

Evaluation of resistance to *Fusarium* wilt race 1 in new banana clones

Evaluación de la resistencia a marchitez por *Fusarium* raza 1 en nuevos clones de banano

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; **José de La Caridad Ventura-Martín**, Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales, Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara, CP 53 000, Cuba; **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; **Nayanci Portal-González**, **Ramón Santos-Bermúdez**, Universidad Técnica “Luis Vargas Torres” de Esmeraldas, Campus Mútiles, San Mateo, Esmeraldas, CP 080150, Ecuador; **Armando Rodríguez-García**, **Barbarita Companioni-González***, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro, No. 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, CP 25315, México.

*Corresponding autor: bcompanioni2007@gmail.com

Received: April 03, 2023.

Accepted: April 26, 2023.

García-Velasco R, Ventura-Martín JdLC, Lorenzo-Feijoo JC, Portal-González N, Santos-Bermúdez R, Rodríguez-García A and Companioni-González B. 2023. Evaluation of resistance to *Fusarium* wilt race 1 in new banana clones. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 285-297.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2304-1>

First DOI publication: April 29, 2023.

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2023.

Abstract. In previous works, a method was developed for the differentiation at the foliar level of the response of banana plants to *Fusarium* race 1 wilt, which constitutes a useful tool to increase the efficiency of resistance selection in *ex vitro*

Resumen. En trabajos previos se desarrolló un método para la diferenciación a nivel foliar de la respuesta de plantas de banano a la marchitez por *Fusarium* raza 1, el cual constituye una herramienta útil para incrementar la eficiencia de la selección de la resistencia en condiciones *ex vitro*. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la resistencia a esta enfermedad en nuevos clones de banano mediante el método de evaluación mencionado. Para ello se realizaron seis momentos de evaluación; y se utilizaron diez plantas de cada línea seleccionada del clon ‘Zanzíbar’ irradiado. Los resultados evidenciaron que las plantas de las líneas evaluadas del clon ‘Zanzíbar’ irradiado indican ser materiales promisorios para el mejoramiento genético en el cultivo dirigido a la resistencia a esta enfermedad. Por otra parte, se obtuvo una respuesta a la

conditions. The objective of this work was to evaluate resistance to this disease in new banana clones using the evaluation method mentioned. For this, six moments of evaluation were made; and ten plants of each selected line of the irradiated 'Zanzíbar' clone were used. The results showed that the plants of the evaluated lines of the irradiated 'Zanzíbar' clone indicate that they are promising materials for genetic improvement in the crop aimed at resistance to this disease. On the other hand, a response to selection was obtained in a short time (48 hours), as well as evaluating the lines selected from large populations of plants (60 plants) with the exclusion of other organisms; and the control of environmental conditions that could interfere with the results obtained. However, it is necessary to continue additional studies in the field to confirm the resistance in the evaluated lines.

Key words: biotechnology, disease, *Musa* spp., early selection.

Bananas and plantains (*Musa* spp.) are a significant source of food for a large portion of the global population. However, their production is threatened by diseases such as *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), which is one of the most destructive and economically important diseases in the genus *Musa*. The control of this vascular pathogen using agrochemicals is expensive and harmful to the environment (FAOSTAT, 2020). Therefore, genetic improvement for resistance is considered the only effective and safe control method in recent years (Saraswathi *et al.*, 2016). The use of biotechnological techniques to support genetic improvement for resistance to *Fusarium* wilt in bananas has facilitated the introduction of improvement results much faster than conventional

selección en un reducido tiempo (48 horas), así como evaluar las líneas seleccionadas a partir de grandes poblaciones de plantas (60 plantas) con la exclusión de otros organismos; y el control de las condiciones ambientales que pudieran interferir en los resultados obtenidos. Sin embargo, constituye una necesidad continuar estudios adicionales en campo para confirmar la resistencia en las líneas evaluadas.

Palabras clave: biotecnología, enfermedad, *Musa* spp., selección temprana.

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) constituyen una importante fuente de alimento para una gran parte de la población mundial. Sin embargo, la producción de las musáceas se encuentra amenazada por la incidencia de enfermedades como la 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*. El control del patógeno vascular con el uso de agroquímicos resulta costoso y causa serios daños al medio ambiente (FAOSTAT, 2020). Por ello, en los últimos años se ha considerado al mejoramiento genético para la resistencia como la única forma de control efectivo y segura (Saraswathi *et al.*, 2016). En este sentido, la utilización de técnicas biotecnológicas en apoyo al mejoramiento genético para la resistencia a la marchitez por *Fusarium* en banano ha permitido introducir los resultados de la mejora con mayor rapidez; en comparación con los métodos del mejoramiento genético convencional (García *et al.*, 2021). Por otro lado, han permitido aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento genético en el cultivo (Saraswathi *et al.*, 2016). Ventura *et al.* (2015) mediante el uso combinado del cultivo de tejidos y la mutagénesis *in vitro*

genetic improvement methods (García *et al.*, 2021). Moreover, it has increased the efficiency of genetic improvement programs in cultivation (Saraswathi *et al.*, 2016). Ventura *et al.* (2015) obtained a wide genetic variability in the ‘Zanzíbar’ cultivar (group AAB) using a combination of tissue culture and *in vitro* mutagenesis in meristematic apices, selecting 15 mutants. ‘Z 13’, ‘Z 30’, and ‘Z 30 A’ were the most promising materials for genetic improvement in the cultivation, due to their high yield, elimination of superficial corms, decreased height, and ordered suckering. This study aimed to evaluate the resistance to *Fusarium* wilt race 1 in new banana clones ‘Z 13’, ‘Z 30’, and ‘Z 30 A’ obtained through biotechnological techniques in Cuba.

The research was carried out at the Laboratory of Plant-Pathogen Interaction of the Bioplants Center of the University of Ciego de Avila “Máximo Gómez Báez”, Cuba.

