

Fast method applied in previous evaluation of resistance of banana to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Método rápido aplicado en evaluación previa de resistencia del banano a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Rómulo García-Velasco, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario Tenancingo, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km 1.5, Tenancingo, Estado de México, CP 52400, México; **Nayanci Portal-González**, **Ramón Santos-Bermúdez**, Universidad Técnica “Luis Vargas Torres” de Esmeraldas, Campus Mútiles, San Mateo, Esmeraldas, CP 080150, Ecuador; **Ermis Yanes-Paz**, **José C. Lorenzo-Feijoo**, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez, Carretera a Morón Km 9, Ciego de Ávila, CP 69450, Cuba; **Barbarita Companioni-González***, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro, No. 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, CP 25315, México. *Autor para correspondencia: bcompanioni2007@gmail.com.

Recibido: 01 de Abril, 2020.

Aceptado: 08 de Junio, 2020.

García-Velasco R, Portal-González N, Santos-Bermúdez R, Yanes-Paz E, Lorenzo-Feijoo JC and Companioni-González B. 2020. Fast method applied in previous evaluation of resistance of banana to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 384-397.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2004-1

Primera publicación DOI: 17 de Julio, 2020.

First DOI publication: July 17, 2020.

Resumen. En trabajos previos se desarrolló un método para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia de cultivares de banano a la marchitez por *Fusarium*. El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar el método para la diferenciación rápida a la enfermedad mediante la utilización del filtrado del cultivo de *Fusarium oxysporum* f.

Abstract. In previous works, a method to differentiate at leaf level the resistance of banana cultivars to *Fusarium* wilt was developed. The present study was carried out to evaluate such method by using fungus culture filtrates from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 VCG [01210] and race 2 VCG [0124/125] strains. Fungus culture filtrates were obtained during *in vitro* growth of the pathogen and the response of *Musa* spp cultivars to fungus culture filtrates was determined. The 15- and 29-days-old host-specific culture filtrates from both races 1 and race 2 strains were able to differentiate more than 93% of individuals with a known response to the pathogen *in vivo*. We demonstrated that resistance or susceptibility to banana *Fusarium* wilt could be differentiated with the use of culture filtrates from diverse population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and a reproducible bioassay on banana

sp. *cubense* raza 1 GCV [01210] y raza 2 GCV [0124/125]. Se procedió a la obtención de filtrados del cultivo del hongo durante el crecimiento *in vitro* del patógeno. Se determinó la respuesta de cultivares de *Musa* spp., a la aplicación de filtrados del hongo para ambas razas. Los filtrados del cultivo del hongo de 15 y 29 días obtenidos a partir de las cepas de las razas 1 y 2, lograron diferenciar más del 93% de los individuos con una respuesta conocida al patógeno *in vivo*. Los resultados obtenidos demostraron que la resistencia o susceptibilidad del banano a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* puede diferenciarse a nivel foliar con el uso de filtrados del cultivo del hongo para diferentes poblaciones del patógeno; lo cual podría ser aplicable en los programas de mejoramiento genético de musáceas tanto convencional como biotecnológicas.

Palabras clave: selección de resistencia, filtrados del hongo, enfermedad, *Musa* spp.

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) están entre los cultivos más importantes en los países del trópico y el subtropical. Estos ocupan el cuarto lugar en importancia a escala mundial después del arroz, el trigo y el maíz (FAO, 2017). Sin embargo, la producción de estos cultivos se encuentra amenazada por el ataque de enfermedades como el Mal de Panamá o marchitez por *Fusarium*. Esta enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) representa una de las enfermedades más destructivas y de importancia económica en el género *Musa* (Ploetz, 2015). El control de esta enfermedad con el uso de agroquímicos resulta costoso y causa serios daños al medio ambiente. Por ello, en los últimos años se ha considerado al mejoramiento genético para la resistencia como la solución más adecuada. Toda técnica del mejoramiento necesita de un procedimiento para la selección

detached leaves. Such results could be applicable in both conventional and biotechnological *Musaceae* breeding program.

Key words: resistance selection, fungus filtrates, disease, *Musa* spp.

Bananas and banana trees (*Musa* spp.) are among the most important crops in the countries of the tropics and subtropics. Worldwide, they are the fourth most important, after rice, wheat and maize (FAO, 2017). However, their production is threatened by diseases such as the Panama disease or the *Fusarium* wilt. This disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), is one of the most destructive and economically important in the genus *Musa* (Ploetz, 2015). The control of this disease with agrochemicals is costly and causes serious damages to the environment. Due to this, in recent years, breeding for resistance has been considered the most adequate solution. Every breeding technique requires a procedure for the positive selection of genotypes with the best traits (Buddenhagen, 2009). In earlier investigations, a method was developed to differentiate the resistance of banana tree cultivars at FOC race 1, at a foliar level, with the use of filtrates of the fungus culture (Companiononi *et al.*, 2003). However, the results for their introduction into the breeding programs in the crop on a massive scale need to be validated for different races of the fungus (isolations belonging to the group of plant compatibility (VCG) [01210] race 1; and the isolation belonging to VCG [0124/125] race 2. The present work was carried out with the aim of evaluating the method for the rapid differentiation of the Panama disease using the filtrate of the FOC culture FOC race 1 VCG [01210] and race 2 VCG [0124/125].

positiva de los genotipos con cualidades superiores (Buddenhagen, 2009). En trabajos previos se desarrolló un método para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia de cultivares de banano a FOC raza 1 mediante la utilización de filtrados del cultivo del hongo (Companioni *et al.*, 2003). No obstante, los resultados para su introducción masiva en los programas de mejoramiento genético en el cultivo requieren ser validados para diferentes razas del hongo (aislado perteneciente al grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) [01210] raza 1; y el aislado perteneciente al GCV [0124/125] raza 2. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el método para la diferenciación rápida del Mal de Panamá mediante la utilización del filtrado del cultivo de FOC raza 1 GCV [01210] y raza 2 GCV [0124/125].

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Interacción Planta-Patógeno del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez”, Cuba.

Material vegetal. Se utilizaron muestras foliares de plantas de banano de ocho a nueve meses de plantadas en el Banco de Germoplasma de Banano del Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales de Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. Todos los cultivares de banano utilizados fueron clasificados previamente en resistentes o susceptibles a FOC raza 1 y 2, por Pérez *et al.* (2004).

Cepas fúngicas. FOC raza 1 GCV [01210]; y raza 2 GCV [0124/125], procedentes del cepario del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana, Cuba.

