

VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE* EN BANANOS Y PLÁTANOS DE CUBA

Alicia Batlle Viera y Luis Pérez Vicente

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, lperezvicente@sanidadvegetal.cu; lperezvicente@live.com

RESUMEN

El mal de Panamá –causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc)– es una de las enfermedades más nocivas que atacan las musáceas. La raza 1 causó una epidemia que destruyó la industria de exportación bananera basada en el clon Gros Michel en América, así como la desaparición del cultivo comercial del clon Manzano en Cuba. Con el fin de determinar la variabilidad genética de las poblaciones en el país, se realizaron 52 aislamientos monospóricos del hongo de clones naturalmente infectados en 26 localidades de ocho provincias de Cuba. Se determinó la morfología de las colonias en PDA y medio K2, se caracterizaron los compuestos volátiles producidos en un medio a base de arroz, se generaron mutantes nit auxotróficos y se determinaron los grupos de compatibilidad vegetativa con una colección internacional de nit M pertenecientes a todos los GCV de Foc. Se determinó la relación genética entre ellos mediante análisis de AFLP. En medio K2 no se observaron colonias lacinadas en ninguno de los aislamientos pertenecientes a las razas 1 y 2; se observó la producción de compuestos volátiles con independencia de las razas a que pertenecían los aislamientos. Las poblaciones de Foc de Cuba pertenecen a los GCV 01210, 0124, 0124/0125 y 0128. Los aislamientos con mayor similitud genética estuvieron en todos los casos agrupados en el mismo GCV y los aislamientos del GCV 0124, se encontraron distribuidos en todos los grupos genéticos por lo que posiblemente de este se diferenciaron los genotipos pertenecientes los GCV 0124/0125 y 0128.

Palabras claves: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, marchitez por *Fusarium*, mal de Panamá, grupos de compatibilidad vegetativa, AFLP

ABSTRACT

Panama disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), is one of the most destructive diseases of *Musa*. The epidemic of race 1 was the cause of banana export industry destruction which was based on Gros Michel in América and its substitution by Cavendish cultivars as well as the commercial cultivation of Manzano cv. in Cuba. In order to determine genetic variability of fungi populations in the country, fifty two monosporic isolates from naturally infected plants from 26 sites in eight provinces of Cuba were obtained. There were determined the colonies morphology in PDA and K2 media, the volatiles compounds produced on a rice based media were identified. Auxotrophic nit mutants were generated to determine the vegetative compatibility groups of each isolate with an international Nit M collection of all VCG of Foc. The genetic relationship between isolates and VCGs were determined by AFLP analysis. In K2 media were not observed lacinated colonies in any of the isolates belonging to race 1 and 2 and volatile compounds were or not were produced in different isolates with independence of the race that they belong. In Cuba the Foc populations were grouped in the VCGs 01210, 0124, 0124/0125 and 0128. The isolates with a higher genetic similarity were in all the cases grouped in the same VCG and in all the genetic groups were present isolates belonging to the VCG 0124 as well, indicating that it could be the original VCG from which the GCV 0124/0125 and 0128 evolved.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, fusarium wilt, Panamá disease, vegetative compatibility groups, AFLP

INTRODUCCIÓN

La marchitez por *Fusarium* o mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) es a nivel mundial una de las enfermedades más importantes, ampliamente distribuida y de mayor impacto de los bananos y plátanos.

El patógeno tiene su origen en el sudeste asiático, aunque la enfermedad fue reconocida por primera vez en otros lugares, y ha coevolucionado junto a las musáceas en su centro de origen [Bentley *et al.*, 1998]. Se calculan en más de 80 000 ha de cultivo del clon Gros Michel destruidas

por la raza 1 entre 1890 y mediados de la década de los cincuenta [Stover, 1962b], lo que determinó su cambio por clones del subgrupo Cavendish (AAA). Los clones Cavendish se afectaban solo en los subtrópicos, pero la aparición más recientemente de la raza 4 tropical, grupo de compatibilidad vegetativa (GCV 01213-01216) ha causado importantes pérdidas en plantaciones de Malasia e Indonesia [Masdek *et al.*, 2003; Nasdir, 2003]. Su entrada eventual a las plantaciones de Cavendish de América tendría un gran impacto económico y social.

El primer informe oficial de la enfermedad en Cuba fue el de Smith (1910). Johnston (1915) informó que el clon Gros Michel (AAA) y el Manzano (subgrupo Silk, AAB) se encontraban severamente afectados ya en 1910, aunque hay antecedentes de incidencia de la enfermedad en el clon Manzano (subgrupo Silk, AAB) desde finales del siglo XIX. A partir de la sustitución del Gros Michel por clones del subgrupo Cavendish y el cultivo masivo de clones de plátanos AAB, la marchitez por *Foc* perdió su importancia económica en Cuba, y quedó confinada a las pequeñas parcelas de agricultores y jardines de viviendas, donde *Foc* se mantenía sobre plantas de los clones Burro Criollo (Bluggoe, ABB) y Manzano.

La aparición de la Sigatoka negra en Cuba a finales de 1990 [Vidal, 1992] tuvo un impacto marcado en los costos de producción, pero especialmente en la estructura clonal de la superficie del país plantada de musáceas [Pérez *et al.*, 2002]. Los bananos Cavendish (AAA) se sustituyeron por los clones tetraploides híbridos de la FHIA (FHIA 23, FHIA 18, FHIA 3), que ocupan alrededor de 11 000 ha. En la actualidad se cultivan a gran escala el clon Burro CEMSA (ABB) que ocupa unas 63 000 ha, y el FHIA 3 (AABB), y se ha popularizado el cultivo del Burro Vietnamita (Pisang awak, ABB) debido a su sabor asemejante al del Manzano. En estos clones se ha incrementado la presencia de la enfermedad.

Foc está considerado un patógeno altamente complejo, y se han utilizado numerosos métodos para caracterizarlo. La variabilidad de las poblaciones, las relaciones filogenéticas y su evolución se han determinado en función de la patogenicidad [Stover y Waite, 1960; Stover, 1962b; Su *et al.*, 1977, 1986; Stover y Buddenhagen, 1986], grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) [Leslie, 1990, 1993; Ploetz, 1990; Pegg *et al.*, 1993; Ploetz y Pegg, 1999], número de cromosomas y cantidad de ADN total [Boehm *et al.*, 1993], producción de volátiles [Stover, 1962a, b; Moore *et al.*, 1991], los cariotipos electroforéticos [Boehm *et al.*, 1993; O'Donnell *et al.*, 1997] y el polimorfismo de los fragmentos de restricción [Bentley y Bassam, 1996; Koenig *et al.*, 1997; Bentley *et al.*, 1998].

La formación de heterocariones es una vía mediante la cual hongos normalmente haploides pueden tener el beneficio de una diploidía funcional, como son la complementación y la heterosis [Leslie, 1993]. A los hongos capaces de formar tales heterocariones se les denomina *vegetativamente compatibles*. La compatibilidad vegetativa ha sido utilizada para identificar

subpoblaciones genéticamente aisladas de especies de patógenos fungosos [Puhalla, 1985; Cove, 1976; Correll *et al.*, 1987]. La compatibilidad vegetativa en muchos hongos requiere que los alelos de al menos 10 locus (*vic*) diferentes sean idénticos [Puhalla y Spieth, 1985], por lo cual los miembros de un GCV constituyen subpoblaciones clonales que están estrechamente relacionadas (nunca se ha observado compatibilidad vegetativa entre líneas de diferentes *formae specialis*). Al mismo tiempo, dos individuos vegetativamente compatibles deben ser idénticos para genes responsables de la patogenicidad, la adaptación ecológica y otras características que afectan su papel como patógenos del banano. Debido a esta asociación los GCV en cada localidad son indicadores fuertes del comportamiento patogénico, y una herramienta poderosa en el estudio de la biología de las poblaciones y la genética, muy especialmente en el caso de *Foc-Musa*, donde el análisis genético de la patogenicidad es prácticamente imposible. Se han clasificado al menos veinte GCV o complejos de GCV en *Foc* [Ploetz y Correll, 1988; Ploetz, 1990; Brake *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 1993; Pegg *et al.*, 1993; Bentley *et al.*, 1998].

El AFLP (polimorfismo de los fragmentos de restricción amplificados) es una poderosa técnica de marcaje molecular basada en la detección de fragmentos de restricción del ADN por amplificación mediante PCR, la cual puede utilizarse en ADN de cualquier origen y complejidad [Vos *et al.*, 1995]. Andel-Satar *et al.* (2003) utilizaron esta técnica para estudiar las relaciones genéticas dentro y entre poblaciones naturales de cinco *Fusarium* spp. Por su parte, O'Neill *et al.* (2003) utilizaron AFLP para el estudio de los niveles de variación genómica dentro de especies como *Colletotrichum* y *Fusarium*.

El objetivo del presente estudio fue determinar la variabilidad fenotípica, fisiológica, genética y patogénica de las poblaciones de *Foc* presentes en Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la colecta de los aislados se realizaron muestreos de plantas con síntomas de marchitez por *Foc* en diferentes localidades del país, los cuales aparecen en la *Tabla 1* y en la *Fig. 2*. Se tomaron fragmentos de tejidos afectados del pseudotallo con síntomas, y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% durante 3 min; luego se sembraron fragmentos de 1-2 mm en agua-agar + 50 µg/mL de sulfato de estreptomycin. El micelio obtenido se transfirió a placas de Petri con agar-papa-

dextrosa (PDA), y se incubó a 25°C en la oscuridad durante cinco días. Se obtuvieron cinco cultivos monospóricos de cada aislado según el procedimiento descrito por Booth (1977), y después de incubarlos de cuatro a siete días se procedió a conservarlos en papel de filtro a 4°C, de acuerdo con el método descrito por Correll *et al.* (1986).

Se sembraron cinco réplicas de discos de micelio de 5 mm de diámetro de cada uno de los aislados en estudio cultivados en PDA y en medio Komada modificado (K2) [Sun *et al.*, 1978]. Se caracterizó la morfología de las colonias y la formación de pigmentos en PDA después de 14 días de incubación a 27°C, y se determinó la presencia o no de bordes laciniados de las colonias en el medio K2.