Evaluated lines of clone ‘Zanzíbar’ (group AAB). The study utilized selected lines from the ‘Zanzíbar’ clone (group AAB) - ‘Z 13’, ‘Z 30’, and ‘Z 30 A’. These lines were obtained from the *Musa* spp. genetic improvement program at the National Institute of Tropical Root and Tuber Crops Research in Santo Domingo, Villa Clara, Cuba (INIVIT). The program utilized ionizing radiation (gamma rays) on meristematic apices of the ‘Zanzíbar’ clone *in vitro* culture, resulting in the selection of 15 mutants. After three vegetative cycles under field conditions, ‘Z 13’, ‘Z 30’, and ‘Z 30 A’ lines were chosen as the most advanced materials for genetic improvement in cultivation. These lines are being proposed for registration as new genotypes in *Musa* spp. by the International Atomic Energy Agency (IAEA) (Ventura *et al.*, 2015).

en ápices meristemáticos del cultivar ‘Zanzíbar’ (grupo AAB) obtuvieron una amplia variabilidad genética en el clon ‘Zanzíbar’ donde seleccionaron 15 mutantes. Las líneas ‘Z 13’, ‘Z 30’ y el ‘Z 30 A’ resultaron los mejores materiales promisorios para el mejoramiento genético en el cultivo por su alto rendimiento; por la eliminación de los cormos superficiales; por la disminución en la altura; y por el ahijamiento ordenado. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la resistencia a marchitez por *Fusarium* raza 1 en nuevos clones de banano ‘Z 13’, ‘Z 30’ y el ‘Z 30 A’ obtenidos mediante técnicas biotecnológicas en Cuba.

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

Líneas evaluadas del clon ‘Zanzíbar’ (grupo AAB). Se utilizaron las líneas seleccionadas del clon ‘Zanzíbar’ (grupo AAB) (‘Z 13’, ‘Z 30’ y el ‘Z 30 A’). Las cuales fueron obtenidas en el programa de mejoramiento genético de *Musa* spp. que se desarrolló en el Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales de Santo Domingo, Villa Clara, Cuba (INIVIT). En el cual mediante la utilización de radiaciones ionizantes (rayos gamma) en ápices meristemáticos del clon ‘Zanzíbar’, a partir del cultivo *in vitro* lograron la selección de 15 mutantes. Posteriormente, en condiciones de campo, y durante tres ciclos vegetativos seleccionaron las líneas ‘Z 13’, ‘Z 30’ y el ‘Z 30 A’ como los materiales más avanzados para el mejoramiento genético en el cultivo. Los cuales son propuestos para ser registrados por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) como nuevos genotipos en *Musa* spp. (Ventura *et al.* 2015).

Material vegetal. Se utilizaron muestras foliares de las líneas ‘Z 13’, ‘Z 30’ y el ‘Z 30 A’ de ocho a

Plant material. Leaf samples from the 'Z 13', 'Z 30' and 'Z 30 A' lines, eight to nine months old, planted in the INIVIT Banana Germplasm Bank, were used.

Fungal strain. We used a FOC race 1 isolate (belonging to the vegetative compatibility group (VCG) [01210] from the culture collection of the Institute of Plant Health Research (INISAV), Havana, Cuba.

Filtration of the fungus culture (FC). To obtain a liquid culture of the fungus, mycelial discs measuring 8 mm in diameter were taken from the periphery of colonies grown on Petri dishes containing Potato Dextrose Agar culture medium. Next, 100 mL of Czapek broth culture medium with a pH of 5.5 was added to a 250 mL Erlenmeyer flask. A mycelial disc was then inoculated into the flask and incubated for 24 days at 28 ± 2 °C, $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity, and a 12-hour light/12-hour dark photoperiod. The fungal culture (FC) was harvested after 24 days and filtered through four layers of gauze and Whatman No. 1 filter paper. Following filtration, it was centrifuged at 8000 rpm for 20 minutes in a Sigma-201M centrifuge to remove mycelial and conidial debris. The supernatant was then passed through filters with 0.22 μm diameter pores (Sartorius, NG, Göttingen, Germany). The FC was then concentrated to 80% (v/v) through rotary evaporation, using a Heidolph rotary evaporator, Bioblock, Paris, France. Two treatments were utilized in the experiment: 1) concentrated FC of the fungus (Czapek broth culture medium inoculated with the fungus and incubated for 24 days); and 2) Czapek broth culture medium without the fungus and incubated for 24 days, which was used as a control treatment.

Procedure for evaluating resistance to *Fusarium* wilt race 1. To evaluate resistance and susceptibility,

nueve meses de plantadas en el Banco de Germoplasma de Banano del INIVIT.

Cepa fúngica. Se utilizó un aislado de FOC raza 1 (perteneciente al grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) [01210] procedente del cepario del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana, Cuba.

Filtrado del cultivo del hongo (FC). Para obtener el cultivo en medio líquido 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 con un pH 5.5, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad. En el matraz se sembró un disco de micelio y se incubó durante 24 días a 28 ± 2 °C, $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa; y con un fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad. El FC del hongo se cosechó a los 24 días, donde se filtró mediante cuatro capas de gasa y luego por papel de filtro Whatman No. 1. 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 de 0.22 mm de diámetro (Sartorius, NG, Göttingen, Alemania). El FC se concentró por rotoevaporación (en rotoevaporador Heidolph, Bioblock, París, Francia) al 80% (v/v). Para llevar a cabo el experimento se utilizaron dos tratamientos que consistieron: 1) el FC del hongo concentrado (medio de cultivo Caldo Czapek inoculado con el hongo e incubado durante 24 días); y 2) el medio de cultivo Caldo Czapek, sin el hongo e incubado durante 24 días, y que se utilizó como tratamiento testigo.