Análisis estadístico. En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el utilitario *Statistical Package for Social Sciences (SPSS para Windows, versión 8, Copyright SPSS Inc., 1989-1997)*.

Research was carried out in the Plant-Pathogen Interaction Laboratory of the Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez” University, Cuba.

Plant material. We used foliar samples of banana trees eight to nine months after being planted in the Banana Germplasm Bank of the National Institute of Research in Tropical Foods of Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. All banana cultivars used were previously classified as resistant or susceptible to FOC race 1 and 2, by Pérez *et al.* (2004).

Fungal strains. FOC race 1 VCG [01210]; and race 2 VCG [0124/125], from the strain collection of the Plant Health Research Institute (INISAV), Havana, Cuba.

Statistical analysis. The statistical processing of data required the use of the *Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows, version 8, Copyright SPSS Inc., 1989-1997)*.

In the first part of the investigation, fungus culture filtrates were obtained during the *in vitro* growth of FOC race 1 VCG [01210]; and race 2 VCG [0124/125]. For this purpose, the optimum moment for the harvest of the fungus culture filtrate of races 1 and 2 was determined on a daily basis for 30 days. The following determinations were carried out: absorbance of the fungus culture filtrate (A), fresh mass of the fungus culture (g) and the phytotoxic activity of the fungus culture filtrates.

Filtrations of the fungus culture (FC). In order to obtain the culture in a liquid medium of the FOC strains corresponding to races 1 and 2 of the fungus, we took mycelium discs, 8 mm in diameter near the periphery of the culture grown in Petri dishes with a Potato Dextrose Agar culture medium. We added 100 mL of Czapek culture medium, modified according to Companioni *et al.* (2004) with a pH of

En la primera parte de la experimentación se procedió a la obtención de filtrados del cultivo del hongo durante el crecimiento *in vitro* de FOC raza 1 GCV [01210]; y raza 2 GCV [0124/125]. Para ello se determinó el momento óptimo para la cosecha del filtrado del cultivo del hongo de las razas 1 y 2 de forma diaria hasta los 30 días. Se realizaron las siguientes determinaciones: absorbancia del filtrado de cultivo del hongo (A), masa fresca del cultivo del hongo (g) y la actividad fitotóxica de los filtrados de cultivo del hongo.

Filtrados del cultivo del hongo (FC). Para obtener el cultivo en medio líquido de las cepas de FOC correspondientes a la raza 1 y 2 del hongo; se tomaron discos de micelio de 8 mm de diámetro próximos a la periferia de la colonia crecida en placas de Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa. Se añadió 100 mL de medio de cultivo Caldo Czapek modificado según Companioni *et al.* (2004) con un pH 5.5, en erlenmeyers de 250 mL de capacidad. Cada erlenmeyer se inoculó con un disco de micelio, y se incubó a 28 ± 2 °C, $56 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, y con un fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Los FC del hongo se cosecharon de forma diaria hasta los 30 días, para ambas razas del hongo. En cada uno de los tiempos de evaluación se colectaron tres erlenmeyers con un volumen de 100 mL de medio de cultivo inoculado. El medio de cultivo líquido se filtró en cada uno de los tiempos evaluados a través de cuatro capas de gasa y luego por papel de filtro Whatman No. 1. Posteriormente, se determinó la masa fresca del cultivo del hongo para determinar el crecimiento del microorganismo. Antes de la determinación de la absorbancia; y la actividad fitotóxica de los FC del hongo, el FC se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga Sigma-201M para eliminar los restos de micelio y conidios. El sobrenadante se pasó a través de filtros con poros

5.5, in 250 mL Erlenmeyer flasks. Each Erlenmeyer was inoculated with a mycelium disk and incubated at 28 ± 2 °C, $56 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ of light density and with a photoperiod of 12 hours light/12 hours darkness. The fungal FCs were harvested on a daily basis for 30 days for both fungal races. In each one of the evaluation times, three Erlenmeyer flasks were collected with a volume of 100 mL of inoculated culture medium. The liquid culture medium was filtered in each of the times evaluated through four layers of fat, and then through Whatman No. 1 filter paper. The fresh mass of the fungal culture was then determined in order to determine the growth of the microorganism. Before determining the absorbance and the phytotoxic activity of the fungus FC, the FC was centrifuged at 8000 rpm for 20 minutes, using a Sigma-201M centrifuge to eliminate all the remaining mycelia and conidia. The supernatant was poured through filters with pores, 0.22 mm in diameter (Sartorius, NG, Göttingen, Germany).

Absorbance of the fungal FC. The fungal FCs obtained for both pathogen races were analyzed for absorbance in the UV region of the spectrum. For this, 1 mL aliquots of the fungal FC were diluted 1/25 in sterile distilled water, and the absorbance was measured from 250 to 300 nm in a UV-Vis spectrophotometer (LKB-Pharmacia).

Phytotoxic activity of the fungal FC. This was determined with the bioassay on banana detached leaves according to Companioni *et al.* (2003) in each time evaluated (1 to 30 days). Mid-aged leaves were collected, according to their position on the plant (leaves 3, 4, 5) of the cultivar Gros Michel (group AAA, susceptible to race 1); and Bluggoe (group ABB, susceptible to race 2). They were washed for 20 minutes with a commercial detergent, rinsed with sterile distilled water, and dried using Whatman No. 1 filter paper. Holes

de 0.22 mm de diámetro (Sartorius, NG, Göttingen, Alemania).

Absorbancia del FC del hongo. A los FC del hongo obtenidos para ambas razas del patógeno, se les realizó el análisis de la absorbancia en la región UV del espectro. Para ello alícuotas de 1 mL del FC del hongo se diluyeron 1/25 en agua destilada estéril; y se midió la absorbancia desde 250 a 300 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (LKB-Pharmacia).

Actividad fitotóxica del FC del hongo. Se determinó mediante el bioensayo de punteadura según Companioni *et al.* (2003) en cada tiempo evaluado (1 hasta 30 días). Se colectaron hojas de mediana edad según la posición en la planta (hojas 3, 4, 5) del cultivar Gros Michel (grupo AAA, susceptible a raza 1); y Bluggoe (grupo ABB, susceptible a raza 2). Estas se lavaron durante 20 minutos con detergente comercial, se enjuagaron con agua destilada estéril; y se secaron con papel de filtro Whatman No. 1. Se realizaron punteaduras con una aguja estéril sobre el lado adaxial del limbo de la hoja con 3 cm de separación entre ellas. Después del daño, se agregaron 5 μL del FC del hongo colectado en cada tiempo evaluado. Las hojas se incubaron a $28\pm 2^\circ\text{C}$, $56 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad y 70% de humedad relativa por 48 horas. Transcurridas las 48 horas se evaluó la actividad fitotóxica de los FC del hongo, a través de la expresión sintomatológica de necrosis formada alrededor del punto de aplicación del FC del hongo, expresada como área de la lesión elíptica (mm^2).

