

## Análisis genético de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* mediante marcadores RAPD

### Genetic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates through RAPD markers

Erik Oswaldo Ruíz-Martínez<sup>1</sup>, Fernando Romero-Parra<sup>1</sup>, Marco Tulio Buenrostro-Nava<sup>1</sup>, Salvador Guzmán-González<sup>1</sup>, Juan Carlos Sánchez-Rangel<sup>1</sup>, Mario Orozco-Santos<sup>2</sup> y Gilberto Manzo-Sánchez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Autopista Colima-Manzanillo km 40, C.P. 28930, Tecomán, Colima, México. INIFAP-Campo Experimental Tecomán, Colima, Ap. Postal 88, C.P. 28100, Tecomán, Colima, México

#### Resumen

El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), ha sido uno de los mayores problemas fitosanitarios presente en los cultivos de bananos y plátanos (*Musa* spp). Con el fin de determinar la diversidad filogenética de *Foc*, en el presente estudio se analizaron 17 aislamientos monospóricos obtenidos de clones [(Pera ABB) y (Manzano AAB)] naturalmente infectados de huertos comerciales del estado de Colima, México. Se identificaron los morfotipos de colonias crecidas en medio papa dextrosa agar (PDA) + Cloranfenicol. Posteriormente, se determinó la relación genética mediante análisis de marcadores de DNAs polimórficos amplificados al azar (RAPDs). Los resultados mostraron seis morfotipos: algodónosa-gris, algodónosa-blanca-rosada, algodónosa-blanca, algodónosa-rosada, algodónosa-gris-blancay tonalidades blanca-rosada. Mientras que el análisis mediante los marcadores RAPDs, mostró diferencias genéticas, las cuales formaron un dendrograma conformado por dos grupos: el grupo I, estuvo compuesto por los aislamientos (TCL<sub>1</sub>F, ACE<sub>3</sub>F, ACE<sub>4</sub>F, ACE<sub>5</sub>F, ACE<sub>6</sub>F, ACE<sub>7</sub>F, ACE<sub>8</sub>F, ACE<sub>9</sub>F, ACE<sub>10</sub>F, TCC<sub>12</sub>F, TCCH<sub>17</sub>F, TCCH<sub>19</sub>F) presentado un coeficiente de similitud de 0.96, mientras que el grupo II agrupó los aislamientos (ACE<sub>11</sub>F, TCCH<sub>18</sub>F, TCCH<sub>20</sub>F y MCS<sub>22</sub>F) el cual obtuvo un coeficiente del 0.80. Sin embargo, el aislamiento TCC<sub>13</sub>F con el morfotipo de crecimiento algodónosa-gris (Manzano) no formó parte de ninguno de los dos grupos. Estos resultados

#### Abstract

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), has been one of the biggest phytosanitary problems present in banana and plantain (*Musa* spp.) crops. In order to determine the phylogenetic diversity of *Foc*, in the present study we analyzed 17 monosporic isolates obtained from naturally infected plants from cultivars “Pear” (ABB) and “Manzano” (AAB) and obtained from commercial plantations in Colima, Mexico. The morphotypes of colonies grown on potato dextrose agar (PDA) + Chloramphenicol medium were identified. Subsequently, the genetic relationship was determined by analysis of random amplified polymorphic DNA markers (RAPDs). The results showed six morphotypes: cottony-gray, cottony-white-pink, cottony-white, cottony-pink, cottony-gray-white and white-pink tones. While the analysis using the RAPDs markers, showed genetic differences, which formed a dendrogram formed by two groups: group I, was composed of isolates (TCL<sub>1</sub>F, ACE<sub>3</sub>F, ACE<sub>4</sub>F, ACE<sub>5</sub>F, ACE<sub>6</sub>F, ACE<sub>7</sub>F, ACE<sub>8</sub>F, ACE<sub>9</sub>F, ACE<sub>10</sub>F, TCC<sub>12</sub>F, TCCH<sub>17</sub>F, TCCH<sub>19</sub>F) presented a coefficient of similarity of 0.96, while group II grouped the isolates (ACE<sub>11</sub>F, TCCH<sub>18</sub>F, TCCH<sub>20</sub>F and MCS<sub>22</sub>F) which obtained a coefficient of 0.80. However, the TCC<sub>13</sub>F isolation with the cotton-gray growth morphotype (isolated from “Manzano”) was not part of either group. These results demonstrate the existence of different morphotypes and a genetic diversity of *Foc* present in the producing regions of the state of Colima.

demuestran la existencia de diferentes morfotipos y una diversidad genética de *Foc* presente en las regiones productoras del estado de Colima.

**Palabras clave:** Morfotipos, RAPDs, mal de Panamá, diversidad genética.

**Autor para correspondencia:** Gilberto Manzo Sánchez. gmanzo@ucol.mx

---

## Introducción

El banano (*Musa* spp.) es considerado como un alimento esencial para la dieta humana (Nadal-Medina *et al.*, 2009; Pérez-Vicente, 2015) y se ubica como el segundo frutal tropical más importante por su consumo mundial, por su alto contenido de carbono, almidón, vitaminas y minerales (Bello-Pérez, Romero-Manilla, & Paredes-López, 2000; Manzo-Sánchez *et al.*, 2005; Manzo-Sánchez, 2010). Su origen es en el sureste asiático, con centros secundarios de diversidad en África Occidental y Central y en las tierras altas de África Oriental (Arteaga-Alcívar, 2015).

En México se establecieron alrededor de 80 000 ha de banano, donde los cinco principales estados con mayor superficie sembrada fueron: Chiapas (23 639 ha), Veracruz (15 547 ha), Tabasco (11 505 ha), Colima (5567 ha) y Jalisco (3724 ha) con una producción total de 2 263 000 t [Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2015).

Las plantaciones de banano son afectadas por diversas plagas y enfermedades, sin embargo, en la actualidad la enfermedad que ha representado uno de los mayores problemas fitosanitarios para el cultivo es el mal de Panamá ocasionado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) (Rodríguez-Gaviria & Cayón, 2008; Pérez-Vicente *et al.*, 2009; Manzo-Sánchez, 2017).