Para determinar la producción de compuestos volátiles se prepararon erlenmeyers de 250 mL con 30 mL de arroz pulido y 90 mL de agua destilada, y se esterilizaron a temperatura de 128°C durante 1 h por dos días consecutivos. Estos erlenmeyers se inocularon con discos de 5 mm de diámetro de micelio de cada aislado en estudio, y se incubaron a 27°C durante 14 días bajo la acción de tres lámparas de 40 W de luz fluorescente a 40 cm de altura, según método descrito por Moore *et al.* (1991). Posteriormente se determinó la presencia de compuestos volátiles en el espacio superior del cultivo de arroz, para lo cual se tomó 1 mL de estos gases y se inyectó en un cromatógrafo gaseoso, equipado con detector de llama y columna capilar de 15 m y 0,53 mm de diámetro interno, recubierta con DB-5, a una temperatura del horno de 40°C y temperatura del inyector de 110°C. Para expresar la composición química de los gases presentes se acopló al cromatógrafo de gases un espectrómetro de masa GC-MS, TRIO 1000.

Para determinar el crecimiento de las colonias a diferentes temperaturas se seleccionaron siete aislados pertenecientes a la raza 1 (GCV 01210) y cinco aislados de la raza 2 (GCV 0124 y 0124/0125). Se sembraron discos de 5 mm de micelio en el centro de placas de Petri de 10 cm con PDA, y se incubaron en una batería de incubadoras a las temperaturas de 8, 10, 12, 15, 20, 25, 28, 30, 35 y 38°C, hasta que la placa quedara cubierta por el crecimiento radial de la colonia en la temperatura más favorable. Se utilizaron cuatro repeticiones por temperatura. Se midió el diámetro de todas las colonias y se ajustaron curvas de regresión cuadráticas del crecimiento en función de la temperatura con el paquete estadístico Statistica 5.0

para Windows. Se compararon las medias del crecimiento de las colonias pertenecientes a cada una de las razas a la temperatura de 27°C mediante el test de Neumann-Keuls.

A cada aislamiento de la colección se le determinó la raza a la que pertenecía por inoculación en los clones diferenciales descritos por Stover (1962b) mediante aplicación de una suspensión de micelio y esporas en bolsas con plantas de cultivo de tejidos sanas, o se estableció putativamente si se obtuvo en el campo en los clones diferenciales Gros Michel, Manzano o Burro Criollo (Bluggoe). Se determinó a cuál grupo de compatibilidad vegetativa pertenecía cada uno de los aislamientos obtenidos, según el procedimiento tratado por Puhalla (1985) y Correll *et al.* (1987), para lo cual se desarrollaron mutantes auxotróficos. Con este fin se inocularon placas Petri de 10 cm con medio mínimo más el 15% de clorato de potasio, y se incubaron a temperatura ambiente hasta el surgimiento de sectores de crecimiento micelial diferenciado, los que fueron aislados en tubos con cuñas de agar con medio mínimo. A continuación se realizaron las pruebas fisiológicas para determinar los fenotipos *nit 1*, *nit 3* y Nit M (deficientes en las enzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa o el cofactor molibdeno, respectivamente), de acuerdo con el procedimiento utilizado por Correll *et al.* (1987). Se realizaron ensayos de autocompatibilidad por el apareo de los mutantes *nit 1* y Nit M obtenidos de cada aislamiento entre sí. Se descartaron los que fueron autoincompatibles, y se asumió que pertenecían a fenotipos *crn* que no formarían heterocariones al cruzarse con los probadores Nit M de la colección internacional. Se determinó a cuál GCV pertenecía cada aislamiento de la colección, y para ello se sometieron a prueba de compatibilidad los mutantes *nit 1* obtenidos de cada aislamiento, con una colección de mutantes Nit M pertenecientes a los GCV 0120, 0121, 0122, 0123, 0124, 0124/0125, 0128, 0129 01210, 01212, 01213, 01214 y 01215 donados por los doctores Ken Pegg, del Queensland Department of Primary Industries, Australia; Suzy Bentley, del Cooperative Research Center for Tropical Plant Pathology in Queensland, Australia; y Julio Hernández, del INIA en Islas Canarias. La existencia de compatibilidad fue determinada por la formación de heterocariones puestos en evidencia por el crecimiento micelial denso en la zona de unión de las colonias enfrentadas (*Fig. 1*).

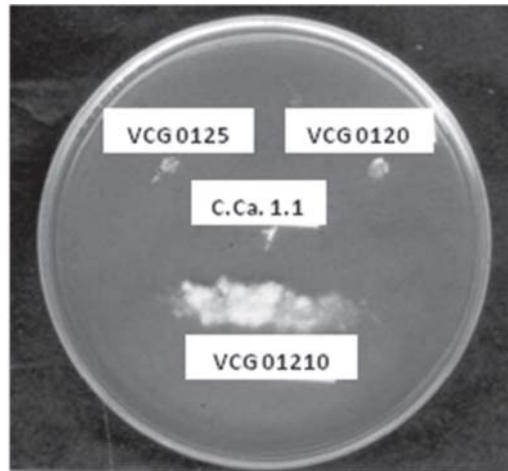


Figura 1. Prueba de complementación entre los Nit M internacionales pertenecientes a los VCG 0125, 0120 y 1210, y el *nit 1* obtenido del aislamiento de *Foc* C.Ca.1.1 del clon Manzano en Camagüey. El crecimiento micelial intenso indica que el aislado pertenece al GCV 01210.

Para proceder a la determinación de la variabilidad genética y las relaciones filogenéticas entre los aislamientos se realizó un ensayo de AFLP. A fin de obtener suficiente micelio para las extracciones de ADN, los aislamientos de *Foc* se cultivaron en erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de caldo de papa-dextrosa durante cinco días a una temperatura de 27-30°C. Transcurrido el tiempo de incubación, el contenido de cada erlenmeyer se filtró a través de papel de filtro y se lavó con agua destilada estéril para eliminar restos del medio y se conservó en placas de Petri de 10 cm en un frízer a -20°C.

Se realizó extracción de ADN de 40 aislados de *Foc*, para lo cual se maceraron 0,2 g de material fresco y se desarrolló el protocolo descrito por Möller y Bahnweg (1992). La concentración de ADN fue determinada mediante un espectrofotómetro con una cubeta de 5 µL.

Para la preparación de los adaptadores se utilizaron 3,58 µL de Eco adaptador superior (0,77 µg/µL); 2,98 µL de Eco adaptador inferior (0,98 µg/µL); 48,14 µL de Mse adaptador superior (0,54 µg/µL); 48,4 µL de Mse adaptador inferior (0,47 µg/µL). Se incubaron a 65°C durante 10 min y se colocaron a temperatura ambiente para que se enfriaran lentamente y garantizar la unión de los oligonucleótidos.

Para la digestión del ADN se utilizó un volumen de reacción de 50 µL y se colocaron 100 ng/µL de ADN, 5 µL de Buffer 2; 0,2 µL de BSA; 5 u de EcoR I y 5 u de Mse I. Los buffers utilizados fueron: a) *buffer* t4 ligasa (Tris HCl pH 7,5; 250 mM; MgCl₂ 100 mM; DTT 50 mM;

espermidina 5 mM); b) *buffer* TaqPol (Tris HCl pH 8,3; 100 mM; MgCl₂ 15 mM; KCl 500 mM); c) *buffer* de carga (formamida 98%, EDTA pH 8, 10 mM; trazas de bromofenol azul y xileno). Esta mezcla se incubó durante 2 h a 37°C. Se preparó en tubo aparte una mezcla de los adaptadores que contenía 1 µL de adaptador de EcoRI; 1 µL de adaptador de Mse I; 1 µL de *buffer* ligasa, con 10 mM de ATP; y 1 u de T₄ ADN ligasa. Se llevó a 10 µL con agua Milli-Q y se añadió a cada tubo de la digestión. Se incubó a 16°C durante toda la noche y se realizó una dilución de 1/10 de cada tubo.

Preamplificación: Se tomaron 5 µL del ADN diluido del paso anterior y en un volumen final de 50 µL se añadió 1 µL de cebador Eco + A (100 ng/µL); 1 µL de cebador Mse + C (100 ng/µL); 2 µL de dNTP; 5 µL *buffer* TaqPol; 2 µL MgCl₂; 1 u de TaqPol, y se utilizó un equipo termociclador para PCR con un programa de 20 ciclos de: a) 30 s a 94°C; b) 60 s a 56°C; c) 60 s a 72°C.

Amplificación: Para la amplificación se utilizaron 5 µL de ADN preamplificado, y se añadió en un volumen final de 20 µL; cebador de E-NNN 0,2 µL; cebador M-NNN 4,5 µL; *buffer* de TaqPol 2,0 µL; MgCl₂ 0,8 µL; TaqPol 1 u.

Las combinaciones de los cebadores utilizadas fueron: a) E-AAC/M-CAA; b) E-AAC/M-CAG; c) E-AGG/M-CTC.

Se utilizó el mismo equipo de PCR. La descripción del programa utilizado para la amplificación fue: ciclo 1) 30 s a 94°C, 30 s a 65°C, 60 s a 72°C; ciclo 2-13) similar

al ciclo 1, pero la temperatura de hibridación disminuyó 0,7°C en cada ciclo durante 12 ciclos; ciclo 14–36) 30 s a 94°C; 30 s a 56°C; 60 s a 72°C.

Corridas electroforéticas. Las corridas electroforéticas se realizaron en gel de poliacrilamida, para lo cual a las muestras se les añadieron 10 µL de *buffer* de corrida, se desnaturalizaron durante 3 min a 95°C y se colocaron rápidamente en hielo. Se aplicaron 7 µL en cada pocito del gel. Los geles de poliacrilamida para las corridas electroforéticas se prepararon según el protocolo de Promega (1998). A través de un espectrofotómetro se determinaron las densidades ópticas de las muestras, y con ellas la concentración de cada una. Se realizó la digestión del DNA con las enzimas Taq I y Ase I.