El medio de cultivo Caldo Czapek, no inoculado con el hongo e incubado como se describió, se utilizó como tratamiento testigo para todos los experimentos evaluados en este trabajo. En este experimento, cada tratamiento incluyó tres hojas de plantas diferentes (18 heridas/hoja). Posteriormente,

were made with a sterilized needle on the adaxial side of the limbo of the leaf with a 3 cm separation between them. After the damage, 5 μL of the fungal FC of the fungus gathered in each time evaluated, were added. The leaves were incubated at $28\pm 2^\circ\text{C}$, $56 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ of light intensity, a photoperiod of 12 hours light/12 hours darkness and a relative humidity of 70% for 48 hours. After this time, the phytotoxic activity of the fungal FCs was evaluated, through the symptomatological expression of necrosis formed around the point of application of the fungal FC, expressed as the area of the elliptical lesion (mm^2).

The Czapek medium, not inoculated and incubated as described, was used as a control treatment for all the experiments evaluated in this work. In this experiment, each treatment included three leaves from different plants (18 lesions/leaf). Later, we determined the response of *Musa* spp. Cultivars to the application of the fungal FC of races 1 and 2, evaluated by the bioassay on banana detached leaves following Companioni *et al.* (2003). Fifteen banana cultivars with different levels of resistance to the *in vivo* pathogen were compared, following Pérez *et al.* (2004). The FC of race 1 of FOC was harvested after 15 days; and race 2, 29 days after inoculation in the Czapek medium.

Based on the absorbance values (250-300 nm) of the FC of the fungus obtained during the *in vitro* growth of the strain of FOC race 1, there are three crucial moments of excretion of metabolites into the culture medium, which correspond to days 15-16, 21-23 and 29-30 days of cultivation respectively (Figure 1). The highest level of absorbance was registered 15 days after planting, with 0.340. However, in the FOC race 2 culture filtrates, the highest absorbance levels were found on days 29 and 30 of cultivation (0.755 and 0.724 respectively), which resulted higher than those reached by FOC race 1 on day 15 of cultivation

se determinó la respuesta de cultivares de *Musa* spp., a la aplicación de FC del hongo de la raza 1 y 2, evaluada por el bioensayo de punteadura en hojas de banano según Companioni *et al.* (2003). Se compararon quince cultivares de bananos con diferentes niveles de resistencia frente al patógeno *in vivo* según Pérez *et al.* (2004). El FC de la raza 1 de FOC se cosechó a los 15 días; y la raza 2 a los 29 días después de la inoculación en el medio de cultivo Caldo Czapek.

Sustentado en los valores de absorbancia (250-300 nm) de los FC del hongo obtenidos durante el crecimiento *in vitro* de la cepa de FOC raza 1, se aprecian tres momentos fundamentales de excreción de metabolitos al medio de cultivo, correspondientes a los 15-16, 21-23 y 29-30 días de cultivo respectivamente (Figura 1). El máximo de absorbancia se registró a los 15 días de cultivo con 0.340. Sin embargo, en los filtrados de cultivo de FOC raza 2 se detectaron los mayores valores de absorbancia a los 29 y 30 días de cultivo (0.755 y 0.724 respectivamente), que resultaron superiores a los alcanzados por FOC raza 1 a los 15 días de cultivo (Figura 2). Las especies del género *Fusarium* producen una amplia variedad de metabolitos secundarios (Sieber *et al.*, 2014). También es bien conocido que la expresión del metabolismo microbiano no está necesariamente asociada al máximo incremento de la masa del micelio sino a diferentes momentos en el crecimiento de los microorganismos; en dependencia de sus fuentes nutricionales y las condiciones de su cultivo *in vitro* (Etzerodt *et al.*, 2016)

Las condiciones de cultivo para ambas cepas de FOC posibilitó la excreción al medio, de metabolitos extracelulares producidos por el patógeno en diferentes momentos de su crecimiento *in vitro*. Los cuales pudieran estar asociado con la patogenicidad y/o la virulencia de estas cepas patogénicas

(Figure 2). The species of the genus *Fusarium* produce a wide variety of secondary metabolites (Sieber *et al.*, 2014). It is also well-known that the expression of the microbial metabolism is not necessarily related to the maximum increase of the myceliar mass, but rather to different moments in the growth of the microorganisms, depending on its sources of nourishment and the conditions of its *in vitro* cultivation (Etzerodt *et al.*, 2016).

The cultivation conditions for both FOC strains helped the excretion into the medium of extracellular metabolites produced by the pathogen in different moments of its growth *in vitro*, which could be related to the pathogenicity and/or the virulence of these pathogenic strains.

When the FOC race 1 [VCG 01210] was cultivated in a liquid medium, no rapid increase in the growth of the evaluated microorganism was found on the fresh mass for the first 18. This result may be related to a slow adaptation of the fungal strain to the culture medium, as well as to other conditions established for their growth and development. After day 18, the pathogen grows exponentially, and a maximum of 12.2 g was recorded for its fresh mass 22 days after inoculation (Figure 3A). However, related to the excretion of extracellular metabolites by the pathogen, the effect of the FC of the fungus on the responses of the foliar tissues of susceptible plants displayed notorious differences in diverse fungal cultivation times (Figure 3C). In general terms, although several moments can be observed with light phytotoxic activity of the FC, the highest levels were found on cultivation days 15-16, 21-23 and 29-30. The highest levels of phytotoxic activity match the increases in the absorbance of the culture filtrate and therefore, the synthesis of extracellular microbial metabolites. In general terms, the FC obtained showed specificity in their way of action. The highest levels of phytotoxicity

