndowora *et al.* 1999). Ce phénomène a des implications majeures pour la pathologie, l'amélioration, les mouvements de matériel génétique et la quarantaine.

Le phénomène de l'intégration du BSV peut être mis en parallèle avec deux autres cas impliquant des pararétrovirus : le virus de la décoloration des nervures de *Petunia* (*Petunia vein-clearing virus*, PVCV) (Richert-Pöggeler and Shepherd 1997) et le virus de la décoloration des nervures du tabac (*Tobacco vein-clearing virus*, TVCV) (Lockhart *et al.* 2000). Il existe chez *Petunia hybrida* un PVCV épisomal qui apparaît à la suite d'un stress environnemental (par exemple, une carence en éléments nutritifs) et chez l'hybride *Nicotiana edwardsonii* un TVCV épisomal qui apparaît après un changement de durée de la photopériode. Chez ces deux espèces hybrides, on trouve des séquences virales intégrées, pratiquement identiques aux séquences du virus épisomal, avec un grand nombre de copies. De même que pour le BSV du bananier, les séquences virales ne sont intégrées que dans l'un des génomes parentaux de l'hybride, bien que le virus épisomal ne soit pas détectable chez le parent en question. Cela semble indiquer que l'autre génome parental joue un rôle dans l'"activation" des séquences virales chez l'hybride.

Des fragments d'une séquence similaire au pararétrovirus du tabac (TPVL) ont été trouvés dans l'ADN génomique de *Nicotiana* sp. (Jakowitsch *et al.* 1999). Nous avons montré que les séquences de pararétrovirus constituent probablement une composante importante et fréquente des génomes des plantes, chez les gymnospermes comme chez les angiospermes. Leur présence a peut-être des effets sur l'inhibition de l'expression de certains gènes et sur l'évolution du génome. Il n'existe encore aucune preuve que ces séquences donnent lieu à de nouveaux symptômes viraux, comme cela semble être le cas pour les séquences pararétrovirales intégrées qui leur sont apparentées.

La nature et le contexte génomique des séquences intégrées du BSV sont en cours d'étude chez Obino l'Ewai et chez d'autres variétés. Une séquence modérément répétée, qui flanque la séquence intégrée du BSV chez Obino l'Ewai (MusaOL), est concentrée avec un nombre variable de copies près des centromères de la plupart des chromosomes dans le génome A comme dans le génome B. Le faible nombre d'intégrants apparentés au BSV par génome indique que l'intégration du BSV a eu lieu après l'amplification et la distribution des séquences MusaOL, et qu'il s'agit donc très probablement d'un événement récent.

#### Références

- Harper G., J.O. Osuji, J.-S. Heslop-Harrison & R. Hull. 1999. Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255:207-213.
- Ndowora T., G. Dahal, D. LaFleur, G. Harper, R. Hull, N. Olszewski & B. Lockhart 1999 Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 255:214-220.
- Richert-Pöggeler K.R. & R.J. Shepherd. 1997. Petunia vein clearing virus: a plant pararetrovirus with the core sequences for an integrase function. *Virology* 236:137-146.
- Lockhart B.E., J. Menke, G. Dahal & N. E. Olszewski. 2000. Characterization and genomic analysis of tobacco vein-clearing virus, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. *J. Gen. Virol.* 81:1579-1585.
- Jakowitsch J., M.F. Mette, J. van der Winden, M.A. Matzke & A.J.M. Matzke. 1999. Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96(23):13241-13246.

### La souche OL du virus de la mosaïque en tirets du bananier est-elle le seul intégrant activable du virus dans le génome de *Musa* ?

A.D.W. Geering<sup>1</sup>, J.N. Parry<sup>1</sup>, L. Zhang<sup>2</sup>, N.E. Olszewski<sup>3</sup>, B.E.L. Lockhart<sup>2</sup> et J.E. Thomas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Queensland Horticulture Institute, Department of Primary Industries, 80 Meiers Road, Indooroopilly, QLD 4068, Australie; <sup>2,3</sup>Departments of Plant Pathology and Plant Biology

(respectivement), University of Minnesota, St. Paul, Minnesota 55108, Etats-Unis.

En 1999, plusieurs infections sévères du virus de la mosaïque en tirets du bananier (BSV) se sont produites dans des plantations d'hybrides IRFA 909, 910 et 914 localisées dans des sites distincts en Nouvelle-Galles du Sud et au Queensland. Ces nouveaux hybrides, provenant du programme d'amélioration des bananiers du CIRAD, faisaient l'objet d'une évaluation pour la résistance à *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* depuis 12 à 18 mois au moment où les symptômes du BSV se sont exprimés. Ils avaient été soumis à des tests par PCR avec immunocapture (IC-PCR) qui avaient donné des résultats négatifs pour le BSV-Onne. Toutefois, les tests avaient donné des résultats positifs pour le BSV-Goldfinger chez IRFA 909 et 910. Le badnavirus isolé chez IRFA 914 ne ressemblait à aucun de ceux qui ont été examinés jusqu'à présent. Nous avons appelé cet isolat BSV-IM. Nous avons amplifié l'ADN du BSV-IM avec des amorces PCR dégénérées et, à partir de la séquence du fragment d'ADN, nous avons créé des amorces spécifiques de ce virus. Nous avons ainsi procédé à une nouvelle analyse par PCR qui a montré qu'IRFA 909 et 910 étaient infectés à la fois par le BSV-Goldfinger et par le BSV-IM. Dans une série d'essais échelonnés dans le temps, IRFA 914 n'a donné de réaction positive que pour le BSV-IM, et jamais pour le BSV-GF. Nous avons aussi constaté l'infection d'un plant d'IRFA 914 par le BSV-IM en Nouvelle-Calédonie.

En purifiant ce virus chez IRFA 910, nous avons obtenu des clones d'ADN représentant la totalité du génome du BSV-IM. Nous avons entièrement séquencé ce virus et les premières analyses des séquences semblent indiquer qu'il s'agit d'une espèce virale distincte. Lors de la comparaison des protéines codées par les ORF I, II et III du BSV-OL (accession AJ002234 de la banque génétique) et du BSV-IM, les identités de séquences étaient respectivement de 60,5 %, 42,3 % et 64,3 %. Nous avons envisagé la possibilité que le BSV-IM soit issu de séquences virales intégrées. Nos clones viraux se sont hybridés avec l'ADN digéré par *EcoRI* et *HindIII* de deux parents diploïdes B des lignées hybrides IRFA, mais ne se sont pas hybridés avec l'ADN digéré de manière similaire d'Obino l'Ewai, de Calcutta 4 et de plusieurs autres cultivars AAA. Les clones viraux se sont aussi hybridés avec l'ADN génomique non coupé des deux parents diploïdes B. Ces derniers n'ont jamais présenté de symptômes du BSV et, dans des essais par immunoelectroscopie sur extraits concentrés de feuilles, ont donné des réactions négatives pour le BSV. Les schémas d'hybridation observés ne correspondent pas à ceux attendus pour un ADN viral épisomal. Ces résultats semblent indiquer que l'infection par le BSV-IM résulte de l'activation de séquences intégrées.

Nous avons aussi examiné la possibilité que d'autres souches du BSV soient également inté-

grées dans le génome de *Musa*. A l'aide de sondes pour la totalité du génome du BSV-Mys (Geering *et al.* 2000), nous avons observé des schémas d'hybridation complexes avec l'ADN digéré par *EcoRI* et *HindIII* de trois bananiers diploïdes B, ainsi que des cultivars Obino l'Ewai (groupe AAB), Goldfinger (groupe AAAB) et Pisang Ceylan (groupe AAB), ce qui semble indiquer que la séquence du BSV-Mys est intégrée. De manière similaire, en utilisant une sonde de 1,3 kb du BSV-GF (Geering *et al.* 2000), nous avons détecté un fragment de *HindIII* d'environ 20 kb dans l'ADN de deux bananiers diploïdes B, ainsi que dans celui des cultivars Obino l'Ewai, Goldfinger et Pisang Ceylan, ce qui laisse à penser que la séquence du BSV-GF y est également intégrée. Nous n'avons observé aucune hybridation entre les sondes BSV-Mys ou BSV-GF et l'ADN d'une série de cultivars AA et AAA, ce qui semble indiquer que l'ADN intégré est lié au génome B des bananiers cultivés.

#### Référence

- Geering A.D.W., L.A. McMichael, R.G. Dietzgen & J.E. Thomas. 2000. Genetic diversity among Banana streak virus isolates from Australia. *Phytopathology* 90:921-927.

### L'expression des gènes chez les plantes transgéniques

#### Obtention de bananiers (*Musa* spp.) transgéniques par transformation à l'aide d'*Agrobacterium*

J.-B. Pérez Hernández<sup>1</sup>, R. Swennen<sup>1</sup>, V. Galán Saúco<sup>2</sup> et L. Sági<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven, Belgique; <sup>2</sup>Department of Tropical Fruits, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna, Espagne (Adresse actuelle : Department of Tropical Fruits, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna, Espagne).

L'évaluation systématique des étapes successives des interactions naturelles entre *Agrobacterium* et les plantes a permis d'élaborer un protocole de transformation efficace pour le bananier. On a observé chez différentes cellules et différents tissus de plusieurs cultivars de bananiers un phénomène de chimiotactisme et de fixation physique de cellules bactériennes (Pérez Hernández *et al.* 1999). L'expression transitoire d'un gène reporter a été mise en évidence dans plusieurs tissus cultivés en association avec *Agrobacterium* induit par *vir*, les fréquences les plus élevées étant enregistrées dans les cultures de suspensions cellulaires embryogènes. Une transformation stable a été obtenue après sélection sur un milieu contenant de la généticine ou du Basta. Au total, on a généré plus de 600 plantes transgéniques au cours de cinq expérimentations distinctes ; plus

de 90 % de ces plantes exprimaient le gène introduit (*gfp* ou *gusA*). La caractérisation moléculaire a révélé un schéma d'intégration simple chez la plupart de ces plantes transgéniques. On a criblé des plantes transgéniques contenant le gène codant pour le peptide antimicrobien Ace-AMPI (Cammue *et al.*) dans un essai sur des morceaux de feuilles et l'on a identifié des plantes susceptibles de présenter une tolérance supérieure aux champignons (Pérez Hernández 2000).

#### Références

- Pérez Hernández J. B., S. Remy, V. Galán Saúco, R. Swennen & L. Sági. 1999. Chemotactic movement and attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to single cells and tissues of banana. *Journal of Plant Physiology* 155:245-250.
- Cammue B.P.A., K. Thevissen, M. Hendricks, K. Eggermont, I.J. Goderis, P. Proost, J. Van Damme, R.W. Osborn, F. Guerbet, J.-C. Kader & W.F. Broekaert. 1995. A potent antimicrobial protein from onion (*Allium cepa* L.) seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiology* 109:445-455.
- Pérez Hernández J.-B. 2000. Development and application of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation to increase fungus-resistance in banana (*Musa* spp.). Thèse de PhD, Katholieke Universiteit Leuven, Belgique.

### Une nouvelle méthode de PCR pour caractériser l'insertion des transgènes dans les plantes transgéniques

J.-B. Pérez Hernández, R. Swennen et L. Sági

Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven, Belgique (Adresse actuelle : Department of Tropical Fruits, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna, Espagne).

On a mis au point une méthode de PCR avec ancrage (APCR) pour procéder rapidement à la caractérisation moléculaire de plantes transgéniques obtenues par transformation à l'aide d'*Agrobacterium*. Des fragments d'ADN génomique, obtenus par digestion par des enzymes de restriction, sont amplifiés spécifiquement avec une amorce spécifique de l'ADN-T combinée à une amorce spécifique de l'adaptateur. La PCR se faisant en conditions suppressives (Siebert *et al.* 1995), la méthode est considérablement améliorée et permet d'amplifier les fragments APCR spécifiques en une seule étape. L'hybridation Southern de sondes spécifiques des bordures de l'ADN-T avec les fragments APCR a révélé que ceux-ci étaient correctement amplifiés. L'analyse par APCR d'un groupe de 20 bananiers transgéniques a démontré qu'environ 70 % contenaient des insertions d'un ou deux transgènes, ce qui constitue un meilleur résultat que le schéma d'insertion de transgènes chez les plantes obtenues par bombardement de microparticules (Becker *et al.* 2000). Cette technique a aussi permis de mettre en évidence la structure fine du (ou des) trans-

gène(s) intégré(s) : on a observé des insertions correctes ainsi que des insertions tronquées, et l'on a pu identifier les plantes contenant les séquences de l'ossature du vecteur. En outre, on a pu facilement reconnaître les plantes transgéniques correspondant à des événements de transformation identiques. Enfin, l'analyse des séquences nucléotidiques de fragments APCR clonés a entièrement confirmé les résultats ci-dessus (Pérez Hernández 2000).

#### Références

- Siebert P.D., A. Chenchik, D.E. Kellogg, K.A. Lukyanov & S.A. Lukyanov. 1995. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research* 23:1087-1088.
- Becker D.K., B. Dugdale, M.K. Smith, R.M. Harding & J.-L. Dale. 2000. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv "Grand Nain" via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 19:229-234.
- Pérez Hernández J.-B. 2000. Development and application of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation to increase fungus-resistance in banana (*Musa* spp.). Thèse de PhD, Katholieke Universiteit Leuven, Belgique.

### Promoteurs dérivés de virus et de plantes pour l'expression de transgènes chez le bananier

S.R. Hermann, B. Dugdale, O.K. Becker, R.M. Harding et J.-L. Dale

Centre for Molecular Biotechnology, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane QLD 4001, Australie.

Des promoteurs dérivés de composants satellites (S1 et S2) du virus du bunchy top du bananier (BBTV) et des gènes de l'actine du bananier ont été isolés et caractérisés chez des bananiers transgéniques. Les promoteurs S1 et S2 du BBTV régulaient l'expression de gènes reporters associés au système vasculaire chez les dicotylédones et les monocotylédones. Chez le bananier, l'activité de ces promoteurs a été intensifiée de manière significative par l'inclusion d'introns dérivés de monocotylédones. Des gènes candidats de l'actine et les séquences associées en 5' en amont ont été isolés chez diverses plantes sources, dont le bananier, à l'aide d'une nouvelle méthode de PCR avec ligation pour amplifier les séquences flanquantes. On a ensuite caractérisé les niveaux d'expression et la spécificité de tissus d'un gène particulier de l'actine du bananier (*ACT1*). D'après les résultats de l'analyse Northern, le promoteur *ACT1* du bananier est exprimé à la fois dans les tissus reproducteurs et les tissus végétatifs. Chez les bananiers transgéniques, le promoteur *ACT1* régulaient une forte expression de gènes reporters dans les feuilles et dans les racines. Des troncations du promoteur *ACT1* ont montré que tous les éléments régulateurs nécessaires à un niveau d'expression élevé (deux fois supérieur à celui du promoteur CaMV 35S), quasi constitutive, sont situés dans 1,2 kb d'ATG de l'*ACT1*.

### Des bananes de meilleure qualité grâce aux biotechnologies

P. Balint-Kurti, E. Firoozabady, Y. Moy, J. Mercier, R. Fong, L. Wong et N. Gutterson

DNAP (DNA Plant Technology Corporation), 6701 San Pablo Avenue, Oakland, Ca. 94608-1239, Etats-Unis. E-mail : balint-kurti@dnap.com

Les activités de la DNAP dans le domaine de l'amélioration des bananiers sont axées sur la résistance à la cercosporiose noire. Il s'agit en particulier de comprendre, aux premiers stades du développement des variétés, les caractéristiques des signaux d'expression des gènes candidats. En utilisant les constructions génétiques chimériques *uidA* pour évaluer la fonction des promoteurs, nous avons réussi à identifier plusieurs promoteurs ayant une activité relativement importante dans les tissus des feuilles, des fruits et des racines. En champ, ces activités semblent se maintenir sur plusieurs générations végétatives. Deux de ces promoteurs ont aussi été utilisés dans des expérimentations visant à retarder la maturation des fruits en inhibant la synthèse de l'éthylène spécifique des fruits par suppression de sens. Dans des essais en champ sur des plantes transgéniques au Costa Rica et dans le sud du Mexique, un certain nombre de lignées ont manifesté un retard significatif de la maturation des fruits sur plusieurs générations. Un fragment d'ARN de ~23 bases permettant de diagnostiquer le phénomène d'inhibition de l'expression du gène a été identifié chez ces lignées.

Des lignées transgéniques exprimant cinq gènes putatifs de résistance aux maladies sont actuellement évaluées dans des essais en champ au Costa Rica. Des transformants exprimant 11 autres gènes putatifs de résistance aux maladies ou des combinaisons de ces gènes en sont à des stades divers de développement. Nous appliquons aussi un test sur des morceaux de feuille pour évaluer certaines de nos lignées transgéniques dans notre laboratoire. Les symptômes produits par ce test sont similaires à ceux observés en champ, tant en ce qui concerne leur aspect que leur moment d'apparition et leur spécificité par rapport aux cultivars.

### Approches biotechnologiques pour l'amélioration des bananiers

T.R. Ganapathi, P. Suprasanna, L. Srinivas et V.A. Bapat

Plant Cell Culture Technology Section, Nuclear Agriculture and Biotechnology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai 400 085, Inde.

Les bananes et les bananes plantain, aliments de base de millions de personnes dans les pays en développement, se classent au quatrième rang des cultures vivrières à l'échelle mondiale. L'Inde est le premier pays producteur de bananes. Dans ce pays, la banane occupe la seconde place parmi les cultures fruitières avec



0,4 million d'hectares fournissant une production de 10 millions de tonnes. Cependant, l'application des méthodes d'amélioration conventionnelles est rendue difficile par la nature triploïde de cette plante, seules quelques variétés diploïdes produisant un pollen viable. Pour créer des variétés productives et capables de résister aux maladies, il faut donc faire appel aux biotechnologies. Les activités de notre équipe couvrent les domaines suivants : culture de tissus, embryogénèse somatique, semences synthétiques, mutagenèse *in vitro* et sélection, empreintes génétiques et transfert de gènes à l'aide d'*Agrobacterium*. Trente cultivars ou espèces sauvages ont été conservés et multipliés *in vitro*. Dans des essais multilocaux, les plants issus de culture *in vitro* se sont caractérisés par un rendement accru, une maturation précoce et un cycle de production plus uniforme. Après traitement de cultures *in vitro* avec des rayons gamma, l'évaluation en champ de la population irradiée a permis d'identifier un certain nombre de variants prometteurs. Les variants isolés et leurs parents ont fait l'objet d'évaluations en champ et d'études moléculaires à l'aide de RAPD.

Nous avons élaboré des protocoles d'embryogénèse somatique à partir de méristèmes apicaux du cv. Rasthali (AAB) et de bourgeons mâles du cv. Shrimanti (AAA). Les cultures cellulaires embryogènes ont été établies avec succès et sont maintenues depuis deux ans par des repiquages réguliers (pour Rasthali). On a obtenu un taux élevé de conversion des embryons somatiques en plants et ceux-ci sont à présent évalués dans des essais en champ.

Nous avons standardisé la méthode de transformation de cultures cellulaires embryogènes du cv. Rasthali avec *Agrobacterium* et nous l'appliquons maintenant couramment pour transférer des gènes. Nous travaillons actuellement avec un peptide antimicrobien, msi99 (homologue synthétique de Magainin). Des études ont montré que ce peptide est efficace pour inhiber la croissance de *Fusarium oxysporum*, agent causal de la fusariose. Nous l'avons utilisé pour transformer Rasthali, cultivar extrêmement sensible à cette maladie, et des plantes transgéniques ont été régénérées.

## Propriété intellectuelle et organismes génétiquement modifiés

### Introduction du thème

#### D. Nicoll

Centre for Law and Genetics, Law School, University of Tasmania, GPO Box 252-89, Hobart, Tas 7001, Australie.

Il faut désormais s'attendre à ce que la prise de brevet entre de plus en plus dans les préoccupations des chercheurs généticiens. Plusieurs éléments vont dans ce sens :

1. évolution de la recherche scientifique et nécessité de rendre compte de ses résultats en termes économiques ;
2. nature de la recherche dans le domaine des biotechnologies : elle coûte cher, exige beaucoup de temps et ses produits peuvent être facilement copiés ;
3. intervention croissante du secteur privé dans la recherche.

Le principal traité international régissant les droits de propriété intellectuelle (DPI) est l'Accord sur les aspects des droits de propriété intellectuelle liés au commerce (ADPIC) qui figure en annexe à l'accord de l'OMC. Si un pays veut faire du commerce, il doit avoir une législation compatible avec l'accord sur les ADPIC. Dans l'article 27 de cet accord, l'objet brevetable est défini comme suit :

- 27.1. Les brevets sont obligatoires pour toutes les inventions dans tous les domaines de la technologie. L'invention doit être nouvelle, impliquer une activité inventive (non-évidence) et être susceptible d'application industrielle (utile).
- 27.2. Il sera possible d'exclure les inventions dont il est nécessaire d'empêcher l'exploitation commerciale pour protéger l'ordre public ou la moralité, y compris pour protéger la santé et la vie des personnes et des animaux ou préserver les végétaux, ou pour éviter de graves atteintes à l'environnement.
- 27.3. Les inventions suivantes pourront aussi être exclues de la brevetabilité : a) les méthodes diagnostiques, thérapeutiques et chirurgicales pour le traitement des personnes ou des animaux ; b) les végétaux et les animaux autres que les micro-organismes ; c) les procédés biologiques d'obtention de végétaux ou d'animaux, mais non les procédés techniques.

(Texte intégral de l'Accord disponible sur le site Web de l'OMC : [http://www.wto.org/french/tratop\\_f/trips\\_f/t\\_agm3c\\_f.htm](http://www.wto.org/french/tratop_f/trips_f/t_agm3c_f.htm))

La possibilité de breveter le vivant est demeurée incertaine jusqu'à ce que la Cour suprême des Etats-Unis rende l'arrêt *Diamond v Chakrabarty* 447 US 303 (1980). Par une courte majorité (5 contre 4), elle a décidé que les organismes vivants pouvaient être brevetés. La décision contraire aurait peut-être entraîné une diminution des investissements dans le secteur des biotechnologies.

D'après la jurisprudence aux Etats-Unis et en Europe, on peut voir que les limites de la brevetabilité des inventions biotechnologiques ne sont pas encore entièrement définies.

1. Dans leur interprétation du droit des brevets, les tribunaux admettent le principe de la brevetabilité des organismes vivants.
2. L'argument de l'ordre public ou de la moralité n'a de chances de prévaloir que dans les cas les plus extrêmes.
3. Les tribunaux américains s'efforcent de répondre à certains des problèmes liés aux demandes de brevets à couverture très large.

L'article 27 de l'accord sur les ADPIC laisse aux pays membres une certaine flexibilité pour décider des types d'inventions biotechnologiques qui sont brevetables. En outre, les tribunaux nationaux ont la possibilité d'interpréter diversement la législation nationale en matière de DPI. Ainsi, chaque pays conserve une certaine liberté pour assurer le niveau de protection des DPI qu'il juge acceptable selon ses propres normes culturelles, morales et légales (en dehors de toutes barrières commerciales).

Des institutions et programmes internationaux comme l'INIBAP et PROMUSA ont un rôle important à jouer dans la gestion des DPI. Ils peuvent en particulier influencer sur les décisions concernant l'acquisition de matériel génétique pouvant servir à mettre au point des inventions brevetables, ainsi que le transfert des technologies nécessaires pour exploiter ce matériel génétique.

## Phytopathologie et résistance aux maladies

### La biologie moléculaire du virus du bunchy top du bananier

R.M. Harding, B. Dugdale, G.J. Hafner, C.L. Horser, R. Wanitchakorn et J.-L. Dale

Centre for Molecular Biotechnology, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane QLD 4001, Australie.  
(Adresse actuelle : CSIRO Plant Industry, Canberra, ACT, 2601, Australie).

Le bunchy top, causé par un nanovirus (*banana bunchy top virus*, BBTV), est considéré comme la principale affection virale des bananiers. On rencontre cette maladie dans presque toutes les régions productrices de bananes du monde, à l'exception des Caraïbes et des Amériques. Dans les années 20, le bunchy top était le principal facteur limitant la production bananière en Australie. L'application de mesures phytosanitaires rigoureuses, appuyées par une stricte législation, a permis de contrôler la maladie dans ce pays. Notre groupe travaille depuis une dizaine d'années à la caractérisation de ce virus afin de développer une résistance transgénique et de pouvoir exploiter le virus.

En se basant sur les symptômes de la maladie, sa transmission persistante par un puceron et les profils de l'ARN double brin, on a cru tout d'abord que le BBTV était causé par un lutéovirus. Cependant, on sait aujourd'hui qu'il s'agit d'un virus isométrique dont le génome comprend au moins six composantes d'ADN simple brin circulaire (ADN-1 à -6) d'une dimension de 1018 à 1111 nucléotides. Ces différentes composantes de l'ADN ont une organisation génomique commune comprenant : i) un gène majeur dans le sens virion (sauf l'ADN-1 qui contient deux gènes) associé à un signal de polyadénylation ; ii) une région commune majeure conservée (CR-M) et une région en épingle à cheveu

(CR-SL) ; et iii) une séquence TATA potentielle située en 3' de l'épingle à cheveu. La région CR-M se trouve en 5' de la région CR-SL et comprend approximativement 92 nt avec au moins 72 % d'homologie entre les composantes de l'ADN (sauf l'ADN-1 qui a une délétion de 26 nt). On pense que la CR-M intervient dans la réplication, en faisant fonction de site de liaison pour une amorce d'ADN endogène de ~80 nt. La CR-SL comprend 69 nt avec au moins 62 % d'homologie entre les composantes. Elle comporte une structure en épingle à cheveu qui contient une tige de 10 bp (14 nt conservés) et une boucle de 11 nt (9 nt conservés). D'après l'analyse de la séquence des ADN-1, -3 et -5, il existe deux groupes distincts d'isolats du BBTV : le groupe du Pacifique Sud (Australie, Burundi, Egypte, Fidji, Inde, Tonga et Samoa) et le groupe asiatique (Philippines, Taiwan et Viêt-Nam). Ces deux groupes diffèrent d'environ 10 % sur l'ensemble de la séquence nucléotidique et d'environ 30 % au sein de la CR-M.

Le gène majeur de l'ADN-1 contient des motifs associés à une réplication en cercle roulant et à une liaison de dNTP, et code pour une protéine d'initiation de la réplication (Rep). On a établi que cette protéine Rep possède une activité d'entaille et de ligation spécifique d'un site (opérant un clivage entre les nt 7 et 8 de l'épingle à cheveu). La fonction du gène interne de l'ADN-1 n'est pas encore connue. L'ADN-3 code pour la protéine capsidique, tandis que le produit génique de l'ADN-5 possède une activité de liaison du rétinoblastome et semble être une protéine du cycle cellulaire faisant passer les cellules infectées en phase S pour faciliter la réplication du virus. L'ADN-4 et l'ADN-6 semblent coder pour des protéines associées respectivement au mouvement de cellule en cellule et au transport nucléaire. La fonction de l'ADN-2 reste à élucider.