Análisis de datos. Se consideraron solamente los marcadores polimórficos, los cuales se registraron manualmente en una matriz de datos binarios (con la presencia como 1 y la ausencia como 0). A partir de las matrices de datos originales se calculó la similitud genética (SG_{ij}) entre cada par de aislados, para lo que se empleó el índice de Jaccard (1908):

$$SG = \frac{a}{a + b + c}$$

donde:

- a: Presencia de la banda en los genotipos i y j
- b: Presencia de la banda en el genotipo i y ausencia en j
- c: Ausencia de la banda en el genotipo i y presencia en j

Los agrupamientos de los genotipos se efectuaron sobre la base de los valores de disimilitud (1-SG_{ij}) entre todos los pares de aislados, con el algoritmo SAHN propuesto por Sneath y Sokal (1973) del paquete estadístico de computación NTSYS pc., versión 2.10j, por presentar los valores cofenéticos más adecuados.

Se realizó la confirmación del análisis de conglomerados y de los grupos de diversidad mediante remuestreo (2000 permutaciones), para lo cual se utilizó el paquete WinBoot (1984-1991; UPGMA bootstrapping for binary data [Nelson, 1996].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un total de 52 aislamientos a partir de plantas naturalmente enfermas de diferentes localidades del país (Fig. 2 y Tabla 1).



Figura 2. Localidades donde se realizaron los muestreos de plantas enfermas de mal de Panamá. Los nombres específicos de los sitios aparecen en la Tabla 1.

La morfología de todas las colonias monoconidiales obtenidas fue del tipo algodonoso, descrito por Stover (1962b), de crecimiento aéreo abundante con diferencias en el tipo de pigmentación. No fueron observadas colonias pionnotales o cordadas. En la Tabla 2 aparecen siete grupos de colonias de acuerdo con el

color del micelio y la pigmentación. No existió relación entre las razas a la que pertenecían los aislamientos y la morfología de las colonias. Asimismo ninguno de los aislamientos formó lacinias en medio K2, lo que concuerda con los resultados de Sun *et al.* (1978).

Tabla 1. Relación de los aislamientos de *Foc*, clones, localidades, razas y GCV, características morfológicas de los aislamientos y producción de volátiles

No.	Aislamientos	Clon de origen	Raza	GCV	Localidad	Morfología de las colonias	Compuestos volátiles
1	C.Esm 1.1	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124/125	Esmeralda, Camagüey	Algodonosa, rosado intenso con bordes rojizos	+
2	C.Esm 1.2	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124/125	Esmeralda, Camagüey	Algodonosa, rosado intenso con bordes rojizos	+
3	C.Esm 1.3	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124/125	Esmeralda, Camagüey	Algodonosa, rosado intenso con bordes rojizos	+
4	C.Esm 2.1	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124/125	Esmeralda, Camagüey	Algodonosa, rosado intenso con bordes rojizos	+
5	C.Esm 2.2	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124/125	Esmeralda, Camagüey	Algodonosa, rosado intenso con bordes rojizos	+
6	Ca.Ji 2.1	Manzano	1	01210	Jimaguayú, Camagüey	Algodonosa, blanca rosácea	-
7	VCSD-1	Gros Michel	1	01210	Santo Domingo, Villa Clara	Algodonosa, blanca-crema-rojiza	+
8	CAM 3	Manzano	1	01210	Camagüey	Algodonosa, blanca rosácea	+
9	C.Gua 1.1	Burro Criollo (Bluggoe)	2	01210	Guáimaro, Camagüey	Algodonosa, rosa intenso	+
10	C.S 1.1	Burro Criollo (Bluggoe)	2	*	Sola, Camagüey	Algodonosa, blanca rosácea	-
11	C.S 1.2	Burro Criollo (Bluggoe)	2	*	Sola, Camagüey	Algodonosa, blanca rosácea	-
12	C.V 2.1	Burro Criollo (Bluggoe)	2	01210	Vertientes, Camagüey	Algodonosa, blanco rosácea	-
13	ESB-1	Burro Criollo (Bluggoe)	2	01210	Esmeralda, Camagüey	Algodonosa, blanca bordes rosado intenso	+
14	ESB-3	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124	Esmeralda, Camagüey	Algodonosa, blanca-rosada	-
15	ESB-4	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124	Esmeralda, Camagüey	Algodonosa, blanca-rosada	-
16	ESB-5	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124	Esmeralda, Camagüey	Algodonosa, blanca-rosada	-
17	CAM 2.1	Manzano	1	0124	Morón, Ciego de Ávila	Algodonosa, blanco-crema-rojizo	-
18	Yat 1.1	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124	Yateras, Guantánamo	Algodonosa blanca-rosada	-
19	PS 1.1	Burro Criollo (Bluggoe)	2	*	Palma Soriano, Santiago de Cuba	Algodonosa blanca-rosada	-
20	C.Ca 1.1	Manzano	1	01210	Ciudad de Camagüey	Algodonosa, blanca-rosada	+
21	IJ-1	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124	Isla de la Juventud	Algodonosa, blanca rosácea	-
22	SC-1	Burro CEMSA	2 (putativa)	*	Palma Soriano, Santiago de Cuba	Algodonosa, blanca con bordes rosado intenso	-
23	SC-2	FHIA-03	2 (putativa)	01210	Palma Soriano, Santiago de Cuba	Algodonosa, blanca con bordes rosado intenso	-
24	SC-3	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0128	Palma Soriano, Santiago de Cuba	Algodonosa, blanca con bordes rosado intenso	-
25	GuCUM	Burro CEMSA	2	0124	Cupey, Maisí, Guantánamo	Algodonosa, blanca rosácea	-
26	GuBaCu	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124	La Cuchilla, Baracoa, Guantánamo	Algodonosa, blanca rosácea	-
27	GuMa	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124	Maisí, Guantánamo	Algodonosa, blanca rosácea	+

28	TUPP	Manzano	1	01210	Puerto Padre, Las Tunas	Algodonosa, blanca bordes rosado intenso	+
29	GuBaPo	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124	La Pao, Baracoa, Guantánamo	Algodonosa, blanca rosácea	+
30	C.Ca 2	Manzano	1	0124	Ciudad de Camagüey	Algodonosa, blanca rosácea	-
31	SCGu	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124	Guamá, Santiago de Cuba	Algodonosa, blanca rosácea	-
32	WaHa	Burro CEMSA	2 (putativa)	No determinado**	Autopista y Wajay, Ciudad de La Habana	Algodonosa, blanca rosácea	-
33	MoGu 1	Burro Vietnamita (Pisang awak)	2	0124	Guira de Melena, finca Morenita	Algodonosa, blanca rosácea	+
34	MoGu 2	Burro Vietnamita (Pisang awak)	2	0124	Guira de Melena, finca Morenita	Algodonosa, blanca rosácea	+
35	MoGu 3	Burro Vietnamita (Pisang awak)	2	0124	Guira de Melena, finca Morenita	Algodonosa, blanca rosácea	+
36	PaGu 1.1	Burro Vietnamita (Pisang awak)	2	0124	Guira de Melena, La Paz	Algodonosa, blanca rosácea	+
37	AlqHa 1	Burro Vietnamita (Pisang awak)	2 (putativa)	GCV No determinado**	Empresa de Cultivos Varios Alquízar	Algodonosa, blanca bordes rosado intenso	-
38	AlqHa 2	Burro Vietnamita (Pisang awak)	2 (putativa)	GCV No determinado**	Empresa de Cultivos Varios Alquízar	Algodonosa, blanca bordes rosado intenso	-
39	GuHa	Burro Vietnamita (Pisang awak)	2 (putativa)	GCV No determinado**	Empresa de Cultivos Varios Guira de Melena	Algodonosa, blanca rosácea	-
40	PeBa	Burro CEMSA	2 (putativa)	0124	La Perera, Quivicán, Baracoa	Algodonosa, blanca	-
41	ToaGu	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124	Palmarco del Toa Baracoa	Algodonosa, blanca violácea	-
42	Bar 1	Burro Criollo (Bluggoe)	2	0124	ETPP Baracoa	Algodonosa blanca rosácea	+
43	Bar 2	Burro Criollo	2	0124	ETPP Baracoa	Algodonosa, blanca rosácea	+
44	MaHo 1	Burro CEMSA	2	0124	CPA Bastión 86, Mayarí, Holguín	Algodonosa, blanca	-
45	BaHo 1	Burro Criollo	2	0124	ETPP Banes, Holguín	Algodonosa, blanca violácea	-
46	BaHo 2	Burro Criollo	2	0124	Banes, casa de vivienda, Holguín	Algodonosa, blanca violácea	-
47	MaHo 2	Burro Criollo	2	0124	El Purio Abajo, Levisa, Mayarí, Holguín	Algodonosa, blanca	-
48	SaHo	Pisang awak	2	0124	Empresa de Cultivos Varios Sagua, Frente José Maceo, Holguín	Algodonosa, blanca	+
49	Bar 3	Manzano	1	01210	Finca autoconsumo, Delegación Baracoa	Algodonosa, blanca rosácea	+
50	R.Go	Manzano	1	01210	Casa particular, municipio, Playa, Ciudad de La Habana	Algodonosa, blanca	+
51	R-1	Burro Criollo (Bluggoe)	1	0124	Invit, Santo Domingo, Villa Clara	Algodonosa blanca violácea	+
52	R-2	Manzano	2	01210	Invit, Santo Domingo, Villa Clara	Algodonosa, blanca violácea	+

* Compatibilidad débil.

** No pertenecen a ninguno de los GCV de los Nit M disponibles en Cuba (0120, 0121, 0122, 0123, 0124, 0124/0125, 0128, 0129, 01210, 01212, 01213, 01214 y 01215).

