

Protocolo para la detección rápida de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1 en banano

María I. Oloriz^{1*}, <https://orcid.org/0000-0002-5818-0644>
Naylin Machado^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0003-0590-5629>
Luis E. Rojas¹, <https://orcid.org/0000-0002-0107-1842>
Bárbara Ocaña¹, <https://orcid.org/0000-0003-0722-3736>
Marilín Hernández¹, <https://orcid.org/0000-0002-8082-2738>

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

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

*Autora para correspondencia e-mail: maria@ibp.co.cu

RESUMEN

La Marchitez por *Fusarium* del banano es una enfermedad típica de marchitamiento vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*. Los programas mejoramiento genético del cultivo para el manejo de la enfermedad necesitan de herramientas que faciliten la detección rápida del hongo fitopatógeno. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo sencillo de detección de *F. oxysporum* raza 1 en muestras de *Musa* spp. basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los principales aspectos relacionados en este protocolo son la toma de muestra y el cultivo del hongo, el método rápido de extracción del ADN, el protocolo de PCR, la separación por electroforesis de los productos del PCR y los cuidados generales para el trabajo.

Palabras clave: Marchitez por *Fusarium* del banano, PCR, extracción de ADN, *Musa* spp.

Rapid detection protocol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* race 1 in banana

ABSTRACT

Fusarium wilt of banana is a typical vascular wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*. The genetic improvement program of the crop needs tools that allow the quick detection of fungal phytopathogen. The objective of this work was to establishment a simple detection protocol of *F. oxysporum* race 1 in *Musa* spp. samples by polymerase chain reaction (PCR). The principal related aspects in this protocol are the sampling, fungal *in vitro* culture, quick DNA extraction method, PCR protocol, electrophoresis separation of PCR products, and general considerations during the work.

Keywords: *Fusarium* wilt of banana, PCR, DNA extraction, *Musa* spp.

INTRODUCCIÓN

Entre las principales enfermedades que afectan los plátanos y bananos (*Musa* spp.) se encuentran las manchas foliares producidas por *Mycosphaerella* spp. (Churchill, 2011) y la Marchitez por *Fusarium*, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (Snyder y Hanson) (*Foc*) (Ploetz, 2015). La Marchitez por *Fusarium* es una enfermedad típica de marchitamiento vascular, causa la interrupción

del sistema de translocación de agua, síntomas foliares sistémicos y el colapso final de las plantas afectadas. La infección inicial ocurre cuando el hongo fitopatógeno invade el tejido vascular (xilema) de las plantas a través de las raíces (Ploetz, 2005). De *Foc* se han descrito cuatro razas de acuerdo con la patogenicidad a diferentes cultivares en condiciones de campo. La raza 1, descrita en plantas con síntomas de 'Gros Michel' (AAA) y cultivares con el genoma AAB como

'Manzano' y 'Pome', la raza 2 que ataca a 'Bluggoe' y otros cultivares con genoma ABB, la raza 4 que afecta al grupo 'Cavendish' y a todos los cultivares susceptibles a las razas 1 y 2. La raza 4 está a su vez dividida en la raza tropical 4 (que infecta en condiciones tropicales y subtropicales) y en la subtropical raza 4 (que solo incide en zonas subtropicales) (Ploetz, 2006).

Debido a la prolongada viabilidad de las clamidosporas de *Foc* en el suelo, las medidas de manejo de la enfermedad se enfocan en la prevención de la entrada del hongo fitopatógeno y en el empleo de cultivares resistentes (Ploetz *et al.*, 2015). Por ello, la detección temprana de *Foc* cobra gran importancia.

En este sentido, autores como Carvalhais *et al.* (2019) publicaron un método de identificación de las razas de *Foc* que afectan *Musa spp.* basado en la combinación de PCR y enzimas de restricción, en los que el material fúngico inicial se obtiene de cultivos monospóricos del hongo crecido durante siete días y la purificación de su ADN se realiza por medio del *kit* DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Sin embargo, contar con un protocolo que permita disponer del material fúngico y la purificación de su ADN en corto tiempo y bajo costo facilitará las medidas de manejo de la enfermedad. Además, puede ser una herramienta útil para programas de mejoramiento genético focalizados en el desarrollo de cultivares resistentes a la Marchitez por *Fusarium*.

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para determinar la presencia de *Foc* raza 1 en muestras de banano como apoyo a los programas de mejoramiento genético, en la búsqueda de resistencia y contribuir al manejo de la Marchitez por *Fusarium*.