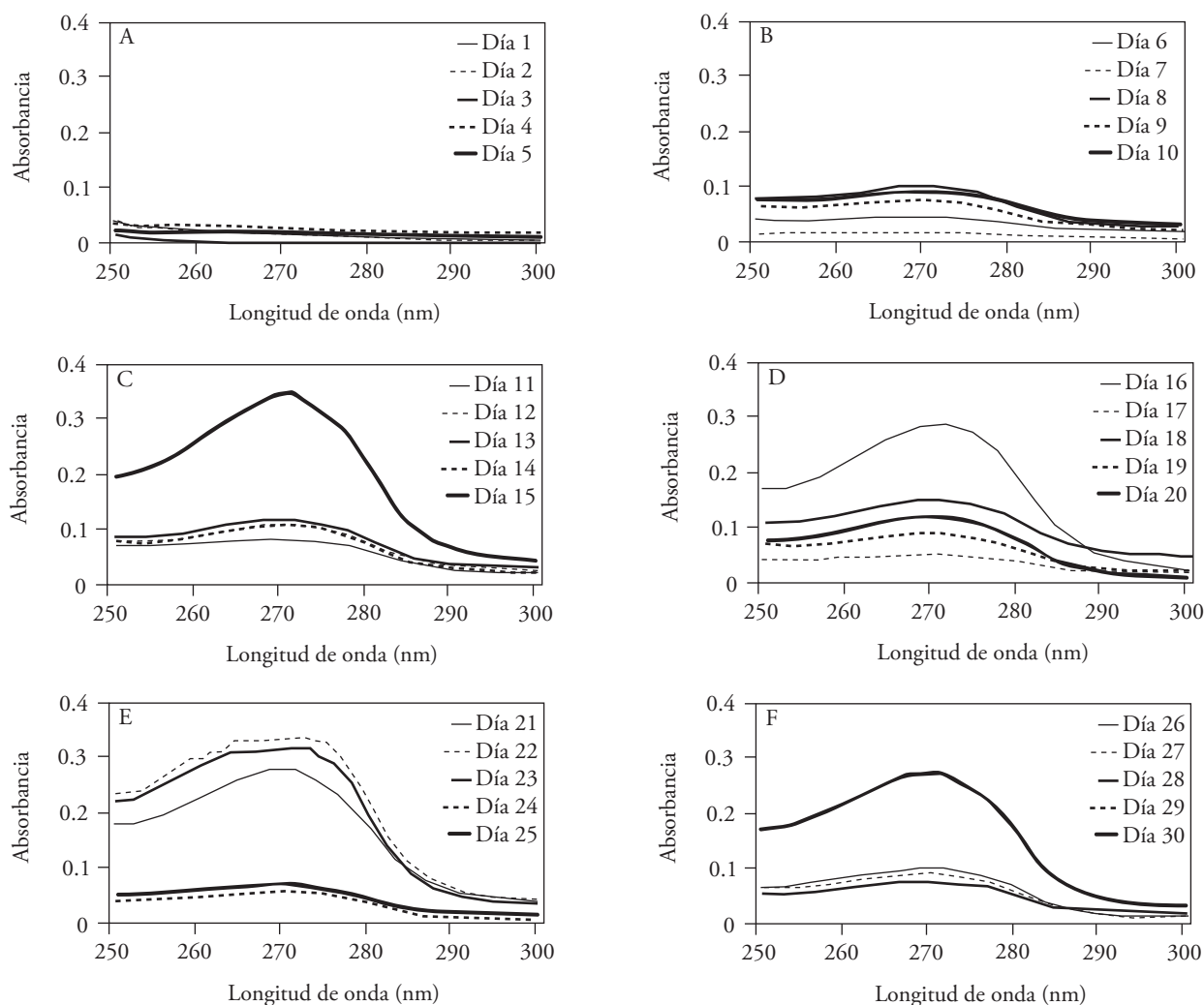


Figura 1. Excreción al medio de cultivo de metabolitos durante el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 GCV [01210] en Caldo Czapek modificado.
Figure 1. Excretion to the metabolite culture medium during the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 VCG [01210] in a modified Czapek medium.

Cuando FOC raza 1 [GCV 01210] se cultivó en medio líquido, no se apreció un incremento rápido del crecimiento del microorganismo evaluado en masa fresca en los primeros 18 días. Este resultado puede ser asociado a una lenta adaptación de la cepa fúngica al medio de cultivo; y a otras condiciones establecidas para su crecimiento y desarrollo. A partir del día 18 el patógeno crece exponencialmente, y se registró un máximo de 12.2 g en su masa

evaluated, such as the area of the lesion on the susceptible genotype, were obtained when the FC cultivated on days 15-16 during the growth of FOC race 1 in the Czapek medium. According to Brakhage (2013), the production of microbial metabolites takes place in different phases of the growth curve of microorganisms, broadly linked to a particular phase for each one of them, yet highly influenced by the conditions of cultivation. On the