Tabla 2. Frecuencia de las características fenotípicas de los cultivos de los aislamientos de *Foc* en medio PDA

No.	Características morfológicas	Raza	Frecuencia (%)	Formación de lacinias en medio K2
1	Algodonosa, blanca crema-rojizo	1	5,2	–
2	Algodonosa, blanca crema-salmón	1	2,2	–
3	Algodonosa, blanca rosácea	1	7,7	–
		2	49,7	–
4	Algodonosa, blanca bordes rosado	2	2,6	–
5	Algodonosa, blanca bordes rosado intenso	1	2,6	–
		2	13,1	–
6	Algodonosa, rosado, con bordes rojizos	2	13,1	–
7	Algodonosa, rosa intenso	2	2,6	–

Las determinaciones cromatográficas y espectrofotométricas de los gases producidos en la superficie de los cultivos de *Foc* en arroz demostraron la presencia de los compuestos etenil-benceno y el biciclo 4,2,0-Octa-1,3,5-trieno (Tabla 3 y Fig. 3), confirmados por los informes previos realizados, por lo que ya había sido ratificado previamente en los informes de Brandes (1919) y Stover (1962a), y cuya composición química coincide con la de los compuestos encontrados por Moore *et al.* (1991) en estudios con poblaciones de *Foc* del sudeste asiático y el Pacífico. Los aislamientos cubanos de las razas 1 y 2 de *Foc* pueden indistintamente producir o

no volátiles, lo que confirman los informes previos de Stover (1962a). No se observó relación entre la producción de pigmentos, las razas a la que pertenecían los aislamientos y la presencia de compuestos volátiles, lo cual está en conflicto con lo reportado por Moore *et al.* (1991), que observaron la producción de estos compuestos volátiles solo en el caso de aislamientos pertenecientes a la raza 4 del patógeno en aislamientos de Asia. Sería interesante en el futuro determinar si existe correlación con la agresividad de *Fusarium oxysporum* mediante la comparación de aislamientos no patogénicos y patogénicos de diferentes *formae specialis* de esta especie.

Tabla 3. Frecuencia de la presencia de compuestos volátiles en medio de arroz producidos por aislamientos de *Foc*

Presencia de volátiles	Raza	Frecuencia de aislamientos (%)
+	1	12,8
–	1	5,1
+	2	38,5
–	2	43,5

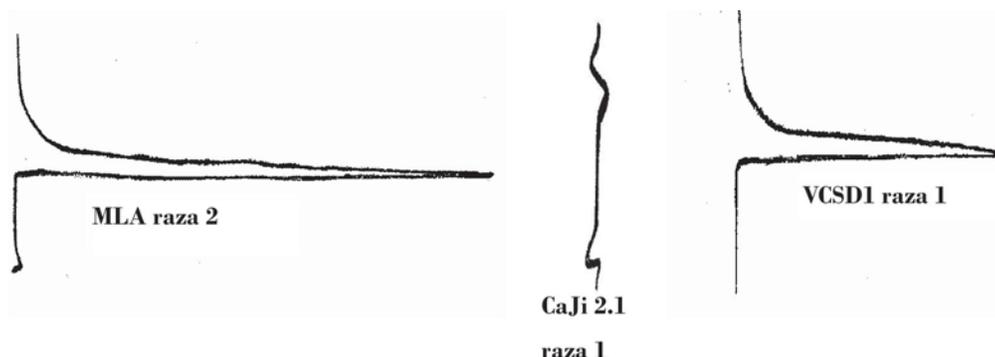


Figura 3. Cromatogramas de los compuestos volátiles producidos por los cultivos de aislamientos pertenecientes a diferentes razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.

En la Fig. 4 aparecen las curvas ajustadas del crecimiento de las colonias de diferentes aislamientos pertenecientes a las razas 1 y 2. Todos los aislamientos se desarrollaron en el rango de temperatura entre 8 y 38°C. Se observa una meseta de crecimiento en todas las curvas en el rango de temperaturas entre 23 y 29°C. En la Tabla 4 aparece el resultado del análisis de varianza del crecimiento de los aislamientos, estimado de acuerdo

con ecuaciones de ajuste de crecimiento de las colonias de un grupo de cinco aislamientos agrupados por razas, en relación con la temperatura de 27°C, que resultó la óptima para el crecimiento de las colonias según todas las ecuaciones de ajuste obtenidas. Los aislamientos pertenecientes a la raza 2 presentaron una leve tendencia a un crecimiento más rápido a la temperatura de 27°C.

Tabla 4. Crecimiento de las colonias en diferentes temperaturas y comparación del crecimiento estimado por ajuste estadístico de aislamientos pertenecientes a las razas 1 y 2 en PDA a 27°C

Aislamientos	Raza	Ecuación de ajuste del crecimiento de las colonias en función de la temperatura / por ciento de la variación explicada	Diámetro estimado de las colonias a los siete días en PDA (mm)	Media del diámetro para cada raza (mm)
C.Ca. 1.1	1	$Y = 0,60 + 0,18X + 0,03X^2 - 0,001X^3/(96,5)$	76,5	
C.V. 1.1	1	$Y = -14,87 + 3,0X - 0,11X^2 + 0,001X^3/(99,5)$	56,2	
CA.M. 1.2	1	$Y = -12,65 + 2,16X - 0,05X^2 - 0,00004X^3/(96,4)$	84,3	80,1 a
CA.M. 2.2	1	$Y = -11,8 + 2,04X - 0,05X^2 + 0,00003X^3/(96,4)$	74,2	
C.Esm 1.3	2	$Y = 79,91 - 8,44X + 0,34X^2 - 0,005X^3/(97,8)$	147,5	
C.S. 1.2	2	$Y = -6,54 + 0,84X + 0,02X^2 - 0,001X^3/(92,4)$	110,4	116,7 b
C.GUA. 1.2	2	$Y = -2,29 + 0,95X - 0,01X^2 - 0,0004X^3/(95,8)$	81,9	
C.E. 2.1	2	$Y = -15,04 + 2,32X - 0,05X^2 - 0,0001X^3/(97,0)$	109,5	
C.V. 2.1	2	$Y = -2,28 + 1,07X - 0,01X^2 - 0,0003X^3/(96,7)$	134,1	

Letras diferentes indican diferencias significativas al 5% según el test de Neuman-Keuls.

La mayoría de los aislamientos (Tabla 5) pertenecieron a los GCV 0124 y 0124/125 (más del 50% de las accesiones de la colección). Estos GCV son de una amplia dis-

tribución mundial [Ploetz, 1990 y Pegg *et al.*, 1996]. La mayoría de los aislamientos pertenecientes a estos dos grupos con dos excepciones pertenecieron a la raza 2.

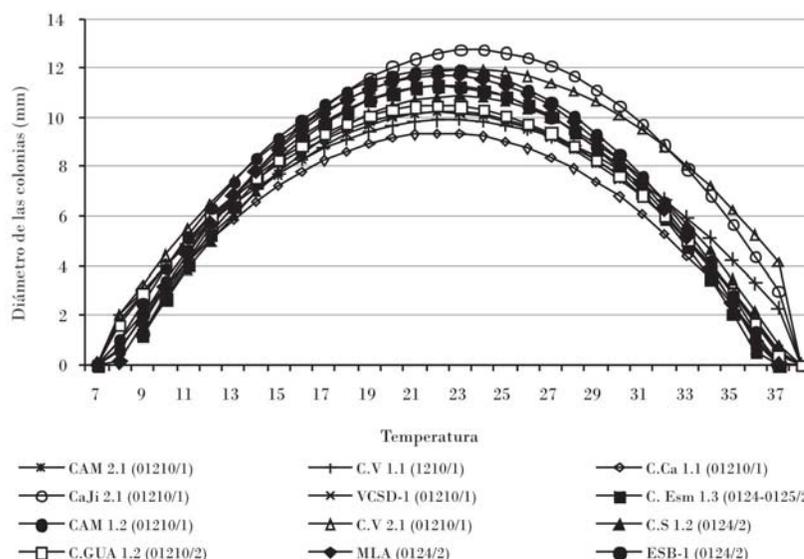


Figura 4. Crecimiento de las colonias pertenecientes a diferentes GCV y razas en diferentes temperaturas (en paréntesis los GCV/razas).

Tabla 5. Frecuencia de los aislamientos por grupos de compatibilidad vegetativa de las poblaciones de *Foc* de Cuba y su relación con las razas patogénicas

GCV	Raza	Frecuencia (%)	Total de aislamientos
01210	1	19,3	9
01210	2	5,8	3
124	2	50,0	26
0124	1	3,8	2
0124/125	2	9,6	5
128	2	1,9	1
Nuevo GCV.	2	7,7	4
CRN	2	3,8	2
Total de aislamientos	–	–	52

El grupo 0128 presenta una limitada distribución en Cuba (1,9% de los aislamientos). Hay informes de su presencia únicamente en Australia [Ploetz, 1990]. El único aislado encontrado en el presente estudio perteneció a la raza 2. Bentley y Bassam (1996) y Bentley *et al.* (1998) informaron que los aislamientos de este GCV que analizaron se encontraban genéticamente muy cercanos a los grupos 0124 y 0125, y lo incluyeron en el mismo linaje a que pertenece el grupo 0124. Los resultados de los análisis moleculares realizados en este estudio confirman estos informes previos, y puede considerarse que evolucionó a partir del GCV 0124.

El grupo 01210 se encontró con una frecuencia relativamente amplia (21,1% de los aislamientos) y con vasta presencia entre los aislamientos de la raza 1. Está informado además solo en el condado de Dade, en la Florida en 1986, y en las Islas Caimán [Ploetz y Pegg, 1999], aunque no se han publicado estudios exhaustivos en el resto de los países del Caribe, incluido las Antillas. La totalidad de los aislamientos obtenidos del clon Manzano (Silk, AAB) en el presente estudio pertenecen al grupo 01210 en correspondencia con los resultados de Ploetz (1990), en la Florida. La enfermedad fue descrita en Cuba desde principios del siglo pasado [Smith, 1910], y dado que el mal de Panamá no se había informado hasta hace relativamente poco tiempo en el condado de Dade, en la Florida [Ploetz y Shepard, 1989], hay posibilidades de que la presencia de este GCV en la Florida pudiera tener su origen en plantas del clon Manzano llevadas desde Cuba. Los GCV 01210 y 0124 fueron clasificados en linajes dife-

rentes debido a la considerable distancia genética en los estudios con una colección mundial de *Foc*, en la que no se incluyeron aislamientos cubanos. Bentley *et al.* (1998) y Ploetz y Pegg (1999) han informado que comparte del 89 al 92% de sus alelos con el GCV 0120, de amplia distribución mundial (Australia, África del Sur, Costa Rica, Guadalupe, Honduras, Islas Canarias, Malasia y Taiwán) [Ploetz, 1990], en el cual se incluyen aislamientos pertenecientes a la raza 4, la que no se ha encontrado en América.