MATERIALES Y EQUIPOS

- Agarosa grado electroforesis
- Agitador magnético
- Agua desionizada estéril
- Bandejas plásticas medianas
- Bata sanitaria
- Bisturí No. 23
- Bolsas de polietileno (1000 g)
- Bromuro de etidio (10 mg/ml en agua)
- Cabina de flujo laminar
- Cámara fotográfica digital
- Cámara y fuente de electroforesis
- Centrifuga

- Cesto o bandeja para desechos
- Cuaderno de trabajo
- Espátula
- Guantes
- Incubadora
- Lactofenol (fenol 20 g, ácido láctico 20 g, glicerol 40 g, agua 20 ml)
- Marcador de peso molecular
- Material vegetal seccionado para el estudio
- Medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Mezcla de desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTPs), a 10 mM
- Micropipetas 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l
- Microscopio óptico
- Nasobuco
- Oligonucleótidos específicos a *Foc* raza 1
- Papel de filtro estéril
- Pinzas
- Placas de Petri
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Puntas estériles para micropipetas 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l
- Tampón A: 100 mM NaOH, 2% Tween 20
- Tampón B: 150 mM Tris-HCl pH 2, 2 mM EDTA
- Tampón de carga (6x): 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol, 30% glicerol, en agua.
- Tampón PCR
- Tampón TBE (5x) 1 L: Tris base, 54 g, ácido bórico, 27.5 g, 0.5 M EDTA pH 8
- *Taq* ADN polimerasa
- Termociclador
- Transiluminador UV ($\lambda \approx 300$ nm)
- Tubos de PCR 200 μ l
- Vaso de precipitado

PRECAUCIONES Y MEDIDAS DE SEGURIDAD

Se recomienda emplear los medios de protección necesarios (guantes, batas sanitarias, nasobuco) para la manipulación de este hongo fitopatógeno con el fin de prevenir riesgos a la salud del personal que participe en el proceso. Aunque *F. oxysporum* ha sido descrito como causante de enfermedades en plantas, se ha encontrado como hongo oportunista en humanos (Triest *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020).

PROCEDIMIENTO

Preparación del material vegetal y microscopía óptica

Material vegetal: Plantas de *Musa spp.* ya sean crecidas en casas de cultivo o en campo, a las que se les desea comprobar la presencia

de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1. Pueden incluirse plantas con síntomas característicos de la infección por *Foc* para confirmar la presencia del hongo, así como plantas presumiblemente sanas en las que el investigador espera confirmar que están libres del hongo fitopatógeno.

- Lavar las plantas con agua corriente.

- Cortar secciones de rizoma, pseudotallo o raíces de aproximadamente 5 mm con ayuda de bisturí.

- Lavar con agua corriente primero, luego con agua desionizada estéril.

- Escurrir los fragmentos de tejido sobre papel de filtro estéril y colocarlos en una placa Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (Figura 1 A).

- Incubar a 28 °C y oscuridad por tres días.

- Hacer preparaciones microscópicas, en un portaobjeto con lactofenol azul, del micelio del hongo (con aspecto algodonoso) que creció sobre el tejido vegetal.

Observar en el microscopio óptico las estructuras típicas de *Fusarium* (Figura 1B).

Detección molecular de *Foc* raza 1 por PCR

- Extraer el ADN del micelio crecido sobre los segmentos de las plantas, mediante el protocolo de extracción *in situ* (Xin *et al.*, 2003) que se describe brevemente.

- Tomar el micelio con una espátula en la cabina de flujo laminar y colocarlo en un tubo de 200 µl al que se le adiciona el tampón A.

- Incubar durante 10 min a 95 °C.

- Añadir 50 µl de tampón B.

- Tomar 2 µl del extracto para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- Para el PCR preparar una mezcla de reacción de 25 µl que incluye 0.4 µM de los oligonucleótidos específicos, SIX6b-210-F y SIX6b-210-R (Calvahais *et al.*, 2019), 0.2 mM dNTPs, 1% de polivinil pirrolidona 0.1% de BSA, 1U de *Taq* ADN polimerarasa y 2 µl del extracto de ADN obtenido previamente.

- Emplear un programa para el PCR que inicia con un paso de desnaturalización del ADN a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 15 s, 55 °C por 15 s, 72 °C por 30 s y una extensión final de 72 °C por 2 min.