Procedimiento para evaluar la resistencia a marchitez por *Fusarium* raza 1. Para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad se establecieron seis momentos de evaluación (cada dos meses en el

six evaluation intervals were established (every two months within the same year of the experiment). Healthy middle-aged leaves were collected from each line ('Z 13', 'Z 30', and 'Z 30 A') in the field. Eighteen punctures were made on each leaf using a sterile needle on the adaxial side of the leaf blade, spaced 3 cm apart and in three different positions (distal, middle, and proximal). After the damage was inflicted, 5 μL of fungus culture filtrate (FC) and 5 μL of concentrated medium without fungus (control treatment) were added. The leaves were incubated for 48 hours at 28 ± 2 °C, $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity, 12-hour light/12-hour dark photoperiod, and 70% relative humidity. The elliptical lesion area (mm^2) of the leaves was measured after 48 hours according to Companioni *et al.* (2005). Leaf fragments with elliptical lesions of 5 x 5 cm were then extracted and placed in liquid nitrogen for subsequent biochemical analyses. Biochemical indicators, including peroxidase activity, chlorophyll pigment levels (a, b, and total), free and cell wall-bound phenol content, malondialdehyde, other aldehydes, and proteins were evaluated.

Peroxidase activity was assessed using the Pascual *et al.* (1983) method. Leaf fragments (100.0 mg) were pulverized in liquid nitrogen and then extracted with a tris-HCl buffer solution (0.01 mol L^{-1} , pH 7.0). The reaction mixture consisted of 0.1 mL of leaf extract, 1.0 mL of tris-HCl buffer solution (0.01 mol L^{-1}), 0.15 mL of guajacol (100 mmol L^{-1}), and 20 μL of hydrogen peroxide. The absorbance at 470 nm was monitored every 15 seconds for three minutes, and the average change in absorbance of the linear segment of the curve was used to estimate peroxidase activity. The reaction of the guajacol and hydrogen peroxide substrates was accounted for in each determination. Guajacol peroxidase enzymatic activity was reported as U g^{-1} fresh leaf weight, where 1 U represents the

mismo año del desarrollo de la experimentación). Se realizó la colecta en campo de hojas sanas de mediana edad según la posición en la planta (hojas 3, 4 y 5) de cada línea a evaluar ('Z 13', 'Z 30' y el 'Z 30 A'). En cada hoja se realizaron 18 punteaduras con una aguja estéril en el lado adaxial del limbo de la hoja con 3 cm de separación entre ellas; y en tres posiciones diferentes (distal, medio y proximal). Después del daño, se agregaron 5 μL del filtrado de cultivo del hongo (FC) y 5 μL del medio de cultivo sin el hongo y concentrado (tratamiento testigo). Las hojas se incubaron durante 48 horas a 28 ± 2 °C, $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y 70% de humedad relativa. Transcurridas las 48 horas se midió el área de las lesiones elíptica (mm^2) de las hojas de acuerdo a Companioni *et al.* (2005); y se extrajeron fragmentos de hoja con las lesiones elípticas de (5 x 5 cm) que se colocaron en nitrógeno líquido para los posteriores análisis bioquímicos. Se evaluaron los siguientes indicadores bioquímicos: actividad peroxidasa, niveles de pigmentos clorofílicos (a, b y totales), contenido de fenoles libres y ligados a las paredes celulares, malondialdehído, otros aldehídos y proteínas.

La actividad peroxidasa se determinó según el método de Pascual *et al.* (1983). Los fragmentos de hoja de 100.0 mg se maceraron en nitrógeno líquido. La extracción se realizó con solución amortiguadora tris-HCl (0.01 mol L^{-1} , pH 7.0). La mezcla de la reacción incluyó: 0.1 mL de extracto de hojas, 1.0 mL de solución amortiguadora tris-HCl (0.01 mol L^{-1}), 0.15 mL de guayacol (100 mmol L^{-1}) y 20 μL de peróxido de hidrógeno. Se evaluó la absorbancia 470 nm cada 15 segundos durante tres minutos. El promedio de la variación de la absorbancia de la sección lineal de la curva se tomó para estimar la actividad peroxidasa. En cada determinación se consideró la reacción espontánea en el tiempo de los sustratos guayacol y peróxido de hidrógeno. La

conversion of 1 μmol of substrate per minute. Additionally, peroxidase activity was expressed as U mg^{-1} of protein.

The chlorophyll pigment content was determined following Porras (1991). Leaf fragments weighing 100.0 mg were macerated in liquid nitrogen and then mixed with 0.5 mL of 80% acetone. After centrifugation at 12,100 xg for 15 minutes at 4 °C, the supernatant was collected and the absorbance was measured at 647 nm and 664 nm. Chlorophyll content was calculated as: $13.19 * \text{Absorbance}_{664\text{nm}} - 2.57 * \text{Absorbance}_{647\text{nm}}$. Chlorophyll b content was calculated as $22.10 * \text{Absorbance}_{647\text{nm}} - 5.26 * \text{Absorbance}_{664\text{nm}}$. Total chlorophyll pigment content was determined by adding $7.93 * \text{Absorbance}_{664\text{nm}} + 19.53 * \text{Absorbance}_{647\text{nm}}$.

The method of Gurr *et al.* (1992) was used to determine the content of free and cell wall-bound phenols. Leaf fragments weighing 100.0 mg were macerated in liquid nitrogen followed by the addition of 0.5 mL of methanol. After vortexing and centrifugation at 12,100 xg for 15 minutes, the precipitate was subjected to two additional cycles of extraction with methanol. The resulting supernatant was collected and designated as the fraction of free phenols. The precipitate was treated with sodium hydroxide (2.0 mol L^{-1}) for 16 hours at 70 °C, followed by addition of hydrochloric acid (0.25 mL, 2.0 mol L^{-1}) and centrifugation at 12,100 xg for 15 minutes. The resulting supernatant was considered the reservoir of cell wall-bound phenols. To quantify free and cell wall-bound phenols, 20 μL of the supernatant was mixed with 980.0 μL of distilled water, and Folin-Ciocalteu's phenol reagent (100.0 μL) was added, followed by incubation for 5 minutes. Sodium bicarbonate (600.0 μL , saturated with sodium hydroxide (0.1 mol L^{-1})) was then added, and after 60 minutes, the absorbance at 725 nm was measured. The content of phenols was expressed in mg of phenols g^{-1}

actividad enzimática guayacol peroxidasa fue expresada como unidades U g^{-1} masa fresca de la hoja donde 1 U corresponde a 1 μmol de sustrato transformado en 1 minuto.