La marchitez del banano o mal de Panamá es considerada la enfermedad más destructiva y ampliamente distribuida del

**Keywords:** Panama disease, banana cultivars, morphology, genetic diversity.

---

## Introduction

Banana (*Musa* spp.) Is considered an essential food for the human diet (Nadal-Medina *et al.*, 2009; Pérez-Vicente, 2015) and is ranked as the second most important tropical fruit tree due to its global consumption, high content of carbon, starch, vitamins and minerals (Bello-Pérez *et al.*, 2000; Manzo-Sánchez *et al.*, 2005; Manzo-Sánchez, 2010). Its origin is in Southeast Asia, with secondary centers of diversity in West and Central Africa and in the highlands of East Africa (Arteaga-Alcívar, 2015). In Mexico, about 80,000 ha of bananas were established in the state of Chiapas (23,639 ha), Veracruz (15,547 ha), Tabasco (11,505 ha), Colima (5567 ha), and Jalisco (3724 ha) with a total production of 2 263 000 t [Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)-Secretariat of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food (SAGARPA, 2015)]. Banana plantations are affected by various pests and diseases; however, currently the disease that has represented one of the biggest phytosanitary problems for the crop is the Panama disease caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) (Rodríguez-Gaviria and Cayón, 2008; Pérez-Vicente *et al.*, 2009; Rosales-Bonilla, 2014).

Banana wilt or “Panama disease” is considered the most destructive and widely distributed disease of banana around the world, because there is no effective chemical control, in addition to its causal agent can survive in the soil for a long period of time (Pérez-Vicente *et al.*, 2009; Porteles *et al.*, 2015). *Foc* has a great genetic and pathogenic diversity breeds have been identified based on the pathogenicity of the fungus populations in certain cultivars, because in each cultivar damage manifests itself differently and morphological alterations become more harmful in cultivars with higher susceptibility (Pérez-Vicente, 2015). *Foc* is

banano alrededor del mundo, debido a que no existe un control químico eficaz, además de que su agente causal puede sobrevivir en el suelo por un largo período de tiempo (Pérez-Vicente *et al.*, 2009 ; Porteles *et al.*, 2015 ). *Foc* presenta una gran diversidad genética y patogénica ; las razas que se han sido identificadas con base en la patogenicidad de las poblaciones del hongo en determinados cultivares el daño se manifiesta de manera distinta y sus alteraciones morfológicas llegan a ser más perjudiciales en cultivares con una mayor susceptibilidad (Pérez-Vicente, 2015).

*Foc* es considerado como un patógeno altamente complejo, por ello, se han utilizado numerosos métodos para su caracterización. Por ejemplo, la variabilidad de las poblaciones, las relaciones filogenéticas y su evolución se han determinado en función de la patogenicidad (Batlle-Viera & Pérez-Vicente, 2009; Dita *et al.*, 2010 ). Sin embargo , una de las técnicas más comunes y eficaces para la identificación de la diversidad genética de *Foc* es mediante el uso de marcadores genéticos moleculares (Manzo - Sánchez, 2017).

Por otro lado, también el uso de análisis filogenéticos ha sido una herramienta importante para estudiar la diversidad genética de *Foc* debido a su compatibilidad vegetativa entre poblaciones. Con el paso de los años diversas metodologías basadas en ADN han sido utilizadas para conocer la serie de linajes clonales de *Foc* que corresponden más o menos a su agrupación basada en los grupos de compatibilidad vegetativa (VCG). Por ello en el presente trabajo se determinó la diversidad genética de aislados de *Foc* obtenidos de cultivares de banano en zonas productoras de Colima mediante el uso de RAPDs y análisis filogenético de los marcadores polimórficos.

## **Materiales y Métodos**

### *Reactivación y purificación de muestras.*

Se llevó a cabo la reactivación de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* a partir de un cepario existente en el Laboratorio de Biología Molecular y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Colima, el cual

considerado a highly complex pathogen, therefore, numerous methods have been used for its characterization. For example, the variability of populations, phylogenetic relationships and their evolution have been determined in terms of pathogenicity (Batlle-Viera and Pérez-Vicente, 2009; Dita *et al.*, 2010). However, one of the most common and effective techniques for identifying the genetic diversity of *Foc* is through the use of molecular genetic markers (Rosales-Bonilla, 2014).

On the other hand, the use of phylogenetic analysis has also been an important tool to study the genetic diversity of *Foc* due to its vegetative compatibility among populations. Over the years, several DNA-based methodologies have been used to know the series of *Foc* clonal lineages that correspond more or less to their grouping based on their vegetative compatibility groups (VCG). Therefore, in the present work the genetic diversity of *Foc* isolates was determined in banana cultivars in Colima producing areas through the use of RAPDs and phylogenetic analysis of their polymorphic markers.

## **Materials and Methods**

*Reactivation and purification of samples.* The reactivation of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from an existing strain in the Laboratory of Molecular Biology and *in vitro* Plant Tissue Culture of the Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias of the Universidad de Colima, and which was collected by Manzo-Sánchez *et al.* (2017) from diseased tissue with symptoms of wilt of banana from the pseudostem of cultivars “Manzano” and “Pera” growing in commercial plantations in Colima state.

With the help of a bacteriological loop, a portion of each tube containing a different isolate of *Foc* was taken and a striatum was made on PDA culture medium with 500 mg L<sup>-1</sup> of chloramphenicol in Petri dishes; subsequently each box was sealed and labeled and finally stored at 24 ° C for 72 h. From the previously cultivated sections of *Foc*, purification was performed by hyphae tip on

fue recolectado por Manzo -Sánchez *et al.* (2017) a partir de tejido enfermo con síntomas de marchitez del banano proveniente del pseudotallo de los cultivares Manzano (AAB) y Pera (ABB), en huertos comerciales del estado de Colima.