On a récemment classé le BBTV dans le genre *Nanovirus* – virus à virions isométriques dont l'activité se limite au phloème et qui possèdent un génome à ADN simple brin, circulaire et à composantes multiples. Dans ce genre figurent également le virus du rabougrissement du trèfle souterrain (*subterranean clover stunt virus*, SCSV), le virus du jaunissement nécrotique de la féverole (*fabo bean necrotic yellows virus*, FBNYV), le virus nain de l'astragale (*milk vetch dwarf virus*, MDV) et peut-être aussi le virus de la pourriture foliaire du cocotier (*coconut foliar decay virus*, CFDV).

On considère que les ADN-1 à 6 font partie intégrante du génome du BBTV, car ces composantes sont systématiquement associées à toutes les infections du BBTV dans le monde entier. On a isolé plusieurs autres composantes de l'ADN associées au BBTV dans divers cas d'infection par ce virus. De même que l'ADN-1 du BBTV, ces autres composantes semblent coder

pour des protéines Rep. Cependant elles diffèrent de l'ADN-1 par plusieurs aspects :

- organisation génomique – en général, les régions CR-M et CR-SL sont absentes, et la séquence TATA se trouve en 5' de l'épingle à cheveu ;
- distribution géographique limitée – on les trouve presque exclusivement dans le groupe asiatique du BBTV.

Nous avons étudié la réplication du BBTV afin de déterminer : 1) les composantes faisant partie intégrante du génome du BBTV ; 2) la composante codant pour la Rep "maîtresse" ; et 3) le rôle du gène interne de l'ADN-1. Pour ce faire, nous avons bombardé des suspensions cellulaires embryogènes de Bluggoe avec des « 1.1mers » clonés des différentes composantes de l'ADN du BBTV, séparément ou en combinaison. Nous avons extrait l'ADN des cellules 0, 4 et 8 jours après le bombardement et l'avons analysé à l'aide de sondes spécifiques de chaque composante pour déterminer les intermédiaires de la réplication. Cette étude a montré que l'ADN-1 code pour la protéine virale Rep "maîtresse" et qu'elle constitue l'unité répliquative minimale du BBTV, car, contrairement aux autres composantes codant pour des Rep, elle est capable de s'autorépliquer et de réguler la réplication des autres composantes génomiques faisant partie intégrante du BBTV. Nous avons aussi pu établir que le gène interne de l'ADN-1 n'est pas indispensable à la réplication, mais qu'il renforce celle-ci en *cis* (peut-être de manière analogue à la protéine REn des bégomovirus). Enfin, nous avons identifié des sites potentiels de liaison des Rep (itérons) au génome du BBTV qui semblent similaires à ceux des bégomovirus. D'après les résultats de cette étude, on peut penser qu'il existe deux groupes de nanovirus : 1) le BBTV, qui infecte les monocotylédones et dont la Rep "maîtresse" contient un gène interne ; et 2) le FBNYV, le MDV et le SCSV, qui infectent les dicotylédones et dont la Rep "maîtresse" ne contient pas de gène interne.

### L'épidémiologie du virus du bunchy top du bananier au Viêt-Nam

K. Bell<sup>1</sup>, P.A. Revill<sup>2</sup>, H.V. Cuong<sup>3</sup>, V.T. Man<sup>3</sup> et J-L. Dale<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Seowon Building, 4th Floor, 57 Garak-Dong, Songpa-Gu, Séoul, Corée du Sud 138-160; <sup>2</sup>Centre for Molecular Biotechnology, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane QLD 4001, Australie; <sup>3</sup>Department of plant Pathology, Hanoi Agricultural University, Gia Lam, Hanoi, Viêt-Nam

Le virus du bunchy top du bananier (*banana bunchy top virus*, BBTV) est à l'origine de l'affection virale la plus dévastatrice pour cette culture. Il a presque entièrement détruit les plantations de bananiers en Australie au début des années 20 et des épidémies similaires se sont produites dans toutes les régions du monde. Au Viêt-Nam où il a été identifié pour la première fois en 1968, le BBTV est endémique dans l'ensemble du pays.

Cependant, il apparaît que son épidémiologie est très différente de ce qui est observé dans d'autres pays, car ici, il ne crée pas de véritable épidémie et semble se diffuser plus lentement dans les plantations. Le BBTV, dont la transmission se fait par l'intermédiaire du puceron *Pentalonia nigronervosa* ou par des rejets et souches infectés, se diffuse normalement avec rapidité au sein des plantations. Mais au Viêt-Nam, il n'est pas inhabituel de trouver des plantes plus âgées infectées par le BBTV à proximité de plantes saines, alors même que les pucerons se nourrissent sur toutes les plantes. En outre, nous n'avons pas observé de symptômes typiques du BBTV chez le cultivar local Chuoi tay. On ne sait si Chuoi tay est un hôte du BBTV, ou s'il est résistant à l'infection par le BBTV. Afin de mieux comprendre l'épidémiologie du BBTV au Viêt-Nam, nous nous sommes penchés sur un certain nombre de facteurs. Premièrement, en étudiant la variabilité des séquences de l'ADN-1, codant pour la Rep "maîtresse", nous avons trouvé un niveau de variabilité plus élevé au Viêt-Nam que ceux enregistrés jusqu'à présent en Asie. Nous avons aussi constaté une différenciation entre les séquences des isolats originaires du Nord Viêt-Nam et du Sud Viêt-Nam. Deuxièmement, nous avons identifié une nouvelle composante putative d'ADN satellite, endémique au Viêt-Nam. Enfin, nous avons criblé des plants de Chuoi tay provenant de toutes les régions du pays, mais nous n'avons pu détecter le virus dans aucun, que ce soit avec la PCR et/ou avec l'hybridation Southern. Cela semble indiquer que Chuoi tay fait preuve de résistance au BBTV au Viêt-Nam, ce qui pourrait être l'un des facteurs influant sur l'épidémiologie de la maladie du bunchy top dans ce pays.

### Les virus infectant le matériel génétique de *Musa*

J.E. Thomas, C.F. Gambley, A.D.W. Geering, L.A. McMichael, J.N. Parry et M. Sharman

Queensland Horticulture Institute, Department of Primary Industries, 80 Meiers Road, Indooroopilly, QLD 4068, Australie.

Les espèces de *Musa* offrant un intérêt commercial sont les bananiers comestibles et les bananiers plantain (pour la plupart des hybrides de *M. acuminata* et/ou de *M. balbisiana*) et l'espèce à fibres *Musa textilis*. A ce jour, on a caractérisé six virus infectant ces espèces (Jones 2000), mais il en existe d'autres qui n'ont pas encore été caractérisés.

Le virus du bunchy top du bananier (*banana bunchy top virus*, BBTV) a des virions isométriques de 18-20 nm et son génome comprend plusieurs composantes d'ADN simple brin. Il est transmis de manière persistante par le puceron *Pentalonia nigronervosa* et a une distribution dispersée en Afrique et dans la région Asie-Pacifique. Le virus de la mosaïque du concombre (*cucumber mosaic virus*, CMV) a des virions isométriques de 29 nm et son gé-

nome se compose d'ARN simple brin tripartite. Transmis de manière non persistante par plusieurs espèces de pucerons, il est largement répandu dans le monde entier. Le virus de la mosaïque des bractées du bananier (*banana bract mosaic virus*, BBrMV) et le virus de la mosaïque de l'abaca (*abaca mosaic virus*, AbaMV) ont tous deux des virions filamenteux, un génome composé d'ARN simple brin, et sont transmis de manière non persistante par diverses espèces de pucerons. L'AbaMV n'a été rencontré jusqu'à présent qu'aux Philippines, tandis que le BBrMV a une distribution dispersée dans la région Asie-Pacifique. Le virus de la mosaïque en tirets du bananier (*banana streak virus*, BSV) a des virions bacilliformes (30 x 130 nm) dont le génome est constitué d'ADN double brin, et il est présent dans le monde entier.

Les virions filamenteux du virus de la mosaïque légère du bananier (*banana mild mosaic virus*, BanMMV) ont un génome constitué d'ARN simple brin d'une dimension de 7353 nt, codant pour cinq cadres de lecture ouverts (ORF). Bien qu'apparenté aux carlavirus, fovéavirus et potex virus, le BanMMV a une organisation génomique et des relations phylogénétiques qui le classent à part de tous les taxons viraux décrits jusqu'à présent (Gambley et Thomas, *sous presse*). Ce virus se rencontre chez une grande diversité de génotypes de *Musa* et a une distribution mondiale. On le trouve souvent sous forme d'infection asymptomatique ou d'infection en mélange avec d'autres virus, mais son mode de transmission n'est pas connu. On ignore également son impact économique.

Des tests sérologiques et des tests basés sur la PCR sont disponibles pour tous les virus de *Musa* caractérisés, mais le BSV demeure problématique. Avec le BSV, les symptômes peuvent être importants, mais ils se manifestent de manière sporadique. On a trouvé chez le BSV une diversité considérable de séquences, et cinq de ces isolats (BSV-OL, BSV-Mys, BSV-GF, BSV-IM et BSV-Lac) sont probablement suffisamment différents pour être considérés comme des virus distincts (Geering *et al.* 2000, A.D.W. Geering, N.E. Olszewski, B.E.L. Lockhart et J.E. Thomas, non publié). Il faut des tests par immunocapture (IC) pour différencier les séquences épisodales et les séquences intégrées du BSV. On a mis au point la technique de l'IC-PCR avec microplaque, permettant de détecter tous les virus du bananier qui ont été caractérisés. Un test multiplex a été publié pour le BBrMV, le BBTv et le CMV (Sharman *et al.* 2000). Des tests ont été aussi mis au point pour le BanMMV et toutes les souches connues du BSV (multiplex) (M. Sharman, A.D.W. Geering, J.N. Parry et J.E. Thomas, non publié). Ces tests sont utilisés en combinaison avec le test ELISA et l'immunoélectroscopie (ISEM) pour l'indexation ordinaire des virus.

Tous les virus de *Musa* se transmettent par le biais des propagules végétatives, y compris les vitroplants, ce qui a des implications pour l'état sanitaire du matériel végétal, la conduite des programmes d'amélioration et de transformation, et les transferts de matériel génétique. L'utilisation de matériel végétal indemne de virus est un facteur fondamental pour lutter contre ces agents pathogènes dans les champs. En outre, plusieurs de ces virus ont une distribution limitée. Peu d'études ont été effectuées sur la transmission des virus du bananier par la culture de tissus. Plusieurs études ont montré qu'avec les repiquages successifs qui sont normalement opérés, on obtient un certain nombre de méristèmes indemnes de virus à partir de clones initialement infectés par le BBTv. Ce processus semble être légèrement accéléré à haute température et les plants issus de ces méristèmes demeurent indemnes de virus (Thomas *et al.* 1995 et références citées par ces auteurs). Récemment, on a observé la situation inverse avec le BSV. Des infections virales ont été détectées chez la descendance d'hybrides de programmes d'amélioration, alors qu'il n'y avait aucun signe d'infection virale chez les lignées parentales. On a établi que ce phénomène était dû à l'"activation" ou à la "libération" de séquences du BSV qui sont intégrées dans le génome de *Musa* (Hull *et al.* 2000). Des travaux récents semblent indiquer que plusieurs autres souches du BSV sont intégrées dans différentes composantes du génome chez les hybrides de *Musa* (A.D.W. Geering, N.E. Olszewski, B.E.L. Lockhart et J.E. Thomas, non publié).

Le Centre de transit de l'INIBAP, basé à la *Katholieke Universiteit Leuven*, détient la plus importante collection *in vitro* de matériel génétique de *Musa* du monde. Cette collection comprend plus de 1100 accessions. Celles-ci sont actuellement soumises à des tests dans les trois centres internationaux d'indexation pour les virus (CIRAD à Montpellier, PPRI à Pretoria et QDPI à Brisbane), et l'on ne distribue que les accessions dont les résultats sont négatifs pour les virus connus. Les virus les plus souvent détectés sont le BanMMV et le BSV, probablement en raison de la fréquence des infections latentes, plus le facteur de l'intégration pour le BSV. On n'a détecté ni le BBTv ni le BBrMV au sein de cette collection.

#### Références

- Gambley C.F. & J.E. Thomas. 2001. Molecular characterisation of Banana mild mosaic virus, a new filamentous virus in *Musa* spp. *Archives of Virology* (*sous presse*).
- Geering A.D.W., L.A. McMichael, R.G. Dietzgen & J.E. Thomas. 2000. Genetic diversity among Banana streak virus isolates from Australia. *Phytopathology* 90:921-927.
- Hull R., G. Harper & B. Lockhart. 2000. Viral sequences integrated into plant genomes. *Trends in Plant Science* 5(9):362-365.

- Jones D.R. (ed.) 2000. Diseases caused by viruses. Pp. 241-293 in *Diseases of banana, abaca and enset*. CABI Publishing, Wallingford, Royaume-Uni/New York, USA.
- Sharman M., J.E. Thomas & R.G. Dietzgen. 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. *Journal of Virological Methods* 89:75-88.
- Thomas J.E., M.K. Smith, Kessling, A.F. & S.D. Hamill. 1995. Inconsistent transmission of banana bunchy top virus in micropropagated bananas and its implication for germplasm screening. *Australian Journal of Agricultural Research* 46:663-671.

### Application de la cryoconservation pour éliminer les affections virales des bananiers et bananiers plantain (*Musa* spp.)

B. Helliot<sup>1</sup>, B. Panis<sup>2</sup>, A. Locicero<sup>1</sup>, K. Reyniers<sup>2</sup>, R. Swennen<sup>2</sup> et P. Lepoivre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité de phytopathologie, Faculté des sciences agronomiques de Gembloux, 5030 Gembloux, Belgique. E-mail : helliot.b@fsagx.ac.be; <sup>2</sup>Laboratory of Tropical Crop Improvement, K.U. Leuven, 3001 Leuven, Belgique.

On a de plus en plus recours à la technique de la cryoconservation *in vitro* pour surmonter les problèmes posés par les techniques traditionnelles de conservation du matériel génétique dans des collections au champ, collections de semences et collections de cultures *in vitro*. La conservation à ultra-basse température (généralement -196°C, température de l'azote liquide) permet de stocker les ressources phylogénétiques pendant une période prolongée et à l'abri de toute contamination. Récemment, Brison et ses collaborateurs (1997) ont démontré qu'on pouvait aussi se servir de cette technique pour éliminer le virus de la sharka (*plum pox virus*) chez des vitroplants de pruniers infectés, le taux d'éradication atteignant jusqu'à 50 %. La possibilité d'appliquer un traitement de cryoconservation de courte durée (quelques heures) au lieu d'un traitement à la chaleur de longue durée (plusieurs semaines) apparaît extrêmement prometteuse.

Nous avons précédemment publié les résultats d'essais fructueux de cryoconservation de méristèmes en prolifération de différentes accessions de bananiers, l'une des cultures vivrières les plus importantes à l'échelle mondiale (Panis *et al.* 2000). Les bananiers appartiennent au genre *Musa*; ils sont cultivés sur cinq continents dans environ 120 pays, principalement tropicaux et subtropicaux, et assurent la subsistance de millions de personnes. Cependant, ils sont menacés par différents agents biotiques : bactéries, champignons et virus tels que le virus de la mosaïque du concombre (CMV), le virus du bunchy top du bananier (BBTV), le virus de la mosaïque en tirets du bananier (BSV), le virus de la mosaïque des bractées du bananier (BBrMV) et le virus de la mosaïque légère du bananier (BaMMV).

Dans le cadre d'un projet de l'INIBAP intitulé "Mise au point de techniques de culture *in vitro* pour éliminer les affections virales des bana-

niers et bananiers plantain (*Musa* spp.)", nous travaillons à évaluer les effets de la cryothérapie sur l'état sanitaire du matériel végétal par rapport à des méthodes traditionnelles comme la culture de méristèmes. A cette fin, nous avons appliqué la cryoconservation à des amas méristématiques excisés sur des cultures de méristèmes hautement proliférantes en utilisant la technique de la vitrification avec la solution PVS-2 (Sakai *et al.* 1990).

Nos résultats montrent que, pour le CMV et le BSV, les taux d'éradication après cryoconservation de méristèmes hautement proliférants atteignent respectivement 39 % (32 plants sur 83 plants testés) et 94 % (31 plants sur 33 plants testés). En comparaison, les taux d'éradication obtenus par culture de méristèmes excisés sur des méristèmes hautement proliférants se chiffraient respectivement à 11 % et 63 %.

L'étude de l'ultrastructure des méristèmes hautement proliférants, effectuée au bout d'une semaine de culture *in vitro* après cryoconservation, a montré que la cryothérapie agit comme un micro-scalpel. De petites zones de cellules vivantes localisées dans le dôme méristématique et à la base des primordiums survivent au processus de cryoconservation, tandis que les cellules plus différenciées, distantes du dôme apical, sont tuées. Ce phénomène, associé à une répartition inégale des particules virales dans le méristème, pourrait expliquer l'efficacité de la cryoconservation. Les études en cours portent sur la localisation spécifique des particules virales au sein du méristème. Nous espérons ainsi parvenir à mieux comprendre les variations qui sont enregistrées dans les taux d'éradication en fonction du virus et en fonction de la thérapie.

#### Références

- Brison M., M.T. de Boucaud, A. Pierronnet & F. Dosba. 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. *Plant Science* 123(1-2):189-196.
- Panis B., H. Schoofs, N.T. Thinh & R. Swennen. 2000. Cryopreservation of proliferating meristem cultures of banana. Pp. 238-243 in *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and applications* (F. Engelmann & H. Takagi, eds.). Japanese International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japon / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
- Sakai A., S. Kobayashi & I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9:30-33.

#### Un test basé sur l'ADN pour diagnostiquer la race 4 "tropicale" de la fusariose du bananier

S. Bentley, N. Moore, J. Pattermore, J. Anderson et K. Pegg

CRCTPP (*Cooperative Research Center for Tropical Plant Pathology*), University of Queensland, Level 5, John Hines Bldg St Lucia, Brisbane QLD 4072, Australie.

La fusariose est un sérieux problème pour la production bananière en Australie. Le champignon à l'origine de cette maladie, *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (*Foc*), est un agent pathogène extrêmement divers. Actuellement, on ne trouve en Australie qu'une fraction de la diversité mondiale de *Foc*. Sur 33 groupes de compatibilité végétative (GCV) et génotypes de *Foc* identifiés dans le monde, neuf se rencontrent en Australie. La quasi-totalité de la diversité de *Foc* ayant été identifiée en Asie, notre proximité de l'Asie du Sud-Est signifie que nous risquons fortement l'introduction d'autres souches de *Foc*, et en particulier de nouvelles introductions de la race 4 "tropicale" qui s'attaque aux Cavendish. Cette race est répandue en Indonésie et en Malaisie, et elle a été récemment détectée à Irian Jaya. Plusieurs infections de la race 4 "tropicale" se sont déjà produites dans le Territoire Nord, mais ont pu être contenues par des mesures de quarantaine. Cette souche de la fusariose fait peser une menace sur les importantes zones de production de bananes Cavendish du nord du Queensland, jusqu'à présent indemnes de toute souche s'attaquant aux Cavendish.

Nous sommes en train de mettre au point un test basé sur l'ADN pour diagnostiquer spécifiquement la race 4 "tropicale" de *Foc*. A l'aide de méthodes d'analyse de l'ADN génomique total comme les empreintes génétiques de produits d'amplification de l'ADN (DAF) et d'autres méthodes basées sur la PCR telles que le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et l'analyse des séquences de l'ADN ribosomique (ADNr), nous avons étudié de manière approfondie la diversité génétique de *Foc* à tous les niveaux taxonomiques, du genre au niveau spécifique à la souche. Nous avons ainsi obtenu des informations sur les séquences d'ADN propres à la race 4 "tropicale" de *Foc* et avons créé des amorces PCR qui amplifient exclusivement l'ADN de cette souche. Des recherches dans les bases de données sur les séquences d'ADN publiées dans *Genbank* ont montré que ces amorces n'ont de correspondance avec aucun autre organisme, mais nous sommes néanmoins en train d'achever les criblages en laboratoire pour établir la spécificité de ces amorces. Nous adapterons ensuite les conditions de la PCR en laboratoire pour pouvoir amplifier l'ADN de *Foc* directement à partir de plantes et de sols infectés. Il faudra ensuite valider le test de diagnostic et l'essayer sur le terrain avant de le diffuser aux producteurs et/ou aux laboratoires commerciaux.

Nous avons aussi entrepris de mettre au point un système d'identification basé sur l'ADN qui permettra de caractériser de manière précise toutes les souches de *Foc* présentes en Austra-

lie. Grâce à ce système, il sera possible de détecter et d'identifier *Foc* directement à partir du matériel végétal et du sol. On pourra s'en servir pour détecter la présence de races de *Foc* dans les champs avant toute plantation, pour cribler les rhizomes ou rejets utilisés comme matériel végétal et pour identifier les isolats de *Foc* dans les tissus de plants ou les sols infectés. Ce système sera également utile aux chercheurs pour étudier la biologie et l'écologie de *Foc*.

#### Isolement de gènes potentiels de résistance aux maladies

K.M. Taylor, J.A. McMahon, R.M. Harding et J-L. Dale

Centre for Molecular Biotechnology, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane QLD 4001, Australie. E-mail : K0.taylor@ qut.edu.au

De toutes les maladies s'attaquant aux bananiers, la fusariose et les cercosporioses noire et jaune sont les plus dévastatrices. Si la plupart des bananiers dessert cultivés commercialement sont sensibles à ces champignons pathogènes, il existe des sources de résistance chez des bananiers sauvages. Afin d'identifier les gènes R qui confèrent cette résistance, on a mis au point une nouvelle approche consistant à amplifier l'ADN génomique à l'aide d'amorces dégénérées conçues pour les gènes R de classe 3. Cette méthode a été appliquée avec succès à la laitue, au soja, au riz et au maïs, mais à ce jour, aucun résultat n'a encore été publié pour les gènes R candidats (GRC) du bananier.

Nous avons utilisé des amorces dégénérées pour amplifier cinq séquences GRC indépendantes du bananier, montrant toutes une homologie avec des gènes R déjà caractérisés. Il s'agissait de séquences isolées chez des cultivars résistants et des cultivars sensibles où elles étaient présentes en un faible nombre de copies. En outre, les cinq séquences ont toutes été amplifiées à partir de l'ARN, ce qui indique qu'elles étaient transcrites. En comparant les séquences d'ADN et d'ARN des cultivars résistants et des cultivars sensibles, on a constaté une variabilité entre les cinq séquences GRC (< 53 % d'homologie) et au sein de chaque séquence GRC (97-100 % d'homologie). L'amplification des séquences flanquant les GRC a révélé un domaine leucine zipper (LZ) en 5' et un domaine de répétitions riches en leucine (LRR) en 3', ce qui est conforme aux gènes R de classe 3.

#### Les promoteurs du virus de la mosaïque en tirets du bananier sont extrêmement actifs chez les bananiers transgéniques et chez d'autres plantes monocotylédones et dicotylédones

T. Remans<sup>1</sup>, L. Ságy<sup>4</sup>, A.R. Elliott<sup>5</sup>, R.G. Dietzgen<sup>3</sup>, R. Swennen<sup>4</sup>, P. Ebert<sup>1</sup>,

Le génie génétique permet d'introduire dans les plantes des caractères désirables (comme la résistance aux maladies) qui s'expriment dans les phénotypes modifiés. Des séquences régulatrices, ou promoteurs, sont nécessaires pour induire l'expression effective du gène introduit dans les plantes transgéniques. On se sert fréquemment de promoteurs viraux, comme le 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) (Kay *et al.* 1987), pour obtenir l'expression constitutive des transgènes chez diverses espèces végétales. Afin d'identifier des promoteurs efficaces, qui induisent un niveau élevé d'expression des gènes chez les bananiers transgéniques, nous avons analysé trois nouvelles séquences de promoteurs d'isolats australiens du badnavirus de la mosaïque en tirets du bananier (BSV). Pour ce faire, nous avons procédé à différents essais de transformation transitoire et de transformation stable à l'aide de gènes reporters codant pour la protéine à fluorescence verte (GFP) et de l'enzyme reporter de la  $\beta$ -glucuronidase (GUS) (Schenk *et al.* 2001). Dans ces essais, nous avons analysé l'activité de promotion de la transcription dans des fragments d'ADN de 1322 bp (Cv), 2105 bp (My) et 1297 bp (Go) entourant le site d'initiation de la transcription chez les isolats Cavendish, Mysore et Goldfinger du BSV (Geering *et al.* 2000).

Dans les essais d'expression transitoire, les fragments Cv, My et Go ont tous manifesté une activité de promoteur chez une grande diversité d'espèces végétales : monocotylédones (bananier, maïs, orge, mil, sorgho), dicotylédones (tabac, colza, tournesol, *Nicotiana benthamiana*, jacaranda jaune *Tipuana tipu*), gymnosperme (*Pinus radiata*) et fougère (*Nephrolepis cordifolia*) (tableau 1).

Nous avons analysé l'activité de l'enzyme reporter GUS chez des vitroplants de bananiers transgéniques (cultivar Three Hand Planty) transformés avec les constructions des promoteurs Cv ou My. Des sections longitudinales et transversales des racines, de la souche, du pseudotrunc et des feuilles ont révélé une coloration bleue dans tous les types de cellules étudiés (des photos en couleur se trouvent sur le site <http://www.uq.edu.au/~uqtrem>). La plus forte expression a été enregistrée dans la souche et les tissus vasculaires. Dans les racines, une forte intensité de coloration a été ob-

servée dans les tissus vasculaires et les racines latérales émergentes. Chez les plants contenant les constructions du promoteur My, le niveau quantitatif d'activité de GUS dans les tissus des feuilles, des racines et de la souche était plus élevé que chez les plants ayant reçu des constructions du promoteur de l'ubiquitine du maïs (tableau 1). Chez des plants de bananiers cultivés en serre, le promoteur My a fait preuve d'une activité plus importante que le promoteur de l'ubiquitine du maïs et le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (tableau 1). Le promoteur Cv a manifesté une activité similaire (racines et souche) ou supérieure (feuilles) à celle du promoteur de l'ubiquitine du maïs chez les plants de bananiers cultivés *in vitro*, mais cette activité s'est trouvée fortement réduite chez des plants de plus grande taille cultivés en serre (tableau 1). Cela pourrait s'expliquer par le phénomène d'inhibition de l'expression des gènes associé à la séquence intégrée du BSV (Ndowora *et al.* 1999, Harper *et al.* 1999) chez les plants de Three Hand Planty (génomme AAB). Cette séquence intégrée du BSV étant apparemment liée au génome B, il serait intéressant de voir si le promoteur Cv est plus actif chez des bananiers de type AAA.