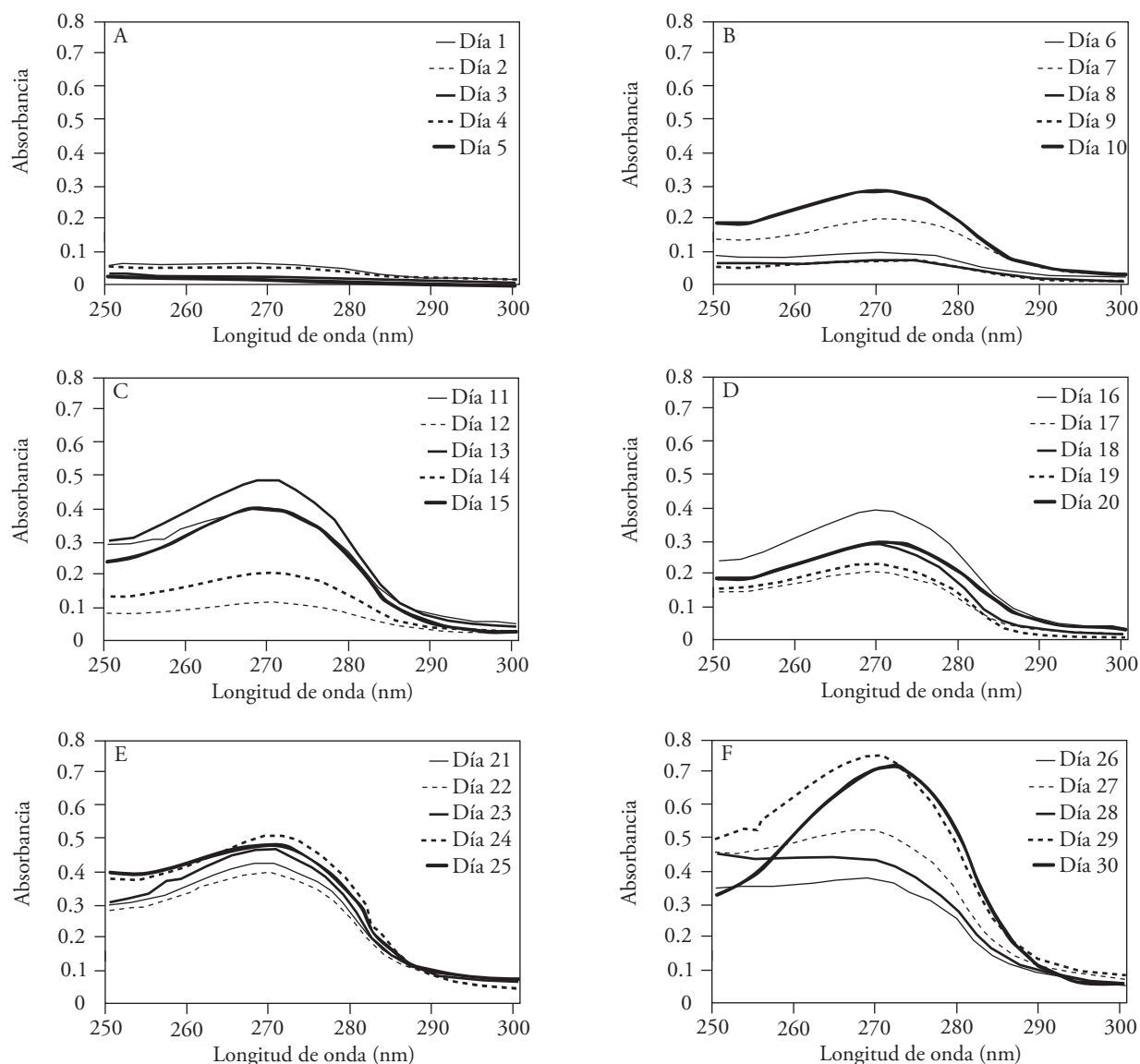


Figura 2. Excreción al medio de cultivo de metabolitos durante el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2 GCV [0124/125] en Caldo Czapek modificado.

Figure 2. Excretion to the metabolite culture medium during the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2 VCG [0124/125] in a modified Czapek medium.

fresca a los 22 días posteriores a la inoculación (Figura 3A). Sin embargo, asociado con la excreción de metabolitos extracelulares por el patógeno, el efecto de los FC del hongo en las respuestas de los tejidos foliares de plantas susceptibles exhibió notorias diferencias en diversos tiempos de cultivo

other hand, Zhang *et al.* (2015) showed that the microbial phytotoxins are metabolic products of the pathogen, characterized as pathogenicity and/or virulence factors. Based on the results obtained in the present investigation, these metabolical products are synthesized by the pathogen in a

del hongo (Figura 3C). De modo general, aunque pueden apreciarse varios momentos con ligera actividad fitotóxica del FC, los mayores niveles se detectaron a los 15-16, 21-23 y 29-30 días de cultivo. Los mayores niveles de actividad fitotóxica se corresponden con los incrementos en la absorbancia del filtrado de cultivo y por ende la síntesis de metabolitos microbianos extracelulares. En sentido general, los FC obtenidos mostraron especificidad en su modo de acción. Los mayores niveles de fitotoxicidad evaluados como área de la lesión sobre el genotipo susceptible, se lograron cuando el FC que se cosechó a 15-16 días durante el crecimiento

certain growth phase. The growth curve of the race 2 fungus displays increases in the fresh mass of the microorganism starting on day 9 after cultivation, reaching maximum values 18 days after inoculating in the culture medium (16.1 g) (Figure 3B). This displays a greater adaptation and assimilation of the components of the culture medium under the conditions established for its growth *in vitro* in relation to the strain of FOC race 1. Meanwhile, FOC race 2 is able to constantly produce phytotoxic molecules 10 days after it begins growing under the same conditions established for both strains (Figure 3D). However, although the evaluation of the