El contenido de pigmentos clorofílicos se determinó según Porras (1991). Los fragmentos de hoja de 100.0 mg se maceraron en nitrógeno líquido y posteriormente se adicionaron 0.5 mL de acetona al 80%. Las muestras se centrifugaron a 12 100 xg , 4 °C durante 15 minutos. Se colectó el sobrenadante y se evaluó la absorbancia 647 nm y 664 nm. El contenido de clorofila se calculó de la siguiente forma: $13.19 * \text{Absorbancia}_{664\text{nm}} - 2.57 * \text{Absorbancia}_{647\text{nm}}$. El contenido de clorofila b se midió a través de la diferencia de $22.10 * \text{Absorbancia}_{647\text{nm}} - 5.26 * \text{Absorbancia}_{664\text{nm}}$. El contenido total de pigmentos clorofílicos se obtuvo a partir de la suma de $7.93 * \text{Absorbancia}_{664\text{nm}} + 19.53 * \text{Absorbancia}_{647\text{nm}}$.

El contenido de fenoles libres y ligados a las paredes celulares se determinó de acuerdo a Gurr *et al.* (1992). Los fragmentos de hoja de 100.0 mg se maceraron en nitrógeno líquido y luego se adicionó 0.5 mL de metanol. Las muestras fueron agitadas en un vortex y se centrifugaron a 12 100 xg , durante 15 minutos. El precipitado se sometió a dos ciclos adicionales de extracción con metanol, como se describió anteriormente. El sobrenadante se colectó siempre y se consideró como la fracción de los fenoles libres. El precipitado se incubó con 0.25 mL de hidróxido de sodio (2.0 mol L^{-1}) durante 16 horas a 70 °C. Se adicionó ácido clorhídrico (0.25 mL, 2.0 mol L^{-1}) después de la incubación. Las muestras se centrifugaron a 12 100 xg , durante 15 minutos. El precipitado se descartó y el sobrenadante se consideró como el reservorio de los fenoles ligados a las paredes celulares. Con el objetivo de cuantificar los niveles de fenoles libres y ligados a las paredes celulares, 20 μL del sobrenadante se mezclaron con 980.0 μL de agua destilada. Se adicionó 100.0 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu,

fresh leaf weight and was referenced to a standard curve of chlorogenic acid.

The levels of malondialdehyde and other aldehydes were evaluated following the protocol of Heath and Packer (1968). Leaf fragments weighing 100.0 mg were macerated in liquid nitrogen and mixed with 1.4 mL of distilled water, briefly vortexed. Then, 1.5 mL of thiobarbituric acid (0.5%, w/v; in trichloroacetic acid 20%, v/v) was added, and the samples were incubated at 100 °C for 25 minutes in a water bath. After cooling the samples on ice for 15 minutes, they were centrifuged at 756 xg for 10 minutes. The supernatant's absorbance was measured at 455 nm, 532 nm, and 600 nm. The non-specific absorbance of the reaction product was measured at 600 nm and subtracted from the maximum absorbance at 532 nm for malondialdehyde measurements and at 455 nm for other aldehydes. The concentrations of malondialdehyde were calculated using an extinction coefficient of 155 mmol⁻¹ cm⁻¹ at 532 nm. For other aldehydes, the extinction coefficient was 45.7 mmol⁻¹ cm⁻¹ (average of the extinction coefficients of propanal, butanal, hexanal, and propanal-dimethylacetal) at 532 nm.

The protein concentration was determined according to Bradford (1976). Leaf fragments weighing 100.0 mg were macerated in liquid nitrogen, and extracted with a tris-HCl buffer solution (0.01 mol L⁻¹, pH 7.0). A 0.1 mL leaf extract was mixed with 1.0 mL of Bradford reagent, and the absorbance was measured at 595 nm. The protein content was expressed in mg of protein per g of fresh leaf mass, using a standard curve of bovine serum albumin (BSA). The protein content present in the fungal culture filtrate was subtracted from the total protein content determined in the leaves, 48 hours after the application of the fungal culture filtrate.

Each treatment included three leaves from different plants in each evaluated line ('Z 13', 'Z 30'

y las muestras se incubaron durante 5 minutos. Se adicionó bicarbonato de sodio (600.0 µL, saturado con hidróxido de sodio (0.1 mol L⁻¹)) y transcurrido 60 minutos se determinó la absorbancia a 725 nm. El contenido de fenoles se expresó en mg de fenoles g⁻¹ de masa fresca de la hoja referidos a una curva patrón de ácido clorogénico.

El contenido de malondialdehído y otros aldehídos se evaluó según Heath y Packer (1968). Los fragmentos de hoja de 100.0 mg se maceraron en nitrógeno líquido. Las muestras maceradas se mezclaron con 1.4 mL de agua destilada, y se agitaron brevemente en un vortex. Se adicionaron 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico (0.5%, m/v; en ácido tricloroacético 20%, v/v), y las muestras se incubaron en baño de María a 100 °C, durante 25 minutos. Más tarde, las muestras se enfriaron en hielo por un tiempo de 15 minutos, y se centrifugaron a 756 xg, durante 10 minutos. Se evaluó la absorbancia del sobrenadante a 455 nm, 532 nm y 600 nm. La absorbancia no específica del producto de la reacción se midió a 600 nm, y se sustrajo de la absorbancia máxima a 532 nm para las mediciones del malondialdehído, y a 455 nm para otros aldehídos. Para los cálculos de las concentraciones del malondialdehído se utilizó un coeficiente de extinción de 155 mmol⁻¹ cm⁻¹ a 532 nm. Para los otros aldehídos, el coeficiente de extinción fue de 45.7 mmol⁻¹ cm⁻¹ (promedio de los coeficientes de extinción del propanal, butanal, hexanal, y propanal-dimetilacetal) a 532 nm.