Les niveaux de GFP dans les feuilles et les tiges de plants transgéniques de canne à sucre contenant une fusion du promoteur Cv et du gène GFP mesurés par fluorométrie (Remans *et al.* 1999) se sont révélés comparables aux niveaux de GFP enregistrés chez des plants contenant une construction du promoteur de l'ubiqui-

tine du maïs (tableau 1). L'expression du promoteur Cv et du promoteur de l'ubiquitine du maïs est demeurée élevée dans le second cycle de culture des plants de canne à sucre. Le promoteur My s'est montré actif chez les jeunes plants, mais on n'a pas observé d'expression de GFP chez les plants adultes. On a enregistré une forte activité du promoteur Go dans des cals de canne à sucre transgéniques, mais pas d'expression de GFP dans les plants régénérés. Les promoteurs Cv et My se sont aussi montrés actifs dans des plants de tabac cultivés *in vitro*, mais cette activité a disparu lorsque les mêmes plants cultivés en serre ont atteint l'âge adulte (tableau 1).

Les promoteurs du virus de la mosaïque en tirets du bananier constituent donc des outils efficaces pour obtenir un niveau élevé d'expression de gènes étrangers chez des monocotylédones et dicotylédones transgéniques. On peut les utiliser de manière interchangeable avec le promoteur CaMV 35S ou celui de l'ubiquitine du maïs.

#### Références

- Geering A.D.W., L.A. McMichael, R.G. Dietzgen & J.E. Thomas. 2000. Genetic diversity among Banana streak virus isolates from Australia. *Phytopathology* 90:921-927.
- Harper G., J.O. Osuji, J.-S. Heslop-Harrison & R. Hull. 1999. Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255:207-213.
- Kay R., A. Chan, M. Daly & J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236:1299-1302.

**Tableau 1. Comparaison entre l'activité des promoteurs Cv, My et Go du BSV et celle du promoteur CaMV 35S et du promoteur de l'ubiquitine du maïs chez différentes espèces végétales. Les valeurs correspondent au plant à plus forte expression : activité enzymatique de GUS (MU) en nmol MU/h/mg de protéine et accumulation de GFP en mg GFP/mg de protéine.**

	Cv	My	Go	CaMV 35S	Ubiquitine du maïs
<b>Plants transgéniques</b>					
Bananier (feuilles <i>in vitro</i> )	1076 MU	6299 MU	nt	nt	214 MU
Bananier (racines+souche <i>in vitro</i> )	2502 MU	10650 MU	nt	nt	2571 MU
Bananier (feuilles en serre)	0 MU	1658 MU	nt	430 MU	418 MU
Canne à sucre (feuilles en serre)	13,1 GFP	< 0,05 GFP	nt	nt	11,6 GFP
canne à sucre (tige en serre)	5,57 GFP	nt	nt	nt	0,80 GFP
Tabac (feuilles <i>in vitro</i> )	0,68 GFP	1,35 GFP	nt	1,68 GFP	nt
Tabac (feuilles en serre)	< 0,06 GFP	< 0,06 GFP	nt	0,29 GFP	nt
<b>Essais d'expression transitoire</b>					
Maïs	+++	+++	+++	+	+++
Orge	+++	+++	nt	+	nt
Bananier	+++	+++	nt	nt	nt
Mil	+++	+++	nt	nt	+++
Sorgho	+++	+++	nt	+	+++
Colza	++	++	++	+++	nt
Tabac	++	++	nt	+++	nt
Tournesol	++	++	nt	+++	nt
<i>N. benthamiana</i>	++	++	nt	+++	nt
<i>T. tipu</i>	+++	+++	nt	+++	nt
Pin	++	++	nt	++	nt
<i>N. cordifolia</i>	++	++	nt	++	nt

nt = non testé, +++ = forte expression, ++ = expression moyenne à forte, + = expression moyenne à faible.



Figure 1. Le variant somaclonal CIEN BTA-03.

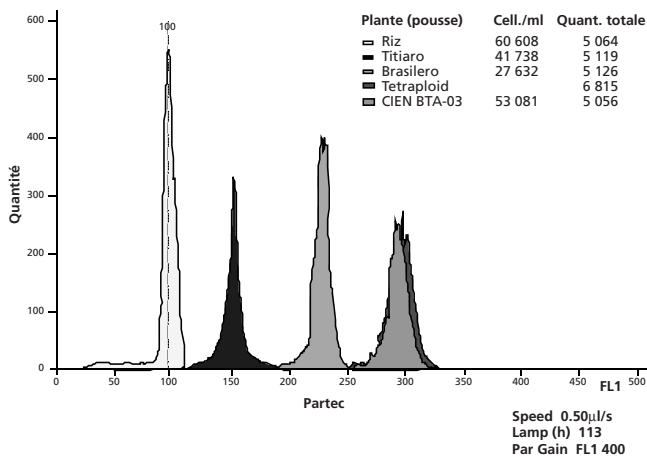


Figure 2. Analyse de quatre clones de bananiers par cytométrie en flux.

Ndowora T., G. Dahal, D. LaFleur, G. Harper, R. Hull, N.E. Olszewski & B. Lockhart. 1999. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 255:214-220.

Remans T., P.M. Schenk, J.-M. Manners, C.P.L. Grof & A.R. Elliott. 1999. A protocol for the fluorometric quantification of mGFP5-ER and sGFP(S65T) in transgenic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 17(4):385-395.

Schenk P.M., T. Remans, L. Sági, A.R. Elliott, R.G. Dietzgen, R. Swennen, P. Ebert, C.P.L. Grof & J.-M. Manners. 2001. Promoters for pregenomic RNA of banana streak badnavirus are active for transgene expression in monocot and dicot plants. *Plant Molecular Biology (soumis pour publication)*.

### “CIEN BTA-03”, un nouveau variant somaclonal résistant à la cercosporiose jaune : caractérisation biochimique, génétique et moléculaire et évaluation agronomique

E. de García<sup>1</sup>, C. Giménez<sup>1</sup>, M. del Carmen Vidal<sup>1</sup>, G. Palacios<sup>1</sup> et O. Haddad<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Central de Venezuela, Apartado 80970, Caracas 1080, Venezuela (E-mail : egarcia@reacciun.ve); <sup>2</sup>Instituto de Agronomía,

Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.

En 1996, Trujillo et de García ont obtenu un variant somaclonal résistant à la cercosporiose jaune par induction de pousses adventives à partir du clone triploïde Williams, du sous-groupe Cavendish, dénommé localement “Brasilero” et sensible à cette maladie (Trujillo et de García 1996, Trujillo *et al.* 1999). Ce variant somaclonal non seulement résiste à la maladie, mais présente une série de caractères morphologiques et anatomiques qui le distinguent des clones triploïdes : a) limbe 1,4 fois plus épais que celui du clone Williams (Hermoso *et al.* 1997, Trujillo *et al.* 1997) ; b) plus faible nombre de stomates par mm<sup>2</sup> dans les couches superficielles et internes de l'épiderme (Hermoso *et al.* 1997, Trujillo *et al.* 1997) ; et c) teneur supérieure en phénol. Ce clone a été appelé CIEN BTA-03 (figure 1).

Les résultats de la caractérisation biochimique, génétique et moléculaire du variant CIEN BTA-03, et de l'évaluation de sa résistance au champ sont présentés ci-dessous.

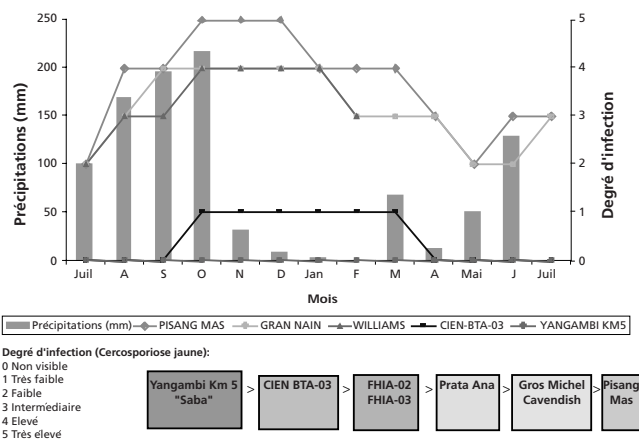


Figure 3. Evaluation de l'incidence de la cercosporiose jaune chez cinq clones de bananiers cultivés en zone forestière sèche à une altitude de 450 m. Station expérimentale de Samán Mocho, Carabobo, Venezuela (1999-2000).

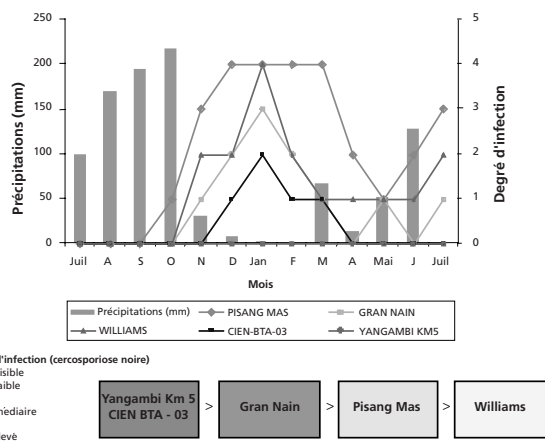


Figure 4. Evaluation de l'incidence de la cercosporiose noire chez cinq clones de bananiers cultivés en zone forestière sèche à une altitude de 450 m. Station expérimentale de Samán Mocho, Carabobo, Venezuela (1999-2000).

Les études biochimiques, reposant sur l'analyse des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide à gradient de dénaturation SDS-PAGE, avec coloration au bleu de Coomassie et lecture par densitomètre imageur modèle GS-690 (Bio-Rad), ont mis en évidence chez le clone Williams la présence de deux polypeptides (14 et 17 kDa) qui ne sont observés ni chez CIEN BTA-03 ni chez Frago 7 (AAAA), tous deux résistants à la cercosporiose jaune (Giménez 1998).

L'analyse cytogénétique a montré que les deux clones présentent des tissus en mosaïque, mais avec une distribution différente du nombre de chromosomes : 22 % des cellules de Williams ont plus de 33 chromosomes et 78 % en ont moins de 33. Au contraire, 65 % des cellules du variant somaclonal résistant CIEN BTA-03 ont plus de 33 chromosomes et 35 % en ont moins de 33 (Giménez 1998, Giménez *et al.* 2000).

L'analyse par cytométrie en flux a démontré que CIEN BTA-03 présente une teneur en ADN similaire ou supérieure à celle de Frago 7



(figure 2). Les valeurs obtenues pour le rapport moyen bananier/riz (indice B/R) se situent entre 2,92 et 2,99, ce qui est similaire aux valeurs obtenues pour le clone tétraploïde.

On a procédé à l'analyse en grappes des données obtenues par amplification aléatoire de séquences polymorphes d'ADN (RAPD) pour CIEN BTA-03 et 16 géotypes différents de *Musa* spp. (Giménez 1998, Giménez *et al.* 2000, Vidal et de García 2000). On a utilisé 56 bandes polymorphes pour cette analyse, en appliquant les méthodes de la moyenne non pondérée des groupes appariés et de la moyenne pondérée des groupes appariés de Ward pour calculer les distances City-Block (Manhattan). Les dendrogrammes produits par ces méthodes différentes étaient identiques et montraient que CIEN BTA-03 se classe dans le même groupe que FHIA-02 (AAAB) et n'est pas étroitement apparenté au sous-groupe Cavendish, auquel appartient son parent Williams (AAA) (Giménez 1998, Giménez *et al.* 2000).

Dans l'évaluation au champ de la résistance de CIEN BTA-03 (García *et al.* 2000), ce somaclone a fait preuve d'une résistance à la cercosporiose jaune comparable à celle du cultivar Yangambi km5 (figure 3). Il s'est également montré résistant à la cercosporiose noire (figure 4).

On a comparé les indices de performance et de productivité de CIEN BTA-03 avec ceux de FHIA-01, FHIA-02 et FHIA-03 (García *et al.* 2000). Les résultats de CIEN BTA-03 étaient très voisins de ceux de FHIA-02 et FHIA-03 (tableau 1).

Nous pouvons en conclure que nous avons là un nouveau clone résistant à la cercosporiose jaune, et très probablement aussi à la cercosporiose noire, et présentant de bonnes caractéristiques agronomiques. Il produit un régime de 34,53 kg et a un indice de productivité de 0,28 kg par jour.

#### Remerciements

Cette recherche a bénéficié d'une subvention du *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas* du Venezuela (CONICIT), accordée à Eva de García dans le cadre du contrat n° G-97000700. Les auteurs remercient Nicolas Roux (*Plant Breeding Unit*, FAO/AIEA, Seibersdorf, Autriche) pour l'analyse par cytométrie en flux.

**Tableau 1. Comparaison des indices de performance et de rendement de quatre clones de bananiers pendant le second cycle de culture. Station expérimentale de Samán Mocho, Carabobo, Venezuela.**

Clone/ cultivar	Génome	Cycle floraison- récolte (jours)	Poids du régime (kg)	Indice de performance (jours/kg)	Indice de productivité (kg/jour)
FHIA-01	AAAB	121,67	26,67	4,61	0,22
FHIA-02	AAAB	124,77	31,27	3,99	0,25
FHIA-03	AABB	126,90	36,85	3,47	0,29
CIEN BTA-03	AAAA	121,07	34,53	3,52	0,28

#### Références

- de García E., O. Haddad, M. Dagert et R. Campagnone. 2000. Segundo informe de avance. Proyecto CONICIT G-97000700. 269pp.
- Giménez C. 1998. Características genéticas y moleculares del variante somaclonal de banano (CIEN BTA-03) asociadas al mecanismo de resistencia a la Sigatoka amarilla y su estabilidad genética. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 114pp.
- Giménez C., E. de García, N. Xena de Enrech et I. Blanca. 2001. Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN-BTA-03. *In Vitro Plant* 37(2).
- Hermoso L., H. Lindorf & E. de García. 1997. Anatomía foliar del variante somaclonal CIEN BTA-03 (*Musa* spp.), resistente a la Sigatoka Amarilla. *Anales de Botánica Agrícola*. 4:63-66.
- Trujillo I. & E. de García. 1996. Estrategias pour l'obtention de variants somaclonaux résistants à la cercosporiose jaune (*Mycosphaerella musicola*). *InfoMusa* 5(2):12-13.
- Trujillo I., L. Hermoso & E. de García. 1997. Caracterización estructural de clones de banano: resistentes y no resistentes a la Sigatoka Amarilla. *Anales de Botánica Agrícola*. 4:59-62.
- Trujillo I., E. de García & J.-L. Berroterán. 1999. Evaluación de banano obtenidas "in vitro". *Anales de Botánica Agrícola*. 6:29-35.
- Vidal M.C. & E. de García. 2000. Analysis of a *Musa* spp. somaclonal variant resistant to yellow Sigatoka. *Plant Molecular Biology Reports*. 18:23-31.

### Biodiversité et évolution

#### Caractérisation des accessions de la banque de matériel génétique de *Musa* de l'INIBAP à l'aide de marqueurs STMS-PCR

F. Carreel<sup>1</sup>, A. Duarte Vilarinhos<sup>2</sup>, I. Van den Houwe<sup>3</sup> et S. Sharrock<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CIRAD-FLHOR Neufchâteau, Sainte Marie, 97130 Capesterre Belle Eau, Guadeloupe (E-mail : carreel@cirad.fr); <sup>2</sup>CNPMP/EMBRAPA, Cx Postal 007, CEP44380000 Cruz Das Almas, Brésil; <sup>3</sup>Katholieke Universiteit Leuven, ITC, Kasteelpark Arenberg 13, 3001 Leuven, Belgique; <sup>4</sup>INIBAP, Parc scientifique Agropolis II, 34397 Montpellier cedex 5, France.

La collection internationale de matériel génétique de *Musa* que l'INIBAP maintient à la *Katholieke Universiteit Leuven* (KUL) contient actuellement plus de 1100 accessions. Cette banque permet de conserver la diversité des bananiers pour le compte de la communauté in-

ternationale et de mettre des espèces et cultivars de *Musa* à la disposition des programmes de recherche-développement.

L'objectif du projet est de procéder à la caractérisation moléculaire de ce matériel génétique afin de faciliter la classification et la gestion de la banque de gènes. Chaque année depuis 1998, on a caractérisé quelque 200 individus au CIRAD-FLHOR en Guadeloupe à l'aide de marqueurs moléculaires.

Parmi les différentes méthodes disponibles, le choix des sites microsatellites à séquences répétées (STMS) comme marqueurs se justifie par de nombreux avantages : ces marqueurs PCR codominants hautement polymorphes, utilisables sur vitroplants, sont disponibles et les schémas obtenus peuvent être interprétés en termes de géotypes, ce qui permet de détecter des allèles spécifiques d'une espèce ou d'identifier les similarités. On a évalué le polymorphisme STMS par électrophorèse sur gel d'urée-polyacrylamide non radioactif, méthode simple et transférable, qui coûte moins cher que la plupart des autres techniques moléculaires (Lagoda *et al.* 1998a). On a mis au point des schémas et des protocoles de migration sur petits et grands gels, que l'on a appliqués selon la différenciation requise entre les clones. Les 10 marqueurs STMS utilisés ont un grand pouvoir de discrimination et sont localisés indépendamment sur les différents groupes de liaison (Lagoda *et al.* 1998b). On a ainsi identifié au moins 18 allèles pour chaque STMS. On a pu détecter des allèles spécifiques des génomes de *schizocarpa*, *balbisiana* et *Australimusa*, qui permettent d'identifier les clones interspécifiques. La plupart des clones ont révélé des schémas différents, excepté les clones appartenant à des sous-groupes tels que Cavendish. La classification des clones a été vérifiée. On a étudié plus de 464 clones, décelé 34 erreurs de classification, complété la classification de 23 clones et classé 31 clones (jusqu'alors non classés) dans un groupe, et pour certains aussi dans un sous-groupe.

Ces données aideront à compléter la base de données morphologiques de l'INIBAP (MGIS), ainsi que les données de l'analyse des degrés de ploïdie par cytométrie en flux (voir plus haut, Dolezel *et al.*), et ultérieurement aussi les données de la caractérisation génomique des chromosomes par hybridation *in situ* d'ADN génomique (GISH) (D'Hont *et al.* 2000).

#### Références

- D'Hont A., A. Paget-Goy, J. Escoute & F. Carreel. 2000. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 100:177-183.
- Lagoda P.J.L., D. Dambier, A. Grapin, F.-C. Baurens, C. Lanaud & J.-L. Noyer. 1998a. Nonradioactive sequence-tagged microsatellite site analyses: a method transferable to the tropics. *Electrophoresis* 19:152-157.



Lagoda P.J.L., J.-L. Noyer, D. Dambier, F.-C. Baurens, A. Grapin & C. Lanaud. 1998b. Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae. *Molecular Ecology* 7:657-666.

## Etudes moléculaires sur *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* et sur des espèces malaisiennes locales

Yasmin Othman<sup>1</sup>, Norzulaani Khalid<sup>1</sup>, Asif Javed<sup>1</sup>, Mak Chai<sup>1</sup> et Tan Siang Hee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biological Sciences, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaisie; <sup>2</sup>Genome Centre, Institute Bioscience, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Selangor, Malaisie.  
E-mail pour la correspondance: yasmin@gene.um.edu.my

La banane, deuxième culture fruitière dans la péninsule de Malaisie, contribue pour plus de 20 millions de ringgits aux recettes d'exportation de ce pays (Jamaluddin 1998).

Cependant, les problèmes de maladies demeurent une contrainte majeure pour la production bananière, d'où la nécessité d'intensifier les efforts pour introduire de nouveaux cultivars résistants.

Le programme de recherche sur les bananiers de l'université de Malaisie et de l'*Universiti Putra Malaysia* a récemment créé un groupe de génétique moléculaire dont le travail est axé sur les espèces indigènes locales, et en particulier sur le bananier sauvage *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. Les projets en cours sont les suivants : analyse des étiquettes de séquences exprimées (EST), des STMS, des rétrotransposons, de gènes potentiels de résistance aux maladies, et études taxinomiques à l'aide de la cytométrie en flux et de la cytologie.

On a établi une bibliothèque d'ADNc, constituée avec un vecteur phagique ltrp1ex2, pour analyser les EST des gènes de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. Dans le cadre d'un projet à long terme de génomique du bananier, les clones de cette bibliothèque sont séquencés de manière aléatoire et analysés. Les recherches de similarités par rapport aux séquences connues déposées dans les bases de données ont déjà révélé des identités avec des gènes de fonction connue et avec d'autres clones d'EST. Toutes les séquences obtenues permettront d'établir une base de données sur les EST de *Musa* dont on se servira pour approfondir la connaissance des gènes des bananiers et leur éventuelle exploitation.

L'analyse des rétrotransposons a permis d'identifier des éléments de type Ty 1-copia chez 10 variétés de bananiers. Une recherche dans la base de données, pour établir une comparaison avec les gènes RT connus de rétrotransposons de type Ty 1-copia, a mis en évidence des identités de 85 à 97 % dans les nucléotides et prédit des identités de 57 à 82 % dans les acides aminés. Les séquences ont été subdivisées en huit groupes distincts similaires aux rétrotransposons

Ty 1-copia trouvés chez d'autres espèces végétales, comme le Tto1 de *Nicotiana tabacum* (Hirochika et Hirochika 1993). On a aussi isolé des rétrotransposons de type Ty 3-gypsy présentant des identités de 55 à 80 % par rapport aux éléments similaires de la base de données. Du fait de leur ubiquité et de leur hétérogénéité, les rétrotransposons de type Ty 1-copia et Ty 3-gypsy sont des marqueurs appropriés pour déterminer la biodiversité des espèces de bananiers de la Malaisie.

Dans le cadre d'un autre projet, on a utilisé la cytométrie en flux (Dolezel *et al.* 1991) pour étudier la variation du degré de ploïdie et de la dimension du génome nucléaire chez des espèces de *Musa* indigènes de Malaisie, à savoir *Musa acuminata* ssp., *Musa balbisiana*, *Musa violascens* et *Musa textilis*. Aucune variation n'a été constatée dans le degré de ploïdie. En revanche, on a observé une importante variation de la dimension du génome entre les différentes espèces analysées. La variation était plus réduite au niveau intraspécifique au sein de l'espèce *Musa acuminata*. L'analyse statistique et en grappes des données sur la dimension du génome pour les différents groupes correspondait bien à la classification taxinomique de *Musa* généralement acceptée.

Les études sur la résistance aux maladies des bananiers sauvages locaux sont axées sur *Fusarium oxysporum*, principal agent pathogène en Malaisie. L'objectif final consistera à introgresser les gènes de résistance des espèces sauvages dans des variétés cultivées en utilisant des méthodes combinant la génomique et la sélection à l'aide de marqueurs.

L'approche intégrée de ce programme, mis en œuvre en étroite relation avec les équipes travaillant sur la génétique et la transformation en Malaisie, devrait apporter une contribution aux programmes d'amélioration des bananiers localement et à l'échelle mondiale.

### Références

- Dolezel J. 1991. Flowcytometric analysis of nuclear DNA contents in higher plants. *Phytochem. Analysis* 2:143-154.  
Hirochika H. & R. Hirochika. 1993. Ty 1-copia group retrotransposons as ubiquitous components of plant genomes. *Jpn. J. Genet.* 68:35-46.  
Jamaluddin S.H. 1999. Commercial exploitation of banana diversity in Malaysia. Pp. 45-51 in *Proceedings of the First National Banana Seminar*, 23-25 Nov. 1998, Genting (Z. Wahab *et al.*, eds.).

### Caractérisation génétique de cultivars commerciaux triploïdes et tétraploïdes et de génotypes diploïdes sauvages du Brésil à l'aide de microsatellites

S.A.C.D. Souza<sup>2</sup>, A. Figueira<sup>1</sup>, A. Tulmann Neto<sup>1</sup> et S.O. Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, CP. 96 Piracicaba, SP, 13400-970, Brésil;

<sup>2</sup>ESALQ-USP (Escola Superior de Agricultura « Luiz de Queiroz », Universidade de São Paulo), Brésil; <sup>3</sup>EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Mandioca Fruticultura, Cruz das Almas, BA, Brésil. E-mail: figueira@cena.usp.br

Au Brésil, des bananiers des sous-groupes "Pome" et "Silk" (AAB) sont couramment cultivés, principalement par de petits producteurs. Le programme d'amélioration de l'EMBRAPA *Mandioca Fruticultura* (basé à Cruz das Almas, dans l'Etat de Bahia) a créé des hybrides tétraploïdes à partir d'un nombre limité de sélections commerciales triploïdes et de diploïdes sauvages. On peut penser qu'il existe un bon nombre de cultivars identiques portant des noms distincts (synonymes) et de génotypes distincts portant des noms similaires (homonymes), et les mutations somatiques tendent à s'accumuler chez les bananiers. Cette étude avait pour objectif de caractériser 33 cultivars commerciaux triploïdes et hybrides tétraploïdes, plus 49 génotypes diploïdes sauvages du programme d'amélioration de l'EMBRAPA à l'aide de marqueurs microsatellites. On a acheté des amorces à la société *Research Genetics Inc.* (Huntsville, AL, Etats-Unis) et l'on a analysé les fragments amplifiés sur des gels de polyacrylamide séquençant en conditions dénaturantes et colorés au nitrate d'argent. Sur la base d'une analyse en grappes, on a groupé les cultivars triploïdes et tétraploïdes selon leur constitution génomique (présence du génome B) et leur sous-groupe. Aucune différence n'a été détectée entre les cultivars des sous-groupes "Cavendish" et "Pome". On a identifié des cultivars qui n'étaient pas classés dans le bon sous-groupe. Les sélections tétraploïdes issues du même croisement n'étaient pas identiques et présentaient une similarité attendue avec les triploïdes maternels. Les diploïdes étaient extrêmement divers, les principales lignées diploïdes parentales employées pour créer les hybrides tétraploïdes étant très distinctes. Certaines amorces ont amplifié plus d'un locus, ce qui laisse à penser que la duplication des locus pourrait être un phénomène commun chez le bananier, comme on l'a déjà mentionné dans des articles publiés précédemment. On pourrait se servir des distances génétiques pour sélectionner les produits des futurs croisements.

### Etudes sur la structure des populations de *Mycosphaerella fijiensis* et sur la résistance partielle des bananiers

C. Abadie<sup>1</sup>, G.-G. Rivas<sup>2</sup>, A. El Hadrami<sup>3</sup>, M.-F. Zapater<sup>3</sup> et J. Carlier<sup>3</sup>

<sup>1</sup>CRBP (Centre régional de recherches sur bananiers et plantains), BP 832, Douala, Cameroun; <sup>2</sup>CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza), 7170, Turrialba, Costa Rica; <sup>3</sup>CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le

Le champignon ascomycète *Mycosphaerella fijiensis* (anamorphe *Paracercospora fijiensis*) est à l'origine de la maladie des raies noires ou cercosporiose noire, la plus destructrice des affections foliaires des bananiers (Jones 2000). Il importe de connaître l'ampleur et la distribution de la variabilité de *M. fijiensis* pour pouvoir créer des variétés résistantes et appliquer des stratégies de gestion de la résistance à cette maladie. Une étude de la structure génétique des populations de *M. fijiensis* à l'échelle mondiale a montré que les différentes populations peuvent maintenir un degré élevé de diversité génétique et que la recombinaison joue un rôle important chez cet agent pathogène (Carlier *et al.* 1996). Les programmes d'amélioration doivent donc faire appel de préférence à une résistance partielle, mais supposée durable. La présente étude avait pour objectifs de décrire la structure génétique des populations de *M. fijiensis* à l'échelle continentale et à l'échelle locale, et d'évaluer l'efficacité et la durabilité de la résistance partielle.