En los estudios incluidos en el presente informe el VCG 01210 resultó agrupado en el mismo grupo donde se encuentra el GCV 0124, aunque no se pudieron incluir aislamientos del GCV 0120 por no encontrarse en Cuba. Por otro lado, todo indica que la marchitez por *Fusarium* antecede a la llegada del Gros Michel a América, y que puede tener una íntima relación con la distribución del clon Manzano [Stover, 1962b]. O'Donnell *et al.* (1997) sugirieron la posibilidad de un origen polifilético de las poblaciones y de la evolución independiente de los diferentes linajes encontrados de *Foc* a partir de otras *formae specialis* de *Fusarium oxysporum*. Hay evidencias que sugieren que unas razas patogénicas pueden derivarse de otras [Gordon y Martín, 1997], aunque no se han aportado pruebas irrefutables de esto.

En la *Tabla 6* aparecen los aislamientos de la colección que se incluyeron en el análisis molecular del polimorfismo de los fragmentos de restricción mediante AFLP, la raza a la que pertenecen y el rendimiento de ADN obtenido en la extracción.

Tabla 6. Aislamientos utilizados para el análisis de AFLP, GCV, raza y concentración de ADN obtenido

No.	Aislado	GCV ⁽¹⁾	Raza	Conc. ADN (µg/mL)	r ⁽²⁾	No.	Aislado	GCV ⁽¹⁾	Raza	Conc. ADN (µg/mL)	r ⁽²⁾
1	CAM 3	01210	1	0,4	1,8	21	PeBa	0124	2	0,1	1,8
2	CGua 1.1	01210	1	0,4	1,6	22	ESB-4	0124	2	0,2	1,7
3	C.Ca 1.1	01210	1	0,2	1,8	23	MaHo-1	0124	2	0,1	1,8
4	C.V 2.1	01210	1	0,1	1,6	24	BaHo-2	0124	2	0,1	1,8
5	Bar 3	01210	1	0,1	1,6	25	R-1	0124	2	0,1	1,8
6	SC-2	01210	2	0,2	1,6	26	Bar-2	0124	2	0,1	1,6
7	C.S 1.1	¿?	2	0,2	1,7	27	CoMa	¿?	2	0,2	1,7
8	ESB-5	0124	2	0,3	1,8	28	AlqHa-2	¿?	2	0,3	1,8
9	IJ-1	0124	2	0,1	1,7	29	Bar-1	0124	2	0,1	1,7
10	GuCuM	0124	2	0,1	1,8	30	ESB-1	0124	2	0,2	1,6
11	GuBaCu	0124	2	0,2	1,7	31	ESB-3	0124	2	0,3	1,6
12	GuMa	0124	2	0,1	1,5	32	AlqHa-1	¿?	2	0,3	1,6
13	GuBaPo	0124	2	0,3	1,8	33	GuHa	¿?	2	0,1	1,6
14	C.CA-2	0124	1	0,1	1,5	34	ToaGu	0124	2	0,2	1,6
15	SCGu	0124	2	0,2	1,7	35	SaHo	0124	2	0,2	1,6
16	WaHa	¿?	2	0,2	1,8	36	Ch	¿?	1	0,3	1,8
17	MoGu-1	0124	2	0,1	1,6	37	SC1	¿?	2	0,1	1,7
18	MOPU-2	0124	2	0,2	1,6	38	C. Esm 1.1	0124/0125	2	0,3	1,7
19	MOPU-3	0124	2	0,1	1,7	39	C.Esm 2.1	0124/0125	2	0,1	1,6
20	PaGu	0124	2	0,3	1,8	40	SC-3	0128	2	0,3	1,7

Los espacios con ¿? significan que el GCV no pudo ser identificado con los Nit M patrones o que no generaron mutantes *nit 1*.
 $r = \Lambda 280 / \Lambda 260$.

En las *Figs. 5A, 5B y 5C* se muestran los resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida al procesarse las muestras con la combinación de cebadores A (E-AAC/M-CAA), B (E-AAC/M-CAG) y C (E-AGG/M-CTC).

Por cuanto no se encontraron diferencias entre el análisis de la distancia genética con el empleo del coeficiente de Dice o de Jaccard, en la *Fig. 6* se muestra el dendrograma donde aparecen los grupos según la distancia genética de acuerdo con los coeficientes de Jaccard.

Los resultados de los análisis se encuentran de alguna manera influidos por el limitado número de combinaciones de cebadores disponibles para el estudio y por la alta proporción de aislamientos pertenecientes al GCV 0124 y la raza 2, en relación con los otros GCV representados en la colección con una menor frecuencia. De acuerdo con el análisis de UPGMA de los datos de la matriz binaria construida con el conjunto de los patrones polimórficos generados en el análisis de AFLP a partir del ADN total extraído de los aislamientos y según los coeficientes de similitud genética de Jaccard, se pudieron separar dos grandes grupos genéticos: uno

que agrupa al aislamiento 12 –obtenido de Burro Criollo, GCV 0124– y el aislamiento 16 –logrado de Burro CEMSA y sin GCV dentro de *Foc*, el cual posiblemente es un aislamiento no patogénico no perteneciente a esta *formae specialis*– y el otro que agrupa al resto de los aislamientos incluidos en el estudio y cuatro subgrupos con un nivel menor de similitud.

Los aislamientos pertenecientes al grupo 0124 se encontraron distribuidos en todos los subgrupos. Los correspondientes al GCV 01210, procedentes del clon Manzano (AAB), se agruparon, con muy poca similitud genética, junto a algunos aislamientos del GCV 0124 en unos de los subgrupos diferenciados, lo que indica que pudieran haber alelos compartidos en el genoma de estos dos subgrupos, y que si se hubiese dispuesto de más cebadores habrían podido agruparse en grupos independientes con un nivel mayor de disimilitud al encontrado.

Los dos aislamientos pertenecientes al grupo 0124/0125 y el único obtenido del GCV 0128 se agruparon dentro del grupo general correspondiente al GCV 0124.

La confirmación por remuestreo—2000 permutaciones, UPGMA *bootstrapping*— del análisis de conglomerados y de los grupos de diversidad, permitió confirmar que el aislamiento 16 no pertenece a *Foc*, a pesar de estar presente en el sistema radical afectado de la planta. Asimismo accedió verificar que hay una considerable distancia genética entre los aislamientos de diferentes GCV, y que los miembros de un mismo GCV formaron subgrupos entre sí y tienen un alto nivel de similitud genética. Los aislamientos pertenecientes al GCV 0124 fueron nueve obtenidos de Burro Camsa, 10 del Burro CEMSA y 18 obtenidos del Pisang awak (con un nivel de similitud del 99,8%); 7, 21 y 27 todos de Burro Criollo (con un nivel del 96,1%); 24 de Burro Criollo y 19 de Burro CEMSA (con el 98,9%); 17 de Pisang awak y 15 de Burro Criollo (con el 86,4%); los aislamientos 13, 15 y 30 de Burro Criollo, 34 y 35 de Burro CEMSA, y 32 de Pisang awak (con el 89%).

Los aislamientos 14 (único aislamiento obtenido del clon Manzano perteneciente al GCV 0124) y 21 (Burro Criollo GCV 0124) mostraron una alta identidad genética (95,3%).

Los aislamientos 38 y 39 obtenidos de Burro Criollo y pertenecientes al GCV 0124/0125 mostraron en el análisis de remuestreo una alta similitud con los aislamientos 26, 22 de Burro Criollo correspondientes al GCV 0124, pero con un nivel más moderado de soporte (79%), lo que indica que comparte alelos con él y puede considerarse que se derivó de este grupo de compatibilidad, como se ha sugerido previamente.

El aislamiento 40, perteneciente al GCV 0128, quedó agrupado en un clúster junto con aislamientos del GCV 0124 (aislamientos procedentes de los clones Burro CEMSA y Burro Criollo), pero con un nivel menor de similitud (66,7%), lo que argumenta a favor de que este GCV comparte alelos comunes con el 0124, aunque se distancia genéticamente de este en alguna medida.

Los aislamientos pertenecientes al GCV 01210 —aislamientos 4, 5, 6, todos obtenidos del clon Manzano de diferentes regiones del país— presentaron una alta identidad genética entre sí, con un nivel del 95,8%. Estos aislamientos, al mismo tiempo, presentan muy baja similitud genética con los aislamientos del GCV 0124, y recibieron muy bajo nivel de soporte en el análisis de remuestreo (< del 44%).

Como puede apreciarse, los aislamientos con mayor similitud genética estuvieron en todos los casos agrupados en el mismo GCV, lo que permite argumentar a favor de esta vía de clasificación genética de las poblaciones.

Los aislamientos pertenecientes al GCV 0124 se encontraron distribuidos en todos los grupos genéticos, para considerar, dada además su amplia distribución geográfica, que comparte sus alelos con la mayoría de los aislamientos y GCV, y que por tanto es un GCV original, del cual posiblemente se diferenciaron los genotipos pertenecientes a los GCV 0124/0125 y 0128. Esto confirma informes previos de los estudios con colecciones mundiales de la variabilidad de las poblaciones de *Foc* [Ploetz, 1990; Pegg *et al.*, 1996; Koenig, *et al.*, 1997].

En estudios similares donde se incluyeron aislamientos pertenecientes a todos los GCV conocidos de *Foc*, el GCV 01210 se agrupó en un linaje independiente [Koenig *et al.*, 1997] o en un linaje en el que se encuentra el GCV 0120 [Bentley *et al.*, 1998], también de gran distribución mundial, el cual no fue encontrado en Cuba, y por tanto no se incluyó en el análisis. En el presente estudio los aislamientos del GCV 01210 presentaron una gran identidad genética entre sí y se agruparon con algunos aislamientos del GCV 0124, lo que indica que comparte algunos alelos comunes en su genoma; pero en el remuestreo se encontró poco nivel de soporte (< 40%), de ahí que ambos GCV sean genéticamente distantes, lo que apoya los informes previos mencionados. No obstante, el hecho de que el GCV 01210 se ha encontrado solo a nivel mundial —en Cuba, donde hay referencias desde el siglo XIX de la presencia del hongo en el clon Manzano [Pérez, 2004] y la Florida, en que fue primeramente informado por Ploetz y Sheperd (1989), sitios donde no se encuentra el GCV 0120, así como la falta de similitud genética encontrada con el GCV 0124 en el presente estudio y en los informes previos— apoya el enfoque de un origen polifilético de las poblaciones de *Foc*, como han sugerido O'Donnell *et al.* (1997).