La concentración de proteínas se determinó según Bradford (1976). Los fragmentos de hoja de 100.0 mg se maceraron en nitrógeno líquido. La extracción se realizó con solución amortiguadora tris-HCl (0.01 mol L⁻¹, pH 7.0). El extracto de hoja de 0.1 mL se mezcló con 1.0 mL de reactivo de Bradford. Se evaluó la absorbancia a 595 nm. El contenido de proteínas se expresó en mg de proteínas g⁻¹ de masa fresca de la hoja referido a una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA). El contenido de proteínas presente en el filtrado del

and 'Z 30 A'). The area of elliptical lesions resulting from 54 punctures/treatment (18 punctures/leaf) was evaluated, and three independent samples (one from each leaf) were used for each biochemical determination. Using these measurements, each plant was evaluated in the discriminant functions described by Companioni *et al.* (2005) to assess if they were accurately classified (Table 1).

As the lesion areas were measured in three groups of 18 lesions, and each biochemical determination was repeated three times, three sets of data were available for each plant in the original matrix. The three sets of data for each plant were assessed using the discriminant function for resistant clones and the discriminant function for susceptible clones. The obtained results were compared using the parametric t-test to determine statistical differences between the results of each function. The maximum probability of making a type I error was 0.05. The Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows, version 8, Copyright SPSS Inc., 1989-1997) was used for the statistical processing of the data. In addition, the evaluation procedure for *Fusarium* race 1 resistance in the 'Zanzíbar' clone lines, as described by Companioni *et al.* (2012), is presented below (Figure 1).

The study evaluated the resistance to *Fusarium* wilt caused by race 1 GCV [01210] in each assessed line and at every evaluation time using discriminant functions (Table 2). After applying the treatments as described and conducting biochemical analyses of the leaves from the 'Zanzíbar' clone lines, the discriminant functions classified 93.3% of the evaluated 'Z 30' mutant plants (56 out of 60) as resistant. Similarly, 91.6% of the evaluated 'Z 13' plants (55 out of 60) were classified as resistant, while 96.6% of the plants in line 'Z 30A' were classified as resistant (58 out of 60). These results suggest that the selected lines from the irradiated 'Zanzíbar' clone, namely 'Z 13', 'Z 30', and 'Z

cultivo del hongo se le restó al contenido total de proteínas determinado en las hojas, a las 48 horas después de la aplicación del filtrado del cultivo del hongo.

Cada tratamiento incluyó tres hojas de plantas diferentes en cada línea evaluada ('Z 13', 'Z 30' y el 'Z 30 A'). Se evaluaron las áreas de la lesión elíptica de 54 punteadura/tratamiento (18 punteadura/hoja) y cada determinación bioquímica implicó a tres muestras independientes (una de cada hoja). Con las mediciones citadas se evaluó cada planta en las funciones discriminantes descritas por Companioni *et al.* (2005) para conocer si eran clasificadas correctamente (Cuadro 1).

Como las áreas de las lesiones se habían medido en tres grupos de 18 lesiones cada uno, y cada determinación bioquímica se había repetido tres veces, entonces se disponía de tres juegos de datos por cada planta de la matriz original. Los tres juegos de datos de cada planta se evaluaron en la función discriminante para clones resistentes y en la función discriminante para clones susceptibles. Los resultados obtenidos se compararon mediante la prueba paramétrica t-test para conocer si los resultados de cada función eran estadísticamente diferentes. La probabilidad máxima de cometer error de tipo I fue 0.05. 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). Por otra parte, el procedimiento descrito anteriormente para la evaluación de la resistencia por *Fusarium* raza 1 en las líneas del clon 'Zanzíbar' se presenta a continuación según Companioni *et al.* (2012) (Figura 1).

La evaluación de la resistencia a marchitez por *Fusarium* raza 1 GCV [01210] en cada línea evaluada y en cada momento de evaluación según las funciones discriminantes se describen a continuación (Cuadro 2). Después de las 48 horas de la aplicación de los tratamientos descritos, y el posterior

Table 1. Discriminant functions to differentiate banana clones resistant and susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1 according to Companioni *et al.* (2005).**Cuadro 1. Funciones discriminantes para diferenciar clones de banano resistentes y susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 1 según Companioni *et al.* (2005).**

Función para clones susceptibles **S:** 11.87 a + 66.73 b + 24.60 c + 13.47 d + 0.09 e + 51.60 f + 20.39 g - 16.85 h + 11.20 i - 11.13 j - 49.20

Función para clones resistentes **R:** 18.94 a + 42.84 b + 7.45 c + 19.58 d + 3.84 e + 45.72 f + 15.79 g - 5.11h - 2.31i + 0.21j - 41.55

Legend (The fractions on the right correspond to the reciprocal of the larger value. These are constants in the discriminant functions):

a = Lesion area of leaves treated with uninoculated culture medium (mm²) * 1/1.22 mm²

b = Lesion area of leaves treated with fungal culture filtrate (mm²) * 1/48.84 mm²

c = Free phenol content in leaves treated with uninoculated culture medium (mg g⁻¹ fresh leaf mass) * 1/43.13 mg phenols g⁻¹ fresh leaf mass.

d = Free phenol content in leaves treated with fungus culture filtrate (mg g⁻¹ fresh leaf mass) * 1/27.51 mg phenols g⁻¹ fresh leaf mass.

e = Content of phenols bound to cell walls in leaves treated with uninoculated culture medium (mg g⁻¹ of fresh leaf mass) * 1/118.51 mg g⁻¹ of fresh leaf mass.

f = Content of phenols bound to cell walls in leaves treated with fungus culture filtrate (mg g⁻¹ of fresh leaf mass) * 1/103.73 mg g⁻¹ of fresh leaf mass.

g = Aldehyde content (except malondialdehyde) in leaves treated with uninoculated culture medium (μmol g⁻¹ fresh leaf mass) * 1/1.06 μmol g⁻¹ fresh leaf mass.

h = Aldehyde content (except malondialdehyde) in leaves treated with fungus culture filtrate (μmol g⁻¹ of fresh leaf mass) * 1/0.83 μmol g⁻¹ of fresh leaf mass.

i = Protein content in leaves treated with uninoculated culture medium (mg protein g⁻¹ fresh leaf mass) * 1/5.88 mg g⁻¹ fresh leaf mass.

