

DIVERSIDAD GENÉTICA DE CEPAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* EN BANANOS DE MÉXICO

GENETIC DIVERSITY OF *FUSARIUM oxysporum* f. sp. *cubense* STRAINS IN BANANAS FROM MEXICO.

Gilberto Manzo-Sánchez*
Noe Rodrigo Rosales-Bonilla
Marco Tulio Buenrostro-Nava
Salvador Guzmán-González

LABORATORIO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CULTIVO DE TEJIDOS
VEGETALES, FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS,
UNIVERSIDAD DE COLIMA

Blondy Beatriz Canto Canche
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA DE YUCATÁN

Mario Orozco-Santos
INIFAP, CAMPO EXPERIMENTAL TECOMÁN

*Autor responsable
gmanzo@ucol.mx

R E S U M E N

En el presente estudio se obtuvo un total de 20 aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* a partir de diferentes cultivares naturalmente afectadas por la enfermedad [Manzano (AAB), Pera (ABB), PisangAwak (ABB), Tabasco (AAA), Esquinado (ABB) y Macho (AAB)], de los estados de Colima, Nayarit, Oaxaca, Yucatán e Hidalgo. Las 20 cepas fueron analizadas mediante la técnica conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), el análisis de seis locus SSR en 20 cepas de *Foc* mediante marcadores SSR, mostraron polimorfismo entre las cepas. El locus MB18 amplificó cinco alelos (305 pb, 300 pb, 294 pb, 393 pb y 290 pb), por otra parte el locus Mv15 amplificó dos alelos (450 pb y 435 pb), mientras que para el resto de los locus generaron solamente un alelo. De acuerdo con el análisis de UPGMA de los datos de la matriz binaria se obtuvieron dos grupos: en el grupo I se integraron las cepas del estado de Nayarit (SNAP1, SNPA2, SNPA3 y SNPA4), Colima (ACP3, ACM14, ACM15 y ACMA1), Yucatán (OYM1, OYM2, OYM3 Y OYM4), Hidalgo (393, 148 y 149) y Oaxaca (504 y 506), las cuales son idénticas genéticamente, ya que mostraron una similitud genética de acuerdo al índice de Nei de 1.0; mientras que el grupo II estuvo conformado por las cepas SNPA5, OYP3 y ACP4, las cuales fueron aisladas del cultivar Pera, las cuales mostraron un coeficiente de variación de 1.42%, siendo este más elevado que el grupo anterior.

Palabras clave: SSR, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, mal de Panamá, diversidad genética.

ABSTRACT

In the present study, a total of 20 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (ABB) were obtained from cultivars: "Pisang Awak" (ABB), "Tabasco" (AAA), "Esquinado" (ABB), «Pera» (ABB), and "Macho" (AAB), from the states of Colima, Nayarit, Oaxaca, Yucatan and Hidalgo. The 20 strains were analyzed PCR based markers. Analysis of six locus in 20 *Foc* strains using SSR markers showed that there is a polymorphism between tested strains. The MB18 locus amplified five alleles (305 bp, 300 bp, 294 bp, 393 bp, and 290 bp); On the other hand, the M v15 locus amplified two alleles (450 bp and 435 bp), whereas for the rest of the loci showed only one allele. According to the UPGMA analysis of the binary matrix data, isolates were clustered in two groups: Group I consisted of strains from Nayarit (SNPA 1, SNPA 2, SNPA 3 and SNPA 4), Colima (ACP 3, ACM 14), ACM15 and ACM to 1), Yucatan (OYM 1, OYM 2, OYM 3 and OYM 4), Hidalgo (393, 148 and 149), and Oaxaca (504 and 506), which are genetically identical according to the Nei index of 1.0; while group II was composed of strains SNPA 5, OYP 3 and ACP 4, which were isolated from the cultivar "Pera" and showed a coefficient of variation of 1.42%, which is higher than the previous group.

Key words: SSR markers, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Fusarium wilt, genetic diversity.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad llamada "mal de Panamá" causada por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*); ha sido ampliamente revisada (Stover, 1962). De este patógeno se han identificado las razas 1, 2, 3 y 4 de *Foc*, estas se distinguen unas de otras en función de su virulencia a un grupo definido de los cultivares de banano bajo condiciones de campo (Stover y Simmonds, 1987). La raza 1 ataca a las variedades Gros Michel, Manzano, mientras que la raza 2 afecta a los plátanos Bluggoe o Pera, la raza 3 ataca solo Heliconias y la raza 4 ataca a todos los cultivares susceptibles a las razas 1 y 2, así como los bananos Cavendish. Aunque los factores que favorecen el desarrollo, tales como las bajas temperaturas, se asocian con el daño causado por la raza 4 de *Foc* en el subtropical (Viljoen, 2002). El conocimiento de la diversidad genética de las poblaciones de hongos y su modo de reproducción es importante para la implementación de estrategias de manejo para reducir el impacto de la enfermedad (McDonald y McDermott, 1993), *Foc* tiene una estructura de población relativamente diversa para un hongo aparentemente asexual que consiste en tres razas (Taylor *et. al.*, 1999) y 24 grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs, por sus siglas en inglés) (Stover y Simmonds, 1987). Uno de los estudios para la identificación de la diversidad genética de *Foc* es mediante el uso de marcadores genéticos moleculares basados en Secuencias Simples Repetidas (SSR) o microsatélites, ya que constituyen una herramienta altamente eficiente para la identificación de genotipos (Ploetz y Pegg, 2000). El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética de cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de los estados de Colima, Nayarit, Oaxaca, Yucatán e Hidalgo mediante marcadores SSR.