No obstante, se detectaron suficientes divergencias entre los aislamientos individuales como para considerar oportuno realizar un estudio posterior, en regiones más conservadas del ADN de *Foc*. Asimismo, el análisis de las bandas polimórficas comunes obtenidas entre los aislamientos del GCV 01210, no presentes en las de GCV 0124 0124/0125 y 0128, permite recomendar para el futuro su secuenciación, y ver la posible generación de cebadores para detectar y diferenciar por PCR los diferentes GCV del país, lo que agilizaría, haría más sensible y abarataría el diagnóstico del patógeno.

Los resultados permiten aseverar que los aislamientos del Burro Criollo (Bluggoe ABB, raza 2) son genéti-

camente muy similares a los obtenidos del clon Pisang awak (Burro Vietnamita, ABB), el cual ha sido atacado en la Florida por aislamientos pertenecientes a la raza 1 [Ploetz, 1990], y confirman los resultados de las inoculaciones artificiales realizadas por Pérez *et al.* (2004), en que ambos clones presentaron reacciones similares frente a dos aislamientos de la raza 2 a los GCV 0124 y 0128 obtenidos del clon Burro Criollo.

Se ha discutido la falta de estudios de la variabilidad de las poblaciones del patógeno en el nuevo mundo [Pérez, 2004]. Sería deseable completar un estudio de la composición de las poblaciones de *Foc* a nivel del Caribe y América del Sur que permitiera reconocer las poblaciones existentes en esta región y obtener un conocimiento más completo de la variabilidad real de las poblaciones de *Foc* en esta zona.

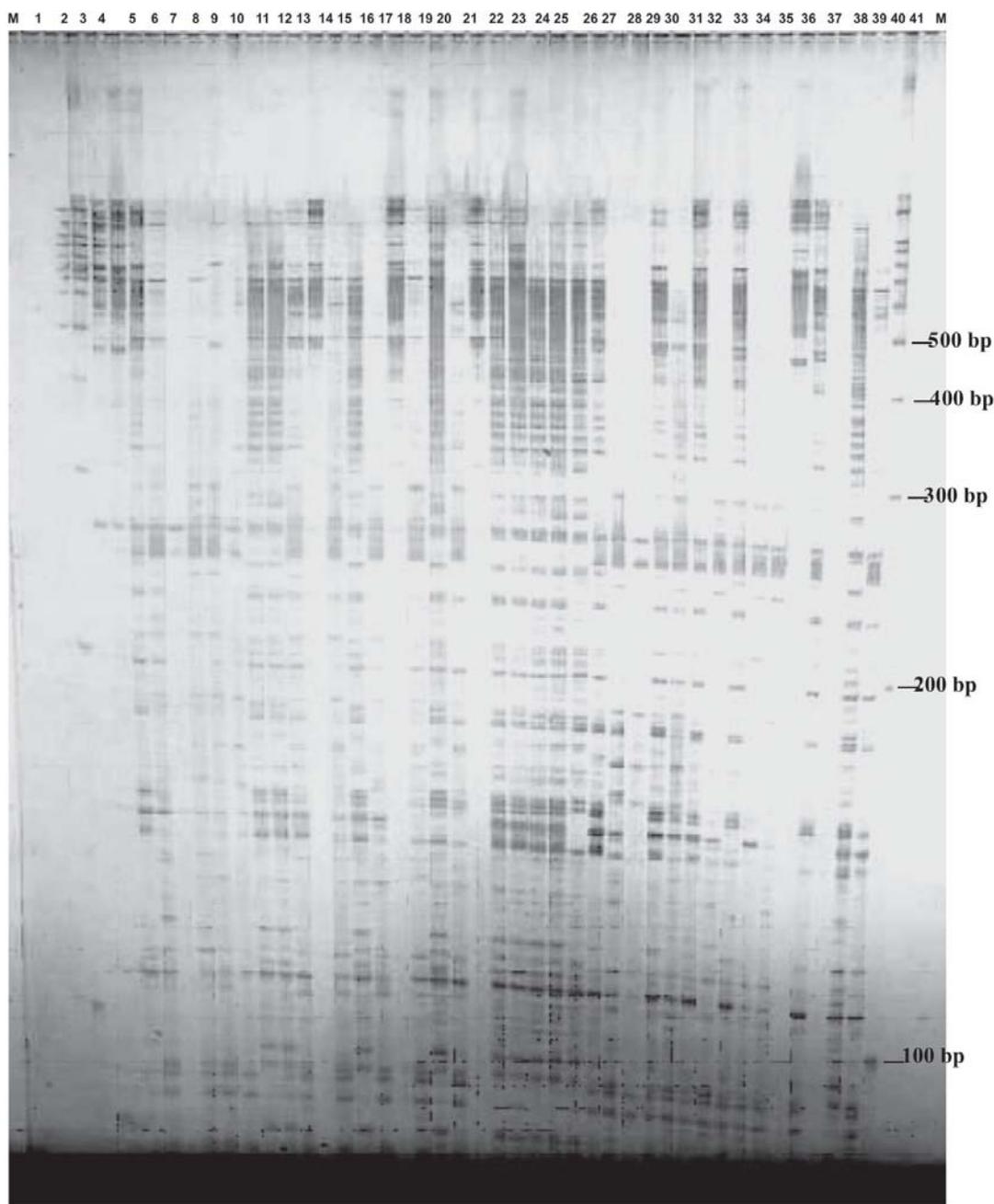


Figura 5A. Bandas polimórficas generadas a partir de la combinación A (E-AAC/M-CAA) de los cebadores utilizados en el análisis de AFLP. En la banda derecha se marca el peso molecular obtenido con patrones de referencia.

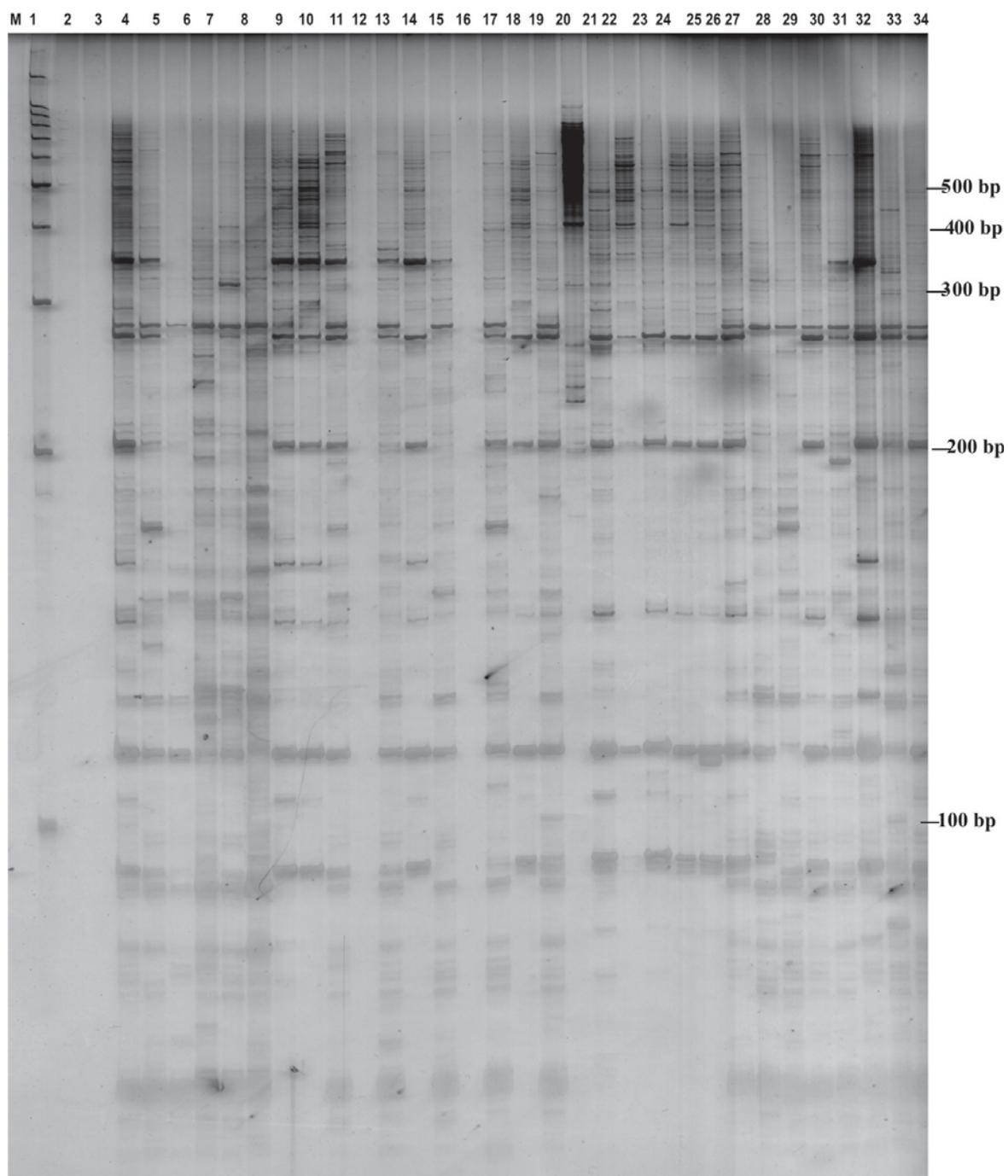


Figura 5B. Bandas polimórficas generadas a partir de la combinación B (E-AAC/M-CAG) de los cebadores utilizados en el análisis de AFLP. En la banda derecha se marca el peso molecular obtenido con patrones de referencia.