Leyenda (Las fracciones a la derecha corresponden al recíproco del valor mayor. Estas son constantes en las funciones discriminantes):

a = Área de la lesión de hojas tratadas con medio de cultivo sin inocular (mm²) * 1/1.22 mm²

b = Área de la lesión de hojas tratadas con filtrado del cultivo del hongo (mm²) * 1/48.84 mm²

c = Contenido de fenoles libres en hojas tratadas con medio de cultivo sin inocular (mg g⁻¹ de masa fresca de la hoja) * 1/43.13 mg de fenoles g⁻¹ de masa fresca de la hoja.

d = Contenido de fenoles libres en hojas tratadas con filtrado del cultivo del hongo (mg g⁻¹ de masa fresca de la hoja) * 1/27.51 mg de fenoles g⁻¹ de masa fresca de la hoja.

e = Contenido de fenoles ligados a las paredes celulares en hojas tratadas con medio de cultivo sin inocular (mg g⁻¹ de masa fresca de la hoja) * 1/118.51 mg g⁻¹ de masa fresca de la hoja.

f = Contenido de fenoles ligados a las paredes celulares en hojas tratadas con filtrado del cultivo del hongo (mg g⁻¹ de masa fresca de la hoja) * 1/103.73 mg g⁻¹ de masa fresca de la hoja.

g = Contenido de aldehídos (excepto malondialdehído) en hojas tratadas con medio de cultivo sin inocular (μmol g⁻¹ de masa fresca de la hoja) * 1/1.06 μmol g⁻¹ de masa fresca de la hoja.

h = Contenido de aldehídos (excepto malondialdehído) en hojas tratadas con filtrado del cultivo del hongo (μmol g⁻¹ de masa fresca de la hoja) * 1/0.83 μmol g⁻¹ de masa fresca de la hoja.

i = Contenido de proteínas en hojas tratadas con medio de cultivo sin inocular (mg de proteínas g⁻¹ de masa fresca de la hoja) * 1/5.88 mg g⁻¹ de masa fresca de la hoja.

j = Contenido de proteínas en hojas tratadas con filtrado del cultivo del hongo (mg de proteínas g⁻¹ de masa fresca de la hoja) * 1/4.85 mg g⁻¹ de masa fresca de la hoja.