Con la ayuda de un asa bacteriológica, se tomó una porción de cada tubo que contenía un aislamiento diferente de *Foc* y se realizó un estriado sobre medio de cultivo PDA con 500 mg L<sup>-1</sup> de cloranfenicol en cajas de Petri; posteriormente cada caja se selló y etiquetó y finalmente se almacenaron a 24 °C por 72 h. De las secciones previamente cultivadas de *Foc* se realizó su purificación por punta de hifa sobre medio de cultivo en cajas de Petri con PDA y cloranfenicol para la obtención de cultivos monospóricos, y posteriormente se realizó la descripción morfológica (aparición de las colonias) de cada una de las cepas obtenidas para su análisis (Lesly & Summerell, 2006; Fourie *et al.*, 2009).

*Extracción, cuantificación y análisis de ADN.* Se realizó con 0.5 g de micelio de cada uno de los cultivos monospóricos de *Foc* y este se colocó en tubos estériles de 2 mL junto con 1 mL del amortiguador de extracción [200 mM Tris-HCl, (pH 8.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, PVP 1%, SDS 1%] y 10 µL de β-mercaptoetanol al 5% (v/v). Posteriormente, se incubó a baño María a 65 °C durante 30 min con agitaciones constantes cada 5 min y luego se agregó 1 mL de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló hasta tener una mezcla homogénea; enseguida se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min a 4°C.

Finalmente, la fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se le adicionó 80 µL de acetato de sodio 3 M (pH 5.2), se agitó y se añadieron 480 µL de isopropanol frío; después los tubos se incubaron a -20 °C durante 10 min y se volvió a centrifugar a 12 000 rpm por 10 min a 4 °C. Se retiró todo el sobrenadante dejando solamente la pastilla del ADN, la cual se lavó con 500 µL de etanol al 70% y posteriormente se secó al vacío durante 20 min. La pastilla seca se resuspendió en 50 µL de agua inyectable y se almacenó a -20°C.

culture medium in Petri dishes with PDA and chloramphenicol to obtain monosporic cultures, and subsequently the morphological description (based on the colonies appearance) of each of the strains obtained for analysis (Lesly and Summerell, 2006; Fourie *et al.*, 2009).

*DNA extraction, quantification and analysis.* It was carried out with 0.5 g of mycelium from each of the monosporic cultures of *Foc* and this was placed in sterile 2 mL tubes together with 1 mL of the extraction buffer [200 mM Tris-HCl, (pH 8.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, PVP 1%, SDS 1%] and 10 µL of 5% β-mercaptoethanol. Subsequently, it was incubated in a water bath at 65 °C for 30 min with constant agitation every 5 min and then 1 mL of phenol-chloroform-isoamyl alcohol solution (25:24:1) was added and mixed until a homogenous mixture was obtained; it was then centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C.

Finally, the aqueous phase was transferred to a 1.5 mL tube and 80 µL of 3 M sodium acetate (pH 5.2) was added, stirred and added with 480 µL of cold isopropanol; then the tubes were incubated at -20 °C for 10 min and centrifuged again at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C. All the supernatant was removed leaving only the DNA pellet, which was washed with 500 µL of 70% ethanol and then dried under vacuum for 20 min. The dried pellet was resuspended in 50 µL of injectable water and stored at -20 °C until used.

DNA quantification was performed using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). The integrity of the nucleic acid was verified by agarose gel electrophoresis with 500 ng of the DNA extract. The run was performed in horizontal electrophoresis chambers on 1% (w / v) agarose gel prepared in 1X TAE buffer (1 M Tris, acetic acid, 0.5 M EDTA, pH 8.0) and at 90 V for a period of 2 h. Subsequently, the gel was stained for 15 min in a solution of ethidium bromide (0.5 µg·mL<sup>-1</sup>) and the bands present in the gel electrophoresis were visualized with the help of a photodocument (Nadal-Medina *et al.*, 2009; Manzo-Sánchez *et al.*, 2017).

La cuantificación del ADN se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). La integridad del ácido nucleico se verificó por electroforesis en gel de agarosa con 500 ng del extracto de ADN. La corrida se realizó en cámaras de electroforesis horizontal en gel de agarosa 1% (p/v) preparado en buffer TAE 1X (Tris 1 M, ácido acético, EDTA 0.5 M, pH 8.0) y a 90 V por un período de 2 h. Posteriormente, el gel se tiñó durante 15 min en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y las bandas presentes en el gel electroforesis se visualizaron con la ayuda de un fotodocumentador (Nadal -Medina *et al.*, 2009).

**Marcadores RAPD.** La reacción de PCR se realizó en un termociclador VeritiFast (Applied Biosystems, USA) en un volumen de 25 µL compuesto por: 5 ng de ADN molde, 1X del buffer de reacción de PCR, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.8 µM de cada oligonucleótido (Tabla 1) que se utilizó para determinar la diversidad genética de *Foc* y 0.05 U de *Taq* ADN polimerasa (Amplificasa, México). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94 °C durante 1.5 min, seguido por 45 ciclos de amplificación a 94 °C cada uno con una duración de 60 s, una temperatura de alineamiento a 36.5 °C por 1 min, extensión a 72 °C durante 2 min, y finalmente un ciclo a 72 °C por 7 min (Visser, 2003; Bogale,

*RAPD markers.* PCR reactions were performed using a VeritiFast thermocycler (Applied Biosystems, USA) in a volume of 25 µL composed of: 5 ng of template DNA, 1X of the PCR reaction buffer, 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of dNTPs, 0.8 µM of each oligonucleotide (Table 1) which was used to determine the genetic diversity of *Foc* and 0.05 U of *Taq* DNA polymerase (Amplificasa, Mexico). The amplification conditions were: initial denaturation at 94 °C for 1.5 min, followed by 45 cycles of amplification at 94 °C each with a duration of 60 s, an alignment temperature at 36.5 °C for 1 min, extension to 72 °C for 2 min, and finally a cycle at 72 °C for 7 min (Visser, 2003; Bogale *et al.*, 2005). The PCR products were separated by electrophoresis on a 2% (w / v) agarose gel and manipulated as described in the previous paragraph.