Nota: Incluir en la determinación un control negativo de reacción, es decir una reacción a la que no se le adiciona ADN y un control positivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* *Foc* raza 1 identificado previamente y que su ADN se extrae de igual modo. Los oligonucleótidos específicos, SIX6b-210-F (5'-ACGCTTCCAATACCGTCTGT-3') y SIX6b-210-R (5'-AAGTTGGTGAGTATCAATGC-3') amplifican una banda de 210 pb específicos

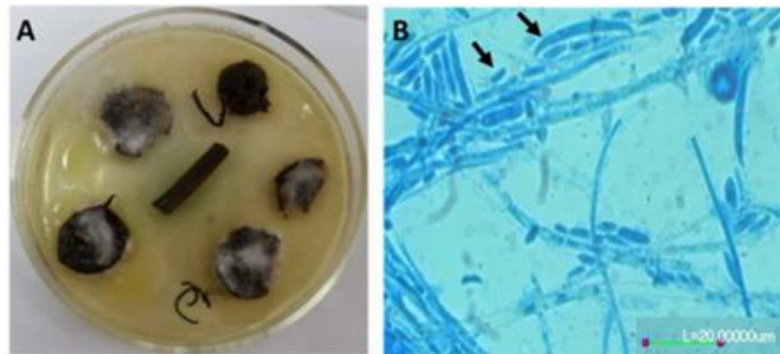


Figura 1. Crecimiento fúngico en secciones de rizoma y pseudotallo de plantas de banano inoculadas artificialmente con *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 (aislado VCG01210), medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (A). Macroconidios y microconidios presentes en el hongo crecido sobre las secciones de tejido, 400x (B).

para el gen *SIX6b* (*Secreted-in-Xylem*) para la raza 1 de *F. oxysporum* que incluye los grupos de grupos de compatibilidad VCG 0123, 01210, 01217, 01218, 0124, 0124/5, 0124/22, 0125, 0128, 01220. Si se desea puede emplearse los oligonucleótidos específicos al gen *SIX9*, un gen conservado en todos los aislados de *Foc*, *SIX9_Foc_F* (5'-ATCGCTGAAGCCCAGAACAA-3') y *SIX9_Foc_R* (5'-TTCTGTCCGTCGATCGTTCC-3') que permiten la amplificación de una banda de 260 pb empleando la temperatura 58 °C para el alineamiento de los oligonucleótidos.

- Preparar un gel de agarosa al 1.2% en tampón TBE 1x en un molde con pocillos. Colocar el gel en la cámara de electroforesis que contenga igual tampón.

- Tomar 10 µl de cada tubo de reacción de PCR, mezclar con 2 µl de tampón de carga (6x) y colocar en cada pocillo del gel.

Nota: Incluir en la misma corrida las muestras, los controles positivos y negativos y un marcador de peso molecular que posea el rango del tamaño de la banda esperada.

- Aplicar 100 Volt de corriente constante hasta que el frente de corrida supere las tres cuartas partes del gel.

- Teñir con bromuro de etidio (0.5 µg ml⁻¹) durante al menos 15 min, exponer a luz ultravioleta en el transiluminador para visualizar las bandas. Un ejemplo de la comprobación molecular por PCR de la presencia de *F. oxysporum* R1 sobre fragmentos de plantas de banano se muestra en la figura 2. Como resultado se obtuvo la amplificación de una banda de 210 pb que se corresponde con el tamaño esperado.

Nota: Evitar el contacto del bromuro de etidio con la piel, y emplear materiales desechables que se eliminan, tomar las medidas de bioseguridad para este agente químico. En caso de derrames descontaminar las superficies con carbón activado.

CULMINACIÓN DEL ENSAYO

Con la conclusión del ensayo los restos de plantas serán colocados en bolsas de polietileno, para evitar de esta forma la posible propagación del hongo fitopatógeno.

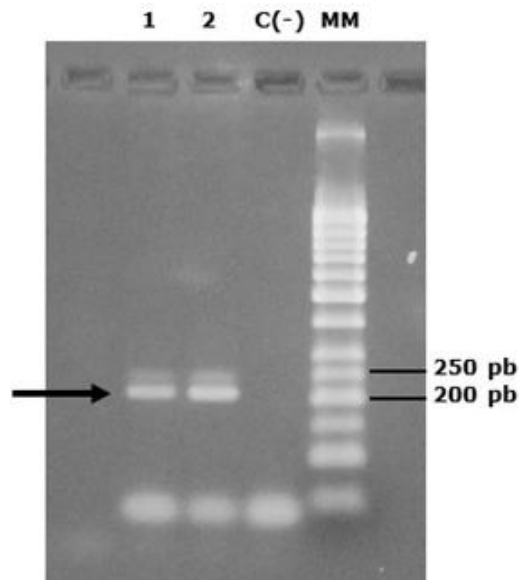


Figura 2. Resultados de la amplificación por PCR de una banda de 210 pb a partir del ADN extraído del micelio del hongo. Carrilera 1, amplificación a partir del ADN del micelio crecido sobre fragmentos de rizoma de plantas de banano inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* *Foc* raza 1 (aislado VCG01210), en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa. Carrilera 2, amplificación a partir del ADN de micelio de la cepa control positivo, identificada como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* *Foc* raza 1 (aislado VCG01210). C(-), control negativo. MM, Marcador de peso molecular O´GeneRuler 50bp DNA ladder.