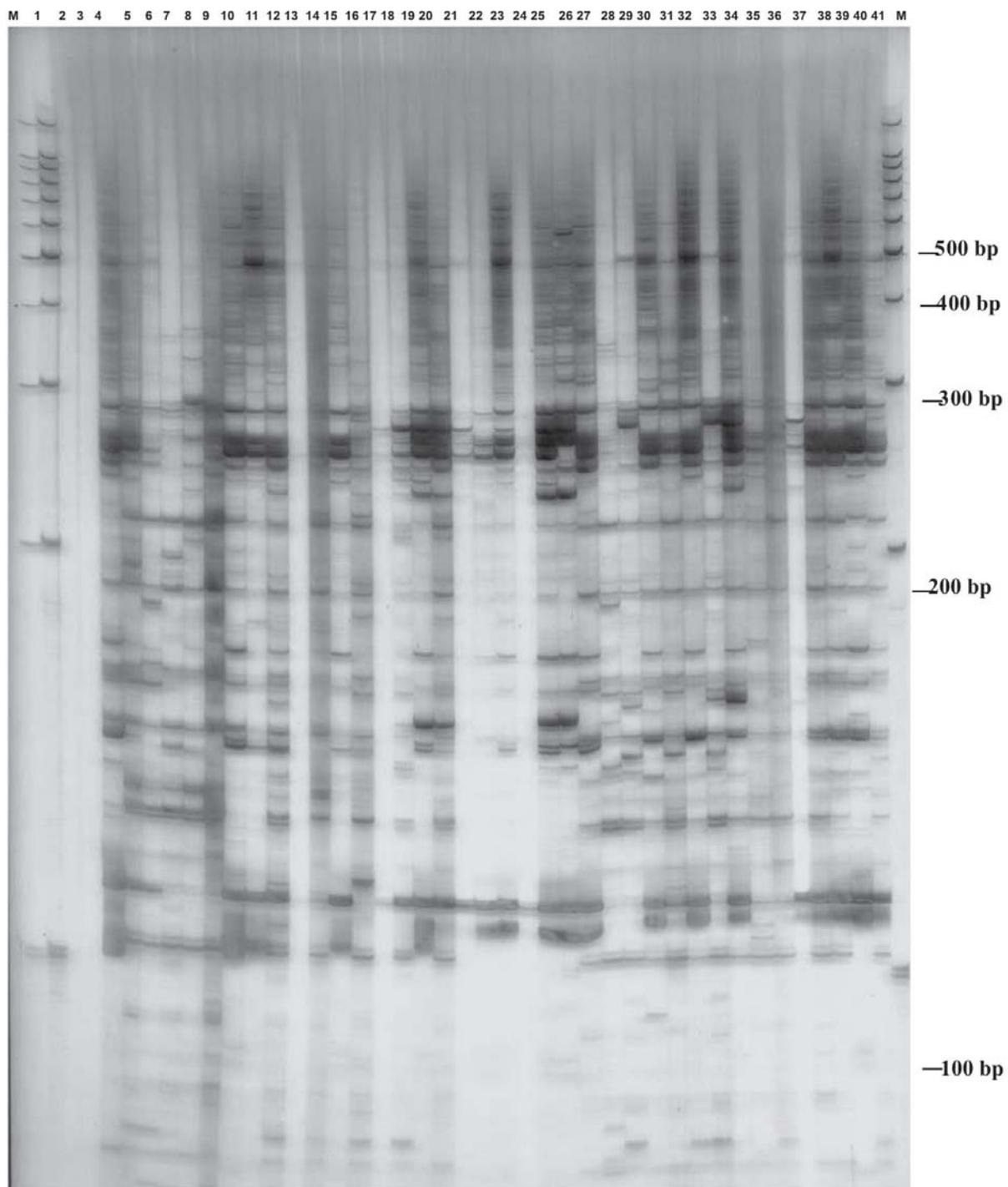


Figura 5C. Bandas polimórficas generados a partir de la combinación C (E-AGG/M-CTC) de los cebadores utilizados en el análisis de AFLP. En la banda derecha se marca el peso molecular obtenido con patrones de referencia.

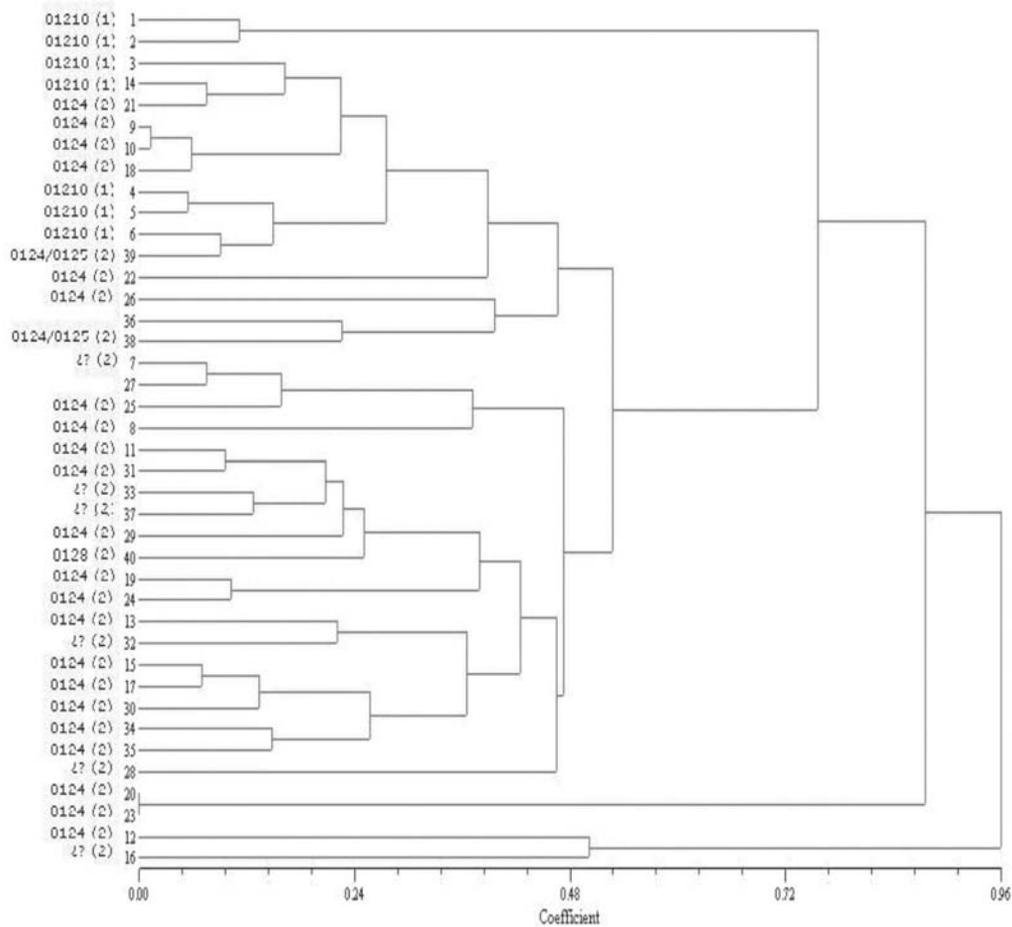


Figura 6. Dendrograma construido a partir del análisis de UPGMA con la matriz obtenida con los datos binarios de las bandas polimórficas generadas por el AFLP. La distancia genética entre aislamientos aparece según coeficiente de Jaccard. Aparecen los GCV y razas (entre paréntesis) y número del aislamiento de acuerdo con la relación de la Tabla 5.

CONCLUSIONES

- La morfología de las colonias de los aislamientos de *Foc* en PDA perteneció en todos los casos al tipo algodonoso blanco con pigmentaciones. No se observó producción de lacinias en medio K2 en ninguno de los aislados de la colección.
- Los aislados estudiados pueden dividirse en dos grupos de acuerdo con la producción (*odoratum*) o no (*inodoratum*) de compuestos volátiles. Este carácter no está relacionado ni con las razas patogénicas ni con la producción de pigmentos.
- Las poblaciones cubanas de *Foc* determinadas hasta el presente pertenecen a los GCV 01210, 0124, 0124/0125 y 128. Existen poblaciones correspondientes a GCV vegetativos diferentes a los grupos 0120, 0121, 0122, 0123, 0124, 0124/0125, 0128, 0129 01210, 01212, 01213, 01214 y 01215 que no pudieron ser clasificados en ningún GCV. Su frecuencia es muy baja y requieren de una recomprobación de su patogenicidad en *Musa*.
- Las poblaciones de *Foc* encontradas en el clon Manzano (subgrupo Silk) pertenecieron en casi todos los casos al GCV 01210. Las poblaciones encontradas sobre el clon Burro Criollo y Burro CEMSA (subgrupo Bluggoe, ABB) pertenecieron casi exclusiva-

mente a los GCV 0124/0125, 0124 y 0128. Los GCV tienen por tanto a nivel local una alta correlación con las razas y los clones de donde se obtuvieron los aislamientos.

- Los aislamientos dentro de cada GCV tienen una alta identidad genética entre sí y son genéticamente distintos de los pertenecientes a los de otros GCV. El GCV 01210 es genéticamente diferente del 0124, aunque comparten alelos comunes, por lo que se consideran sus orígenes independientes. Se comprobó que los aislamientos de los GCV 0128 y 0124/0125 se agruparon con el GCV 0124, de ahí que se pueda asumir que comparten alelos con el 0124 y que pudieran, dada su más baja distribución y frecuencia, haberse derivado de este grupo de amplia distribución mundial y nacional.
- La compatibilidad vegetativa ha mostrado ser una potente herramienta para el diagnóstico de poblaciones y la cuarentena. Los resultados del presente estudio se deben tener en cuenta para la exclusión cuarentenaria de otros GCV no presentes en el país en el germoplasma que se importa con diferentes fines.
- El análisis de las bandas polimórficas comunes obtenidas entre los aislados del GCV 01210 no presentes en las de GCV 0124/0125 y 0128 permite recomendar para el futuro su secuenciación, y ver la posible generación de cebadores para detectar y diferenciar por PCR los diferentes GCV del país, lo que agilizaría, haría más sensible y abarataría el diagnóstico del patógeno.