M E T O D O L O G Í A

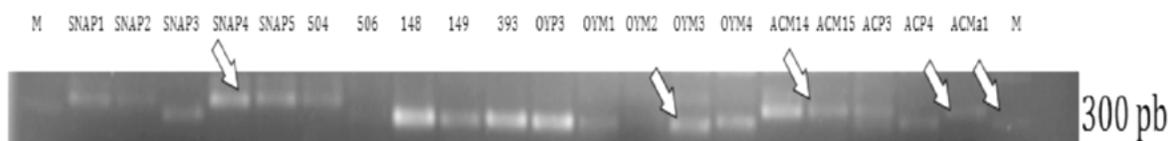
Se llevaron a cabo colectas de tejido de pseudotallo de los cultivares de plátano: Manzano (AAB), Pera (ABB), Macho (AAB), Esquinado (ABB), Tabasco (AAA) y 'PisangAwak' (ABB), con síntomas de Mal de Panamá en huertos comerciales de las zonas productoras de los estados de Nayarit, Colima, Yucatán, Oaxaca e Hidalgo. Cada muestra se tomó haciendo un corte en el pseudotallo de la planta identificada con los síntomas del mal de Panamá, tomando 300 g de material vegetativo infectado por *Foc*. Estas se colocaron en una bolsa de papel, se etiquetaron y almacenaron en hielo seco para su transporte.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I Ó N

El análisis de seis locus en 20 cepas de *Foc* mediante marcadores SSR, mostraron polimorfismo entre las cepas. El locus MB18 amplificó cinco alelos (305 pb, 300 pb, 294 pb, 393 pb y 290 pb), por otra parte el locus Mv15 amplificó dos alelos (450 pb y 435 pb), mientras que el resto de los locus generaron solamente un alelo como se muestra en la Figura 1.

FIGURA 1.

Polimorfismo de las 20 cepas de *Foc*.



Las características fenotípicas de las 20 colonias monospóricas de *Foc* fueron de tipo algodonoso, de crecimiento aéreo abundante con diferente tipo de pigmentación (blanca cremosa-rojiza, blanca crema-salmón, blanca rosácea, roja intensa, con bordes rosados), lo cual concuerda con las características típicas del patógeno (Bogale *et. al.*, 2005).

Los marcadores SSR se utilizan para estudiar la evolución y diversificación de las poblaciones de patógenos que están estrechamente relacionados. Este tipo de marcadores son altamente polimórficos que se encuentran dispersos por todo el genoma en estudio (Ploetz y Pegg, 2000).

La diversidad genética de cepas de *Foc* de los Estados de Colima, Nayarit, Oaxaca, Yucatán e Hidalgo fue determinada mediante marcadores SSR. La separación de *Foc* dentro de dos grupos genotípicos por el análisis de marcadores SSR es consistente con resultados presentados previamente usando marcadores de ADN (Lesliey Summerell).