*Phylogenetic analysis.* For this analysis the Nei measure was used, which is useful for the comparison of genetic diversity between fungal populations and bacteria. The values were calculated as  $H = 1 - \sum pi^2$ , where pi was the allele frequency at the loci (Nei, 1973). Only the polymorphic markers were taken, to which they were given the value of 1 that assumed the presence and 0 for the absence. Subsequently, the method of arithmetic average of the Unweighted Pair Group Method (UPGMA) was used to obtain the dendrogram and its

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos utilizados para determinar la diversidad filogenética de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Table 1. Oligonucleotide sequences used to determine the phylogenetic diversity of *F. oxysporum* f. sp. *cubense*

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
OPA-R15	GGACAACGAG
OPA-K06	CACCTTTCCC
OPA-B06	TGCTCTGCCC
OPA-A09	GGGTAACGCC
OPA-W01	CTCAGTGTCC
OPA-Y01	GTGGCATCTC

Wingfield, Winfield, & Stenkamp, 2005). Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (p/v) y se manipularon como se describió en el párrafo anterior.

## Resultados y Discusión

Se obtuvieron 17 aislamientos a partir de plantas naturalmente enfermas por *Foc* de huertos comerciales de banano, de los cuales siete pertenecieron a Tecoman, nueve a Armería y uno a Manzanillo, municipios pertenecientes al estado de Colima. Las características geográficas de donde originalmente se obtuvieron los aislamientos se muestran en la tabla 2, asimismo, se observa la descripción morfológica de las colonias, así como también la forma respectiva de los conidios. La morfología de todas las colonias obtenidas a partir de cultivos monospóricos resultó ser de tipo algodonosa (Figura 1) con diferencias en el tipo de coloración.

subsequent analysis with NTSYS-pc software (Avisé, 1994; Rholf, 2000).

## Results and discussion

Seventeen isolations were obtained from naturally diseased plants by *Foc* of commercial banana orchards, of which seven belonged to Tecoman, nine to Armería and one to Manzanillo, municipalities belonging to the state of Colima. The geographical characteristics where the samples from were the isolates were originally collected, morphological description of the colonies, as well as the respective shape of the conidia are shown in Table 2. The morphology of all the colonies obtained from monosporic cultures turned out to be of cottony type (Figure 1) with differences in the type of coloration.

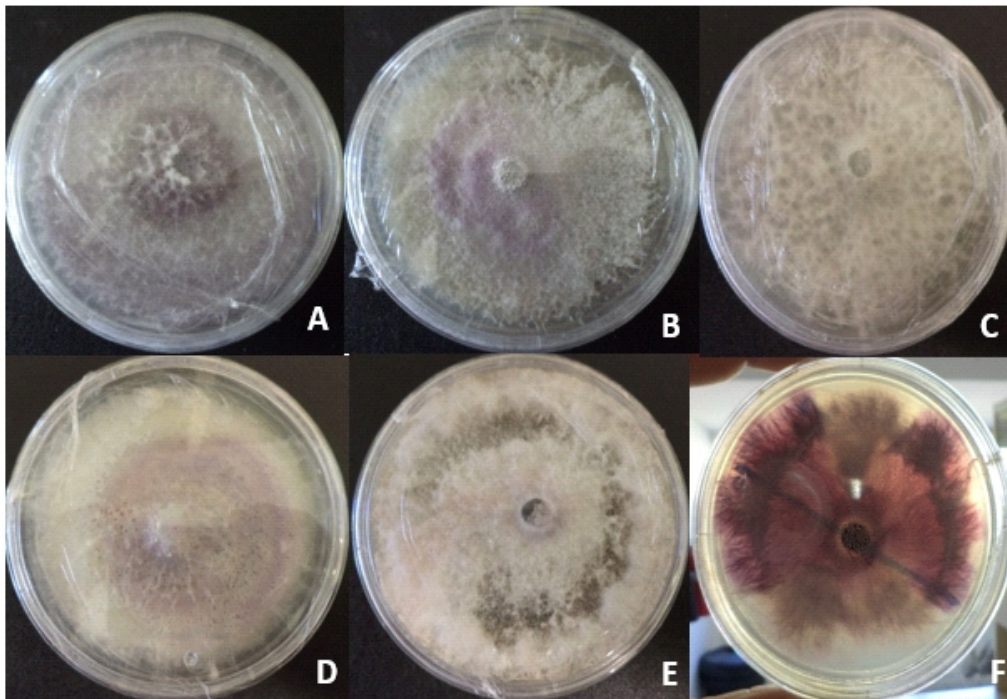


Figura 1. Morfología de colonias de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de banano del estado de Colima, México. (A) algodonosa-gris (TCL1F); (B) algodonosa blanca-rosada (ACE4F); (C) algodonosa-blanca (ACE7F); (D) algodonosa-rosada (ACE9F); (E) algodonosa gris-blanca (MCS22F); (F) blanca-rosada (TCCH18F).

Figure 1. Colony morphology of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* of banana from the state of Colima, Mexico. (A) cottony-gray (TCL1F); (B) cottony white-pink (ACE4F); (C) cottony-white (ACE7F); (D) cottony-pink (ACE9F); (E) cotton-gray-white (MCS22F); (F) white-pink (TCCH18F).

Tabla 2. Características geográficas y morfológicas de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* obtenidos de bananos en el estado de Colima, México.  
 Table 2. Geographical and morphological characteristics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cuban* obtained from bananas in the state of Colima, Mexico.