REFERENCIAS

- Andel-Satar, M.; M. S. Khalil; I. N. Mohamed: «Molecular Phylogeny of *Fusarium* Species by AFLP Fingerprinting», *African Journal of Biotechnology* 2 (3):51-55, Nigeria, 2003.
- Bentley, S.; B. J. Bassam: «A Robust DNA Amplification Fingerprinting System Applied to Analysis of Genetic Variation within *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*», *J. Phytopathology* 144:207-213, EE.UU., 1996.
- Bentley, S.; K. G. Pegg; N. Y. Moore; D. R. Davis; I. W. Buddenhagen: «Genetic Variation Among Vegetative Compatibility Groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Analyzed by DNA Fingerprinting», *Phytopathology* 88:1283-1293, EE.UU., 1998.
- Boehm, E. W. A.; R. C. Ploetz; H. C. Kistler: «Statistical Analysis of Electrophoretic Karyotype Variations Among Vegetative Compatibility Groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*», *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7:196-207, EE.UU., 1993.
- Booth, C.: *Fusarium Laboratory Guide to the Identification of the Major Species*, CMI, Kew, Surrey, Inglaterra, 1977.
- Brandes, E. W.: «Banana Wilt», *Phytopathology* 9:339-389, EE.UU., 1919.
- Brake, V. M.; K. G. Pegg; J. A. G. Irwin; P. W. Langdon: «Vegetative Compatibility Groups within Australian Populations of *F. oxysporum* f. sp. *cubense* the Cause of *Fusarium* wilt of Banana», *Aust. J. Agric. Res.* 41:863-870, 1990.
- Correll, J. C.; J. E. Puhalla; R. W. Schneider: «Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* on the Basis of Colony Rise Virulence and Vegetative Compatibility», *Phytopathology* 76:396-400, EE.UU., 1986.
- Correll, J. C.; C. J. R. Klittich; J. F. Leslie: «Nitrate Non-Utilizing Mutants of *Fusarium oxysporum* and Their Use in Vegetative Compatibility Tests», *Phytopathology* 77:1640-1646, EE.UU., 1987.
- Cove, D. J.: «Chlorate Toxicity in *Aspergillus nidulans*: the Selection and Characterization of Chlorate Resistant Mutants», *Heredity* 36:191-203, EE.UU., 1976.
- Gordon, T. R.; R. D. Martyn: «The Evolutionary Biology of *Fusarium oxysporum*», *Annual Review of Phytopathology* 35:111-128, EE.UU., 1997.
- Jaccard, P.: «Nouvelles recherches sur la distribution florale», *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44:223-270, Francia, 1908.
- Johnston, J. R.: «La enfermedad del plátano en Cuba», *Circ.* 47, 13, Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas, La Habana, 1915.
- Koenig, R. L.; R. C. Ploetz; H. C. Kistler: «*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Consist of a Small Number of Divergent and Globally Distributed Clonal Lineages», *Phytopathology* 87:915-923, EE.UU., 1997.
- Leslie, J. F.: *Genetic Exchange within Sexual and Asexual Populations in the Genus Fusarium. Fusarium wilt of Banana*, APS Press St. Paul, EE.UU., 1990, pp. 37-48.
- : «Vegetative Compatibility in Fungi», *Ann. Rev. of Phytopath.* 31:127-151, EE.UU., 1993.
- Masdek, N.; M. Mahmood; A. Molina; S. C. Hwang; A. Dimiyati; R. Tangaveli; I. Omar: «Global Significance of *Fusarium* Wilt: Asia», Abstracts of Papers 2nd. International Symposium on *Fusarium* wilt on Banana, Promusa-INIBAP/EMBrapa, Salvador de Bahía, Brasil, 22-26 sept. 2003.
- Möller, E. M.; G. Bahnweg: «A Simple and Efficient Protocol for Isolation of High Molecular Weight DNA from Filamentous Fungi, Fruit Bodies and Infected Plant Tissues», *Nucleic Acids Research* 20:6115-6116, EE.UU., 1992.
- Moore, N. Y.; P. Heargraves; K. E. Pegg; J. A. G. Irvin: «Characterization of Strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* by Production of Volatiles», *Aust. J. of Bot.* 39:161-166, Australia, 1991.
- Moore, N. Y.; K. Pegg; A. R. Allen; J. A. G. Irvin: «Vegetative Compatibility and Distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Australia», *Aust. J. Exp. Agric.* 33:797-802, Australia, 1993.
- Nasdir, N.: «*Fusarium* wilt Race 4 in Indonesia», Research Institute for Fruits West Sumatra, Indonesia, Abstracts of Papers 2nd. International Symposium on *Fusarium* wilt on Banana, Promusa-INIBAP/EMBRAPA, Salvador de Bahía, Brasil, 22-26 septiembre del 2003.
- Nelson, R. J.: «WinBoot Yap IV: a program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-Based Dendrograms», IRRI, Manila Philippines, <http://www.irri.org/science/software/winboot.asp>. 1996.
- O'Donnell, K.; H. C. Kistler; E. Cigelnick; R. C. Ploetz: «Multiple Evolutionary Origins of the Fungus Causing Panama Disease of Banana: Concordant Evidence from Nuclear and Mitochondrial Gene Genealogies», *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:2044-2049, EE.UU., 1997.
- O'Neill, N. R.; B. A. Bailey; P. B. Berkum: «AFLP, a Novel PCR-Based DNA Analysis Technique, Reveals Levels of Genomic Variation within Species of *Colletotrichum*, *Fusarium* and *Dendryphon*», <http://www.fgsc.net/fgn38/duteau.html>. 2003 (consultado en noviembre del 2004).
- Pegg, K. G.; N. Y. Moore; S. Sorensen: «*Fusarium* Wilt in the Asian Pacific Region», *Proc. Int. Symp. Recent Developments in Banana*

- Cultivation Techn., International Network of Banana and Plantain/ ASNET, Los Baños, Laguna, Filipinas, 1993, pp. 225-269.
- Pegg, K. G.; N. Y. Moore; S. Bentley: «*Fusarium* Wilt of Banana in Australia: a Review», *Aust. J. of Agric. Res.* 47:637-650, Australia, 1996.
- Pérez, L.; J. M. Álvarez; M. Pérez: «Economic Impact and Management of Black Leaf Streak Disease in Cuba», *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook, Proceedings of the International Workshop on *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases, San José, Costa Rica, 2002, pp. 71-83.
- Pérez, L.: «*Fusarium* wilt (Panama Disease) of Bananas: an Updating Review of the Current Knowledge on the Disease and Its Causal Agent», *Memorias del XV ACORBAT*, Oaxaca, México, oct. 2004, pp 1-14.
- Pérez, L.; A. Battle; J. Fonseca; V. Montenegro: «Reaction of Cultivars of Bananas and Plantains to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense*», *Resúmenes del V Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal*, Basílica Menor de San Francisco de Asís, 24-28 de mayo del 2004, La Habana.
- Ploetz, R. C.; J. C. Correll: «Vegetative Compatibility Among Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense*», *Plant Disease* 72:325-328, EE.UU., 1988.
- Ploetz, R. C.; E. S. Shepard: «*Fusarium* Wilt of Banana in Florida», *Mycol. Research* 93:242-245, EE.UU., 1989.
- Ploetz, R. C.: *Population Biology of Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense*. *Fusarium Wilt of Banana*, APS Press St. Paul, EE.UU., 1990, pp. 63-76.
- Ploetz, R. C.; K. G. Pegg: *Fusarium Wilt. Diseases of Banana*, Abaca and Enset, CABI Publishing., Colombia, 1999, pp. 143-159.
- Promega: «Preparación de geles de poliacrilamida», GenePrint STR.Systems (Silver Stain Detection), Technical Manual, Part # TMD004, Revised 5/1998.
- Puhalla, J. E.: «Classification of Strains of *Fusarium oxysporum* on the Basis of Vegetative Compatibility», *Canadian Journal of Botany* 63:179-183, Canadá, 1985.
- Puhalla, J. E.; P. T. Spieth: «A Comparison of Heterokaryosis and Vegetative Compatibility Among Varieties of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*)», *Exptl. Mycol.* 9:39-47, EE.UU., 1985.
- Smith, E. F.: «A Cuban Banana Disease» (Abstr.), *Science* 31:754-755, EE.UU., 1910.
- Sneath, P. H. A.; R. R. Sokal: *Numerical Taxonomy*, Freeman, San Francisco, 2000 by Applied Biostatistics, 1973.
- Stover, R. H.; B. H. Waite: «Studies on *Fusarium* Wilt of banana. V. Pathogenic and Distribution of *F. oxysporum* f. sp. *cabense* Races 1 and 2», *Can. J. Botany* 38:51-61, Canadá, 1960.
- Stover, R. H.: «Studies on *Fusarium* Wilt of Bananas. VIII. Differentiation of Clones by Cultural Interaction and Volatile Substances», *Can. Journal of Bot.* 40:1467-1471, Canadá, 1962a.
- : «*Fusarium* Wilt (Panama Disease) of Bananas and Other *Musa* species», *Phytopathological Paper* 4, CMI, Kew, Surrey, Inglaterra, 1962b.
- Stover, R. H.; I. W. Buddenhagen: «Banana Breeding, Polyploidy, Disease Resistance and Productivity», *Fruits* 41:175-191, EE.UU., 1986.
- Su, H. J.; T. J. Chuang; W. S. Kong: «Physiological Race of Fusarial Wilt Fungus Attacking Cavendish Banana of Taiwan», *Taiwan Banana Research Institute*, Spec. Publ. 2, 1977.
- Su, H. J.; S. C. Hwang; W. H. Ko: «*Fusarium* Wilt of Bananas in Taiwan», *Plant Disease* 70:813-818, EE.UU., 1986.
- Sun, E. J.; H. J. Su; W. H. Ko: «Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* Race 4 from Soil or Host Tissue by Cultural Characters», *Phytopathology* 68:1672-1673, EE.UU., 1978.
- Vidal, A.: «Sigatoka negra en Cuba. Nuevos Focos de plagas y enfermedades», *Boletín Fitosanitario de la FAO* 40:(1-2), Italia, 1992.
- Vos, P.; R. Hogers; M. Bleeker; M. Reijans; T. Van de Lee; M. Hornes; A. Fritjers; J. Peleman; M. Kuiper; M. Zabeau: «AFLP: a New Technique for DNA Fingerprinting», *Nucleic Acid Research*, 23:4407-4414, EE.UU., 1995.