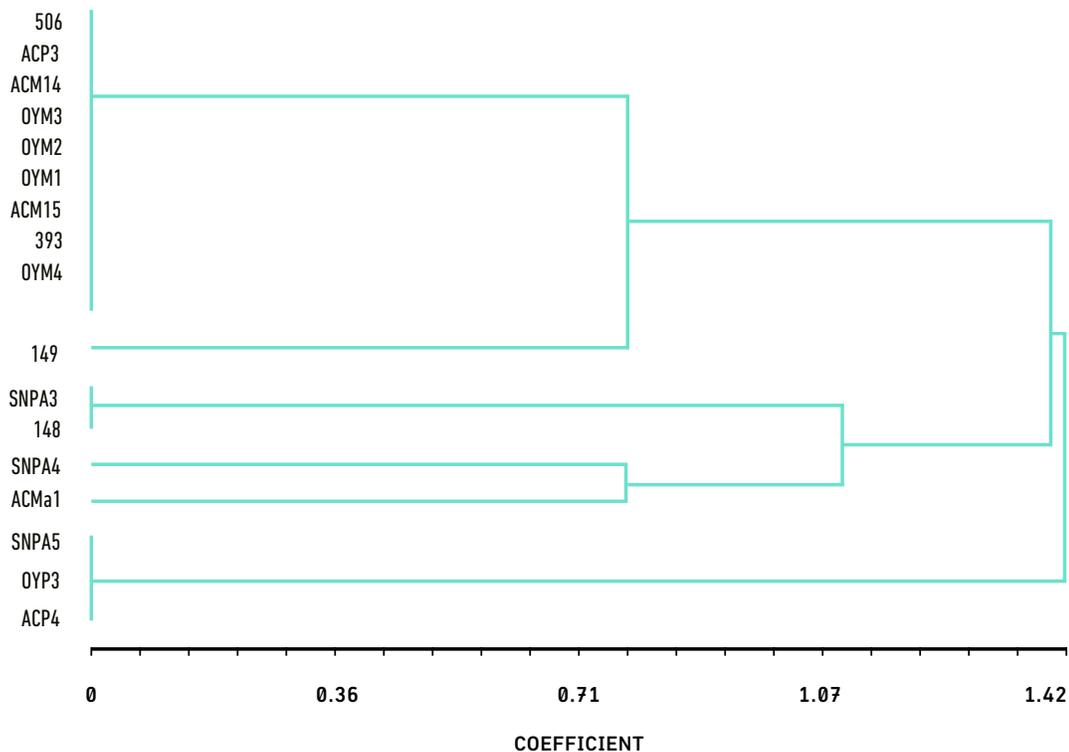
Los estudios previos sugieren una estrategia reproductiva clonal para *Foc* (Bentley *et. al.*, 1998), Sin embargo, la diversidad genética determinada en el presente estudio podría ser por causas de mutaciones, por el efecto del hospedero (Koenig *et. al.*, 1997) y/o recombinación parasexual (Kistler, 2000).

La historia evolutiva del *Foc* es compleja, los resultados sobre la filogenia molecular han demostrado que este patógeno es un grupo polifilético, y podría estar compuesto por más de 24 grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) (Buxton, 1962) o por ocho distintas líneas filogenéticas (O'Donnell *et al.*, 2009), esto concuerda con los niveles de diversidad genética de las 20 cepas de *Foc*.

En previos estudios moleculares, empleando diferentes tipos de marcadores han separado las cepas de *Foc* dentro de dos grupos genotípicos (Bentley *et. al.*, 1998), dichos resultados concuerdan con los resultados generados por el dendrograma de este estudio. Principalmente, en un grupo se localizan cepas de la raza 1 y en el otro cepas de la raza 2.

FIGURA 2.

Dendrograma de consenso estricto obtenido mediante el índice de similitud (Dice, 1945) y adaptado por Nei (1978) y el método de agrupamiento UPGMA a partir del análisis de 12 alelos de marcadores SSR en 20 cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense provenientes de los estados de Nayarit, Colima, Hidalgo, Oaxaca y Yucatán.



C O N C L U S I O N E S

Los marcadores SSR fueron capaces de determinar la diversidad genética entre cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense en bananos de México.

REFERENCIAS

- BENTLEY, S., Pegg, K., Moore, N., Davis, R., & Buddenhagen, I. (1998). Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense analyzed by DNA fingerprinting. *Phytopathology*, 88(12), 1283-1293.
- BOGALE, M., Wingfield, B., Wingfield, M., & Steenkamp, E. (2005). Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 622-624.
- BUXTON, E. (1962). Parasexual recombination in the banana-wilt *Fusarium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 45(2), 274-279.
- DICE, L. R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26(3), 297-302.
- KISTLER, H.C., 2000. Evolution of host specificity in *Fusariumoxysporum*. In: Symposium, P.E.N.M. (Ed.), *Fusarium*, pp. 70-82.
- KOENIG, R., Ploetz, R., & Kistler, H. (1997). *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. *Phytopathology*, 87(9), 915-923.
- LESLIE, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*: Blackwell publishing.
- MCDONALD, B. A., & McDermott, J. M. (1993). Population genetics of plant pathogenic fungi. *Bioscience*, 311-319.
- NEI, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590.
- O'DONNELL, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A., Waalwijk, C. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 46(12), 936-948.
- PLOETZ, R. C. y Pegg, K. G. 2000. Enfermedad fungosa de la raíz, cormo y del pseudotallo: marchitamiento por *Fusarium*. En: Jones DR, editor. *Las enfermedades del banano, abacá y ensete*. Londres: CAB International. 143-157.
- STOVER, R. H. (1962). Fusarial wilt (Panama Disease) of bananas and other *Musa* species. *Fusarial wilt (Panama disease) of bananas and other Musa species*.
- STOVER, R. H. y Simmonds, N. W. 1987. *Bananas*. 3ª ed. London: Longmans. 366- 378.
- TAYLOR, J. W., Geiser, D. M., Burt, A., & Koufopanou, V. (1999). The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 126-146.
- VILJOEN, A. (2002). The status of *Fusarium* wilt (Panama disease) of banana in South Africa: review article. *South African Journal of Science*, 98(7 & 8), p. 341-344.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Ramón Alvarez-Buylla de Aldana de la Universidad de Colima por el apoyo al proyecto 779/12.