Clave	Municipio	Genotipo de banano		Tipo de conidios
TCL1F	Tecomán	Manzano (AAB)	Algodonosa-gris	Macro
ACE3F	Armería	Manzano (AAB)	Algodonosa- gris	Micro
ACE4F	Armería	Manzano (AAB)	Algodonosa- blanca- rosada	Micro
ACE5F	Armería	Pera (ABB)	Algodonosa- gris	Micro
ACE6F	Armería	Pera (ABB)	Algodonosa- blanca- rosada	Micro
ACE7F	Armería	Manzano (AAB)	Algodonosa- blanca	Micro
ACE8F	Armería	Manzano (AAB)	Algodonosa- blanca	Macro
ACE9F	Armería	Manzano (AAB)	Algodonosa- rosada	Micro
ACE10F	Armería	Manzano (AAB)	Algodonosa- blanca	Micro
ACE11F	Armería	Manzano (AAB)	Algodonosa- rosada	Micro
TCC12F	Tecomán	Manzano (AAB)	Algodonosa-gris	Micro
TCC13F	Tecomán	Manzano (AAB)	Algodonosa-gris	Micro
TCCH17F	Tecomán	Manzano (AAB)	Algodonosa con tonalidades gris, blanca y rosada	Micro
TCCH18F	Tecomán	Manzano (AAB)	Tonalidades blanca- rosadas.	Micro
TCCH19F	Tecomán	Manzano (AAB)	Algodonosa- blanca	Micro
TCCH20F	Tecomán	Manzano (AAB)	Algodonosa- blanca	Micro
MCS22F	Manzanillo	Pera (ABB)	Algodonosa con tonalidades gris, blanca y rosada	Micro

Por otro lado, en cuanto a morfotipos de colonias, se obtuvieron seis: la primera fue del tipo algodonosa-gris compuesta por cinco cepas (TCL1F, ACE3F, ACE5F, TCC12F y TCC13F), todas obtenidas de los municipios de Tecomán y Armería; la segunda fue del tipo algodonosa-blanca-rosada, la cual constó de dos cepas (ACE4F y ACE6F) pertenecientes a aislamientos de Armería y Tecomán, respectivamente. El tercer morfotipo fue de apariencia algodonosa-blanca y agrupó a las cepas (ACE7F, ACE8F, ACE10F, TCCH19F y TCCH20F), mientras que un cuarto tipo

Six colony morphotypes were obtained: the first was of the cotton-gray type composed of five strains (TCL1F, ACE3F, ACE5F, TCC12F and TCC13F), all obtained from the municipalities of Tecoman and Armeria; the second was of the cotton-white-pink type, which consisted of two strains (ACE4F and ACE6F) belonging to Armeria and Tecoman isolates, respectively. A third morphotype showed a cottony-white appearance and grouped the strains (ACE7F, ACE8F, ACE10F, TCCH19F and TCCH20F), while a fourth type identified as cottony-pink and was composed only of the

identificado como algodónosa-rosada estuvo compuesto sólo por las cepas (ACE9F y ACE11F) originarias de Armería. El quinto morfotipo fue del tipo algodónosa-gris-blanca con tonalidades rosadas, y estuvo integrado por dos cepas recolectadas de Manzanillo y Tecmán (TCCH17F y MCS22F). Por último, se obtuvo un morfotipo con tonalidades blanca-rosada compuesto por la cepa TCCH18F originaria de Tecmán.

De los 17 aislamientos caracterizados fenotípicamente, 14 de ellos pertenecieron al genotipo Manzano (AAB) y los demás pertenecieron al genotipo Pera (ABB) de bananos.

De los aislamientos obtenidos, el 100% presentó crecimiento de micelio en medio de cultivo. En cuanto a la morfología de los tipos de conidios presentes, se observó mayor presencia de microconidios y en menor cantidad producción de macroconidios, ambas formas de reproducción específicas de *Foc*.

En el análisis de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) se registró una diversidad de fragmentos distintos para cada uno de los oligonucleótidos utilizados (Figura 2). Con los seis oligonucleótidos usados se obtuvo 51 bandas, las cuales variaron de seis a 12, siendo el decámero OPA-K06 el que registró el mayor número de bandas amplificadas, seguido del OPA-A09 con 10 bandas y OPA-B06 con nueve bandas. Por otro lado, el oligonucleótido OPA-W01 produjo ocho bandas, mientras que OPA-R15 y OPA-Y01 seis bandas.

Con respecto al número de bandas polimórficas presentes en cada uno de los decámeros utilizados, el decámero OPA-K06 produjo doce bandas polimórficas con respecto al primer OPA-Y01 con solo cinco, logrando obtener entre todos los cebadores un total de 47 bandas polimórficas. Por último, se observó que los primers OPA-R15, OPA-K06 y OPA-B06 presentaron un porcentaje de polimorfismo del 100% (Figura 2), mientras que OPA-A09 mostró un 80%.

De acuerdo con el dendrograma generado con base en las bandas amplificadas por RAPD, no se observó un agrupamiento de

strains (ACE9F and ACE11F) originating in Armory. The fifth morphotype was of the cotton-gray-white type with pink tones, and was composed of two strains collected from Manzanillo and Tecoman (TCCH17F and MCS22F). Finally, a morphotype with white-pink tones was obtained, composed of the strain TCCH18F, originally from Tecoman.

Of the 17 genotypic banana isolates that were phenotypically characterized, 14 of them belonged to the “Manzano” and the others belonged to “Pera” cultivars. All isolates showed mycelium growth in culture medium. There was a high rate of microconidia formation and a lower production of macroconidia, both forms of specific reproduction of *Foc*.

In the analysis of random amplification of polymorphic DNA (RAPDs) performed in the experiment to evaluate the phylogenetic diversity of *Foc* in banana plants cultivated in Colima, Mexico, a diversity of different fragments was recorded for each of the oligonucleotides used (Table 1). The six oligonucleotides used, 51 bands were obtained, which varied from six to 12, with the OPA-K06 decamer recording the highest number of amplified bands with a total of 12, followed by OPA-A09 with 10 bands and OPA-B06 with nine bands. On the other hand, the primer OPA-W01 presented eight bands, while OPA-R15 and OPA-Y01 six bands only.

With respect to the number of polymorphic bands present in each of the random decamer used, the OPA-K06 decamer produced twelve polymorphic bands and OPA-Y01 decamer produced five, achieving a total of 47 polymorphic bands among all the primers. Finally, it was observed that primers OPA-R15, OPA-K06 and OPA-B06 showed a percentage of polymorphism of 100% (Figure 2), while OPA-A09 showed only a 80%.