Pour étudier la structure des populations d'une espèce pathogène donnée, il faut tout d'abord la distinguer des espèces étroitement apparentées et déterminer sa distribution. Des recherches en ce sens en Asie du Sud et du Sud-Est ont amené à découvrir un champignon encore jamais décrit jusqu'alors, *Mycosphaerella eumusae* (anamorphe *Septoria eumusae*, Carlier *et al.* 2000). Dans le cadre d'une étude taxonomique et phylogénétique de l'ADN ribosomique, nous avons établi qu'on peut isoler à partir des feuilles de bananiers au moins neuf espèces appartenant à *Mycosphaerella* ou aux genres anamorphes apparentés (Carlier *et al.* non publié). Compte tenu de la présence de toutes ces espèces, les amorces définies dans la région ITS (Johanson et Jegger 1993) ne sont strictement spécifiques ni de *M. fijiensis* ni de *M. musicola*. Ces résultats montrent qu'il faut avoir une bonne connaissance du complexe d'espèces fongiques pour élaborer des outils de diagnostic. A partir de l'étude phylogénétique, nous avons mis au point un autre outil reposant sur une analyse de restriction de la région ITS et nous avons commencé à rechercher de nouvelles amorces spécifiques. Ces outils devraient aider à déterminer la distribution et l'importance des différentes espèces.

Nous avons analysé la structure des populations de *M. fijiensis* à l'échelle continentale et à l'échelle locale à partir d'échantillons collectés dans des pays d'Amérique latine, des Caraïbes et d'Afrique, en utilisant huit séquences polymorphes amplifiées et digérées par des enzymes de restriction (CAPS) comme marqueurs moléculaires (Zapater *et al.* non publié).

Nous avons constaté qu'au sein des populations locales, la majeure partie de la variabilité génétique est distribuée à une petite échelle correspondant à l'échelle de la plante. Dans la région Amérique latine et Caraïbes (ALC), la diversité génétique de *M. fijiensis* est relativement plus élevée au Honduras et au Costa Rica qu'ailleurs, ce qui permet de penser que c'est par là que l'agent pathogène a pénétré dans cette zone. Au sein de la zone ALC tout comme en Afrique, on a détecté un niveau élevé de différenciation génétique entre la plupart des populations analysées, ce qui indique que le flux de gènes est limité (Rivas *et al.* et Carlier *et al.* non publié). Il est donc probable que la maladie s'est diffusée dans ces régions par l'intermédiaire de plantes infectées et/ou par une dispersion restreinte d'ascospores. La poursuite des recherches au niveau des pays nous permettra de préciser l'importance relative de ces deux moyens de transmission. On a évalué la variabilité de l'agressivité de l'agent pathogène sur deux échantillons collectés au Cameroun et aux Philippines, en inoculant cinq cultivars partiellement résistants dans un essai sur des morceaux de feuilles (El Hadrami *et al.* 1998). Il s'est avéré que la variabilité était faible et d'un niveau similaire dans les deux pays, bien que la diversité génétique observée aux Philippines soit nettement plus importante (Carlier *et al.* 1996). On n'a détecté aucune interaction spécifique isolat x cultivar. Etant donné qu'on ne cultive que des hôtes sensibles dans ces pays, ces résultats pourraient s'expliquer par l'absence de sélection par l'hôte. Il faudrait analyser le potentiel d'adaptation des populations pathogènes à la résistance partielle en suivant leur évolution dans le temps dans des parcelles de génotypes de bananiers résistants.

Pour évaluer l'efficacité et la durabilité de la résistance partielle, trois approches complémentaires ont été adoptées : caractérisation des composantes de la résistance partielle en conditions contrôlées, évaluation de l'efficacité de ces composantes dans des essais en plein champ et analyse de la structure des populations de l'agent pathogène. Dans un essai sur des morceaux de feuilles, on a constaté des différences significatives entre 10 génotypes de bananiers à tous les stades du cycle infectieux (El Hadrami 2000). On peut donc en conclure que différentes composantes de la résistance partielle interviennent à ces différents stades. Nous avons entrepris d'étudier les rôles épidémiologiques de certaines composantes de la résistance dans des essais en plein champ sur différentes parcelles contenant chacune un seul génotype de bananier. La structure des populations pathogènes et leur variation dans l'espace et dans le temps selon les parcelles sont également en cours d'étude.

## Références

- Carlier J., M.H. Lebrun, M.F. Zapater, C. Dubois & X. Mourichon. 1996. Genetic structure of the global population of *Banana black leaf streak fungus Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 5:499-510.
- Carlier J., M.F. Zapater, F. Lapeyre, D.R. Jones & X. Mourichon. 2000. Septoria leaf spot of banana: a newly discovered disease caused by *Mycosphaerella eumusae* (anamorph *Septoria eumusae*). *Phytopathology* 90: 884-890.
- El Hadrami A., M.F. Zapater, F. Lapeyre, C. Abadie & J. Carlier. 1998. A leaf disk assay to assess partial resistance of banana germplasm and aggressiveness of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease. 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland. *BSP* Vol. 2, p. 1.1.24.
- El Hadrami A. 2000. Caractérisation de la résistance partielle des bananiers à la maladie des raies noires et évaluation de la variabilité de l'agressivité de l'agent causal, *Mycosphaerella fijiensis*. Thèse d'université. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. 153pp.
- Johanson A. & M.J. Jegger. 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycological Research* 97:670-674.
- Jones D.R. 2000. Diseases of banana, Abaca and Enset. CABI Publishing, CAB International, Royaume-Uni. 544pp.

## Nouvelles méthodes cytologiques pour l'étude du bananier

M. Pillay, M.T.V. Adeleke et A. Tenkouano

Crop Improvement Division, Plantain and Banana Improvement Project, International Institute of Tropical Agriculture, PMB 008 Nchia-Elleme, Port-Harcourt, Nigeria.

L'amélioration génétique des bananiers est rendue difficile par un certain nombre de contraintes, qui tiennent notamment au manque de connaissance de la structure des chromosomes, des degrés de ploïdie et des causes de stérilité. On n'a pas encore pu établir de caryotypes de *Musa*, car ses chromosomes sont petits, uniformes et se colorent mal, de sorte qu'il est difficile d'obtenir de bons étalements. Il est également indispensable d'identifier correctement les degrés de ploïdie et de mettre au point des techniques pour déterminer les causes de stérilité si l'on veut faire progresser l'amélioration. Cette étude décrit : i) l'utilisation du nitrate d'argent pour colorer les chromosomes ; ii) un nouveau protocole pour examiner les chromosomes pendant la méiose ; iii) l'analyse de la variation du degré de ploïdie au sein du matériel génétique ; et iv) l'observation de la croissance des tubes polliniques chez *Musa*. La coloration à l'acétocarmine, la plus fréquemment utilisée dans les études cytologiques sur les bananiers, est efficace quand les chromosomes sont condensés, comme c'est le cas pendant la métaphase, mais elle n'est pas efficace pendant la prophase. La coloration au nitrate d'argent offre une bonne solution de remplacement. L'étude présente une méthode améliorée pour examiner les chromosomes de *Musa* pendant la méiose. Les différentes étapes sont les suivantes : dis-

section de microsporocytes des anthères, centrifugation pour obtenir un grand nombre de microsporocytes, digestion à l'aide d'enzymes et traitement des cellules à l'acide acétique et à l'éthanol. Bien que les colorations de Giemsa et de Leishman soient efficaces pour les chromosomes de *Musa*, la coloration au nitrate d'argent s'est révélée la plus efficace pendant la phase où ils sont moins condensés. Cette technique pourra servir à établir les caryotypes pendant le pachytène, caractériser les nouveaux hybrides et identifier les mécanismes de restitution nucléaire (FDR ou SDR). L'analyse du degré de ploïdie et de la composition du génome de certaines de nos accessions a mis en évidence des différences par rapport aux données existantes, ce qui montre la nécessité de mieux caractériser le matériel génétique existant. Enfin, l'étude décrit une méthode permettant d'observer la croissance des tubes polliniques dans les styles des hybrides de *Musa*.

## Biochimie et maturation des fruits

### Les semences synthétiques : un nouveau mode de multiplication et de distribution du matériel génétique de bananier

T.R. Ganapathi, P. Suprasanna, L. Srinivas et V.A. Bapat

Plant Cell Culture Technology Section,  
Nuclear Agriculture and Biotechnology Division,  
Bhabha Atomic Research Centre, Trombay,  
Mumbai 400 085, Inde.

Les bananiers comestibles ne produisant généralement pas de semences viables, leur multiplication se fait de manière végétative, sous forme de rejets. Il serait avantageux de mettre au point de nouveaux modes de multiplication plus efficaces pour assurer la maintenance, les échanges et aussi le transport du matériel génétique. La culture *in vitro* de méristèmes végétatifs ou d'apex floraux apparaît comme la méthode la plus prometteuse pour multiplier du matériel en grande quantité. On applique de plus en plus la technique des semences synthétiques, consistant à encapsuler des embryons somatiques et des propagules végétatives, qui offre un excellent rendement pour multiplier le matériel d'élite. Cette technique exercera un impact significatif tant sur la production des plantes à multiplication végétative que sur celle des plantes se reproduisant par semences. En ce qui concerne les plantes à multiplication vé-

gétative, les semences synthétiques permettront de planter directement les variétés clonales et elles pourraient aussi servir à maintenir le matériel d'élite.

Après avoir produit des semences synthétiques en encapsulant des méristèmes apicaux et des embryons somatiques, on a étudié leur conversion en plantules. Des méristèmes apicaux du cv. Basrai, encapsulés dans de l'alginate de sodium contenant différentes matrices de gel, ont été régénérés *in vitro* sur divers substrats. Avec le milieu de Whites, on a obtenu un taux élevé de conversion en plantules. On a aussi produit des semences synthétiques avec des embryons somatiques dérivés de cultures cellulaires embryogènes du cv. Rasthali. Les taux de conversion sur différentes matrices de gel et différents substrats ont été variables. Les plantules obtenues à partir de semences synthétiques se sont établies avec succès dans le sol. Les semences synthétiques constituent donc un instrument utile, car on peut s'en servir comme de semences ordinaires pour stocker, transporter et distribuer le matériel génétique de bananier.

### Evaluation de systèmes de transformation et de régénération chez *Musa acuminata* var. Pisang Mas (AA) et Pisang Berangan (AAA)

Norzulaani Khalid, Yasmin Othman, Wirakarnain Sani, Mahanom Jalil et Norziah Juli

Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University  
Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaisie.

La fusariose du bananier (ou maladie de Panama), originaire de la péninsule de Malaisie, est considérée comme une sérieuse menace pour la production locale (Thompson et Johnston 1953). Cependant, les méthodes conventionnelles d'amélioration se heurtent à la stérilité des bananiers cultivés. C'est pourquoi notre laboratoire travaille à mettre au point des protocoles de culture de tissus et de transformation pour les variétés locales de *Musa acuminata* Pisang Mas (AA) et Pisang Berangan (AAA). Nous avons testé des méthodes de régénération à partir de méristèmes individuels et nus (scalps), de globules méristématiques et de calcs embryogènes. Ces derniers étaient dérivés de méristèmes (Novak *et al.* 1989) et d'inflorescences mâles (Escalant *et al.*). Les scalps ont donné le plus grand nombre de plants régénérés. Nous sommes en train de transférer les plants régénérés en champ afin d'étudier la variation soma-

clonale. Nous avons observé une fréquence de régénération plus élevée chez Pisang Berangan (AAA) que chez Pisang Mas (AA). Nous sommes aussi en train d'établir des suspensions cellulaires des deux variétés. Les suspensions cellulaires dérivées d'inflorescences mâles se développent à un rythme plus rapide que celles dérivées de méristèmes apicaux.

Nous avons fait des essais de transformation à l'aide de la biolistique et d'*Agrobacterium*. Les scalps et les calcs embryogènes ont donné les meilleures réponses. Des analyses histochimiques nous ont permis d'optimiser les paramètres de transformation et d'identifier des explants appropriés. De nouveaux essais de transformation doivent être faits sur des suspensions cellulaires des deux variétés.

Nous nous efforçons aussi d'isoler le gène antifongique du bananier sauvage *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. D'après les données publiées, cette espèce est résistante aux races 1 et 4 de la fusariose (Vakili 1965).

D'autre part, nous réalisons des innovations pour la production commerciale de vitroplants. Nous avons créé ce que nous appelons une "chambre stériliponique", qui combine les principes de la culture de tissus et de l'aéroponique. Elle offre plusieurs avantages : production accélérée des plants, minimisation des risques de contamination et besoins réduits en main-d'oeuvre. Cette chambre pourrait aussi servir à des essais physiologiques et à l'évaluation d'agents pathogènes.

Enfin, nous avons mis au point un système de suivi des données pour contrôler la production des plantes à l'aide de codes barres. Ce système permettra le suivi des plantes indexées pour les virus et le contrôle de qualité, et fournira les données de production requises.

### Références

- Escalant J.V., C. Teisson, A. Grapin & F. Côte. 1994. Embryogenèse somatique de différents cultivars de bananiers à partir de jeunes fleurs. *InfoMusa* 3(2):4-6.
- Novak F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Conger & Tang Xiolang. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) banana (*Musa* spp.). *Biotech.* 7:154-159.
- Thompson A. & A. Johnston 1953. A host list of plant diseases in Malaya. *Mycological papers* n° 52. CMI, Kew, Surrey, Royaume-Uni.
- Vakili N.G. 1965. Fusarium wilt resistance in seedlings and mature plants of *Musa* species. *Phytopathology* 55:135-140.

**Contenido**

Reunión de convocadores de grupos de trabajo de PROMUSA ..... p. I

2<sup>do</sup> Simposio internacional sobre la biología molecular y celular de bananos ..... p. II

Resumenes de los trabajos presentados ..... p. II

- Genómica ..... p. II
- Expresión de genes en plantas transgénicas ..... p. V
- Propiedad intelectual y organismos modificados genéticamente ..... p. VII
- Fitopatología y resistencia a las enfermedades ..... p. VII
- Biodiversidad y evolución ..... p. XIII
- Bioquímica y maduración de la fruta ..... p. XVI

**¿Qué es PROMUSA ?**

El Programa Global para el Mejoramiento de *Musa* (PROMUSA) es un amplio programa que tiene el propósito de involucrar a todos los principales actores del mejoramiento de *Musa*. Este programa fue desarrollado como un medio de enlazar el trabajo realizado para resolver los problemas de los productores de bananos para la exportación, además de las iniciativas dirigidas al mejoramiento de la producción de bananos y plátanos a nivel de subsistencia y pequeña escala para los mercados locales. El programa global se construye sobre los logros existentes en la investigación y está basado en las iniciativas de las investigaciones en curso. Por lo tanto, PROMUSA es un mecanismo para maximizar los logros y acelerar el impacto de todo el esfuerzo mundial del mejoramiento en el área de *Musa*. El programa representa un mecanismo innovador que reúne investigaciones que se realizan tanto dentro, como fuera del CGIAR, creando nuevas asociaciones entre los Sistemas Nacionales de Investigación Agrícola (SNIA) e instituciones de investigación en países desarrollados y en vías de desarrollo. La formación de tales asociaciones también contribuirá a fortalecer la capacidad de los SNIA con respecto a la conducción de las investigaciones relacionadas con *Musa*.

La principal meta de PROMUSA es desarrollar un amplio rango de variedades mejoradas de banano, a partir de las cuales los productores de todo el mundo puedan seleccionar aquellas que más responden a sus necesidades. El programa reúne el mejoramiento convencional basado en las técnicas de hibridación, con el mejoramiento mediante la ingeniería genética y la biotecnología. Este amplio esfuerzo de mejoramiento genético es apoyado por las investigaciones que se realizan sobre plagas y enfermedades específicas dentro de varios grupos de trabajo de PROMUSA. Un mecanismo eficaz para la evaluación de nuevas variedades, desarrollado en el marco de PROMUSA, también representa un componente esencial del programa.



# PROMUSA

Un programa global para el mejoramiento de *Musa*

## Reunión de convocadores de grupos de trabajo de PROMUSA

La primera reunión de convocadores de Grupos de trabajo de PROMUSA se celebró en Montpellier del 18 al 20 de abril. Se compartieron las últimas noticias sobre las actividades de cada uno de los cinco grupos y se acordó que el Grupo de trabajo sobre Mejoramiento Genético debe continuar operando a través de dos subgrupos y no dividirlo en dos grupos independientes como fue propuesto.

Se concibió una formulación de dos niveles para los participantes en los grupos de trabajo:

- aquellos que están interesados en recibir información con el fin de desarrollar investigaciones en general,
- aquellos cuya participación es más activa y que están involucrados en el desarrollo de las áreas prioritarias de investigación en el grupo.

Los convocadores tendrán la responsabilidad de familiarizarse con el trabajo de los participantes e identificar a aquellos que están más activos, así como estimular a que los participantes compartan información y utilicen el servidor de listas. Los miembros de los grupos de trabajo deben ser alentados para que envíen regularmente las actualizaciones sobre publicaciones, reuniones, eventos de capacitación y colaboren en el desarrollo de las propuestas de proyectos. PROMUSA ayudará en el desarrollo de las propuestas poniendo a su disposición la información sobre los donantes, guías para desarrollo de propuestas, información básica sobre la producción de bananos y plátanos y asistirá en la edición y traducción al inglés, si fuera necesario. Se enfatizaron las responsabilidades de los coordinadores regionales de INIBAP con respecto a estimular la participación de todas las regiones productoras de banano y también se consolidaron las responsabilidades del secretariado con respecto a la ayuda a los convocadores.

Se establecerá una base de datos de los participantes de PROMUSA, utilizando las bases de datos de INIBAP, BRIS Y MUSALIT y creando

enlaces con estas. El contenido de la base de datos será relativamente amplio y se les solicitará a los participantes proporcionar información sobre:

- Materiales, herramientas y métodos disponibles para la distribución,
- Disponibilidad de los materiales biológicos y condiciones para obtenerlos,
- Información sobre las actividades corrientes de colaboración y nuevas áreas para la colaboración,
- Actividades de capacitación corrientes, así como áreas de conocimiento y facilidades para la capacitación.

Se sugirieron cambios para el sitio web de PROMUSA. Cada grupo de trabajo tendrá su propia página con información sobre:

- Miembros (con un enlace a la base de datos propuesta arriba)
- Prioridades de investigación
- Cualesquiera bases de datos relevantes sobre los aspectos de investigación (por ejemplo, las bases de datos sobre el *Foc*)
- Protocolos y metodologías disponibles (con detalles sobre contactos)
- Publicaciones útiles: hojas divulgativas, guías técnicas, folletos (versiones en Word o PDF).
- Enlaces con otras páginas relevantes.

También se propuso preparar los carteles para las reuniones científicas, tanto sobre PROMUSA en general, como la labor de diferentes grupos de trabajo. Se discutieron los beneficios individuales de las reuniones globales de PROMUSA y reuniones de los grupos de trabajo. Las futuras reuniones globales invariablemente deberán ser programadas inmediatamente después de otra reunión científica importante. Se sugirió tentativamente el siguiente programa:

- Grupo de trabajo sobre Nematología (24-25 de mayo de 2001) después del Simposio internacional en nematología en África del Sur (21-23 de mayo de 2001).

- Grupo de trabajo sobre la Sigatoka negra (marzo de 2002) en América Latina después de un Simposio Internacional sobre las Enfermedades de las manchas foliares de banano.
- Grupo de trabajo sobre Mejoramiento genético + Reunión sobre las estrategias de mejoramiento en banano (3) después del 3<sup>er</sup>

Simposio internacional sobre la biología molecular y celular en banano en Lovaina, Bélgica (septiembre/octubre de 2002).

- Grupo de trabajo sobre el Marchitamiento por *Fusarium* - a decidir, se aceptan sugerencias.
- Grupo de trabajo sobre Virología - a decidir, se aceptan sugerencias.

La reunión global se celebrará cada tres años, con el fin permitir más tiempo para que los grupos de trabajo se reúnan independientemente y hagan progresos significativos. Por lo tanto, la siguiente reunión de PROMUSA tendrá lugar en 2003 y posiblemente se celebrará después del Congreso bananero internacional en noviembre

## 2<sup>do</sup> Simposio internacional sobre la biología molecular y celular de bananos

El Simposio inaugural sobre la biología molecular y celular de bananos, celebrado en marzo de 1999 en Ithaca, New York, EEUU, fue organizado por el Boyce Thompson Institute for Plant Research. El propósito del Simposio consistió en abrir un foro para que todas las personas involucradas en biología molecular y celular tuvieran oportunidad de encontrarse e intercambiar información sobre sus investigaciones. La reunión resultó un rotundo éxito y, por lo tanto, se sugirió a continuar la celebración de este tipo de simposios bajo los auspicios de PROMUSA.

El 2<sup>do</sup> Simposio internacional sobre la biología molecular y celular de bananos, celebrado del 29 de octubre al 3 de noviembre de 2000 en Byron Bay, Australia, fue organizado por la *Queensland University of Technology* (QUT) con la colaboración local de CRCTPP (*Cooperative Research Center for Tropical Plant Pathology*) y QDPI

(*Queensland Department of Primary Industries*). El comité de organización local también recibió una gran ayuda internacional de INIBAP, Zeneca y DNAP (*DNA Plant Technology Corporation*, EEUU). Este segundo simposio permitió a los participantes tanto de los países desarrollados como de los países en vías de desarrollo, a presentar sus actividades de investigación, que abarcaron un amplio rango de áreas.

El simposio fue estructurado alrededor de las siguientes sesiones: genómica; expresión génica en las plantas transgénicas; fitopatología y resistencia a las enfermedades; propiedad intelectual y organismos modificados genéticamente; biodiversidad y evolución; y bioquímica y maduración de la fruta. Gracias al apoyo recibido de las instituciones participantes, fueron invitados científicos reconocidos mundialmente para que asistieran y presentaran trabajos sobre "Genómica y

banano" (Colin Bird, Zeneca) y "Propiedad intelectual y organismos modificados genéticamente" (Dianne Nicoll, Universidad de Tasmania). Los participantes de la CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*) *Plant Industry* también presentaron discursos introduciendo las sesiones sobre la expresión génica en plantas transgénicas (Peter Waterhouse), fitopatología y resistencia a las enfermedades (Jeff Ellis), y bioquímica y maduración de la fruta (Simon Robinson).

Con 50 trabajos presentados y 60 participantes de 17 países que asistieron al simposio, este evento se encuentra entre los foros científicos sobre *Musa* más importantes.

Como una contribución adicional, INIBAP publica aquí un suplemento especial de PROMUSA que contiene resúmenes de las presentaciones del simposio.

### Resúmenes de los trabajos presentados

#### Genómica

##### Inducción, detección y uso de aneuploides para los estudios genéticos en *Musa* spp.

N.S. Roux<sup>1</sup>, A. Toloza<sup>1</sup>, J. Dolezel<sup>2</sup> y F.J. Zapata-Arias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plant Breeding Unit, FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Seibersdorf, Austria; <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, Olomouc, República Checa.

Después de realizar tratamientos con radiación gama y colchicina, se obtuvieron plantas de banano poliploides y aneuploides. También se observó una variación en el número de cromosomas en las plantas regeneradas a partir de los cultivos de tejidos mediante organogénesis o embriogénesis somática, que no fueron expuestos a ningún tratamiento mutagénico. Las plantas anormales regeneradas fueron analizadas me-

dante la técnica de citometría de flujo, según fue descrito por Dolezel *et al.* (1997), con el fin de estimar sus niveles de ploidía y verificar la sensibilidad del método para detectar la aneuploidía en *Musa*. Los núcleos de los glóbulos rojos de la sangre de pollo (*chicken red blood cell*, CRBC) se utilizaron como estándar para referencia interna y el índice de ADN se calculó comparando las posiciones pico de los núcleos de CRBC con las de la muestra. A nivel triploide, la diferencia mínima entre una planta euploide (3x) y una planta aneuploide (3x ± 1) debería ser aproximadamente de un 3%. Por lo tanto, todas las plantas cuyo índice de ADN difiere en 1.5 % del índice establecido para las plantas testigo (3x), fueron consideradas aneuploides. Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo fueron verificados mediante el conteo de cromosomas en las células meristemáticas de las puntas de las raíces (Dolezel *et al.* 1998). Los resultados indicaron que la citometría de flujo ha sido suficientemente sensible para detectar la aneuploidía en *Musa*. Sin embargo, la detección de aneuploidía con una precisión de cromosomas de ± 1 requirió la realización de los análisis de alta resolución

con coeficiente de variación de los picos de ADN inferiores a 2%. La ventaja de la prueba de citometría de flujo consistió en que las anomalías en el contenido de ADN pudieron ser detectadas en una etapa temprana del crecimiento de la planta, así como durante el cultivo *in vitro*. Además, la citometría de flujo permitió detectar la mixoploidía. De esta manera, en varios casos se detectaron diferencias en los niveles de ploidía entre el tejido foliar y el tejido de las raíces de la misma planta. Los aneuploides han sido particularmente útiles en los estudios genéticos de muchas especies de plantas como el maíz, tomate, tabaco y trigo (Khush 1973). Siguiendo el trabajo de Sears, la recolección de las líneas aneuploides permitió definir las relaciones entre los cromosomas de trigo hexaploide en términos de su origen y función (Law *et al.* 1987). En *Musa* spp., los aneuploides son relativamente frecuentes y viables en clones triploides. Siendo estériles, su valor para los análisis genéticos es limitado. Sin embargo, ellos podrían ser muy útiles para la confección de mapas físicos y para enlazar los mapas genéticos y físicos utilizando marcadores moleculares actualmente disponibles.

## Bibliografía

- Dolezel J., M. Lysak, I. Van den Houwe, M. Dolezelova & N. Roux. 1997. Utilización de la citometría de flujo para la determinación rápida de ploidía en especies de *Musa*. *INFOMUSA* 6:6-9.
- Dolezel J., M. Dolezelova, N. Roux & I. Van den Houwe. 1998. Nuevo método de preparación de láminas para realizar estudios cromosómicos mediante alta resolución en *Musa* spp. *INFOMUSA* 7:3-4.
- Khush G.S. 1973. *Cytogenetics of aneuploids*. Academic Press, New York, USA.
- Law C.N., J.W. Snape & A.J. Worland. 1987. Aneuploidy in wheat and its uses in genetic analysis. Pp. 71-108 in *Wheat breeding: its scientific basis* (F.G.H. Lupton, ed.). Chapman & Hall, London.

## Agradecimiento

Agradecemos a Ines Van den Houwe (INIBAP) por suministrar los clones vegetativos de *Musa* y a Rony Swennen (KUL) por suministrar suspensiones de células embriogénicas de *Musa*. Este trabajo fue apoyado por un Proyecto Conjunto de Investigación Coordinada de FAO/IAEA/GDIC (Dirección General Belga para la Cooperación Internacional, *Belgian General Direction for International Cooperation*). El estudio fue realizado como parte del Programa Global para el Mejoramiento de *Musa* (PROMUSA).