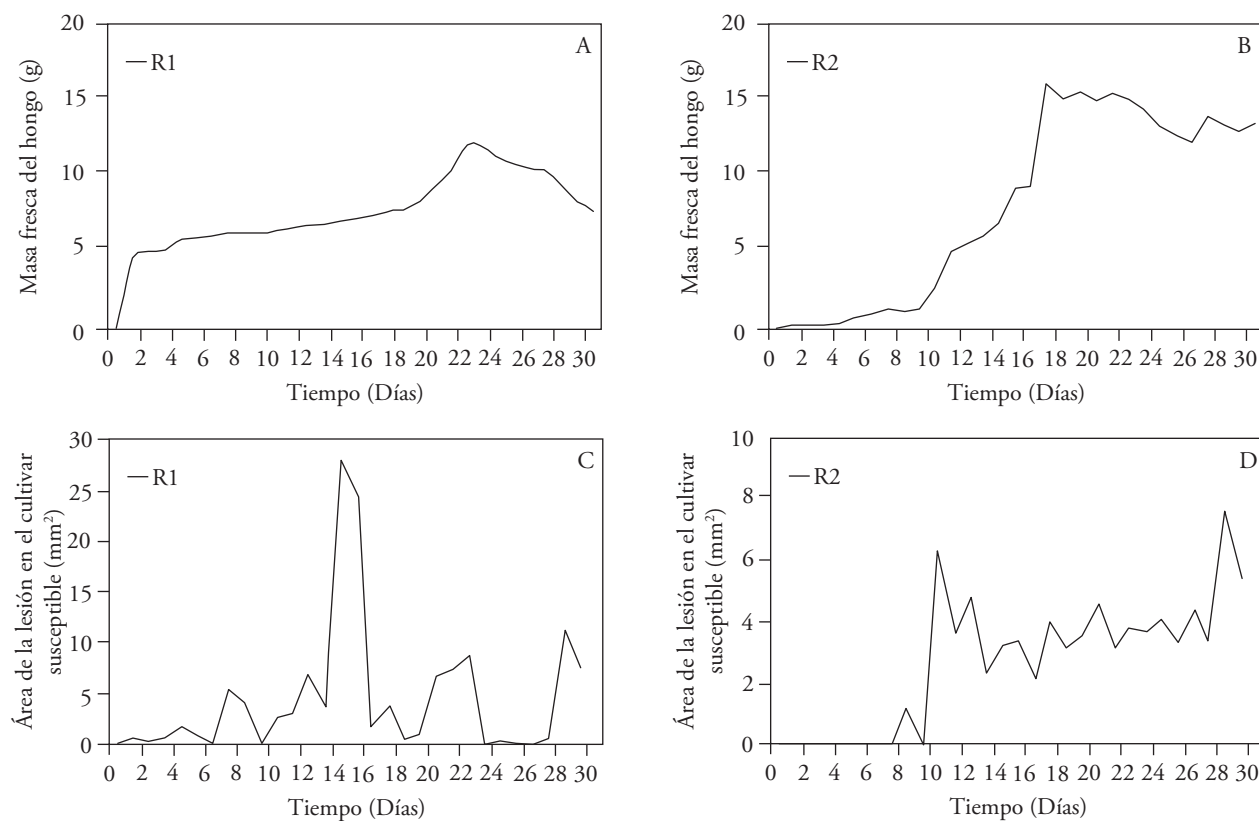


Figura 3. Actividad fitotóxica de filtrados de cultivo cosechados diariamente durante el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 y 2. Masa fresca del patógeno (A y B), y área de la lesión en cultivares de banana susceptibles a la enfermedad *in vivo* (C y D).

Figure 3. Phytotoxic activity of filtrates of crops planted on a daily basis during the *in vitro* growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* races 1 and 2. Fresh mass of the pathogen (A and B), and area of the lesion in banana tree cultivars susceptible to the disease *in vivo* (C and D).

de FOC raza 1 en el medio de cultivo Caldo Czapek. Según Brakhage (2013), la producción de los metabolitos microbianos ocurre en diferentes fases de la curva de crecimiento de los microorganismos, estrechamente relacionada a una fase en particular para cada uno de ellos; pero muy influenciada por las condiciones de cultivo. Por otro lado, Zhang *et al.* (2015) demostraron que las fitotoxinas microbianas son productos metabólicos del patógeno, caracterizados como factores de patogenicidad y/o de virulencia. Basado en los resultados obtenidos en el presente trabajo, estos productos metabólicos son sintetizados por el patógeno en determinada fase de crecimiento. La curva de crecimiento del hongo raza 2 muestra incrementos de la masa fresca del microorganismo a partir de los nueve días de cultivo, alcanzando valores máximos a los 18 días posteriores a la inoculación en el medio de cultivo (16.1 g) (Figura 3B). Lo cual evidencia una mayor adaptación y asimilación de los componentes del medio de cultivo bajo las condiciones establecidas para su crecimiento *in vitro* en relación a la cepa de la raza 1 de FOC. Mientras que FOC raza 2 es capaz de producir moléculas fitotóxicas de forma continua a partir de los 10 días de su crecimiento bajo las mismas condiciones establecidas para ambas cepas (Figura 3D). Sin embargo, aunque la evaluación de la actividad fitotóxica muestra la excreción de metabolitos fitotóxicos al medio de cultivo de forma continua, pudiera existir un proceso de conversión de los compuestos inicialmente sintetizados a otros que aún conservan la mostrada actividad fitotóxica. En el cultivar Bluggoe (susceptible) se observan daños, medidos como área de la lesión, de forma continua con los FC de 11 a 30 días de cultivo del hongo. Pero, a los 29 días del cultivo del patógeno en medio líquido se apreció un mayor daño sobre los tejidos de las plantas susceptibles. Varios investigadores en múltiples interacciones planta-patógeno han descrito la

phytotoxic activity shows the constant excretion of phytotoxic metabolites into the culture medium, there may be a process of conversion of the initially synthesized components into others that still maintain the displayed phytotoxic activity. The Bluggoe cultivar (susceptible) displays damages, measured as area of the lesion, in a continuous manner with the FCs of 11 to 30 days of cultivation of the fungus. Nevertheless, 29 days after the cultivation of the pathogen in the liquid medium, a greater damage was observed on the tissues of susceptible plants. Several researchers, on multiple plant-pathogen interactions, have described the extraction of culture filtrates with phytotoxic activities for their use as precocious selection agents for resistance. In addition, schemes have been developed for the isolation and purification of the metabolites involved in the selective response of plants (Ramírez *et al.*, 2015). The precocious selection of resistance in plants faced with different '*formae specialis*' of *Fusarium oxysporum* has been a crucial objective in conventional and biotechnological breeding. Raw extracts and pure metabolites of FOC cultivations have been used in the selection of resistant plants (Companiononi *et al.*, 2003; Saraswathil *et al.*, 2016).

The cultivars observed to be the most susceptible to the FC of race 1 were Manzano Criollo, Gros Michel, Pisang Lilin and Yangambi km 5, with no statistical differences between them, followed by the del cultivar Paka. All FHIA cultivars evaluated (01, 02, 03, 04, 18 and 21) were observed to be resistant to the phytotoxic action of the FC race 1 VCG [01210], without statistical differences in their respective responses. Cultivars Burro Criollo, Pelipita, Pisang jari guaya and Bluggoe also proved to be resistant, with a similar response to those of the FHIA (Table 1).

Pérez *et al.* (2004) determined, among other studies, the reaction of different cultivars towards

obtención de filtrados de cultivo con actividad fitotóxica para su uso como agentes de selección precoz de resistencia. Además, se han desarrollado esquemas para el aislamiento y purificación de los metabolitos involucrados en la respuesta selectiva de las plantas (Ramírez *et al.*, 2015). La selección precoz de resistencia en plantas frente a diferentes '*formae specialis*' de *Fusarium oxysporum* ha sido un objetivo primordial en el mejoramiento genético convencional y biotecnológico. Extractos crudos y metabolitos puros de cultivos de FOC se han usado en la selección de plantas resistentes (Companioni *et al.*, 2003; Saraswathil *et al.*, 2016).

Los cultivares que se mostraron más susceptibles al FC de la raza 1 fueron Manzano Criollo, Gros Michel, Pisang Lilin y Yangambi km 5, sin diferencias estadísticas entre ellos, seguido del cultivar Paka. Todos los cultivares FHIA evaluados (01, 02, 03, 04, 18 y 21) se mostraron resistentes a la acción fitotóxica del FC raza 1 GCV [01210], sin diferencias estadísticas en sus respectivas respuestas. También se mostraron resistentes los cultivares Burro Criollo, Pelipita, Pisang jari guaya y Bluggoe, con respuesta similar a la de los FHIA (Cuadro 1).