According to the dendrogram generated on the basis of the bands amplified by RAPD, a grouping of the isolates of *Foc* was not observed in relation to its geographical origin or its genotype, since the groups formed were isolates from different municipalities and two different hosts.



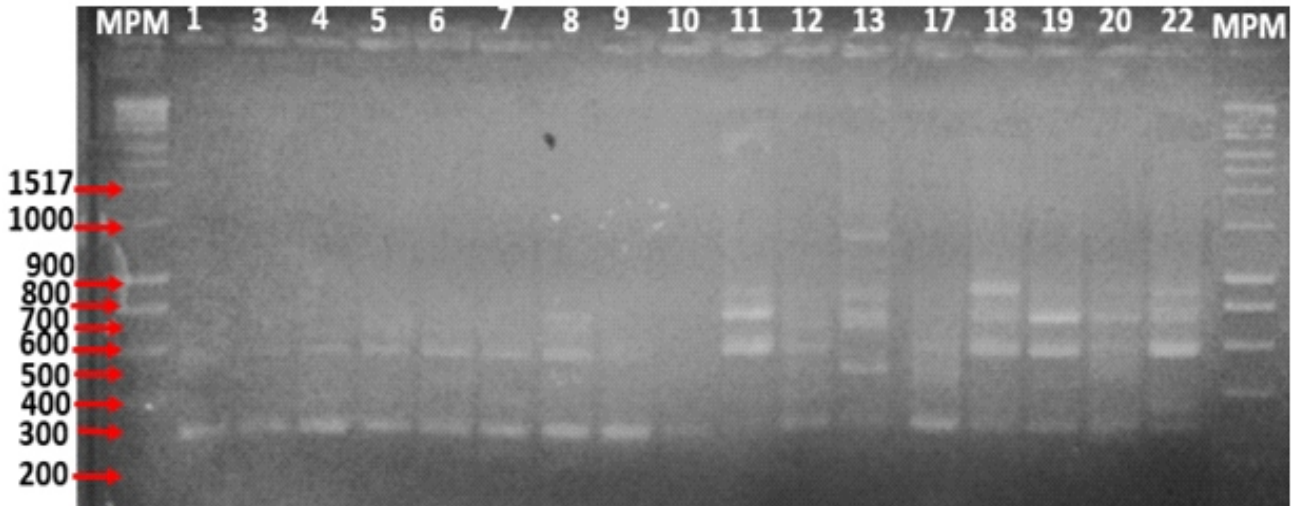


Figura 2. Gel representativo de la separación electroforética de productos amplificados con OPA -R15 en aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* obtenidos de banana en el estado de Colima, México. MPM: marcador de peso molecular (BIOLINE, México) en pares de bases. Los carriles 1-22 corresponden al número de cepa del hongo usada para el análisis (Tabla 2).

Figure 2. Amplified PCR products using OPA-R15 decamer in isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* obtained from banana plants growing in Colima State, Mexico. MPM: molecular weight marker (BIOLINE, Mexico) in base pairs. Lanes 1-22 correspond to the strain number of the fungus used for the analysis (Table 2).

los aislamientos de Foc en relación con su origen geográfico ni por su genotipo, ya que los grupos formados fueron por aislamientos de distintos municipios y dos diferentes hospedantes.

El dendrograma consistió en dos grupos (I y II) (Figura 3), donde el corte para clasificarlos indicó un coeficiente de similitud de 0.59. En el grupo I se agruparon los aislamientos TCL1F, ACE3F, ACE4F, ACE5F, ACE6F, ACE7F, ACE8F, ACE9F, ACE10F, TCC12F, TCCH17F y TCCH19F, donde los aislados más cercanos con base en su similitud genética fueron 1 y 3 (TCL1F y ACE3F, respectivamente) con un coeficiente de 0.96. En el mismo grupo, las otras muestras más cercanas entre sí fueron ACE5F y ACE6F con un coeficiente de similitud de 0.94.

Por otro lado, el grupo II se formó por los aislamientos ACE11F, TCC13F, TCCH18F, TCCH20F, MCS22F, donde las muestras más similares entre sí fueron la TCCH18F y la MCS22F con un coeficiente de 0.80.

The dendrogram consisted of two groups (I and II) (Figure 3), where the cut to classify them indicated a coefficient of similarity of 0.59. In group I the isolates TCL1F, ACE3F, ACE4F, ACE5F, ACE6F, ACE7F, ACE8F, ACE9F, ACE10F, TCC12F, TCCH17F and TCCH19F were grouped, where the closest isolates based on their genetic similarity were 1 and 3 (TCL1F and ACE3F, respectively) with a coefficient of 0.96. In the same group, the other samples closest to each other were ACE5F and ACE6F with a coefficient of similarity of 0.94.

On the other hand, group II was formed by isolates ACE11F, TCC13F, TCCH18F, TCCH20F, MCS22F, where the samples most similar to each other were TCCH18F and MCS22F with a coefficient of 0.80. On the other hand, the sample TCC13F was totally different genetically to the rest of the samples with a coefficient of 0.59, so it was not grouped with the rest of the isolates (Figure 3).

Por otro lado, la muestra TCC13F fue totalmente diferente genéticamente al resto de las muestras con un coeficiente de 0.59, por lo que no se agrupó con el resto de los aislamientos (Figura 3).

### Conclusiones

En este estudio se puso a prueba la hipótesis de que existiría diversidad filogenética en aislamientos de *Foc* en bananos en el estado de Colima. Con base en los resultados obtenidos en el análisis de marcadores RAPD en al menos 17 aislamientos clasificados, esta hipótesis es aceptada.

### Conclusions

In this study, we were able to determine the phylogenetic diversity in isolates of *Foc* in banana plants growing in the state of Colima. The morphological characteristics of the 17 monosporic colonies of *Foc* were of the cotton-like type, of abundant aerial growth with different type of pigmentation, between which they emphasized white creamy-pink, white-pink and cottony-gray. This result agrees with the typical characteristics of the pathogen reported by Stover (1962), Leslie and Summerell (2006), and Batlle-Viera and Pérez-Vicente (2009).