## Citogenética molecular y análisis citométrico de los genomas de *Musa*

J. Dolezel, M. Valárik, J. Vrána, M. Dolezelová, J. Safár, M. Lysák y H. Simková

Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, Olomouc, República Checa.

La aplicación de la citometría de flujo y citogenética molecular estimularon el progreso en el entendimiento del genoma de *Musa* a escala molecular y cromosómica. La técnica de citometría de flujo resultó ser un método conveniente para estimar el contenido del ADN nuclear en *Musa* (Dolezel *et al.* 1994) y ha sido utilizado para verificar la ploidía en las colecciones existentes de germoplasma, caracterización de los materiales recolectados recientemente y evaluación de la estabilidad cariológica *in vitro*. Debido a la gran cantidad de material que puede ser procesado mediante este análisis, el método puede ser incorporado fácilmente en los programas de mejoramiento existentes. Las muestras pueden ser enviadas a los laboratorios equipados con un citómetro de flujo, ya que se necesita sólo una pequeña cantidad de tejido vegetal. El método también permite la determinación del tamaño del genoma nuclear. Se descubrió que los genomas de *Musa* son pequeños y que el genoma B es más pequeño que el genoma A (Lysák *et al.* 1999). El desarrollo de los procedimientos para la detección rápida y confiable de aneuploidía y para la ordenación del flujo de cromosomas sigue siendo el principal reto. Dado el pequeño tamaño y una

pobre diferenciación morfológica de los cromosomas de *Musa* (Dolezel *et al.* 1998), la citogenética molecular sigue siendo la principal promesa para el análisis cariotípico y el estudio de la organización de los cromosomas. Mientras que la hibridación genómica *in situ* es adecuada para la determinación de la constitución genómica en los híbridos (D'Hont *et al.* 2000), la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) permite el mapeo físico de las secuencias de ADN hacia los cromosomas. Varias clases de secuencias repetitivas de ADN, incluyendo los genes del ARN ribosomal, el retrotransposon y las secuencias del BSV ya han sido localizados en los cromosomas de *Musa* (Balint-Kurti *et al.* 2000, Dolezelová *et al.* 1998, Harper *et al.* 1999). Es necesario aislar y confeccionar mapas de una mayor cantidad de secuencias de ADN con el fin de aclarar la estructura molecular de los cromosomas y establecer los mecanismos de diferenciación genómica en *Musa*. La identificación de los cromosomas individuales utilizando los mapas físicos de las secuencias de ADN, permitirá realizar el análisis de su comportamiento y la segregación durante la evolución, así como en los programas de mejoramiento. Los mapas físicos de las secuencias de ADN de una sola copia y de un número bajo de copias permitirán la integración de los mapas físicos y genéticos.

## Bibliografía

- Balint-Kurti, P.J., S.K. Clendennen, M. Dolezelová, M. Valárik, J. Dolezel, P.R. Beetham & G.D. May. 2000. Identification and chromosomal localization of the *monkey* retrotransposon in *Musa* sp. *Mol. Gen. Genet.* 263:908-915.
- D'Hont, A., A. Paget-Goy, J. Escoute & F. Carreel. 2000. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 100:177-183.
- Dolezel, J., M. Dolezelová & F.J. Novák. 1994. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biol. Plant.* 36:351-357.
- Dolezel J., M. Dolezelova, N. Roux & I. Van den Houwe. 1998. Nuevo método de preparación de láminas para realizar estudios cromosómicos mediante alta resolución en *Musa* spp. *InfoMusa* 7:3-4.
- Dolezelová, M., M. Valárik, R. Swennen, J.P. Horry & J. Dolezel. 1998. Physical mapping of the 18S-25S and 5S ribosomal RNA genes in diploid bananas. *Biol. Plant.* 41:497-505.
- Harper G., J. Osuji, J.S.P. Heslop-Harrison & R. Hull. 1999. Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: Molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255:207-213.
- Lysák, M.A., M. Dolezelová, J.P. Horry, R. Swennen & J. Dolezel. 1999. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theor. Appl. Genet.* 98:1344-1350.

## Agradecimiento

El estudio fue realizado como parte del Programa Global para el Mejoramiento de *Musa* (PROMUSA) y apoyado por el Contrato de In-

vestigación No. 8145/RB de la Agencia Internacional de Energía Atómica.

## Marcadores para la determinación de la integridad genómica: Variantes somaclonales en bananos como un sistema modelo

C.A. Cullis<sup>1</sup>, K. Kunert<sup>2</sup> y B. Okole<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Case Western Reserve University and NovoMark Technologies LLC, Cleveland, Ohio 44106, EEUU; <sup>2</sup>Botany Department, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria, Pretoria 0002, África del Sur; <sup>3</sup>African Biotechnologies (PTY) LTD, Tzaneen 0850, África del Sur.

Por largo tiempo la variación somaclonal ha sido reconocida como un subproducto de la propagación de las células vegetales a través de uno o más ciclos del crecimiento desorganizado de las células. La mayoría de los procesos de transformación utilizados en la generación de las plantas transgénicas, incluyen al menos una etapa donde primero se cultivan las células y luego se regeneran las plantas. Por lo tanto, todos los individuos que son transgénicos y los cuales surgieron mediante este método tienen el potencial de contener esta variación, aún en ausencia de cualquier mutación visible. Muchas alteraciones genómicas en plantas transgénicas ya han sido detectadas utilizando métodos RAPD y AFLP. A pesar de la observación de que los polimorfismos similares surgen repetitivamente, ninguna de estas variantes ha mostrado ser útil para predecir el nivel de variación genómica que tuvo lugar. Los tipos anormales bien documentados que aparecen en los cultivos de tejidos de los bananos, han sido utilizados como un sistema modelo para identificar las regiones del genoma que pueden ser especialmente susceptibles al cambio y desarrollar los marcadores con el fin de determinar la magnitud de este cambio. Se utilizó el análisis de diferencia representativa para aislar las diferencias genómicas entre dos juegos de cultivares de banano, normales y variantes, entre un Williams y un tipo anormal clorótico masada, y entre un individuo Curare Enano y un tipo anormal enano (el último proporcionado por el Dr R. Swennen). En ambas instancias, se identificaron clones de diferencia. Muchas de las secuencias fueron comunes a ambos juegos de productos de diferencia, a pesar del hecho de que todos ellos resultaron ser fenotipos aberrantes diferentes. Uno de los productos de diferencia identificados fue una secuencia microsatélite que también resultó inestable en datileras. Estos resultados añaden más evidencias a la presencia de un segmento inestable del genoma que se modifica preferencialmente durante la generación de variantes somaclonales. Estos productos de diferencia están siendo caracterizados con vistas a desarrollar una serie de marcadores que pueden ser utilizados para identificar cambios genómicos tempranos

y también como un diagnóstico para los fenotipos específicos que aparecen durante el proceso de cultivo de tejidos.

## Identificación de los marcadores AFLP y ISSR asociados con variantes somaclonales enanas en bananos Cavendish

T.R. Benatti<sup>1</sup>, S.A.C.D. Souza<sup>1</sup>, J.A. Scarpate<sup>2</sup> Filho, P.C. Santos<sup>3</sup>, A. Tullmann Neto<sup>1</sup>, E.A. Kido<sup>1</sup> y A. Figueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, CP 96, Piracicaba, SP, 13400-970, Brasil;

<sup>2</sup>ESALQ-USP (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo), Brasil; <sup>3</sup>UNESP (Universidade Nacional do Estado de São Paulo), Ilha Solteira, Brasil. Correo electrónico: figueira@cena.usp.br

Variación somaclonal es una característica común de algunos cultivares micropropagados de banano, causada por razones no determinadas. La detección temprana de las variantes es deseable para la micropropagación comercial o para establecer métodos con el fin de aumentar la variabilidad para el mejoramiento. Los marcadores moleculares ofrecen un gran potencial para detectar y exponer las causas de la variación somaclonal. El objetivo de este estudio consistió en examinar los ensayos de Polimorfismo por Amplificación de Longitud de Fragmentos (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP) y Repeticiones de Secuencias Internas Simples (*Inter-Simple Sequence Repeat*, ISSR), utilizando geles de poliacrilamida y teñido con plata, comparando un cultivar Cavendish "Nanicão Jangada" con su variante somaclonal enana. Se examinaron doce iniciadores ISSR y dos de ellos (16.6%) presentaron fragmentos polimórficos presentes solo en la variante enana. Se examinaron todas las combinaciones de los iniciadores AFLP de la serie AFLP System I (Life Technologies, Rockville, MD, USA), amplificando un total de 1665 bandas. Cada combinación de iniciadores amplificó un promedio de 26.4 fragmentos, con variación de 7 a 44 bandas. Se identificaron 43 fragmentos polimórficos (2.6%), entre los cuales 19 (1.1%) estaban presentes solo en la variante enana. Los fragmentos polimórficos se mantuvieron estables entre los ensayos. También se examinó un ensayo AFLP sensible a metilación y basado en la habilidad diferencial de un par de isoquimeras para restringir citosina metilada. Se utilizó una combinación de 24 iniciadores para amplificar el ADN de ambos genotipos. Se amplificó un promedio de 24.8 fragmentos de los ADN tratados con *Hpa*II y 22.1 de los ADN tratados con *Msp*I, comparables a la AFLP regular. Doce bandas polimórficas (2.1%) se encontraban presentes solo en el "Nanicão Jangada" en *Hpa*II digerido, mientras que ocho fragmentos (1.6%) resultaron polimórficos para el ADN tratado con *Msp*I. Sólo tres polimorfismos (0.5%) podrían haber sido derivados de las diferencias en metilación. Se está exa-

minando otras variantes enanas utilizando las mismas combinaciones de iniciadores, y los fragmentos polimórficos serán clonados y secuenciados.

## Aplicación de las técnicas de polimorfismo amplificado de longitud de fragmentos (AFLP) y de polimorfismo amplificado sensible a metilación (MSAP) para la detección de los polimorfismos de ADN y cambios en la metilación de ADN en los bananos micropropagados

A. James, V. Herrera, L. Peraza y S. Peraza

Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 #130, Colonia Churburna de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México.

Se investigó el efecto de la fuente de explantes sobre los polimorfismos de ADN y los cambios en la metilación en las hojas de 'Grande Naine' (*Musa* AAA) micropropagado. Los explantes fueron derivados de los ápices florales masculinos jóvenes o retoños, y los cultivos de brotes inducidos a partir de estos explantes, fueron micropropagados durante 5 subcultivos. Como testigos para el análisis MSAP (Xiong *et al.* 1999), se escogieron tejidos foliares equivalentes de 10 plantas propagadas con el método convencional. Diez combinaciones de iniciadores fueron utilizadas para el análisis AFLP, y ocho, para el análisis MSAP. No se encontraron diferencias significativas entre cualesquiera tipos de explantes utilizando el AFLP o MSAP en el tejido foliar de las plantas derivadas de la propagación convencional. Sin embargo, al compararlas con los explantes, las plantas micropropagadas, derivadas de estos explantes, tuvieron una cantidad de polimorfismos de ADN mucho mayor. En adición, encontramos que la fuente de explantes tuvo una influencia significativa sobre la magnitud de los polimorfismos ADN obtenidos mediante la técnica AFLP en las plantas regeneradas. Las plantas regeneradas derivadas de las inflorescencias dieron la variación más alta con 6.36%, en comparación con las plantas regeneradas derivadas de los retoños, que dieron un 3.96% de polimorfismos.

Un total de 107 (23%) de 465 bandas resultaron ser metiladas con citosina en las plantas micropropagadas, mientras que en las propagadas convencionalmente el 18% de las bandas resultaron ser metiladas con citosina. No hubo diferencias significativas en la magnitud de los polimorfismos de metilación de ADN entre las plantas micropropagadas derivadas de las inflorescencias (3%) y plantas derivadas de los retoños (1.7%). La mayoría de las bandas polimórficas fueron de alto peso molecular (más de 700 bp) y supermetiladas. Este fue el caso para la mayoría de las bandas supermetiladas comunes a todas las plantas micropropagadas que no fueron meti-

ladas en las plantas propagadas convencionalmente. Se encontró una correlación entre algunas plantas con polimorfismos AFLP y plantas con polimorfismos de metilación.

De este modo, se descubrió que el proceso de micropropagación de los bananos genera cambios genéticos y posiblemente epigenéticos significativos en las plantas micropropagadas del banano 'Grande Naine'. La pregunta de si la supermetilación encontrada en todas las plantas regeneradas está relacionada con el desarrollo o es una consecuencia del ambiente del cultivo de tejido *per se*, sigue sin respuesta. Las correlaciones encontradas entre los polimorfismos AFLP y MSAP proporcionan evidencia indirecta de que la supermetilación puede inducir cambios básicos, posiblemente mediante deaminación (Kaepler *et al.* 2000). Todas las plantas regeneradas están siendo cultivadas actualmente hasta que alcancen su madurez en nuestra plantación experimental en Yucatán para poder realizar una caracterización fenotípica.

### Bibliografía

- Kaepler S., H.F. Kaepler & Y. Rhee. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43:179-188.  
Xiong L.Z., C.G. Xu, S. Maroof & Q. Zhang. 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol. Gen. Genet.* 261:439-466.

### Secuencias del badnavirus del rayado de banano en *Musa*

G. Harper<sup>1</sup>, T. Schwarzacher<sup>2</sup>, C. Hansen<sup>2</sup>, P. Heslop-Harrison<sup>2</sup> y R. Hull<sup>1</sup>

<sup>1</sup>John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, RU;

<sup>2</sup>Department of Biology, University of Leicester, Leicester LE1 7RH, RU.

Datos moleculares y citogenéticos muestran una evidencia inequívoca de la integración de las secuencias del badnavirus del rayado del banano (BSV) en el genoma del plátano Obino l'Ewai (*Musa* AAB) y estas secuencias son esencialmente idénticas a las de un virus episomal que causa infección en *Musa* (Harper *et al.* 1999, Ndowora *et al.* 1999). Existen dos loci, cuyas secuencias del BSV en Obino l'Ewai son diferentes en el número de copias, y al menos una de ellas, la estructura de la secuencia integrada, está reestructurada con respecto a la secuencia del virus. Significativas infecciones con el BSV se han detectado en cierto germoplasma de *Musa* que contiene genoma B durante la meiosis o cultivo de tejidos y la evidencia circunstancial apunta a la infección episomal con el BSV, que surge de la activación o movilización de las secuencias integradas del BSV. Se propuso un modelo que involucra la recombinación que enlaza la secuencia integrada con la generación de las formas repetitivas del virus (Ndowora *et al.* 1999). Este fenómeno tiene mayores implicacio-



nes para la patología, mejoramiento, movimiento de germoplasma y cuarentena de *Musa*.

El fenómeno de integración del BSV tiene paralelos en otros dos casos de los pararetrovirus, virus de la necrosis de las venas de *Petunia* (PVCV) (Richert-Pöggeler y Shepherd 1997) y el virus de la necrosis de las venas del Tabaco (TVCV) (Lockhart *et al.* 2000). El PVCV episomal se encuentra en la *Petunia hybrida* y aparece después de un estrés ambiental como una deficiencia de nutrientes, y el TVCV episomal se encuentra en el híbrido *Nicotiana edwardsonii* al cambiar la duración del día. Las secuencias virales integradas esencialmente idénticas a las secuencias del virus episomal son encontradas en ambas especies híbridas con alto número de copias. Como en el caso de *Musa* y BSV, las secuencias de virus están integradas en solo uno de los genomas de los progenitores del híbrido, aunque el virus episomal no se detecta en aquel progenitor. Esto sugiere que el otro genoma de uno de los progenitores desempeña una parte en la "activación" de las secuencias del virus en el híbrido.

Fragmentos de la secuencia de un virus de tabaco parecido a pararetrovirus (TPVL) han sido encontrados en el ADN genómico de *Nicotiana* sp. (Jakowitsch *et al.* 1999). Hemos mostrado que la secuencia de pararetrovirus contiene probablemente un componente importante y muy difundido de los genomas de las plantas, incluyendo Gimnospermas y Angiospermas. Su presencia puede tener consecuencias para el silenciamiento de los genes y la evolución genómica. Hasta la fecha no hay evidencias de que estas secuencias dieron origen a nuevos síntomas virales, como se sugiere para las secuencias pararetrovirales integradas relacionadas.

Estamos examinando la naturaleza y el contexto genómico de las secuencias integradas del BSV en Obino l'Ewai y en otros cultivares de *Musa*. Una secuencia repetida moderadamente que rodea la secuencia integrada del BSV en Obino l'Ewai (*MusaOL*), se concentra cerca de los centrómeros de la mayoría de los cromosomas de los genomas A y B de *Musa* al variar la cantidad de copias. Los números bajos de integrantes por genoma relacionados con el BSV indican que la integración del BSV ocurrió después de la amplificación y distribución de las secuencias de *MusaOL* y, por lo tanto, probablemente es un evento reciente.

#### Bibliografía

- Harper G., J.O. Osuji, J.S. Heslop-Harrison & R. Hull. 1999. Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255:207-213.
- Ndowora T., G. Dahal, D. LaFleur, G. Harper, R. Hull, N. Olszewski & B. Lockhart. 1999. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 255:214-220.
- Richert-Pöggeler K.R. & R.J. Shepherd. 1997. *Petunia* vein clearing virus: a plant pararetrovirus with the

core sequences for an integrase function. *Virology* 236:137-146.

Lockhart B.E., J. Menke, G. Dahal & N. E. Olszewski. 2000. Characterization and genomic analysis of tobacco vein-clearing virus, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. *J. Gen. Virol.* 81:1579-1585.

Jakowitsch J., M.F. Mette, J. van der Winden, M.A. Matzke and A.J.M. Matzke. 1999. Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96(23):13241-13246.

### ¿Es la cepa OL del virus del rayado del banano el único integrante de virus activable en el genoma de *Musa*?

A.D.W. Geering<sup>1</sup>, J.N. Parry<sup>1</sup>, L. Zhang<sup>2</sup>, N.E. Olszewski<sup>3</sup>, B.E.L. Lockhart<sup>2</sup> y J.E. Thomas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Queensland Horticulture Institute, Department of Primary Industries, 80 Meiers Road, Indooroopilly, QLD 4068, Australia; <sup>2,3</sup>Departments of Plant Pathology and Plant Biology, respectivamente, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota 55108, EEUU.

En 1999, hubo varias epidemias del Virus del rayado del banano (*banana streak virus*, BSV) en las siembras de los híbridos 909, 910 y 914 de IRFA en localidades separadas de Nueva Gales del Sur y Queensland. Estos nuevos híbridos, provenientes del programa de mejoramiento de *Musa* de CIRAD, estuvieron bajo evaluación con respecto a su resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, por 12-18 meses previos a la expresión de los síntomas. Estas plantas mostraron reacciones negativas con respecto al BSV-Onne obtenidas mediante la técnica (IC)-PCR de inmunocaptación. Sin embargo, los híbridos IRFA 909 y 910 sí dieron reacciones positivas para el BSV-Goldfinger mediante IC-PCR. El badnavirus del IRFA 914 fue distinto a todos los examinados previamente. A este aislado de virus le hemos dado el nombre BSV-IM. Utilizando iniciadores degenerados de PCR, hemos amplificado el ADN del BSV-IM, y utilizando la secuencia del fragmento de ADN, designado iniciadores específicos del virus. Utilizando este nuevo ensayo PCR, hemos mostrado que el IRFA 909 y el 910 fueron infectados tanto con el BSV-Goldfinger como con el BSV-IM. En ensayos repetidos durante un período de tiempo, el IRFA 914 siempre mostró reacción positiva hacia el BSV-IM, pero no hacia el BSV-GF. También hemos encontrado una planta IRFA 914 infectada con el BSV-IM en Nueva Caledonia.

Hemos purificado el virus proveniente del IRFA 910, y obtenido clones de ADN que representan el genoma entero del BSV-IM. Hemos completado la secuenciación de este virus, y el análisis inicial de secuencias sugiere que el BSV-IM es una especie distinta de virus. Cuando las proteínas codificadas por el ORF I, II y III del BSV-OL (Accesión del Banco de Genes AJ002234) y del BSV-IM, fueron comparadas, las identidades de secuencias fueron 60.5, 42.3

y 64.3%, respectivamente. Hemos considerado la posibilidad de que el BSV-IM ha surgido de las secuencias virales integradas. Nuestros clones virales hibridados a *EcoRI* y *HindIII* digirieron el ADN de dos progenitores diploides B de las líneas híbridas de IRFA, pero fracasaron en hibridar los ADN digeridos de manera similar procedentes de los cultivares Obino l'Ewai, Calcutta 4 y varios cultivares AAA. Los clones virales también hibridaron con el ADN genómico sin cortar de ambos progenitores diploides B. Ambos progenitores diploides B nunca han mostrado síntomas de infección con el BSV, y han mostrado reacciones negativas para la infección con el BSV mediante la microscopía electrónica inmunoabsorbente de los extractos foliares concentrados. Los patrones de hibridación observados no son consistentes con aquellos esperados con el ADN del virus episomal. Estos resultados sugieren que el BSV-IM ha surgido vía activación de las secuencias integradas.

Igualmente hemos examinado la posibilidad de que otras cepas del BSV también estén integradas en el genoma de *Musa*. Utilizando sondas para el genoma completo del BSV-Mys (Geering *et al.* 2000), hemos observado patrones complejos de hibridación donde *EcoRI* y *HindIII* digirieron el ADN de tres bananos diploides B, así como de los cultivares Obino l'Ewai (grupo AAB), Goldfinger (grupo AAAB) y Pisang Ceylan (grupo AAB), sugiriendo que la secuencia del BSV-Mys está integrada. Asimismo, al examinar con una sonda de 1.3 kb de BSV-GF (Geering *et al.* 2000), se detectó un fragmento de 20 kb de *HindIII* en el ADN de dos bananos diploides B, así, como de los cultivares Obino l'Ewai, Goldfinger y Pisang Ceylan, sugiriendo que la secuencia de BSV-GF también está integrada. No se observó la hibridación entre las sondas BSV-Mys o BSV-GF y el ADN de una serie de cultivares AA y AAA, sugiriendo que el ADN integrado está ligado al genoma B de *Musa* cultivado.

#### Bibliografía

- Geering A.D.W., L.A. McMichael, R.G. Dietzgen & J.E. Thomas. 2000. Genetic diversity among Banana streak virus isolates from Australia. *Phytopathology* 90:921-927.

### Expresión de genes en plantas transgénicas

#### Transformación mediante Agrobacterium para la generación de banano (*Musa* spp.) transgénico

J.B. Pérez Hernández<sup>1</sup>, R. Swennen<sup>1</sup>, V. Galán Saúco<sup>2</sup> y L. Sági<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica; <sup>2</sup>Departamento de Frutas Tropicales, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna, España. (Dirección actual: Departamento de Frutas Tropicales, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna, España).

Una evaluación sistemática de los pasos sucesivos en la interacción natural entre *Agrobacterium* y las plantas dio como resultado la elaboración de un protocolo de transformación eficaz para los bananos. La quimotaxis y el enlace físico de las células bacterianas se observaron en diferentes células y tejidos de varios cultivares de banano (Pérez Hernández *et al.* 1999). La expresión del gen reportero transitorio se demostró en varios tejidos cultivados conjuntamente con el *Agrobacterium* inducido por la vía viral (*vir*-induced) y las frecuencias más altas se encontraron en los cultivos de suspensiones de células embriónicas. Una transformación estable se obtuvo después de realizar la selección en el medio que contenía geneticina o Basta. En total, se regeneraron más de 600 plantas transgénicas en cinco experimentos independientes y más del 90% de ellas expresaron los genes introducidos (*gfp* o *gusA*). La caracterización molecular reveló un patrón de integración sencillo en la mayoría de las plantas transgénicas. Las plantas transgénicas que contenían el gen que codifica el péptido antimicrobiano Ace-AMP1 (Cammue *et al.*) fueron cribadas mediante un bioensayo con un disco de hoja, y se identificaron las plantas candidatas con aumentada tolerancia al hongo (Pérez Hernández 2000).

#### Bibliografía

- Pérez Hernández J. B., S. Remy, V. Galán Saúco, R. Swennen & L. Sági. 1999. Chemotactic movement and attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to single cells and tissues of banana. *Journal of Plant Physiology* 155:245-250.
- Cammue B.P.A., K. Thevissen, M. Hendricks, K. Eggermont, I.J. Goderis, P. Proost, J. Van Damme, R.W. Osborn, F. Guerbet, J.-C. Kader & W.F. Broekaert. 1995. A potent antimicrobial protein from onion (*Allium cepa* L.) seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiology* 109:445-455.
- Pérez Hernández J.B. 2000. Development and application of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation to increase fungus-resistance in banana (*Musa* spp.). PhD Thesis, Catholic University of Leuven, Belgium.

### Un nuevo método basado en PCR para la caracterización de la inserción del transgen en plantas transgénicas

J.B. Pérez Hernández\*, R. Swennen y L. Sági

Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica. (Dirección actual: Departamento de Frutas Tropicales, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna, España).

Se desarrolló un método de PCR anclado (APCR) que permite una rápida caracterización molecular de plantas transgénicas generadas vía transformación mediante *Agrobacterium*. Los fragmentos de ADN genómico obtenidos por digestión con enzimas de restricción son amplificados específicamente con un iniciador específico T-ADN en combinación con un iniciador específico de adaptador. La incorporación

de las condiciones de supresión de PCR (Siebert *et al.* 1995) dio como resultado un mejoramiento significativo y permitió la amplificación de los fragmentos específicos de APCR en un solo paso. La hibridación Southern de las sondas específicas de los márgenes de T-DNA a los fragmentos de APCR reveló que ellos fueron amplificados correctamente de los transgenes. El análisis APCR de un juego de prueba de 20 plantas transgénicas de banano demostró que alrededor del 70% de ellas contenían una o dos inserciones de transgenes, que se compara favorablemente con el patrón de inserción de transgenes en las plantas obtenidas vía bombardeo con micropartículas (Becker *et al.* 2000). La técnica también permitió revelar la fina estructura de los transgenes integrados: se observaron inserciones tanto correctas como truncadas, y se pudo identificar las plantas que contenían secuencias principales de los vectores (*vector backbone sequences*). En adición, las plantas transgénicas que representaban eventos idénticos de transformación se reconocían con facilidad. Finalmente, el análisis de las secuencias nucleótidas de los fragmentos APCR clonados confirmó completamente los descubrimientos descritos anteriormente (Pérez Hernández 2000).

#### Bibliografía

- Siebert P.D., A. Chenchik, D.E. Kellogg, K.A. Lukyanov & S.A. Lukyanov. 1995. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research* 23:1087-1088.
- Becker D.K., B. Dugdale., M.K. Smith, R.M. Harding & J.L. Dale. 2000. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv "Grand Nain" via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 19:229-234.
- Pérez Hernández J.B. 2000. Development and application of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation to increase fungus-resistance in banana (*Musa* spp.). PhD Thesis, Catholic University of Leuven, Belgium.

### Virus y promotores derivados de las plantas para la expresión de transgenes en banano

S.R. Hermann, B. Dugdale, O.K. Becker, R.M. Harding y J.L. Dale

Centre for Molecular Biotechnology, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane QLD 4001, Australia.