Luego las bolsas pasarán por un proceso de incineración para eliminar todos los restos vegetales. De igual manera deben tratarse los materiales desechables empleados (puntas y tubos). Las placas con restos de micelio y medio de cultivo se descontaminarán en autoclave.

CONSIDERACIONES FINALES

El protocolo permite la identificación molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 en un tiempo relativamente corto. Se emplean 3 días para el crecimiento del micelio del hongo y aproximadamente 4 h para la identificación molecular. Se utiliza un método simple de extracción del ADN fúngico que evita usar juegos o kit de purificación comerciales más costosos. El procedimiento permite el crecimiento del hongo que se encuentra colonizando los tejidos vegetales y facilita la extracción de su ADN. De este modo se brinda un protocolo de identificación rápida hasta nivel de especie y se evita un análisis integral de caracteres culturales sobre medios de cultivos específicos, medir las estructuras de reproducción, describir sus características, etc.

El presente protocolo es una herramienta útil para identificar la presencia de *Foc* en plantas de banano en estudios de selección para la búsqueda de cultivares resistentes o en materiales vegetales que se trasladan entre diferentes localidades. También puede apoyar los estudios de interacción *Musa-F. oxysporum*, así como aquellas estrategias basadas en el uso de microorganismos beneficiosos para el manejo de la Marchitez del banano causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1.

CONCLUSIONES

El protocolo propuesto permite disponer del material fúngico y la purificación de su ADN en corto tiempo y bajo costo, para la detección por PCR, de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 a partir de muestras de tejido de *Musa* spp.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero recibido por el Fondo Financiero de Ciencia

e Innovación de Cuba proyecto 19/2019, el proyecto P131LH0030035 y al VLIR-UOS mediante proyecto ZEIN2016RIP33 para la síntesis de los oligonucleótidos utilizados. Los financistas no tuvieron participación en el diseño del estudio, la colecta y análisis de los datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

Conflicto de interés

No se declaran conflictos de interés.

Contribución de los autores

Conceptualización MIO, Investigación MIO, NM, LER, BO, Metodología NM, LER, BO, MH, Recursos MH, Supervisión MIO, Escritura: primera redacción MIO, NM y BO, Escritura: revisión y edición de MIO.

REFERENCIAS

Carvalhais LC, Henderson J, Rincon-Florez VA, O'Dwyer C, Czisowski E, Aitken EAB, Drenth A (2019) Molecular diagnostics of banana *Fusarium* wilt targeting secreted-in-xylem genes. *Frontiers in Plant Science* 10: 54; doi: 10.3389/fpls.2019.00547

Churchill ACL (2011) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology* 12: 307-328

Ploetz RC (2006) *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 96: 653-656

Ploetz RC (2015) *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology* 105: 1512-1521; doi: 10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW

Triest D, Stubbe D, De Cremer K, Piérard D, Detandt M, Hendrickx M (2015) Banana infecting fungus, *Fusarium musae*, is also an opportunistic human pathogen: are bananas potential carriers and source of fusariosis? *Mycologia* 107(1): 46-53; doi: 10.3852/14-174

Wang CJ, Thanarut C, Sun PL, Chung WH (2020) Colonization of humano pportunistic *Fusarium oxysporum* (HOFo) isolates in tomato and cucumber tissues assessed by a specific

molecular marker. PLoS ONE 15(6): e0234517;
doi: 10.1371/journal.pone.0234517

Xin Z, Jeff PV, Melvin JO, John JB (2003)
High throughput DNA extraction method
suitable for PCR. BioTechniques 34: 820-
826; doi: 10.1.1.453.6278

Recibido: 11-01-2021

Aceptado: 16-02-2021

Este es un artículo de acceso abierto
distribuido bajo una Licencia Creative
Commons Atribución-No Comercial 4.0
Internacional (CC BY-NC 4.0) [https://
creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)
Está permitido su uso, distribución o
reproducción citando la fuente original y los
autores.