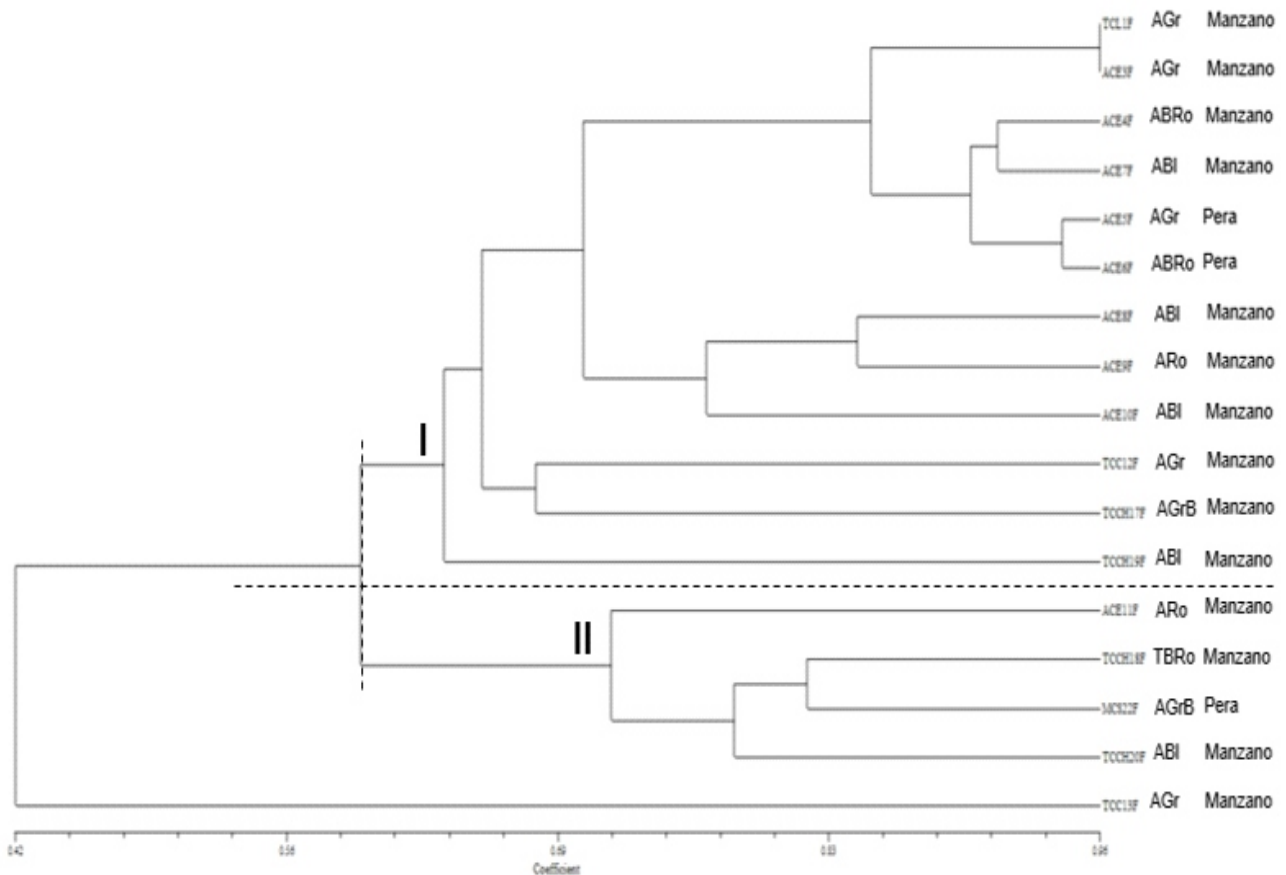


Figura 3. Dendrograma UPGMA de 17 aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* obtenidos de bananos en el estado de Colima, México. La clave de los aislamientos se describe en el Cuadro 2. Asimismo, se muestra el genotipo de cada banano.

Figura 3. UPGMA dendrogram of 17 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates from Colima state, México.

Las características morfológicas de las 17 colonias monospóricas de *Foc* resultaron del tipo algodonoso, de crecimiento aéreo abundante con diferente tipo de pigmentación, entre las que destacaron blanca cremosa-rosada, blanca-rosada y algodonosa-gris. Este resultado concuerda con las características típicas del patógeno reportado por Stover (1962), Leslie y Summerell (2006) y Batlle-Viera y Pérez-Vicente (2009).

En cuanto al uso de RAPDs, los resultados del porcentaje de polimorfismo y tamaño de amplicones generados con los oligonucleótidos evaluados en este estudio fueron similares a los reportados por Zambrano et al. (2000), quienes evaluaron este tipo de marcadores en la resistencia a *Fusarium oxysporum* en *Musa*, con 80.49% de polimorfismo, y amplicones entre 300-1300 pb. Como continuación de esta investigación, sería conveniente evaluar una mayor cantidad de oligonucleótidos decámeros para RAPDs con la finalidad de aumentar el número de bandas amplificadas y por consecuencia contar con datos sobre la reproducibilidad de la técnica, así como una mayor cobertura de secuencias genómicas para aumentar la confiabilidad del análisis filogenético.

El dendrograma generado en este trabajo es similar al obtenido por María da Silva et al. (2010), sobre un estudio de diversidad genética hecho con marcadores RAPDs en *Foc*, donde reportan la formación de dos grupos (I y II), el uno con 58 aislamientos y otro con solo tres. Por otra parte, los datos relacionados con los coeficientes de similitud obtenidos en este estudio también coinciden con los reportados por estos autores, demostrando con esto que la técnica RAPD presenta un alto potencial para estudiar la dinámica de la población y diversidad de *Foc*.

Con la finalidad de continuar con el análisis de la diversidad genética de *Foc* en México, será recomendable ampliar el número de aislamientos de otras regiones productoras de banano donde este hongo ya haya sido reportado.