Las regiones de los promotores derivados de los componentes satélites (S1 y S2) del virus bunchy top de banano (BBTV) y los genes de actina de banano fueron aislados y caracterizados en las plantas transgénicas de banano. Los promotores S1 y S2 del BBTV dirigieron la expresión del gen reportero asociado con el tejido vascular tanto en dicotiledóneas como monocotiledóneas. En banano, la actividad de estos promotores aumentó significativamente al incluir los intrones derivados de las monocotiledóneas. Los genes actina candidatos y sus secuencias aso-

ciadas (*upstream*) de 5' fueron aislados de una variedad de fuentes vegetales, incluyendo bananos, utilizando un nuevo enfoque de PCR mediante ligación para amplificar las secuencias flanqueadoras. Los niveles de expresión y la especificidad de los tejidos de un gen actina particular de banano (ACT1) fueron caracterizados posteriormente. El análisis Northern sugirió que el ACT1 de banano se expresa tanto en los tejidos reproductores como vegetativos. En las plantas transgénicas de banano el promotor ACT1 dirigió una fuerte expresión del gen reportero en ambos niveles y en las raíces. Los truncamientos del promotor ACT1 indicaron que todos los elementos reguladores necesarios requeridos para un nivel alto (2 veces mayor que el CaMV 35S) cerca de la expresión constituyente están localizados dentro de 1.2 kb del ACT1 ATG.

### Mejores bananos: vía biotecnológica

P. Balint-Kurti, E. Firoozabady, Y. Moy, J. Mercier, R. Fong, L. Wong y N. Gutterson

DNAP (DNA Plant Technology Corporation), 6701 San Pablo Avenue, Oakland, Ca. 94608-1239, EEUU. Correo electrónico: balint-kurti@dnap.com

En la DNAP, nuestros esfuerzos con respecto al banano se enfocan en la resistencia a la Sigatoka negra, con énfasis en las etapas tempranas de desarrollo de la variedad sobre el entendimiento de las características de expresión de las señales de expresión del gen candidato. Utilizando constituyentes génicos quiméricos *uidA* para evaluar la función de promotor, hemos sido capaces de identificar varios promotores con una actividad relativamente fuerte en los tejidos de hojas, frutas y raíces. Estas actividades parecen mantenerse durante varias generaciones vegetativas en el campo. Dos de estos promotores también han sido utilizados en experimentos para demorar la maduración de la fruta inhibiendo la síntesis de etileno específico de la fruta utilizando supresión de percepción. Las plantas transgénicas han sido evaluadas en los ensayos de campo en Costa Rica y en el sur de México y varias líneas han mostrado tener retardos significativos en la maduración de la fruta durante múltiples generaciones. Mediante un diagnóstico con fragmentos básicos ~23 de ARN se identificó el fenómeno de silenciamiento de genes en estas líneas suprimidas.

Actualmente, las líneas transgénicas que expresan cinco genes putativos de resistencia a la enfermedad se encuentran bajo investigación de campo en Costa Rica. Los transformantes que también expresan 11 genes putativos de resistencia a la enfermedad o combinaciones de genes se encuentran en varias etapas de preparación. Asimismo estamos utilizando un ensayo con pedazos de hojas para evaluar algunas

plantas transgénicas en casa. Los síntomas producidos en este ensayo son similares a los que se observan en el campo en términos de apariencia, tiempo y especificidad del cultivar.

## Enfoques biotecnológicos hacia el mejoramiento de bananos

T.R. Ganapathi, P. Suprasanna, V.M. Kulkarni, Apratim Chakrabarti y V.A. Bapat

*Plant Cell Culture Technology Section, Nuclear Agriculture and Biotechnology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai 400 085, India.*

Los bananos y plátanos representan el cuarto cultivo alimentario en importancia y el alimento básico de millones de personas en el mundo en desarrollo. India es el productor bananero más grande del mundo. En este país, el banano es el segundo cultivo frutícola en importancia y se cultiva en 0.4 millones de ha con una producción de 10 millones de toneladas. El método convencional de mejoramiento es complicado debido a su naturaleza triploide y sólo unos pocos clones diploides producen polen viable. El mejoramiento para la resistencia a las enfermedades y productividad requiere el uso de las herramientas biotecnológicas. Nuestro grupo está comprometido con el cultivo de tejidos, embriogénesis somática, semillas sintéticas, mutagénesis y selección *in vitro*, impresión de huellas genéticas de ADN y transferencia de genes mediante *Agrobacterium*. Se conservaron y se propagaron *in vitro* treinta cultivares y especies silvestres. Las plantas provenientes de cultivos de tejidos sembradas en el campo en diferentes localidades exhibieron un aumento de rendimiento, maduración precoz y ciclo de producción más uniforme. Los cultivos *in vitro* fueron irradiados con rayos gamma y la evaluación en el campo de las poblaciones irradiadas dio como resultado ciertas variantes promisorias. Las variantes aisladas y cultivares progenitores se analizaron en el campo y a nivel molecular utilizando la técnica RAPD.

Se han desarrollado protocolos para la embriogénesis somática utilizando secciones de puntas apicales en el cv. Rasthali (AAB) y brotes de flores masculinas en el cv. Shrimanti (AAA). Los cultivos de células embriogénicas se establecieron con éxito y se mantuvieron mediante subcultivos regulares durante los últimos dos años (en Rasthali). Se ha logrado la conversión de alta frecuencia de embriones somáticos en plantas y las plantas derivadas de los embriones somáticos están siendo evaluadas en el campo.

Se ha normalizado la transformación mediante *Agrobacterium* utilizando cultivos de células embriogénicas del cv. Rasthali y actualmente se utiliza habitualmente para la transferencia de genes. Actualmente, estamos trabajando con un péptido antimicrobiano, msi99 (un homólogo sintético de Magainin). Los estudios han demos-

trado que este péptido inhibe eficazmente el crecimiento del *Fusarium oxysporum*, agente causal del marchitamiento por Fusarium. Rasthali, un cultivar altamente susceptible, ha sido transformado con el msi99 y se han regenerado plantas transgénicas.

## Propiedad intelectual y organismos modificados genéticamente

### Introducción del tema

#### D. Nicoll

*Centre for Law and Genetics, Law School, University of Tasmania, GPO Box 252-89, Hobart, Tas 7001, Australia.*

Probablemente, es justo decir que el patentado en nuestros días estará en la mente de todo el científico geneticista por varias razones, incluyendo:

1. La naturaleza cambiante de la ciencia académica, en particular, la necesidad de compromisos en términos económicos;
2. La naturaleza de la investigación biotecnológica: costosa, requiere de mucho tiempo y es fácil de ser copiada; y
3. El aumento del involucramiento del sector privado en la fase de investigación.

El tratado internacional más influyente sobre los derechos de propiedad intelectual (PI) es el Acuerdo sobre los aspectos de los derechos de propiedad intelectual relacionados con el comercio o ADPIC (*Agreement on Trade Related Aspects of Intellectual Property Rights, o TRIP*), que representa un anexo al Acuerdo sobre la OMC. Si un país desea tener comercio con otros países, debe tener una ley sobre la PI compatible con el TRIP. El Artículo 27 establece los siguientes requisitos para la patentación:

- 27.1: Las patentes son obligatorias para cualesquiera inventos en todas las áreas de la tecnología. Los elementos de novedad, el paso inventivo (no evidencia) y la aplicabilidad industrial (utilidad) deben estar satisfechos.
- 27.2: Los inventos pueden ser excluidos para prevenir la explotación comercial del invento con el fin de proteger el orden público o moralidad, incluyendo la protección de la vida o salud de los humanos, animales o plantas y evitando prejuicios serios para el ambiente.
- 27.3: Otros inventos que pueden ser excluidos, son los siguientes: a) métodos diagnósticos, terapéuticos y quirúrgicos para el tratamiento de seres humanos y animales; b) plantas y animales, pero no microorganismos; c) procesos biológicos para la producción de plantas y animales, pero no procesos técnicos. Las variedades de plantas deben ser protegidas de una manera u otra.

(Para el texto completo del Acuerdo, ver el sitio Web del WTO: [http://www.wto.org/spanish/tratop\\_s/trips\\_s/t\\_agm3c\\_s.htm](http://www.wto.org/spanish/tratop_s/trips_s/t_agm3c_s.htm))

La "patentabilidad" de los organismos vivos fue incierta previo a la decisión de la Corte Suprema de los EEUU en *Diamond v Chakrabarty* 447 US 303 (1980). La Corte decidió que los organismos vivos podrían ser patentados por una pequeña mayoría (5 a 4). Si la decisión hubiera tomado otra vía, esto podría llevar a una disminución en inversiones en la industria biotecnológica.

Las leyes en este respecto en EEUU y Europa indican que las limitaciones para la patentación de los inventos biotecnológicos aún no están definidas completamente.

1. Las Cortes han interpretado la legislación sobre las patentes para incluir los organismos vivos.
2. Los argumentos de orden público o moralidad probablemente tendrán éxito en los casos más extremos.
3. Las Cortes de los EEUU están tratando de resolver algunos de los tópicos asociados con amplios reclamos de patentes.

El Artículo 27 del TRIP permite a los países miembros alguna flexibilidad para decidir que tipos de inventos biotecnológicos pueden ser patentados. De esta manera, junto con las interpretaciones variadas de la legislación nacional referente a la PI por parte de las cortes nacionales, este artículo permite a los países individuales algún respiro para que concedan el nivel de protección de la PI que ellos consideren aceptable, en el marco de sus propias normas culturales, morales y legales (aparte de las barreras comerciales).

Las instituciones y los programas globales, como INIBAP y PROMUSA, tienen un importante papel que desempeñar en el manejo de la PI. En particular, ellos tienen la capacidad para influenciar las decisiones sobre la adquisición de material que puede ser utilizado para crear inventos que pueden ser patentados y la transferencia de tecnología utilizando este material.

## Fitopatología y resistencia a las enfermedades

### Biología molecular del virus bunchy top de banano

R.M. Harding, B. Dugdale, G.J. Hafner, C.L. Horser\*, R. Wanitchakorn y J.L. Dale

*Centre for Molecular Biotechnology, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane QLD 4001, Australia.*  
(\* Dirección actual: CSIRO Plant Industry, Canberra, ACT, 2601, Australia).

La enfermedad bunchy top del banano, causada por el nanovirus bunchy top del banano (BBTV), se considera la enfermedad viral más importante que afecta a los bananos. Esta enfermedad se encuentra en casi todas las regiones productoras de banano del mundo, exceptuando el Caribe y América Latina. En 1920, el bunchy top ha sido el principal factor limitador para la produc-

ción bananera en Australia. Desde entonces la enfermedad fue controlada en Australia a través de la implementación de estrictas medidas de control fitosanitario respaldadas por una estricta legislación gubernamental. Nuestro grupo ha estado caracterizando este virus durante los últimos 10 años en un esfuerzo por desarrollar resistencia transgénica al virus y beneficiarse de él posteriormente.

Inicialmente se pensó que el BBTV fue causado por un luteovirus, basándose en los síntomas, transmisión persistente por los áfidos y perfiles de dsARN. Sin embargo, actualmente se sabe que el BBTV es un virus isométrico con un genoma que comprende al menos seis diferentes componentes de ADN monocatenario circular (BBTV ADN-1 a -6) que varían en su tamaño de 1018 a 1111 nucleótidos. Cada componente de ADN comparte una organización genómica común incluyendo (i) un gen principal en el sentido de virión (con excepción del ADN-1 que contiene dos genes) con una señal asociada de poliadenilación, (ii) una región principal común conservada (CR-M) y una región tallo - bucle (CR-SL) y (iii) una secuencia TATA potencial localizada en 3' del tallo - bucle. El CR-M está localizado a 5' del CR-SL y mide aproximadamente 92 nt con al menos 72% de homología entre los componentes de ADN (con excepción del ADN-1, que tiene una delección de 26 nt). Se cree que la CR-M está involucrada en la replicación, donde actúa como un sitio de unión para un iniciador endógeno de ~80 nt ADN. La CR-SL de 69 nt con una homología entre los componentes de al menos 62%. La misma incorpora una estructura tallo - bucle que contiene un tallo de 10 bp (14 nt conservados) y un bucle de 11 nt (9 nt conservados). Basándose en el análisis secuencial de ADN -1, -3 y -5, existen dos grupos distintos de aislamientos de BBTV, el grupo del Pacífico Sur (Australia, Burundi, Egipto, Fiji, India, Tonga y Samoa) y el grupo asiático (Filipinas, Taiwan, Vietnam). Estos dos grupos difieren en aproximadamente 10% con respecto a la secuencia nucleotídica total y en aproximadamente 30% dentro de la CR-M.

El principal gen del ADN -1 contiene motivos asociados con la replicación del círculo rodante y la unión de dNTP y codifica una proteína de iniciación de replicación (Rep). Esta proteína Rep mostró poseer la actividad de la endonucleasa ajustadora y ligasa específica del sitio (fragmenta entre 7 y 8 nt del tallo - bucle). Actualmente se desconoce la función del gen interno del ADN-1. El ADN-3 codifica la envoltura proteica, mientras que producto génico de ADN-5 mostró poseer una actividad de unión con retinoblastoma y se considera como una proteína de ciclo celular responsable por la desviación de las células infectadas en la fase S para facilitar la replicación del virus. El ADN-4

y -6 parecen codificar proteínas asociadas con el movimiento de célula a célula y movimiento nuclear, respectivamente. La función de ADN-2 sigue sin aclarar.

Recientemente, el BBTV ha sido clasificado en el género *Nanovirus*, género de virus con viriones isométricos limitados al floema y que poseen un genoma de ADN monocatenario circular con componentes múltiples. Entre otros miembros de este género se encuentran el virus de estancamiento subterráneo del trébol (SCSV), el virus de amarilleo necrótico de faba (FBNYV), el virus de enanismo de arveja lechosa (MDV) y posiblemente el virus de la caída foliar del cocotero (CFDV).

Los ADN-1 a -6 del BBTV se consideran integrantes del genoma del BBTV, ya que estos componentes están asociados consistentemente con todas las infecciones con el BBTV en todo el mundo. Varios componentes adicionales de ADN asociados con el BBTV también han sido aislados de varias infecciones con el BBTV. Como el ADN-1 del BBTV, estos componentes adicionales parecen codificar las proteínas Rep. Sin embargo, ellos difieren del ADN-1 del BBTV en varios aspectos, incluyendo:

- Organización genómica - en general, la CR-M y la CR-SL están ausentes y la secuencia TATA está localizada a 5' del tallo - bucle; y
- Ellos tienen una distribución geográfica limitada, están restringidos casi exclusivamente al grupo asiático del BBTV.

Hemos estado examinando la replicación del BBTV para determinar (i) los componentes integrantes del genoma del BBTV, (ii) cual de los componentes codifica la proteína Rep "maestra" y (iii) el papel del gen interno de ADN-1 del BBTV. Estos estudios incluían el bombardeo de las suspensiones de células embriogénicas de Bluggoe con "1.1mers" clonados de diferentes componentes de ADN del BBTV individualmente o en combinación. El ADN se extrajo de las células 0, 4 y 8 días después del bombardeo y se analizó con sondas específicas de los componentes para los intermediarios replicativos. Estos estudios han mostrado que el ADN -1 codifica la proteína viral Rep "maestra" y representa la unidad replicativa mínima del BBTV, ya que este componente, y no los componentes adicionales que codifican Rep, son capaces de autoreplicación así como de dirigir la replicación de otros componentes genómicos integrantes del BBTV. También hemos mostrado que el gen interno del ADN -1 no es esencial para la replicación pero mejora la replicación en *cis* (posiblemente de manera análoga que la proteína REn de los begomovirus). Finalmente, hemos identificado los sitios de unión de Rep potenciales (iterones) del genoma del BBTV que parecen ser similares a los de los begomovirus. Los resultados de este estudio sugieren la posibilidad de dos grupos de nanovirus: (i) BBTV, que

infecta las monocotiledóneas y contiene un gen interno en la proteína Rep "maestra" Rep y (ii) FBNYV, MDV y SCSV, todos ellos infectan las dicotiledóneas y no poseen un gen interno en la Rep "maestra".

## Epidemiología del virus bunchy top del banano en Vietnam

K. Bell<sup>1</sup>, P.A. Revill<sup>2</sup>, H.V. Cuong<sup>3</sup>, V.T. Man<sup>3</sup> y J.L. Dale<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Seowon Building, 4th Floor, 57 Garak-Dong, Songpa-Gu, Seoul, Korea del Sur 138-160; <sup>2</sup>Centre for Molecular Biotechnology, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane QLD 4001, Australia; <sup>3</sup>Department of Plant Pathology, Hanoi Agricultural University, Gia Lam, Hanoi, Vietnam.

El virus bunchy top del banano (BBTV) causa la enfermedad viral más seria de los bananos en todo el mundo. La enfermedad bunchy top del banano casi destruyó la industria bananera en Australia a principios de la década de los años 20, y epidemias similares ocurrieron en otros países en todo el mundo. El BBTV fue identificado por primera vez en Vietnam en 1968, y es endémico en todo el país. Sin embargo, la epidemiología del BBTV en Vietnam parece ser totalmente diferente que en otros países, ya que no causa epidemias serias y parece moverse con mayor lentitud a través de un cultivo. El BBTV se transmite por el áfido *Pentalonia nigronervosa* o a través de los retoños y cormos infectados, y típicamente se mueve con rapidez a través del cultivo. Sin embargo, en Vietnam no es inusual encontrar plantas más viejas infectadas con el BBTV adyacentes a las plantas sanas, y los áfidos de banano se alimentan de todas las plantas. En adición, no hemos observado síntomas típicos del BBTV en el cultivar local Chuoi tay. Se desconoce si el Chuoi tay es un hospedante para el BBTV, o si es resistente a la infección con el BBTV. Para mejorar nuestro entendimiento de la epidemiología del BBTV en Vietnam, hemos investigado varios factores: (1) Investigamos el nivel de la variabilidad secuencial del ADN-1, el componente maestro que codifica rep, y demostramos que la variabilidad secuencial del BBTV en Vietnam es la más alta de todas las registradas anteriormente en Asia. También hemos observado que las secuencias se separaron en aislados vietnamitas del norte y del sur, dependiendo de su origen en Vietnam; (2) Identificamos un componente putativo de ADN satélite endémico a Vietnam. Finalmente, criamos las plantas de Chuoi tay de todo Vietnam para detectar la presencia del BBTV, pero no detectamos el virus en ninguna de las plantas utilizando el PCR e hibridación Southern. Esto sugiere que el Chuoi tay puede ser resistente al BBTV en Vietnam, lo que podría representar uno de los factores que influyen sobre la epidemiología de la enfermedad bunchy top del banano en Vietnam.

## Virus y germoplasma de *Musa*

J.E. Thomas, C.F. Gambley, A.D.W. Geering, L.A. McMichael, J.N. Parry y M. Sharman

Queensland Horticulture Institute, Department of Primary Industries, 80 Meiers Road, Indooroopilly, QLD 4068, Australia.

Las especies de *Musa* importantes desde el punto de vista comercial incluyen bananos y plátanos en su mayoría híbridos de *M. acuminata* y/o *M. balbisiana* y un cultivo de fibra *Musa textilis*. Hasta la fecha se han caracterizado seis virus que afectan a *Musa* (Jones 2000), pero también se reconocen virus no caracterizados.

El virus bunchy top de banano (BBTV) tiene viriones isométricos de 18-20 nm y un genoma multicomponente de ssADN. Se transmite de manera persistente por el áfido de banano *Pentalonia nigronervosa* y se tiene una distribución dispersa en África y la región de Asia y el Pacífico. El virus del mosaico del pepino (CMV) tiene viriones isométricos de 29 nm y un genoma tripartita de ssARN. Se transmite de manera no persistente por varias especies de áfidos y tiene una amplia distribución internacional. El virus del mosaico de las brácteas (BBRMV) y el virus del mosaico del Abaca (AbaMV) tienen viriones filamentosos, un genoma de ssARN y se transmiten de manera no persistente por varias especies de áfidos. El AbaMV sólo se ha registrado en Filipinas, mientras que el BBRMV tiene una distribución dispersa en la región de Asia y el Pacífico. El virus del rayado del banano (BSV) tiene viriones baciliformes (30 x 130 nm) que contienen un genoma de dsADN y tiene una amplia distribución en todo el mundo.

Los viriones filamentosos del virus suave del mosaico de banano (BanMMV) contiene un genoma de ssARN de 7353 nt, que codifica cinco ORF. Aunque relacionado con los carlavirus, foveavirus y potexvirus, la organización genómica y las relaciones filogenéticas del BanMMV lo colocan aparte de todos los taxa virales descritos anteriormente (Gambley y Thomas, *in press*). Este virus ocurre en un amplio rango de genotipos de *Musa* y tiene una amplia distribución mundial. A menudo el virus ocurre como infecciones asintomáticas y mixtas con otros virus, aunque su modo de transmisión se desconoce. Su impacto económico también se desconoce.

Se dispone de los ensayos de diagnóstico serológicos y basados en PCR para todos los virus caracterizados de *Musa*, pero el BSV aún presenta retos. En el caso del BSV, los síntomas pueden ser prominentes, pero ocurren esporádicamente. Una considerable diversidad de secuencias ha sido encontrada en el BSV, y cinco de estos aislados (BSV-OL, BSV-Mys, BSV-GF, BSV-IM y BSV-Lac) probablemente son suficientemente distintos para ser considerados como virus separados (Geering *et al.* 2000, A.D.W.

Geering, N.E. Olszewski, B.E.L. Lockhart y J.E. Thomas, sin publicar). Es necesario realizar ensayos de inmunocaptura (IC) para diferenciar secuencias episomales e integradas del BSV. Se ha desarrollado la prueba IC-PCR con detección en microplatos para todos los virus caracterizados de banano. Se ha publicado sobre un ensayo multiplex para el BBRMV, BBTB y CMV (Sharman *et al.* 2000). También se han desarrollado ensayos para el BanMMV y todas las cepas conocidas del BSV (multiplex) (M. Sharman, A.D.W. Geering, J.N. Parry y J.E. Thomas, sin publicar). Estos ensayos se utilizan en conjunto con ELISA e ISEM para la indización habitual de los virus.

Todos los virus de *Musa* se transmiten a través de propágulos vegetativos, incluyendo las plántulas *in vitro*, y este hecho tiene implicaciones para la salud del material de plantación, que sirve de conducto para los programas de mejoramiento y transformación y la transferencia de germoplasma. El material de plantación es el principal factor para el control en el campo de estos patógenos y, además, varios de estos virus tienen distribución limitada. Pocos estudios han sido realizados sobre la transmisión de los virus de banano a través de los cultivos de tejidos. Varios estudios han mostrado que a través de un subcultivo normal, surge una proporción de meristemas libres de virus de los clones infectados inicialmente con el BBTB. Este proceso parece acelerarse de alguna manera a temperaturas elevadas, y las plantas derivadas de estos meristemas siguen estando libres de virus (Thomas *et al.* 1995, y otras referencias en este trabajo). Recientemente, ocurrió una situación inversa con el BSV. Las infecciones virales fueron detectadas en la progenie de los híbridos procedentes de los programas de mejoramiento, donde no existía evidencia de infección viral en líneas parentales. Esto fue posiblemente debido a la "activación" o "liberación" de las secuencias del BSV que están integradas en el genoma de *Musa* (Hull *et al.* 2000). Evidencias recientes sugieren que varias sepas adicionales del BSV pueden estar integradas en diferentes componentes del genoma de los híbridos de *Musa* (A.D.W. Geering, N.E. Olszewski, B.E.L. Lockhart y J.E. Thomas, sin publicar).

El Centro de Tránsito de INIBAP en la Universidad Católica de Lovaina alberga la colección de germoplasma *in vitro* de *Musa* más grande del mundo que comprende más de 1100 accesiones. Estas accesiones están siendo indizadas para detectar la presencia de virus en tres Centros internacionales de indización de virus (CIRAD, Montpellier, PPRI, Pretoria y QDPI, Brisbane), y sólo se liberan las accesiones con reacción negativa para los virus conocidos. El BanMMV y BSV son los virus detectados con mayor frecuencia, probablemente debido a frecuentes infecciones latentes, y al factor adicional

de integración del BSV. El BBTB y BBRMV no han sido detectados en la colección.

### Bibliografía

- Gambley C.F. & J.E. Thomas. 2001. Molecular characterisation of Banana mild mosaic virus, a new filamentous virus in *Musa* spp. Archives of Virology (*en imprenta*).
- Geering A.D.W., L.A. McMichael, R.G. Dietzgen & J.E. Thomas. 2000. Genetic diversity among Banana streak virus isolates from Australia. *Phytopathology* 90:921-927.
- Hull R., G. Harper & B. Lockhart. 2000. Viral sequences integrated into plant genomes. *Trends in Plant Science* 5(9):362-365.
- Jones D.R. (ed.) 2000. Diseases caused by viruses. Pp. 241-293 in *Diseases of banana, abaca and enset*. CABI Publishing, Wallingford, UK/New York, USA.
- Sharman M., J.E. Thomas & R.G. Dietzgen. 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. *Journal of Virological Methods* 89:75-88.
- Thomas J.E., M.K. Smith, Kessling, A.F. & S.D. Hamill. 1995. Inconsistent transmission of banana bunchy top virus in micropropagated bananas and its implication for germplasm screening. *Australian Journal of Agricultural Research* 46:663-671.

### Eliminación de las enfermedades virales del banano y plátano (*Musa* spp.) mediante crioconservación

B. Helliot<sup>1</sup>, B. Panis<sup>2</sup>, A. Locicero<sup>1</sup>, K. Reyniers<sup>2</sup>, R. Swennen<sup>2</sup> y P. Lepoivre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plant Pathology Unit, Gembloux Agricultural University, 5030 Gembloux, Bélgica. Correo electrónico: helliot.b@fsagx.ac.be;

<sup>2</sup>Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven, 3001 Leuven, Bélgica.

La crioconservación se está convirtiendo en una técnica *in vitro* habitual que supera serias limitaciones con las cuales se encuentran las estrategias tradicionales de conservación de germoplasma utilizadas en las colecciones de campo, de semillas y de cultivos *in vitro*. La conservación a temperaturas ultra bajas, usualmente a -196°C que es la temperatura del nitrógeno líquido, permite un almacenamiento de los recursos fitogenéticos a largo plazo y libre de contaminación. Recientemente, Brison y colaboradores (1997) han demostrado que la crioconservación podría ser utilizada, en adición a la conservación de germoplasma, para eliminar los virus de los brotes de ciruelo *in vitro* infectados con el virus de viruela del ciruelo con una tasa de erradicación de hasta 50%. La posibilidad de aplicar un tratamiento corto de crioconservación (durante pocas horas) en vez de uno prolongado (durante algunas semanas) tratamiento con calor sería muy promisorio.