Pérez *et al.* (2004) determinaron, entre otros estudios, la reacción de diferentes cultivares frente a las poblaciones de FOC de Cuba, y la frecuencia de plantas enfermas. Sus resultados muestran que la raza 1 afecta con mayor frecuencia los cultivares Gros Michel, Yangambi km 5, Paka y Manzano. Mientras que menores afectaciones mostraron Pisang Lilin, Pisang jari buaya, FHIA03 y FHIA-18. En los resultados descritos en este trabajo, el bioensayo del FC del hongo raza 1 en hojas del cultivar Pisang Lilin mostró una reacción de susceptibilidad, en contraposición a la respuesta de tolerancia determinada previamente en condiciones de campo por Pérez *et al.* (2004). Por su parte, el FC de 29 días de FOC raza 2 causó los mayores daños a los

the FOC populations in Cuba, and the frequency of diseased plants. Their results show that race 1 most frequently affects the cultivars Gros Michel, Yangambi km 5, Paka and Manzano Criollo, while Pisang Lilin, Pisang jari buaya, FHIA03 and FHIA-18 showed the least effects. In the results described in this work, the bioassay of the FC of the race 1 fungus on Pisang Lilin cultivar leaves displayed a reaction of susceptibility, as opposed to the response of tolerance, determined previously under field conditions by Pérez *et al.* (2004). On the other hand, the 29-day FCs of FOC race 2 caused the greatest damage on cultivars Burro Criollo, Pisang jari guaya, FHIA-03 and Bluggoe, while in cultivars Manzano Criollo, Gros Michel, Pelipita, Pisang Lilin, Paka and Yangambi Km 5, they displayed a similar resistance response to the evaluated FHIA. The bioassay of the cultivar Pisang jari buaya revealed a susceptibility response, unlike the tolerance displayed in the mentioned field evaluations. In this sense, the problem concerning the resistance tests under *in vivo* is the task of ensuring a homogenous distribution of the inoculant of the pathogen in all plants to be evaluated. Some plants may have received an excessive amount of the inoculant, while the others may not receive enough inoculant to develop the disease (Mert and Karakaya, 2003). Additionally, there are concerns over the effect of the environment on inoculated plants studied in the field (Ribeiro *et al.*, 2011). On the other hand, it is not always possible to characterize the FOC populations using pathogenicity tests, due to the interactions of the plant with the environment. There is proven evidence of the differential response of plants under different environmental conditions to established differential groups (Li *et al.*, 2013). The FCs of 15 and 29 days obtained from FOC strains of races 1 and 2, were able to differentiate over 93% of the individuals with a known response to

Cuadro 1. Respuesta de los cultivares de *Musa* spp., a la aplicación de filtrados del cultivo del hongo de la raza 1 y 2, evaluado mediante el bioensayo de punteadura en hojas de banano; y en evaluaciones previas de campo frente al microorganismo *in vivo*.

Table 1. Responses of the *Musa* spp. cultivars to the application of filtrates of the fungus culture of races 1 and 2, evaluated with the bioassay on banana detached leaves and in earlier field evaluations faced with the microorganism *in vivo*.

| Cultivares | Área de la lesión (mm ²) | |
|------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | FOC raza 1 GCV [01210] (Día 15) | FOC raza 2 GCV [0124/125] (Día 29) |
| Manzano Criollo (AAB) | *** 53.6 a | * 2.3 b |
| Gros Michel (AAA) | *** 55.4 a | * 2.8 b |
| Yangambi Km 5 (AAA) | *** 55.3 a | ** 4.1 b |
| Paka (AA) | *** 52.4 a | * 3.5 b |
| Pisang Lilin (AA) | ** 54.4 a | * 3.4 b |
| Pisang jari guaya (AA) | ** 4.1 b | ** 52.8 a |
| Burro Criollo (ABB) | * 3.2 b | *** 54.0 a |
| Bluggoe (ABB) | * 2.1 b | *** 53.7 a |
| Pelipita (ABB) | * 3.4 b | * 2.6 b |
| FHIA-01 (AAAB) | * 3.6 b | * 2.3 b |
| FHIA-02 (AAAB) | * 2.5 b | * 2.6 b |
| FHIA-03 (AABB) | ** 2.8 b | *** 53.5 a |
| FHIA-04 (AAAB) | * 3.4 b | * 3.2 b |
| FHIA-18 (AAAB) | ** 3.2 b | * 4.1 b |
| FHIA-21 (AAAB) | * 4.0 b | ** 4.8 b |

Medias con letras iguales indican que no existe diferencias estadísticamente significativas (Análisis de varianza univariante, ANOVA de un factor, ANOVA y HSD de Tukey, $p \leq 0.05$). Respuesta de los cultivares en evaluaciones en campo según Pérez *et al.*, 2004): *Resistente, **Tolerante, ***Susceptible / Averages with same letters indicate no statistically significant differences (One-factor univariate analysis of variance, ANOVA, Tukey ANOVA and HSD, $p \leq 0.05$). Responses of the cultivars in field evaluations according to Pérez *et al.*, 2004): *Resistant, **Tolerant, ***Susceptible.

cultivares Burro Criollo, Pisang jari guaya, FHIA-03 y Bluggoe. Mientras que los cultivares Manzano Criollo, Gros Michel, Pelipita, Pisang Lilin, Paka y Yangambi Km 5, mostraron una respuesta de resistencia similar a los FHIA evaluados. El bioensayo del cultivar Pisang jari guaya reveló una respuesta de susceptibilidad, diferente a la tolerancia mostrada en las mencionadas evaluaciones de campo. En tal sentido, el problema que concierne las pruebas de resistencia en condiciones *in vivo* es la tarea de garantizar una distribución homogénea del inóculo del patógeno en todas las plantas a evaluar. Algunas plantas pueden haber recibido una cantidad

the pathogen *in vivo*. The remaining 7% consisted, in both cases, of an intermediate response to the disease under natural conditions. It is important to point out that, in order to establish a method to evaluate the resistance to diseases, it must be better than the traditional one in terms of work, space and time, aspects which are considered in this method, tested for both races of the pathogen.