Regarding the use of RAPDs, the results of the polymorphism percentage and size of amplicons generated with the oligonucleotides evaluated in this study were similar to those reported by Zambrano *et al.* (2000), who evaluated this type of markers in resistance to *Fusarium oxysporum* in *Musa*, with 80.49% polymorphism, and amplicons between 300-1300 bp. As a continuation of this research, it would be advisable to evaluate a greater number of decamers oligonucleotides for RAPDs in order to increase the number of amplified bands and, consequently, have data on the reproducibility of the technique, as well as greater coverage of genomic sequences to increase the reliability of phylogenetic analysis.

The dendrogram generated in this work is similar to that obtained by María da Silva *et al.* (2010), on a study of genetic diversity made with RAPDs markers in *Foc*, where they report the formation of two groups (I and II) of the isolates, group one with 58 isolates and the rest with only three. On the other hand, the data related to the coefficients of similarity obtained in this study also coincide with those reported by these authors, demonstrating that the RAPD technique has a high potential to study the population dynamics and diversity of *Foc*.

In order to continue with the analysis of the genetic diversity of *Foc* in Mexico, it will be advisable to expand the number of isolates from other banana producing regions where this fungus has already been reported.

## Acknowledgments

To the University of Colima and to the INIFAP experimental field Tecoman for the support for the realization of this project.

## Agradecimientos

A la Universidad de Colima y al INIFAP campo experimental Tecomán por el apoyo para la realización de este proyecto.

## Referencias

- Arteaga-Alcivar, F. J. (2015). Origen y evolución del banano. Ficha Técnica. Pp. 1-11.
- Avise, J. C. (1994). Molecular markers, natural history and evolution. *Journal of Evolutionary Biology*, 7, 511.
- Batlle-Viera, A., & Pérez-Vicente, L. (2009). Variabilidad genética de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en bananos y plátanos de Cuba. *Fitosanidad*, 13, 169-186.
- Bello-Pérez, L. A., Romero-Manilla, R., & Paredes-López, O. (2000). Preparation and properties of physically modified banana starch prepared by alcoholic-alkaline treatment. *Starch/Starke*, 52, 154-159.
- Bogale, M., Wingfield, B. D., Winfield, M. J., & Stenkamp, E. T. (2005). Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex. *Molecular Ecology Notes*, 5, 622-624.
- Dita, M. A., Waalwijk, C., Buddenhang, I. W., Souza-Jr., M. T., & Kema, H. J. (2010). A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. *Plant Pathology*, 59, 348-357.
- Fourie, G., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., & Viljoen, A. (2009). Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* vegetative compatibility groups. *Microbiology*, 75, 4770-4781.
- Leslie, J. F., & Sumner, B. A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Manhattan, USA: Copyright Clearance.
- Manzo-Sánchez, G. (2010). Transferencia de tecnología para el manejo fitosanitario de plagas y enfermedades en el cultivo del plátano. COFUPRO-Unidad operativa Michoacán. 1-28. Recuperado de:

## References

- [https://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q=cofupro+2010&btnG=](https://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=cofupro+2010&btnG=). Consultado el 21 de septiembre de 2017.
- Manzo-Sánchez, G., Guzmán-González, S., Rodríguez-García, C. M., James, A., & Orozco-Santos, M. (2005). Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23, 87-96.
- Manzo-Sánchez, G., Rosales-Bonilla, N.R., Buenrostro-Nava, M.T., Guzmán-González, S., Canto Canche, B.B., Orozco-Santos, M. (2017). Diversidad genética de cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en bananos de México. *Revista Biotecnología y Sustentabilidad* 1, 37-42.
- María da Silva, C., Harri-Hinz, R., João-Stadnik, M., Pereira, A., & Adami-Teacenco, F. (2010). Diversidade genética por marcadores moleculares em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no estado de Santa Catarina. *Ciencia Rural*, 40, 2480-2485.
- Nadal-Medina, R., Manzo-Sánchez, G., Orozco-Romero, J. Orozco-Santos, M., & Guzmán-González, S. (2009). Diversidad genética de bananos y plátanos (*Musa* spp.) determinada mediante marcadores RAPD. *RevistaFitotecnia Mexicana*, 32, 1-7.
- Nei, M. (1973). Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 70, 3321-3323.
- Nei, M., & Li, M. H. (1979). Mathematical model for the studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 76, 5269-5273.
- Pérez-Vicente, L. (2015). Banana farm best practices for prevention of *Fusarium* wilt TR4 and other exotic banana. *Fitosanidad*, 19, 243-250.
- Pérez-Vicente, L., Batlle-Viera, A., Chacon-Benazet, J., & Montenegro-Moracen, V. (2009). Reacción de clones naturales e híbridos de la FHIA de bananos y plátanos a las poblaciones de Cuba de *Fusarium*

- oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal de la marchitez por *Fusarium* o mal de panamá. *Fitosanidad*, 13, 237-242.
- Porteles, M. Rodríguez, D., Ulacio, D., & Torres, J. (2015). Determinación de razas y grupos de compatibilidad vegetativa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en *Musa*, en los estados de Carabobo, Cojedes, Guarico y Miranda, Venezuela. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*, 27, 334-340.
- Rodríguez-Gaviria, P. A., & Cayón, G. (2008). Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de banano. *Agronomía Colombiana*, 26, 256-265.
- Rohlf, D. J. (2000). NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0 Exeter software, New York.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2015). Recuperado de: [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/icultivo/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp) Consultado el 06 de septiembre de 2017.
- Stover, R. H. (1962). *Fusarium* wilt (Panama disease) of bananas and other *Musa* species, *Phytopathological* 4, CMI, Kew, Surrey, England.
- Visser, M. (2003). Molecular biological studies of *Fusarium* wilt pathogen of banana in South Africa. Pretoria South Africa: University of Pretoria.
- Yuzsely-Zambrano, A., Martínez, G., Gutiérrez, Z., Manzanilla, E., Vicente-Villardón, J. L., & Demey, J. R. (2000). Marcador RAPD asociado a la resistencia a *Fusarium oxysporum* en *Musa*. *Interciencia*, 32, 775-779.