Hemos informado previamente sobre la crioconservación exitosa de meristemas en proliferación de diferentes accesiones de banano, uno de los productos básicos más importantes del mundo (Panis *et al.* 2000). Los bananos, que pertenecen al género *Musa*, se encuentran en más de 120 países, principalmente tropicales y

subtropicales, de los cinco continentes y proporcionan el sustento a millones de personas. Sin embargo, las plantas de banano están amenazadas por diferentes agentes bióticos como bacterias, hongos o virus, como el virus del mosaico del pepino (CMV), virus bunchy top del banano (BBTV), virus del rayado del banano (BSV), virus del mosaico de las brácteas del banano (BBRMV) y virus suave del mosaico del banano (BaMMV).

En el marco de un proyecto de INIBAP titulado "Desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* para la eliminación de las enfermedades virales de banano y plátano (*Musa spp.*)", hemos intentado evaluar el efecto de crioterapia sobre el estado sanitario del material de plantación en comparación con los métodos tradicionales como el cultivo de meristemas. Para este propósito, se realizó la crioconservación de los agregados meristemáticos extraídos de los cultivos de meristemas altamente proliferantes mediante un procedimiento de vitrificación utilizando la solución PVS-2 (Sakai *et al.* 1990).

Nuestros resultados muestran que las tasas de erradicación después de la crioconservación de meristemas altamente proliferantes alcanza hasta 39% (32 plantas de 83 plantas examinadas) y 94% (31 plantas de 33 plantas examinadas) para el CMV y BSV respectivamente. Para los efectos de comparación, las tasas de erradicación obtenidas mediante el cultivo de meristemas extraídas de los meristemas altamente proliferantes alcanzaron el 11% y el 63% para el CMV y BSV respectivamente.

El estudio superestructural de los meristemas altamente proliferantes realizado después de 1 semana del cultivo *in vitro* después de crioconservación, mostró que la crioterapia actúa como un escalpelo microscópico. Pequeñas áreas de células vivas localizadas en el domo meristemático y en la base de la primordia sobreviven al procedimiento de crioconservación, mientras que las células más diferenciadas, alejadas del domo apical, se mueren. Este hecho, asociado con una distribución desigual de partículas virales en el meristema, podría explicar la eficacia de la crioconservación. Actualmente, estamos investigando la localización específica de las partículas virales dentro del meristema. Esperamos obtener un mejor entendimiento de las variaciones en las tasas de erradicación observadas de acuerdo al tipo de virus y de acuerdo al método de terapia.

#### Bibliografía

- Brison M., M.T. de Boucaud, A. Pierronnet & F. Dosba. 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a *cv Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. *Plant Science* 123(1-2):189-196.
- Panis B., H. Schoofs, N.T. Thin & R. Swennen. 2000. Cryopreservation of proliferating meristem cultures of banana. Pp. 238-243 in *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress*

and applications (F. Engelmann & H. Takagi, eds.). Japanese International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

- Sakai A., S. Kobayashi & I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9:30-33.

### Una prueba de diagnóstico basada en ADN para la raza 4 'tropical' del marchitamiento por *Fusarium* de banano

S. Bentley, N. Moore, J. Pattemore, J. Anderson y K. Pegg

CRCTPP (Cooperative Research Center for Tropical Plant Pathology), University of Queensland, Level 5, John Hines Bldg St Lucia, Brisbane QLD 4072, Australia.

El marchitamiento por *Fusarium* del banano es un problema significativo para la industria bananera australiana. El hongo, que causa la enfermedad *F. oxysporum* f.sp. *ubense* (*Foc*), es un patógeno altamente diverso. Actualmente, en Australia se ha encontrado sólo una porción limitada de toda la diversidad global del *Foc*. Se han identificado treinta y tres diferentes grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) y genotipos de *Foc* a escala global, de los cuales nueve ocurren en Australia. Casi toda la diversidad dentro del *Foc* ha sido identificada en Asia, y nuestra proximidad al Sudeste asiático presenta un considerable riesgo de introducción de nuevas cepas de *Foc*, y particularmente considerables serían las introducciones de la cepa 'tropical' de la raza 4 que afecta a los bananos Cavendish. La raza 4 'tropical' está muy diseminada en Indonesia y Malasia, y recientemente fue detectada en Irian Jaya. Varias epidemias de la cepa 'tropical' de la raza 4 del marchitamiento por *Fusarium* ya han estallado en el Territorio Norte, y hasta la fecha estas epidemias han sido contenidas por medidas cuarentenarias. Esta cepa del marchitamiento por *Fusarium* presenta una amenaza a las principales áreas de producción de Cavendish en el norte de Queensland, las cuales actualmente están libres de todas las razas de este patógeno los cuales afectan a los bananos Cavendish.

Actualmente, estamos desarrollando una prueba de diagnóstico basada en ADN, específica para la cepa 'tropical' de la raza 4 del *Foc*. Hemos analizado minuciosamente la diversidad genética dentro del *Foc* desde el género, hasta los niveles de taxones específicos de la cepa, utilizando métodos de impresión total de huellas genéticas como la impresión de huellas genéticas de ADN mediante amplificación (*DNA Amplification Fingerprinting*, DAF), otros métodos basados en PCR como el polimorfismo por restricción de longitud de fragmentos (RFLP) y el análisis secuencial del ADN ribosomal, (r) ADN. Hemos identificado la información sobre las se-

cuencias de ADN que es única para la cepa 'tropical' de la raza 4 del *Foc* e iniciadores de PCR designados que amplifican específicamente el ADN sólo de la cepa 'tropical' de la raza 4. Las búsquedas en las bases de datos de la información sobre las secuencias de ADN publicada en *Genbank*, han indicado que no existen coincidencias para estos iniciadores con cualquier otro organismo, pero actualmente estamos completando el cribado de la especificidad de estos iniciadores en laboratorio. Luego, adaptaremos nuestras condiciones PCR de laboratorio para la amplificación del ADN del *Foc* directamente de las plantas infectadas y suelo infestado. Luego, la prueba de diagnóstico tendrá que ser validada y examinada en el campo antes de liberarla para su uso en la industria y por laboratorios comerciales.

También estamos desarrollando un sistema de identificación basado en ADN que permitirá la caracterización precisa de todas las cepas del *Foc* que se encuentran en Australia. Este sistema de diagnóstico permitirá la detección e identificación del *Foc* directamente del material de plantación y suelo. Este sistema será útil para cribar los campos con respecto a la presencia de las razas del *Foc* antes de realizar la siembra, cribar los rizomas o retoños que se utilizan como material de plantación, identificar los aislados del *Foc* de los tejidos de las plantas infectadas o suelo infestado, y también será útil para los investigadores en sus estudios de la biología y ecología del *Foc*.

### Aislamiento de genes potenciales de resistencia a las enfermedades a partir del banano

K.M. Taylor, J.A. McMahon, R.M. Harding y J.L. Dale

Centre for Molecular Biotechnology, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane QLD 4001, Australia. Correo electrónico: K0.taylor@gut.edu.au

Los bananos son susceptibles a un amplio rango de enfermedades, de las cuales el marchitamiento por *Fusarium* y las Sigatocas negra y amarilla son los más devastadores. Aunque la mayoría de los bananos de postre cultivados a escala comercial son susceptibles a estos patógenos fúngicos, se identificó resistencia en los cultivares silvestres de banano. Un nuevo enfoque en la identificación de genes de resistencia (genes R) que confieren estas características de resistencia, consiste en amplificar el ADN genómico del banano utilizando iniciadores degenerados designados a los genes R clase 3. Este enfoque fue utilizado con éxito en lechuga, frijol de soya, arroz y maíz, pero hasta ahora no se han publicado candidatos de genes R (CGR) de banano.

Hemos usado iniciadores degenerados para amplificar cinco secuencias CGR independien-

tes de banano, cada una de las cuales muestra homología con los genes R caracterizados anteriormente. Las cinco secuencias fueron aisladas tanto de los cultivares resistentes, como de cultivares susceptibles con pocas copias. En adición, todas las cinco secuencias fueron amplificadas del ARN, lo que indica que ellas fueron transcritas. Cuando se compararon las secuencias de ADN y ARN de los cultivares resistentes y susceptibles, se observó variabilidad entre las cinco secuencias CGR (<53% de homología) y dentro de cada CGR (97-100% de homología). La amplificación de las secuencias CGR flanqueadoras reveló un dominio de 5' de cremallera de leucinas y un dominio de 3' de repeticiones ricas en leucinas, que son consistentes con los genes R clase 3.

### Los promotores del virus del rayado del banano son altamente activos en los bananos transgénicos y en otras plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas

T. Remans<sup>1</sup>, L. Sáji<sup>4</sup>, A.R. Elliott<sup>5</sup>, R.G. Dietzgen<sup>3</sup>, R. Swennen<sup>4</sup>, P. Ebert<sup>1</sup>, C.P.L. Grof<sup>5</sup>, J.M. Manners<sup>2,5</sup> y P.M. Schenk<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, The University of Queensland, Brisbane QLD 4072 Australia; <sup>2</sup>CRCTPP (Cooperative Research Center for Tropical Plant Pathology), University of Queensland, Level 5, John Hines Bldg St Lucia, Brisbane QLD 4072, Australia; <sup>3</sup>QDPI, Queensland Agricultural Biotechnology Centre, The University of Queensland, St. Lucia, QLD 4072, Australia; <sup>4</sup>Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium; <sup>5</sup>CSIRO Plant Industries, Long Pocket Laboratories, 120 Meiers Road, Indooroopilly, QLD 4068, Australia. Correo electrónico: remans@biosci.uq.edu.au

La ingeniería fitogenética ha demostrado ser un método útil para la introducción de nuevas características deseables que se reflejan en fenotipos alterados, por ejemplo, resistencia mejorada a las enfermedades. Las secuencias reguladoras o promotores son necesarios para llevar la expresión eficaz en el gen introducido en las plantas transgénicas. Los promotores virales, como el promotor 35S del virus del mosaico de coliflor, CaMV (Kay *et al.* 1987) han sido frecuentemente utilizados para la expresión constituyente de los transgenes en muchos cultivos. Para obtener promotores fuertes adecuados para una expresión génica de alto nivel en el banano transgénico, hemos analizado tres nuevas secuencias de promotores obtenidas de los aislados australianos del badnavirus del rayado del banano (BSV). Estas secuencias fueron evaluadas en diversos ensayos de transformación transitoria y estable utilizando genes reporteros que codifican proteínas fluorescentes verdes (GFP) y enzimas reporteros de b-glucuronidasa (GUS) (Schenk *et al.* 2001). En estos experimentos, se analizaron los fragmentos de ADN de 1322 bp (Cv), 2105 bp (My) y 1297 bp (Go) que rodean el sitio de iniciación de transcripción de los aisla-

dos del BSV obtenidos de los cultivares Caven-dish, Mysore y Goldfinger (Geering *et al.* 2000) con respecto a su actividad de transcripción y promotora.

Utilizando ensayos de expresión transitoria, los fragmentos de Cv, My y Go mostraron tener actividad promotora en un amplio rango de especies de plantas incluyendo las monocotiledóneas (banano, maíz, cebada, mijo, sorgo), dicotiledóneas (tabaco, canola, girasol, *Nicotiana benthamiana*, árbol tipu), gimnosperma (*Pinus radiata*) y helecho (*Nephrolepis cordifolia*) (Tabla 1).

La actividad de la enzima reportero GUS fue analizada en las plantas transgénicas de banano cultivadas *in vitro* (cultivar Three Hand Planty) transformadas con los constituyentes de promotores de Cv o My. Secciones longitudinales y transversales de las raíces, cormos, pseudotallos y hojas revelaron un manchado azul en todos los tipos de células analizados (para ver fotografías a color, visite: <http://www.uq.edu.au/~uqtreman>). La expresión más fuerte fue observada en el tejido vascular y del cormo. En las raíces, se observó una alta intensidad de manchado en el tejido vascular y en el de las raíces laterales emergentes. Los niveles de actividad cuantitativa del GUS para las plantas que contienen constituyentes promotores de My fueron más altos en los tejidos de hojas, raíces y cormo en comparación con las plantas que albergaron los constituyentes promotores de ubiquitina de maíz (Tabla 1). En las plantas de banano cultivadas en el invernadero, el promotor My mostró actividades más altas que los promo-

tores de la ubiquitina de maíz y del virus del mosaico de coliflor 35S (Tabla 1). El promotor Cv mostró actividades similares (raíz y cormo) o superiores que (hoja) las del promotor de ubiquitina de maíz en las plantas de banano cultivadas *in vitro*, pero las cuales se redujeron significativamente en las plantas cultivadas en el invernadero más grandes (Tabla 1). Esto puede estar relacionado con la silenciamiento asociada con la secuencia integrada del BSV (Ndowora *et al.* 1999, Harper *et al.* 1999) en las plantas de Three Hand Planty (genoma AAB). Como la secuencia integrada del BSV se considera estar asociada con el genoma B, sería interesante observar si el promotor Cv está más activo en las plantas de banano de tipo AAA.

Los niveles de GFP en hojas y tallos de las plantas transgénicas de la caña de azúcar, que alberga una fusión del promotor Cv y el gen GFP, fueron cuantificados fluorométricamente (Remans *et al.* 1999) y resultaron ser comparables con los niveles de GFP en las plantas que albergan un constituyente promotor de ubiquitina de maíz (Tabla 1). La expresión del Cv y del promotor de ubiquitina de maíz también permaneció alta en los retoños de la caña de azúcar. El promotor My fue activo en las plantas jóvenes, pero la expresión GFP no se observó en las plantas maduras. Una fuerte actividad del promotor Go fue observada en los callos de la caña de azúcar transgénica, pero no se detectó la expresión GFP en los retoños regenerados. Los promotores Cv y My también estuvieron activos en las plantas transgénicas de tabaco cultivadas *in*

**Tabla 1. Revisión de las actividades de promotores BSV Cv, My y Go en comparación con los promotores CaMV 35S y de ubiquitina de maíz en diferentes especies de plantas. Valores que representan la planta con la expresión más alta: actividad enzimática GUS (MU) en nmol MU/h/mg de proteína y acumulación de GFP en mg GFP/mg de proteína.**

	Cv	My	Go	CaMV 35S	Ubiquitina de maíz
<b>Plantas transgénicas</b>					
Banano (hoja <i>in vitro</i> )	1076 MU	6299 MU	ne	ne	214 MU
Banano (raíz+cormo <i>in vitro</i> )	2502 MU	10650 MU	ne	ne	2571 MU
Banano (hoja en invernadero)	0 MU	1658 MU	ne	430 MU	418 MU
Caña de azúcar (hoja <i>in vitro</i> )	13.1 GFP	< 0.05 GFP	ne	ne	11.6 GFP
Caña de azúcar (tallos en invernadero)	5.57 GFP	ne	ne	ne	0.80 GFP
Tabaco (hoja <i>in vitro</i> )	0.68 GFP	1.35 GFP	ne	1.68 GFP	ne
Tabaco (hoja en invernadero)	< 0.06 GFP	< 0.06 GFP	ne	0.29 GFP	ne
<b>Ensayos transitorios</b>					
Maíz (dulce)	+++	+++	+++	+	+++
Cebada	+++	+++	ne	+	ne
Banano	+++	+++	ne	ne	ne
Mijo	+++	+++	ne	ne	+++
Sorgo	+++	+++	ne	+	+++
Canola	++	++	++	+++	ne
Tabaco	++	++	ne	+++	ne
Girasol	++	++	ne	+++	ne
N. benthamiana	++	++	ne	+++	ne
Tipu	+++	+++	ne	+++	ne
Pino	++	++	ne	++	ne
Helecho Fishbone	++	++	ne	++	ne

ne = no examinado, +++ = actividad fuerte, ++ = expresión de fuerte a moderada, + = expresión de moderada a débil.



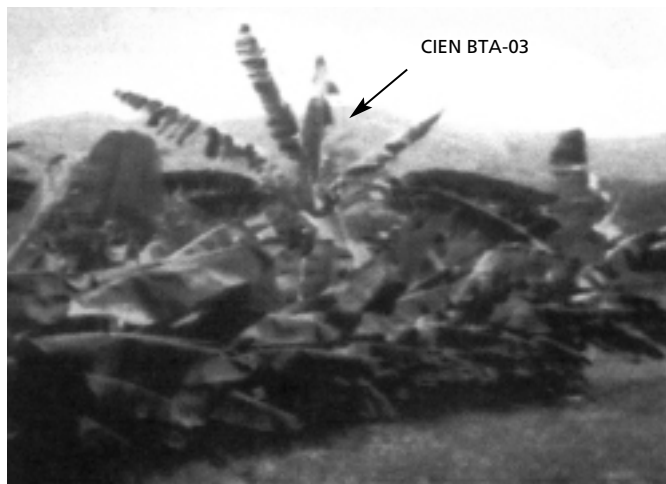


Figura 1. Variante somaclonal CIEN BTA-03.

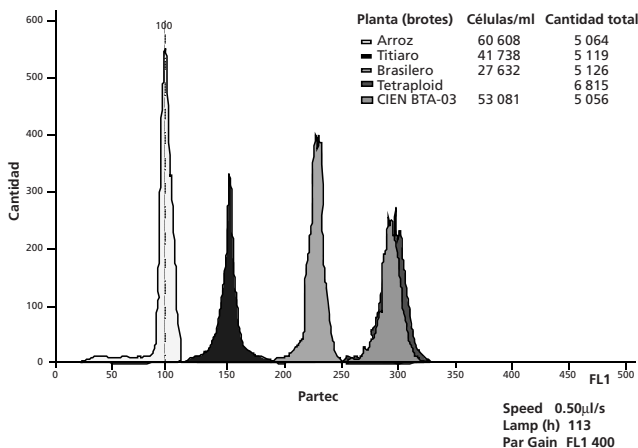


Figura 2. Análisis mediante citometría de flujo de cuatro clones de banana.

*in vitro*, pero esta actividad fue perdida cuando estas plantas alcanzaron la etapa adulta en el invernadero (Tabla 1).

Los promotores del virus del rayado del banana representan herramientas útiles para la expresión de alto nivel de genes foráneos en plantas transgénicas tanto monocotiledóneas, como dicotiledóneas, que podrían ser utilizados de manera intercambiable con los promotores CaMV 35S o de ubiquitina de maíz.

#### Bibliografía

Geering A.D.W., L.A. McMichael, R.G. Dietzgen & J.E. Thomas. 2000. Genetic diversity among Banana streak virus isolates from Australia. *Phytopathology* 90:921-927.

Harper G., J.O. Osuji, J.S. Heslop-Harrison & R. Hull. 1999. Integration of banana streak badnavirus into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255:207-213.

Kay R., A. Chan, M. Daly & J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236:1299-1302.

Ndowora T., G. Dahal, D. LaFleur, G. Harper, R. Hull, N.E. Olszewski & B. Lockhart. 1999. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 255:214-220.

Remans T., P.M. Schenk, J.M. Manners, C.P.L. Grof & A.R. Elliott. 1999. A protocol for the fluorometric quantification of mGFP5-ER and sGFP(S65T) in transgenic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 17(4):385-395.

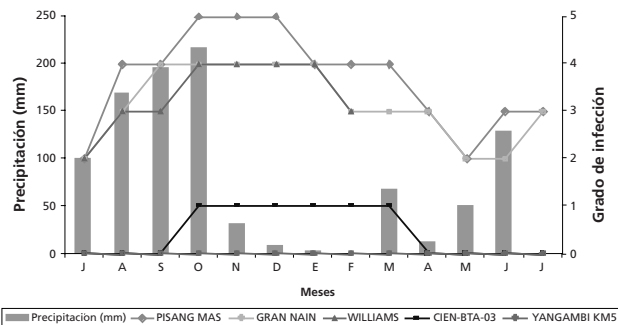
Schenk P.M., T. Remans, L. Sági, A.R. Elliott, R.G. Dietzgen, R. Swennen, P. Ebert, C.P.L. Grof & J.M. Manners. 2001. Promoters for pregenomic RNA of banana streak badnavirus are active for transgene expression in monocot and dicot plants. *Plant Molecular Biology (sometido)*.

#### “CIEN BTA-03”, una nueva variante somaclonal resistente a la Sigatoka amarilla: caracterización bioquímica, genética y molecular y estudios agrónomos

E. de García<sup>1</sup>, C. Giménez<sup>1</sup>, M. del Carmen Vidal<sup>1</sup>, G. Palacios<sup>1</sup> y O. Haddad<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Central de Venezuela, Apartado 80970, Caracas 1080, Venezuela (Correo electrónico: egarcia@reacciun.ve); <sup>2</sup>Instituto de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.

En 1996, Trujillo y de García obtuvieron una variante somaclonal resistente a la Sigatoka amarilla



Grado de infección (Sigatoka amarilla):

- 0 No visible
- 1 Muy bajo
- 2 Bajo
- 3 Intermediario
- 4 Alto
- 5 Muy Alto

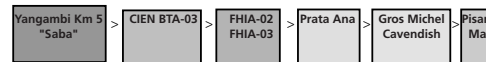
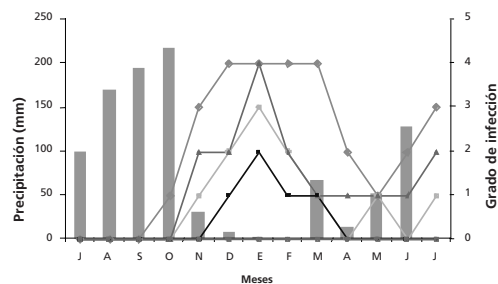


Figura 3. Evaluación de la incidencia de la Sigatoka amarilla en cinco clones de banana que se cultivan en bosque seco a 450 m sobre el nivel del mar. Estación Experimental Samán Mocho, Carabobo, Venezuela (1999-2000).



Grado de infección (Sigatoka Negra):

- 0 No visible
- 1 Muy bajo
- 2 Bajo
- 3 Intermediario
- 4 Alto
- 5 Muy Alto



Figura 4. Evaluación de la incidencia de la Sigatoka negra en cinco clones de banana que se cultivan en bosque seco a 450 m sobre el nivel del mar. Estación Experimental Samán Mocho, Carabobo, Venezuela (1999-2000).

lla mediante la inducción de brotes adventicios del clone triploide Williams, subgrupo Cavendish, llamado localmente 'Brasilero', que es susceptible a la enfermedad (Trujillo y de García 1996, Trujillo *et al.* 1999). Esta variante somaclonal no es sólo resistente a la enfermedad, sino también muestra una serie de características morfológicas y anatómicas que la distinguen de los clones triploides: a) la hoja 1.4 veces más gruesa que la del clon Williams (Hermoso *et al.* 1997, Trujillo *et al.* 1997); b) menor cantidad de estomas por mm<sup>2</sup> en epidermis superior e inferior (Hermoso *et al.* 1997, Trujillo *et al.* 1997); y c) mayor contenido de fenoles. Este clon fue llamado CIEN BTA-03 (Figura 1).

El propósito de este trabajo consiste en informar sobre los datos de caracterización bioquímica, genética y molecular del CIEN BTA-03, así como una referencia a la evaluación del comportamiento resistente de la variante en el campo.

Los estudios bioquímicos basados en el análisis de proteínas mediante electroforesis en los geles de acrilamida desnaturizada SDS-PAGE, manchadas con el azul coomassie y digitalizadas en un Densitómetro de Imagen modelo GS-

690 (Bio-Rad), demostraron la presencia de dos polipéptidos (14 y 17 kDa) en el clon Williams en que nunca fueron observados, ni en el clon CIEN BTA-03, ni en el Fragro 7 (AAAA), siendo ambos resistentes a la Sigatoka amarilla (Giménez 1998).

El análisis citogenético mostró que ambos clones presentaron tejidos con mosaico, pero con diferente distribución de la cantidad de cromosomas; el 22% de las células del clon Williams tiene más de 33 cromosomas y el 78% tiene menos de 33 cromosomas. Por el contrario, el 65% de las células en la variante somaclonal resistente CIEN BTA-03 tiene más de 33 cromosomas y el 35% tiene menos de 33 (Giménez 1998, Giménez *et al.* 2000).

El análisis mediante la citometría de flujo demostró que el somaclon CIEN BTA-03 presenta un contenido de ADN similar o superior al del clon Fagro 7 (Figura 2). Los valores obtenidos para la proporción promedio banano/arroz (índice B/A) varía entre 2.92 y 2.99, similar a los clones tetraploides.

Se realizó el análisis de masa utilizando datos obtenidos mediante marcadores de ADN polimórficos amplificados al azar (RAPD) para el CIEN BTA-03 y 16 genotipos diferentes de *Musa* spp. (Giménez 1998, Giménez *et al.* 2000, Vidal y de García 2000). Cincuenta y seis bandas polimórficas fueron utilizadas para los análisis de masa utilizando el Promedio de Pares de Grupos Sin Pesar de Ward (Ward's Unweighted Pair-Group Average, UPGA), y el Promedio de Pares de Grupos Pesados (Weighted Pair-Group Average, WPGA) para calcular distancias de bloques (Manhattan). Los dendrogramas generados por diferentes métodos fueron idénticos y mostraron que el CIEN BTA-03 entra en el grupo del FHIA-02 (AAAB) y no se relaciona estrechamente con el subgrupo Cavendish, al cual pertenece el cultivar progenitor Williams (AAA) (Giménez 1998, Giménez *et al.* 2000).

La evaluación en el campo del carácter resistente del CIEN BTA-03 (García *et al.* 2000) muestra que este somaclon puede ser agrupado con el cultivar Yangambi km5, basándose en su resistencia a la Sigatoka amarilla (Figura 3). Este somaclon también probó ser resistente a la Sigatoka negra (Figura 4).

Los índices de eficacia y productividad del CIEN BTA-03 se compararon con los índices del FHIA-01, FHIA-02 y FHIA-03 (García *et al.* 2000). Los índices del CIEN BTA-03 son muy similares en valores a los índices del FHIA-02 y FHIA-03 (Tabla 1).

Hemos concluido que tenemos un nuevo clon resistente a la Sigatoka amarilla, con una alta probabilidad de ser también resistente a la Sigatoka negra, con buenas características agronómicas. Este clon produce un racimo de 34.53 kg. y tiene un índice de productividad de 0.28 kg. por día.

#### Agradecimiento

Esta investigación fue apoyada por una beca bajo el contrato G-97000700 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Venezuela (CONICIT) para la Dra Eva de García. Los autores están muy agradecidos con el Sr Nicolas Roux (*Plant Breeding Unit*, FAO/IAEA, Seibersdorf, Austria) por el análisis de la citometría de flujo.

#### Bibliografía

- de García E., O. Haddad, M. Dagert & R. Campagnone. 2000. Segundo informe de avance. Proyecto CONICIT G-97000700. 269pp.
- Giménez C. 1998. Características genéticas y moleculares del variante somaclonal de banano (CIEN BTA-03) asociadas al mecanismo de resistencia a la Sigatoka amarilla y su estabilidad genética. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 114pp.
- Giménez C., E. de García, N. Xena de Enrech & I. Blanca. 2001. Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN-BTA-03. *In Vitro Plant* 37(2).
- Hermoso L., H. Lindorf & E. de García. 1997. Anatomía foliar del variante somaclonal CIEN BTA-03 (*Musa* spp.), resistente a la Sigatoka Amarilla. *Anales de Botánica Agrícola*. 4:63-66.
- Trujillo I. & E. de García. 1996. Estrategias para la obtención de variantes somaclonales resistentes a la Sigatoka amarilla. *InfoMusa* 5(2):12-13.
- Trujillo I., L. Hermoso & E. de García. 1997. Caracterización estructural de clones de banano: resistentes y no resistentes a la Sigatoka Amarilla. *Anales de Botánica Agrícola*. 4:59-62.
- Trujillo I., E. de García & J.L. Berroterán. 1999. Evaluación de banano obtenidas "in vitro". *Anales de Botánica Agrícola*. 6:29-35.