The results obtained in this work show that the method to differentiate susceptibility or resistance to the Panama disease according to Companioni *et al.* (2003) can be performed in a quick and non-destructive way with the use of the FC of the fungus

excesiva del inóculo, mientras que las otras pueden no recibir suficiente inóculo para desarrollar la enfermedad (Mert y Karakaya, 2003). Además, existe preocupación por el efecto del ambiente en las plantas inoculadas estudiadas en campo (Ribeiro *et al.*, 2011). Por otra parte, no siempre es posible caracterizar las poblaciones de FOC mediante pruebas de patogenicidad debido a las interacciones de la planta con el ambiente. Existen demostradas evidencias acerca de la respuesta diferencial de las plantas bajo condiciones ambientales diferentes para grupos diferenciales ya establecidos (Li *et al.*, 2013). Los FC de 15 y 29 días obtenidos a partir de las cepas FOC de las razas 1 y 2, lograron diferenciar más del 93% de los individuos con una respuesta conocida al patógeno *in vivo*. El 7% restante consistió en ambos casos de una respuesta intermedia a la enfermedad en condiciones naturales. Es importante señalar que para establecer un método de evaluación de la resistencia a las enfermedades es necesario que el mismo sea superior al tradicional en trabajo, espacio y tiempo aspectos que son tenidos en cuenta en este método ensayado para ambas razas del patógeno.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el método para la diferenciación de la susceptibilidad o resistencia al Mal de Panamá según Companioni *et al.* (2003) puede realizarse de forma rápida; y no destructiva con el uso de FC del hongo tratados en las hojas para diferentes poblaciones del patógeno, lo cual podría ser aplicable para los programas de mejoramiento genético de musáceas, tanto convencional como biotecnológicas. Por otro lado, constituyen los primeros resultados enfocados a la validación del método que rompe el esquema biológico natural del ciclo de la enfermedad. Además, propician las bases para futuros proyectos relacionados con la identificación de los metabolitos fitotóxicos, y de la especificidad de presuntos genes de avirulencia del patógeno. Lo

treated in on leaves for different populations of the pathogen, which may be applicable to the breeding programs of *Musaceae*, both conventional and biotechnological. On the other hand, they are the first set of results focused on the validation of the method that break the natural biological scheme of the natural cycle of the disease. In addition, they lay the foundations for future projects related with the identification of phytotoxic metabolites, and of the specificity of alleged avirulence genes of the pathogen, which will help determine the role played by the metabolites involved in the response of *Musa* spp. to wilt by *Fusarium*.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

cual permitirá determinar el papel de los metabolitos involucrados en la respuesta de *Musa* spp. al marchitamiento por *Fusarium*.

## LITERATURA CITADA

- Brakhage AA. 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology* 11:21-32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>
- Buddenhagen IW. 2009. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of 'tropical race 4' to better manage banana production. *Acta Horticulturae* 828:193-204. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.828.19>
- Companioni B, Arzola M, Rodríguez Y, Mosqueda M, Pérez MC, Borrás O, Lorenzo JC and Santos R. 2003. Use of *in vitro* culture-derived *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 filtrates for rapid and non-destructive differentiation of field-grown banana resistant from susceptible clones. *Euphytica* 130:341-347. <https://doi.org/10.1023/A:1023027604627>
- Companioni B, Mora N, Arzola M, Ventura J, Pérez MC, Santos R and Lorenzo JC. 2004. Improved technique for rapid and non-destructive *in vitro* differentiation between resistant and susceptible banana clones *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Biotechnology Letters* 26 (3):213-216. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000013717.72794.ba>
- Etzerodt T, Gislum R, Laursen BB, Heinrichson K, Gregersen PL, Jørgensen LN and Fomsgaard IS. 2016. Correlation of

- deoxynivalenol accumulation in *Fusarium*-infected winter and spring wheat cultivars with secondary metabolites at different growth stages. *Journal Agricultural Food Chemistry* 64 (22):4545–4555. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01162>
- FAO. 2017. Global programme on banana *Fusarium* wilt disease: Protecting banana production from the disease with focus on tropical race 4 (TR4). FAO, Rome, ITA. Disponible en línea: <http://www.fao.org/3/a-i7921e.pdf>
- Li CY, Mostert G, Zuo CW, Beukes I, Yang QS, Sheng O, Kuang RB, Wei YR, Hu CH, Rose L, Karangwa P, Yang J, Deng GM, Liu SW, Gao J, Viljoen A and Yi GJ. 2013. Diversity and distribution of the banana wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in China. *Fungal Genomics and Biology* 3:2-6. <https://doi.org/10.4172/2165-8056.1000111>
- Mert Z and Karakaya A. 2003. Determination of the suitable inoculum concentration for *Rhynchosporium secalis* seedlings assays. *Journal Phytopathology* 151:699-701. <https://doi.org/10.1046/j.0931-1785.2003.00770.x>
- Pérez L, Batlle A, Fonseca J and Montenegro V. 2004. Reaction of FHIA hybrids and landraces cultivars to *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Abstracts of "The International Congress on Banana: harnessing research to improve the livelihoods". Malasia, July, 6-9, 152p. Disponible en línea: [http://file:///C:/Users/Asus/Downloads/IN050500\\_eng.pdf](http://file:///C:/Users/Asus/Downloads/IN050500_eng.pdf)
- Ploetz RC. 2015. *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology* 105:1512-1521. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>
- Ramírez MA, Iglesias LG, Luna M and Castro AA. 2015. *In vitro* phytotoxicity of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* in *Vanilla planifolia* Jacks. *Scientia Horticulturae* 197:573–578. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.019>
- Ribeiro LR, Amorim AP, Cordeiro ZJM, Silva S and Dita MA. 2011. Discrimination of banana genotypes for *Fusarium* wilt resistance in the greenhouse. *Acta Horticulturae* 897 (52):381-386. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.897.52>
- Saraswathi MS, Kannan G, Uma S, Thangavelu R and Backiyarani S. 2016. Improvement of banana cv. Rasthali (Silk, AAB) against *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (VCG 0124/5) through induced mutagenesis: Determination of LD50 specific to mutagen, explants, toxins and *in vitro* and *in vivo* screening for *Fusarium* wilt resistance. *Indian Journal of Experimental Biology* 54 (5): 345-353. Disponible en línea: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27319054/>
- Sieber CMK, Lee W, Wong P, Münsterkötter M, Mewes HW, Schmeitzl C, Varga E, Berthiller F, Adam G and Gülden U. 2014. The *Fusarium graminearum* genome reveals more secondary metabolite gene clusters and hints of horizontal gene transfer. *PLoS ONE* 9 (10): e110311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110311>
- Zhang X, Wu Q, Cui S, Ren J, Qian W, Yang Y, He S, Chu J, Sun X, Yan C, Yu X and An C. 2015. Hijacking of the jasmonate pathway by the mycotoxin fumonisin B1 (FB1) to initiate programmed cell death in *Arabidopsis* is modulated by RGLG3 and RGLG4. *Journal of Experimental Botany* 66 (9):2709–2721. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv068>