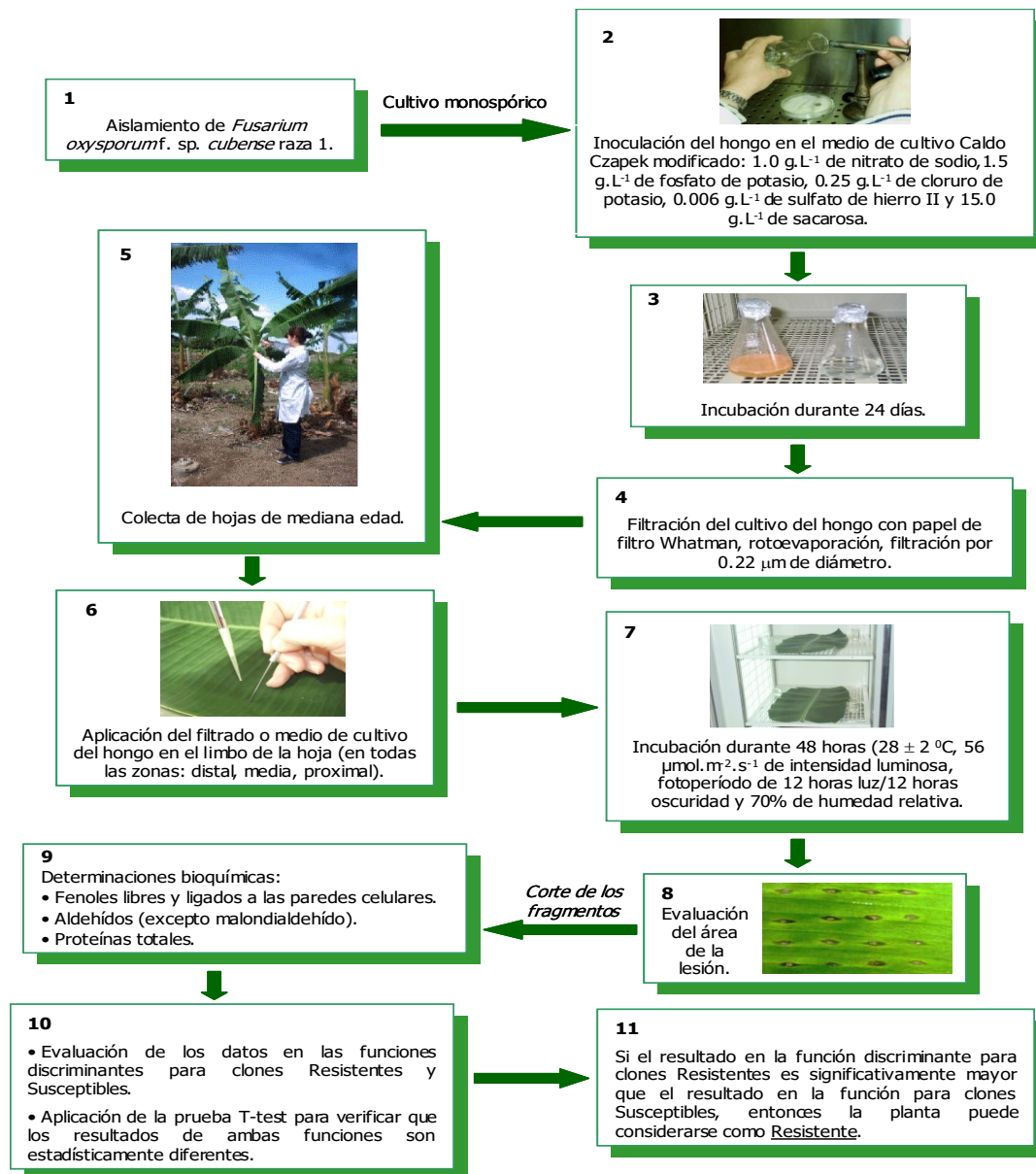


Figure 1. Method for leaf-level differentiation of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 in banana according to Companioni *et al.* (2012).

Figura 1. Método para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 en banano según Companioni *et al.* (2012).

30A', may be promising materials for genetic improvement in cultivation focused on resistance to FOC race 1 GCV [01210]. However, to confirm the resistance observed in these lines, additional

análisis bioquímico en las hojas de las líneas del clon 'Zanzíbar' se pudo observar que las funciones discriminantes clasificaron como resistente al 93.3% de las plantas evaluadas del mutante 'Z 30'

Table 2. Classification into susceptible or resistant made by discriminant functions on selected lines of the irradiated ‘Zanzibar’ clone.**Cuadro 2. Clasificación en susceptibles o resistentes hecha por las funciones discriminantes en las líneas seleccionadas del clon ‘Zanzibar’ irradiado.**

Momentos de evaluación	Líneas evaluadas	Número total de plantas evaluadas	Número total de plantas potencialmente resistentes según funciones discriminantes
1	‘Z-30’	10	10 (100%)
2	‘Z-30’	10	8 (80%)
3	‘Z-30’	10	9 (90%)
4	‘Z-30’	10	9 (90%)
5	‘Z-30’	10	10 (100%)
6	‘Z-30’	10	10 (100%)
1	‘Z-13’	10	8 (80%)
2	‘Z-13’	10	9 (90%)
3	‘Z-13’	10	9 (90%)
4	‘Z-13’	10	10 (100%)
5	‘Z-13’	10	10 (100%)
6	‘Z-13’	10	9 (90%)
1	‘Z-30A’	10	10 (100%)
2	‘Z-30A’	10	9 (90%)
3	‘Z-30A’	10	9 (90%)
4	‘Z-30A’	10	10 (100%)
5	‘Z-30A’	10	10 (100%)
6	‘Z-30A’	10	10 (100%)

field studies are necessary. The first and most crucial step when assessing a new banana clone is evaluating resistance in plants against different ‘formae specialis’ of *Fusarium oxysporum* (Buddenhagen, 2009).

Even though *in vitro* resistance evaluations are performed, supposedly resistant plants require field studies (Dita *et al.*, 2018). In this context, Saraswathi *et al.* (2016) selected banana mutants of the Rasthali cultivar (Silk, AAB) for resistance to race 1 of GCV [0124/5] of FOC through *in vitro* selection. To achieve this, they used toxin (fusaric acid) and the pathogen’s culture filtrate (CF) as selection agents. Individual banana mutant shoots obtained after the third or fourth subculture were transferred to multiplication medium supplemented with different concentrations of the toxin

(56 plantas de 60). Mientras, que en la línea ‘Z 13’ se clasificaron como resistentes el 91.6% de las plantas evaluadas (55 plantas de 60). Por último, en la línea ‘Z 30A’ se observó que las funciones discriminantes en este cultivar clasificaron al 96.6% de las plantas como resistente (58 plantas de 60). Los resultados evidenciaron que las líneas seleccionadas del clon ‘Zanzibar’ irradiado (‘Z 13’, ‘Z 30’ y el ‘Z 30 A’) pueden ser materiales promisorios para el mejoramiento genético en el cultivo, dirigido a la resistencia a FOC raza 1 GCV [01210], donde su resistencia osciló del 91.6 al 96.6%. Sin embargo, no se descarta la necesidad de continuar estudios adicionales en campo para verificar la resistencia en las líneas evaluadas. El primero y más crucial de todos los pasos al evaluar un nuevo clon de banana consiste en la evaluación de la resistencia en

(commercial fusaric acid) (Sigma Aldrich, USA) (0.0125, 0.025, 0.0375, 0.05, and 0.0625 mM) and 3, 4, 5, 6, 7, and 8% concentrations of the pathogen's CF, in addition to the growth regulator. After three weeks, they observed 50% survival of the explants at a concentration of 0.050 mM of the toxin and 7% with the fungal CF. At higher concentrations, there was a rapid decrease in banana mutant shoot growth. The selected mutants were transferred for pot tests under controlled conditions by inoculating the substrate with a spore suspension of 12×10^9 conidia mL^{-1} of the fungus for the next three months. After six months of resistance evaluation, three putatively resistant mutants to race 1 of FOC were obtained, which were massively multiplied *in vitro* for further interaction studies. It is important to note that determining the correct concentration of pathogen CF or toxin for the expression of differential phytotoxic activity between varieties is necessary for establishing resistance selection systems. This increases the chances of obtaining stable lines of plants with disease resistance (Portal *et al.*, 2021).