Vidal M.C. & E. de García. 2000. Analysis of a *Musa* spp. somaclonal variant resistant to yellow Sigatoka. *Plant Molecular Biology Reports* 18:23-31.

## Biodiversidad y evolución

### Caracterización del germoplasma de *Musa* mantenido en el banco de genes de INIBAP con marcadores STMS-PCR

F. Carreel<sup>1</sup>, A. Duarte Vilarinhos<sup>2</sup>, I. Van den Houwe<sup>3</sup> y S. Sharrock<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CIRAD-FLHOR Neufchâteau, Sainte Marie, 97130 Capesterre Belle Eau, Guadalupe (Email: carreel@cirad.fr);

<sup>2</sup>CNPQ/EMBRAPA, Cx Postal 007, CEP44380000 Cruz Das Almas, Brasil; <sup>3</sup>Katholieke Universiteit Leuven, ITC, Kasteelpark Arenberg 13, 3001 Lovaina, Bélgica; <sup>4</sup>INIBAP, Parc Scientifique Agropolis II, 34397 Montpellier cedex 5, Francia.

La Colección Internacional de Germoplasma de *Musa* mantenida por INIBAP y hospedada por la Universidad Católica de Lovaina (KUL), contiene más de 1100 accesiones. El objetivo de este banco genético consiste en conservar la diversidad de *Musa* para el beneficio de la comunidad internacional y distribuir las especies y cultivares de *Musa* para los propósitos de investigación y desarrollo.

El objetivo del proyecto consiste en obtener la caracterización molecular de este germoplasma con el fin de facilitar la clasificación y el manejo del banco genético. Cada año desde 1998, cerca de 200 individuos están siendo caracterizados en el CIRAD-FLHOR en Guadalupe con la ayuda de marcadores moleculares.

Entre los diferentes métodos disponibles, se justifica la opción de marcadores de sitio microsatélite (sequence-tagged microsatellite site markers, STMS), debido a sus numerosas ventajas: estos marcadores codominantes altamente polimórficos de PCR, que pueden ser utilizados en las plántulas obtenidas in vitro, están disponibles, y los patrones pueden ser interpretados en términos de genotipos, permitiendo de esta manera la detección de los alelos de la especie específica o la determinación de similitudes. El polimorfismo de los marcadores STMS fue examinado mediante la electroforesis en gel de urea y poliácridamida no radioactiva, un método transferible sencillo y menos costoso que la mayoría de las otras técnicas moleculares (Lagoda *et al.* 1998a). Se desarrollaron los patrones y procedimientos de migración en geles pequeños y grandes que fueron aplicados dependiendo de la diferenciación requerida entre los clones. Los 10 marcadores STMS utilizados tienen un alto potencial de discriminación y están localizados en diferentes grupos de enlace (Lagoda *et al.* 1998b). Se han identificado al menos 18 alelos para cada STMS. Se identificaron algunos alelos específicos de los genomas de *schizocarpa*, *balbisiana* y *Australimusa* que permite

Tabla 1. Comparación del índice de eficacia y del índice de productividad en cuatro clones de banano durante segundo ciclo de cosecha. Estación Experimental Samán Mocho, Carabobo, Venezuela.

Clon/Cultivar	Genoma	Período desde la floración hasta la cosecha (días)	Peso del racimo (kg.)	Índice de eficacia (días/kg)	Índice de productividad (kg/días)
FHIA-01	AAAB	121.67	26.67	4.61	0.22
FHIA-02	AAAB	124.77	31.27	3.99	0.25
FHIA-03	AABB	126.90	36.85	3.47	0.29
CIEN BTA-03	AAAA	121.07	34.53	3.52	0.28

la identificación de clones interespecíficos. La mayoría de los clones revelaron patrones diferentes exceptuando los clones de subgrupos como Cavendish. Se verificó la clasificación de los clones. Se estudiaron más de 464 clones, se identificaron 34 errores de clasificación, se completó la clasificación de 23 clones y 31 clones no clasificados fueron asignados a un grupo y, cuando fue posible, a un subgrupo.

Estos datos ayudan a completar la base de datos morfológicos de germoplasma (INIBAP-MGIS), junto con los datos sobre los análisis de los niveles de ploidia mediante citometría de flujo (ver Dolezel et al., arriba) y eventualmente los datos sobre la caracterización genómica de cromosomas a través de GISH (hibridación genómica *in situ*) (D'Hont et al. 2000).

#### Bibliografía

- D'Hont A., A. Paget-Goy, J. Escoute & F. Carreel. 2000. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 100:177-183.
- Lagoda P.J.L., D. Dambier, A. Grapin, F.-C. Baurens, C. Lanaud & J.-L. Noyer. 1998a. Nonradioactive sequence-tagged microsatellite site analyses: a method transferable to the tropics. *Electrophoresis* 19:152-157.
- Lagoda P.J.L., J.-L. Noyer, D. Dambier, F.-C. Baurens, A. Grapin & C. Lanaud. 1998b. Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae. *Molecular Ecology* 7:657-666.

#### Estudios moleculares de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* especies locales de Malasia seleccionados

Y. Othman<sup>1</sup>, Norzulaani Khalid<sup>1</sup>, Asif Javed<sup>1</sup>, Mak Chai<sup>1</sup> y Tan Siang Hee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biological Sciences, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malasia; <sup>2</sup>Genome Centre, Institute Bioscience, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Selangor, Malasia. (Correo electrónico: yasmin@gene.um.edu.my)

Actualmente el banano es el segundo cultivo frutícola más grande en Malasia peninsular y contribuye con más de RM20 millones en ganancias por exportación (Jamaluddin 1998).

Sin embargo, los problemas de las enfermedades muy diseminadas siguen siendo la principal limitación para la industria y requieren que se realicen intensos esfuerzos para introducir nuevos cultivares resistentes.

El programa bananero en la Universidad de Malasia y *Universiti Putra Malaysia* estableció recientemente un grupo de mejoramiento molecular que se concentrará en las especies indígenas locales con el principal énfasis en el banano silvestre *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. Actualmente, el programa incluye un proyecto de etiquetas de secuencias expresadas (expressed sequence tag, EST), análisis de los STMS, análisis de retrotransposones, análisis de los genes potenciales de resistencia a las enfermedades y

estudios taxonómicos basados en citometría de flujo y citología.

Para el análisis de los EST de los genes de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* se estableció una biblioteca de cADN, construida sobre un vector de fago Itrip1ex2. Los clones de la biblioteca están siendo secuenciados al azar y analizados como parte de un proyecto de la genómica de banano a largo plazo. Búsquedas similares de las secuencias conocidas depositadas en las bases de datos, ya han revelado semejanzas con los genes de función conocida y con otros clones EST. Todas las secuencias obtenidas serán utilizadas para generar una base de datos de los EST de *Musa*, que será utilizada para un entendimiento posterior y explotación potencial de los genes de banano.

El análisis de los retrotransposones ha identificado elementos parecidos a la copia Ty 1 en 10 variedades de banano. Una búsqueda en las bases de datos mostró semejanzas nucleotídicas que variaban entre 85 y 97% y predijo semejanzas de aminoácidos de entre 57 y 82% en comparación con los genes RT conocidos de los retrotransposones parecidos a las copias Ty 1. Las secuencias se subdividieron en ocho grupos distintos similares a los retrotransposones parecidos a las copias Ty 1, encontrados en otras especies de plantas como el Tto1 en *Nicotiana tabacum* (Hirochika y Hirochika 1993). Los retrotransposones parecidos a Ty 3-gypsy también han sido aislados con similitudes que variaban entre 55 y 80% al compararlos con los elementos similares en la base de datos. La ubicuidad y heterogeneidad de los transposones tipo copia Ty 1 y tipo Ty 3-gypsy permitieron utilizarlos como marcadores adecuados para la determinación de la biodiversidad de las especies de banano en Malasia.

En otro proyecto, se utilizó la citometría de flujo (Dolezel et al. 1991) para estudiar la variación de ploidia y del tamaño del genoma nuclear en las especies de *Musa* indígenas para Malasia, es decir, subespecies *Musa acuminata*, *Musa balbiana*, *Musa violascens* y *Musa textilis*. No se observaron variaciones en los niveles de ploidia, mientras que entre las diferentes especies de *Musa* examinadas se observó una gran variación en el tamaño del genoma. Menor cantidad de variabilidad se observó en el nivel intraespecífico dentro de las especies de *Musa acuminata*. El análisis estadístico y de masas de los datos sobre el tamaño del genoma relacionado con el agrupamiento, concordó con la clasificación taxonómica de *Musa* generalmente aceptada.

Los estudios sobre la resistencia a las enfermedades se concentran en la resistencia de los bananos silvestres locales a *Fusarium oxysporum*, el principal patógeno de los bananos en Malasia. El último propósito será la introgresión de los genes de resistencia de las especies silvestres en las variedades cultivadas utilizando

genómica integrada y selección con la ayuda de marcadores.

El enfoque integrado general del programa con estrechos enlaces con los grupos de transformación y mejoramiento en el país, espera contribuir con los programas de mejoramiento de *Musa* tanto local como globalmente.

#### Bibliografía

- Dolezel J. 1991. Flowcytometric analysis of nuclear DNA contents in higher plants. *Phytochem. Analysis* 2:143-154.
- Hirochika H. & R. Hirochika. 1993. Ty 1-copia group retrotransposons as ubiquitous components of plant genomes. *Jpn. J. Genet.* 68:35-46.
- Jamaluddin S.H. 1999. Commercial exploitation of banana diversity in Malaysia. Pp. 45-51 in *Proceedings of the First National Banana Seminar*, 23-25 Nov. 1998, Genting (Z. Wahab et al., eds).

#### Caracterización genética de los cultivares triploides y tetraploides comerciales y genotipos diploides silvestres de Brasil utilizando microsatélites

S.A.C.D. Souza<sup>2</sup>, A. Figueira<sup>1</sup>, A. Tulmann Neto<sup>1</sup> y S.O. Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, CP 96 Piracicaba, SP, 13400-970, Brasil; <sup>2</sup>ESALQ-USP (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidad de São Paulo), Brasil; <sup>3</sup>EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria) Mandioca Fruticultura, Cruz das Almas, BA, Brasil. Correo electrónico: figueira@cena.usp.br

En Brasil, los cultivares de banano de los subgrupos "Pome" y "Silk" (AAB) se cultivan ampliamente, principalmente por pequeños agricultores. El programa de mejoramiento de EMBRAPA *Mandioca Fruticultura*, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, ha desarrollado híbridos tetraploides basados en un número limitado de selecciones triploides comerciales y diploides silvestres. Los cultivares idénticos con nombres distintos (sinónimos) y genotipos distintos con nombres similares (homónimos) podrían representar un fenómeno común, y las mutaciones somáticas tienden a acumularse en el banano. Los objetivos de este trabajo consistieron en caracterizar 33 cultivares comerciales triploides e híbridos tetraploides, más 49 genotipos diploides silvestres del programa de mejoramiento de EMBRAPA, utilizando marcadores de microsatélite. Los iniciadores fueron adquiridos en *Research Genetics Inc.* (Huntsville, AL, EEUU), y los fragmentos amplificados fueron registrados en geles de poliacrilamida desnaturalizados teñidos con nitrato de plata. Basándose en el análisis de los agregados, los cultivares triploides y tetraploides se agruparon de acuerdo a la composición genómica (presencia del genoma B) y a la clasificación de subgrupos. No se detectaron diferencias entre los cultivares de los subgrupos "Cavendish" y "Pome". Los cultivares se identificaron clasificándolos en un subgrupo erróneo. Las se-

lecciones tetraploides del mismo cruzamiento no fueron idénticas y presentaron la similitud esperada con los triploides maternos. Los diploides fueron altamente diversos, con las principales líneas diploides parentales empleadas para desarrollar híbridos tetraploides muy distintas. Algunos iniciadores amplificaron más de un locus sugiriendo que la duplicación de los loci podría ser común en banano, como se describió previamente en la literatura. Las distancias genéticas pueden ser utilizadas para seleccionar cruza- mientos futuros.

### Estudios de la estructura de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* y de la resistencia parcial de los bananos

C. Abadie<sup>1</sup>, G.-G. Rivas<sup>2</sup>, A. El Hadrami<sup>3</sup>, M.-F. Zapater<sup>3</sup> y J. Carlier<sup>3</sup>

<sup>1</sup>CRBP (Centre régional de recherches sur bananiers et plantains), BP 832, Douala, Camerún; <sup>2</sup>CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza), 7170, Turrialba, Costa Rica; <sup>3</sup>CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement), TA 40/02, avenue d'Agropolis, 34398 Montpellier, Francia. Correo electrónico: jean.carlier@cirad.fr

El hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* (anamorfo *Paracercospora fijiensis*) causa la enfermedad de la raya negra del banano (BLS) o Sigatoka negra, la enfermedad foliar más destructiva de los bananos (Jones 2000). El conocimiento de la magnitud y distribución de la variabilidad dentro de *M. fijiensis* es necesario para el mejoramiento y manejo de la resistencia al BLS. Un estudio de la estructura genética de las poblaciones de *M. fijiensis* a una escala global mostró que las poblaciones individuales pueden mantener un alto nivel de diversidad genética y que la recombinación desempeña un papel importante en este patógeno (Carlier *et al.* 1996). De esta manera, en los programas de mejoramiento se debe utilizar preferiblemente la resistencia parcial que es supuestamente duradera. Los principales objetivos de este trabajo consistieron en describir la estructura genética de las poblaciones de *M. fijiensis* a escalas continental y local y evaluar la eficacia y durabilidad de la resistencia parcial.

Para estudiar la estructura de las poblaciones de una sola especie patógena, primero tenemos que diferenciar esta especie de sus parientes cercanos y determinar su distribución. Este tipo de encuesta, realizada en el sur y sudeste de Asia, llevó al descubrimiento de un hongo no descrito anteriormente, *Mycosphaerella eumusae* (anamorfo *Septoria eumusae*, Carlier *et al.* 2000). De un estudio taxonómico y filogenético del ADN ribosomal, hemos demostrado que al menos nueve especies, pertenecientes a *Mycosphaerella* o géneros anamorfos relacionados, pueden ser aislados de las hojas de banano (Carlier *et al.*, sin publicar). Considerando la pre-

sencia de todas estas especies, los iniciadores que están definidos en la región ITS (Johanson y Jegger 1993) no son estrictamente específicos a *M. fijiensis* ni a *M. musicola*. Estos resultados muestran que es necesario tener un buen conocimiento del complejo de las especies de hongos para desarrollar herramientas de diagnóstico. Del estudio filogenético hemos desarrollado otra herramienta basada en un ensayo de restricción de la región ITS y comenzamos a buscar nuevos iniciadores específicos. Estas herramientas deberían ser útiles para determinar la distribución y la importancia de diferentes especies.

La estructura de las poblaciones de *M. fijiensis* a escalas continental y local fue analizada a partir de las muestras recolectadas en los países de América Latina, Caribe y África, utilizando ocho secuencias polimórficas amplificadas fragmentadas (cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS), como marcadores moleculares (Zapater *et al.*, sin publicar). Dentro de las poblaciones locales, hemos descubierto que la mayor parte de la variabilidad genética está distribuida en una escala pequeña correspondiente a la escala de la planta. En la zona de América Latina y del Caribe, la diversidad genética de *M. fijiensis* en Honduras y Costa Rica es relativamente alta en comparación a las poblaciones en otros lugares, sugiriendo que el patógeno primero entró en la zona en estos lugares. En las áreas de América Latina/el Caribe y África, se detectó un alto nivel de diferenciación genética entre la mayoría de las poblaciones analizadas, lo que indica, que el flujo génico es limitado (Rivas *et al.* y Carlier *et al.*, sin publicar). Es probable que la enfermedad por lo tanto, se ha propagado en la región a través de las plantas infectadas y a través de la dispersión restringida de ascosporas. La continuación de esta investigación a escala de países ayudará a especificar la importancia relativa de ambos medios de transmisión. La agresividad de la variabilidad se evaluó en dos muestras recolectadas en Camerún y Filipinas, mediante la inoculación de cinco cultivares parcialmente resistentes utilizando un ensayo con fragmentos de hojas (El Hadrami *et al.* 1998). Esta variabilidad fue similar para ambos países aunque el nivel de diversidad genética observado en Filipinas es mucho más alto (Carlier *et al.* 1996). No se detectaron interacciones específicas entre aislados y cultivares. Ya que en estos países sólo se cultivan hospedantes susceptibles, estos resultados podrían ser explicados por la ausencia de la selección de hospedantes. El potencial de las poblaciones del patógeno de adaptarse a la resistencia parcial debe ser investigado siguiendo su evolución durante un tiempo en las parcelas de genotipos resistentes de banano.

Para evaluar la eficacia y durabilidad de la resistencia parcial, se utilizaron tres enfoques complementarios: la caracterización de los componentes de resistencia parcial bajo condiciones

controladas, la evaluación de la eficacia de estos componentes en el campo y el análisis de la estructura de las poblaciones del patógeno. Se observaron diferencias significativas entre los 10 genotipos de banano en todas las etapas del ciclo de infección utilizando un ensayo con fragmentos de hojas (El Hadrami 2000). De esta manera, los diferentes componentes de la resistencia parcial se presentan en estas etapas. Actualmente se ha estudiado el papel epidemiológico de los componentes seleccionados de resistencia bajo condiciones de campo en diferentes parcelas, cada una de las cuales incluye sólo un genotipo de banano. También estamos comparando la estructura de las poblaciones del patógeno entre estas parcelas en espacio y tiempo.

### Bibliografía

- Carlier J., M.H. Lebrun, M.F. Zapater, C. Dubois & X. Mourichon. 1996. Genetic structure of the global population of Banana black leaf streak fungus *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 5: 499-510.
- Carlier J., M.F. Zapater, F. Lapeyre, D.R. Jones & X. Mourichon. 2000. Septoria leaf spot of banana: a newly discovered disease caused by *Mycosphaerella eumusae* (anamorph *Septoria eumusae*). *Phytopathology* 90: 884-890.
- El Hadrami A., M.F. Zapater, F. Lapeyre, C. Abadie & J. Carlier. 1998. A leaf disk assay to assess partial resistance of banana germplasm and aggressiveness of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease. 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland. BSPP Vol. 2, p.1.1.24.
- El Hadrami A. 2000. Caractérisation de la résistance partielle des bananiers à la maladie des raies noires et évaluation de la variabilité de l'agressivité de l'agent causal, *Mycosphaerella fijiensis*. Thèse d'Université. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. 153pp.
- Johanson A. & M.J. Jegger. 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycological Research* 97:670-674.
- Jones D.R. 2000. Diseases of banana, Abaca and Enset. CABI Publishing, CAB International, UK. 544pp.

### Nuevos métodos citológicos para estudiar los viejos problemas en *Musa* L.

M. Pillay, M.T.V. Adeleke y A. Tenkouano

Crop Improvement Division, Plantain and Banana Improvement Project, International Institute of Tropical Agriculture, PMB 008 Nchia-Elleme, Port-Harcourt, Nigeria

El mejoramiento de *Musa* es obstaculizado por varias limitaciones incluyendo la falta de conocimientos sobre la estructura de los cromosomas, la ploidia y causas de la esterilidad. Tampoco existen cariotipos establecidos en *Musa* debido a sus cromosomas uniformes que se tiñen con dificultad y a complicaciones para obtener buenos preparados. La definición de los niveles de ploidia correctamente y el establecimiento de técnicas para las causas de la esterilidad son necesarios en el mejoramiento de *Musa*. Este

estudio describe (i) el uso de nitrato de plata como agente de teñido para cromosomas de *Musa*, (ii) un nuevo procedimiento para examinar cromosomas meióticos en *Musa*, (iii) variación de ploidía en el germoplasma de *Musa* y (iv) crecimiento del tubo de polen en *Musa*. La acetocarmina, que es el teñido más comúnmente utilizado en la citología de *Musa*, es eficaz para cromosomas condensados como los que se encuentran en la metafase, pero ineficaz para los cromosomas en la prófase. El nitrato de plata mostró ser un teñido alternativo útil para los cromosomas de *Musa*. Se describe un método mejorado para examinar la meiosis en *Musa*. El procedimiento envuelve la disección de los microsporocitos de las anteras, centrifugación para la obtención de grandes cantidades de microsporocitos, digestión con enzimas y tratamiento de las células con ácido etanol acético. Aunque los teñidos Giemsa y de Leishman fueron eficaces para los cromosomas de *Musa*, el teñido con plata resultó ser el más eficaz para los cromosomas de prófase menos contraídos. Esta técnica será útil para desarrollar cariotipos de pachiteno, caracterizar nuevos híbridos e identificar mecanismos de restitución nuclear (FDR o SDR). La ploidía y la composición genómica en algunas variedades de nuestro germoplasma de *Musa* presentaron diferencias, en comparación con los datos existentes, mostrando la necesidad de una mejor caracterización del germoplasma existente. Finalmente, se describirá un método para observar el crecimiento del tubo de polen en los estilos de los híbridos de *Musa*.

## Bioquímica y maduración de la fruta

### Semillas sintéticas en banano: un nuevo sistema de propagación y entrega

T.R. Ganapathi, P. Suprasanna, L. Srinivas y V.A. Bapat

Plant Cell Culture Technology Section, Nuclear Agriculture and Biotechnology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai 400 085, India.

Los bananos comestibles se propagan vegetativamente mediante retoños, ya que usualmente no producen semillas viables. Nuevos y eficaces medios para la propagación de los bananos serían ventajosos en comparación con el uso convencional de retoños, tanto para el mantenimiento de germoplasma como para su intercambio y también transporte. El cultivo *in vitro* de meristemas vegetativos o ápices florales es el método más prometedor para la propagación masiva. La producción de semillas sintéticas, encapsulando los embriones somáticos y propágulos vegetativos, se está convirtiendo rápidamente en una técnica

aplicada con potencial para la propagación masiva de las especies vegetales elites. La tecnología de semillas sintéticas tendrá un impacto significativo sobre la producción de cultivos, tanto de los cultivos con propagación vegetativa, como a través de semillas. Para las plantas que se propagan vegetativamente, las semillas sintéticas permitirán sembrar variedades clonales directamente y proporcionarán un medio para el mantenimiento de germoplasma elite.

Las semillas sintéticas se prepararon encapsulando las puntas apicales y embriones somáticos y se estudió su conversión en plántulas. Las puntas apicales del cv. Basrai encapsuladas en alginato de sodio, que contenía diferentes matrices de gel, se regeneraron *in vitro* en varios substratos. El uso del medio de Whites dio como resultado una alta conversión de puntas apicales en plántulas. Los embriones somáticos derivados de los cultivos de células embriogénicas del cv. Rasthali también fueron empleados para la preparación de semillas sintéticas. Los embriones encapsulados se convirtieron en plantas con frecuencias variables en diferentes matrices de gel y substratos. Las plántulas desarrolladas de las semillas sintéticas fueron transferidas al suelo exitosamente. Las semillas sintéticas ofrecen una herramienta útil, ya que pueden ser manipuladas como semillas y pueden ser útiles para el almacenamiento, entrega y transporte de germoplasma de banano.

### Evaluación de los sistemas de regeneración y transformación en las variedades Pisang Mas (AA) y Pisang Berangan (AAA) de *Musa acuminata*

Norzulaani Khalid, Yasmin Othman, Wirakarnain Sani, Mahanom Jalil y Norrazia Juh

Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, Universidad de Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malasia.

El marchitamiento por *Fusarium* del banano (Mal de Panamá) es originario de Malasia peninsular y ha sido registrado como un serio peligro para la industria local (Thompson y Johnston 1953). Sin embargo, los intentos de mejoramiento mediante métodos convencionales fueron impedidos por la naturaleza no fértil de los bananos cultivados. Por esta razón, nuestro laboratorio está desarrollando protocolos de cultivo de tejidos y transformación con el fin de utilizarlos en nuestras variedades locales de banano, Pisang Mas (AA) y Pisang Berangan (AAA) de *Musa acuminata*. Se intentaron varios métodos de regeneración de meristemas individuales y desnudos (pelados), glóbulos meristemáticos y callos embriogénicos. Los callos embriogénicos fueron derivados de los meristemas (Novak *et al.* 1989) e inflorescencias masculinas (Escalant *et al.*) La

cantidad más grande de plantas regeneradas resultó de los meristemas pelados. Actualmente, estamos plantando estas plantas regeneradas en el campo para examinarlas con respecto a la variación somaclonal. Hemos observado que la frecuencia de regeneración es más alta en Pisang Berangan (AAA) que en Pisang Mas (AA). También se establecieron suspensiones celulares para ambas variedades. Las suspensiones celulares procedentes de las inflorescencias masculinas se desarrollaron más rápidamente que las de los meristemas apicales.

Se intentó la transformación de las plantas utilizando el método biolístico y mediante *Agrobacterium*. Los meristemas pelados y los callos embriogénicos respondieron mejor en los experimentos de transformación. Se utilizaron ensayos histoquímicos para optimizar los parámetros de transformación e identificar los explantes adecuados. Las suspensiones celulares de ambas variedades se utilizarán para la transformación en el futuro.

Asimismo, estamos aislando el gen antifungoso a partir del banano silvestre *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. De acuerdo a los datos publicados, esta especie se conoce como resistente a las razas 1 y 4 del marchitamiento por *Fusarium* (Vakili 1965).

Igualmente, estamos desarrollando innovaciones para la producción comercial de plantas procedentes de los cultivos de tejidos. Hemos desarrollado una cámara que llamamos una "cámara esteripónica", la cual une los principios del cultivo de tejidos y la aeropónica. Entre las ventajas de esta cámara se encuentran una producción de plantas más rápida, riesgo mínimo de contaminación y menor dependencia de la mano de obra. Esta cámara también podría ser utilizada para los experimentos de evaluación fisiológica y de patógenos.

También se desarrolló un sistema de rastreo de datos con el fin de monitorear la producción vegetal utilizando un sistema de código de barras. El uso de este sistema permitirá el monitoreo de las plantas indizadas para la presencia de los virus y control de calidad, y proporcionar los datos de producción necesarios.

### Bibliografía

- Escalant J.V., C. Teisson, A. Grapin & F. Côte. 1994. Embriogénesis somática de bananos y plátanos a partir de flores jóvenes. *InfoMusa* 3(2):4-6.
- Novak F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Conger & Tang Xiolang. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) banana (*Musa* spp.). *Biotech.* 7: 154-159.
- Thompson A. and A. Johnston 1953. A host list of plant diseases in Malaya. *Mycological papers* no. 52. CMI, Kew, Surrey, England.
- Vakili N.G. 1965. *Fusarium* wilt resistance in seedlings and mature plants of *Musa* species. *Phytopathology* 55:135-140.