The findings of this study demonstrate that the selected lines of the irradiated 'Zanzibar' clone ('Z 13', 'Z 30', and 'Z 30 A') showed resistance to FOC race 1 GCV [01210] when evaluated at different selection times using the method described by Companioni *et al.* (2005; 2012) for differentiating susceptibility or resistance to *Fusarium* wilt. Additionally, the ease of evaluating resistance using the FC of the fungus and the reduced response time (48 hours) to determine plant susceptibility or resistance were also observed. Furthermore, this method facilitates the evaluation of a significant number of samples under laboratory conditions, enabling the acceleration of genetic improvement programs for this disease. These results highlight the potential of biotechnology in crop genetic improvement.

plantas frente a las diferentes '*formae specialis*' de *Fusarium oxysporum* (Buddenhagen, 2009).

Por otro lado, aunque se realicen evaluaciones de la resistencia *in vitro*, las plantas supuestamente resistentes deben someterse a estudios en campo (Dita *et al.*, 2018). En este sentido, Saraswathi *et al.* (2016) realizaron la selección de los mutantes de banano del cultivar Rasthali (Silk, AAB) con resistencia a la raza 1 del GCV [0124/5] de FOC mediante la selección *in vitro*. Para ello, utilizaron como agentes de selección toxina (ácido fusárico), y FC del patógeno. Los brotes individuales de los mutantes de banano obtenidos después del tercer o cuarto subcultivo fueron transferidos al medio de cultivo de multiplicación, suplementado con diferentes concentraciones de la toxina (ácido fusárico comercial) (Sigma Aldrich, EE. UU.) (0.0125; 0.025; 0.0375; 0.05 y 0.0625 mM); y a las concentraciones de 3; 4; 5; 6; 7 y 8% del FC del patógeno. Además, añadieron el regulador de crecimiento. Después de tres semanas observaron el 50% de supervivencia de los explantes en la concentración de 0.050 mM de la toxina; y 7% con el FC del hongo. En concentraciones superiores observaron una rápida disminución en el crecimiento de los brotes de los mutantes de banano. A los tres meses siguientes, los mutantes seleccionados fueron transferidos para realizar las pruebas en macetas, en condiciones controladas mediante la inoculación al sustrato con una suspensión de esporas de 12×10^9 conidios mL^{-1} del hongo. Posterior a los seis meses del proceso de evaluación de la resistencia obtuvieron tres mutantes putativos resistentes a la raza 1 de FOC. Los cuales fueron multiplicado *in vitro* de forma masiva para continuar otros estudios en la interacción. Es importante señalar que para el establecimiento de sistemas de selección de la resistencia la determinación de una concentración correcta del FC del patógeno o toxina, para la expresión de la actividad fitotóxica diferencial entre variedades es

CITED LITERATURE

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- 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>
- Companiononi B, Mora N, Díaz L, Pérez A, Arzola M, Espinosa P, Hernández M, Ventura J, Pérez MC, Santos R and Lorenzo JC. 2005. Identification of discriminant factors alter treatment of resistant and susceptible banana leaves with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* culture filtrates. *Plant Breeding* 124: 79-85. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2004.00997.x>
- Companiononi B, Lorenzo JC and Santos R. 2012. Nuevo método para la diferenciación al Mal de Panamá en banano. Editorial Académica Española. <http://www.eae-publishing.com>
- Dita M, Barquero M, Heck D, Mizubuti ESG and Staver CP. 2018. *Fusarium* wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in Plant Science* 9: 1468. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>
- FAOSTAT. 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- García R, Portal N, Santos R, Rodríguez A and Companiononi B. 2021. Mejoramiento genético para la resistencia a marchitez por *Fusarium* en banano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39 (1): 122-146. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2008-2>.
- Gurr SJ, McPherson MJ and Bowles DJ. 1992. Lignin and associated phenolic acids in cell walls. In: D. L. Wilkinson (ed.). *Molecular plant pathology: a practical approach*. No. III, IRL Press, Oxford. Pp. 51-56.
- Heath RL and Packer I. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives Biochemistry Biophysics* 125: 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Pascual MR, CM Pereda and Pérez R. 1983. Inverse correlation between estrogen receptor and peroxidase activity in human mammary tumor. *Neoplasia* 30: 611.
- Porrás RJ. 1991. Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic and marine organisms including recalcitrant algae. In: H. Scheer (ed.). *Chemistry of chlorophyll*. CRC. Press Inc. Boca Raton Ann Arbor Boston London. Pp. 320.
- Portal N, Soler A, Ribadeneira C, Solano J, Portieles R, Herrera L, Companiononi B, Borrás O and Santos R. 2021. Phytotoxic metabolites produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2. *Frontiers in Microbiology* 12: 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629395>

necesaria. Lo cual incrementa las posibilidades de obtener líneas estables de plantas con resistencia a las enfermedades (Portal *et al.* 2021). Como se puede mostrar, aunque se realicen selecciones *in vitro* las plantas supuestamente resistentes deben someterse a estudios en campo.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las líneas seleccionadas del clon 'Zanzíbar' irradiado ('Z 13', 'Z 30' y el 'Z 30 A') evaluadas en los diferentes momentos de la selección mostraron resistencia a FOC raza 1 GCV [01210] según el método para la diferenciación de la susceptibilidad o resistencia a marchitez por *Fusarium* descrito por Companiononi *et al.* (2005; 2012). Por otra parte, se evidencia la facilidad para realizar el trabajo de evaluación de la resistencia con FC del hongo; así como la reducción del tiempo necesario de respuesta para conocer si una planta es resistente o susceptible (48 horas). Por último, permite evaluar un número importante de muestras en condiciones de laboratorio, y de esta manera acelerar los programas de mejoramiento genético a esta enfermedad. Lo cual evidencia el potencial de la biotecnología en el campo del mejoramiento genético en el cultivo.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Saraswathi M, 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: 345-353. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27319054/>
- Ventura JC, López J, Rodríguez S, Medero V, González L, Ventura V, Vázquez D, Torres M, Montano N, Gálvez J, Valdés M and Triana O. 2015. Obtención de mutantes de porta bajo por irradiaciones en el cultivar 'Zanzíbar' (*Musa* spp, grupo AAB). *Revista Agricultura Tropical* 1 (1): 39-50.