

Primer reporte de micovirus con actividad de hipovirulencia sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc)

Laura Arango-Palacio¹; Carlos Alberto Peláez-Jaramillo¹; María Dolores García-Pedrajas²; Carmen Cañizares-Nolasco²; Sebastián Zapata-Henao³; Andrés Mauricio Pinzón-Núñez^{3*}

¹Universidad de Antioquia, campus Medellín, 050022, Colombia; ²Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM), Algarrobo Costa-Málaga 29750, España; ³Centro de Investigación del Banano CENIBANANO-AUGURA, Carepa-Antioquia 057850, Colombia.

***Autor de**

Correspondencia:

Andrés Mauricio Pinzón-Núñez
fitopatologia@augura.com.co

Contribución:
Científico

Sección:
Fitosanidad

Recibido:
15 Diciembre, 2023

Aceptado:
15 Enero, 2024

Publicado:
16 Abril, 2024

Cita:
Arango-Palacio L, Peláez-Jaramillo CA, García-Pedrajas MD, Cañizares-Nolasco C, Zapata-Henao S y Pinzón-Núñez AM. 2024. Primer reporte de micovirus con actividad de hipovirulencia sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Acorbat Revista de Tecnología y Ciencia 1(1): 54
<https://doi.org/10.62498/AR.TC.2454>

RESUMEN

La Marchitez por *Fusarium* es considerada la enfermedad más devastadora en la historia del Banano, ocasionada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). La eventual llegada de Foc Raza 4 Tropical (Foc R4T) a Latinoamérica, ha generado gran preocupación y activado la alerta en el gremio bananero, lo que ha conllevado a la búsqueda de estrategias para contener y manejar la enfermedad. A nivel mundial no existen productos de síntesis química que la controlen y las investigaciones están orientadas al mejoramiento genético y a la bioprospección de microorganismos antagonistas. En ese contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de hipovirulencia del hipovirus asociado a *Cryphonectria parasitica* (CHV-1) sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1), mediante la fusión de protoplastos. Las cepas de Foc R1 transformadas con el hipovirus evidenciaron diferentes niveles de acumulación, disminución en el crecimiento, cambios morfológicos y de pigmentación. Los resultados obtenidos demuestran el efecto de hipovirulencia sobre cepas de Foc R1 e indican que la fusión mediante protoplastos puede ser utilizada para la transferencia viral. Estudios posteriores en condiciones de invernadero, permitirán esclarecer si las cepas transformadas presentan disminución en la virulencia del hongo y consecuentemente reducción de la severidad de la enfermedad en plantas de banano.

Palabras clave: Banano, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Micovirus, Hipovirulencia, Biocontrol.

ABSTRACT

Fusarium wilt is considered the most devastating disease in the history of Banana, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). The eventual arrival of Tropical Race 4 (TR4) to Latin America has generated great concern and raised the alarms in the banana industry, which has led to the search for strategies to contain and manage the disease. At a global scale there are no chemical synthesis products that control it and research is aimed at genetic improvement and bioprospecting of antagonistic microorganisms. In this context, the aim of the present work was to evaluate the hypovirulence effect of the hypovirus associated with *Cryphonectria parasitica* (CHV-1) on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 (Foc R1), through protoplast fusion. The Foc R1 strains transformed with the hypovirus, showed different levels of



accumulation, decreased growth, morphological and pigmentation changes. The results obtained demonstrate the effect of hypovirulence on Foc R1 strains, and indicate that fusion through protoplasts can be implemented for viral transfer. Additional research under greenhouse conditions, will clarify whether the transformed strains present a decrease in the virulence of the fungus and consequently a reduction in the disease severity in banana plants.

Keywords: Banana, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Mycovirus, Hypovirulence, Biocontrol, phytosanitary.

INTRODUCCIÓN

El banano es considerado una de las frutas tropicales de mayor importancia e influencia, debido a su alto consumo, aporte en las economías de los países productores, exportadores y consumidores, además, de ser catalogado como cultivo fundamental en la seguridad alimentaria (FAO, 2019). Sin embargo, uno de los limitantes del cultivo son los problemas fitosanitarios, siendo el caso de la “Marchitez Vascular” una de las enfermedades más limitantes y devastadoras de la industria bananera, ocasionada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, el cual coloniza y obstruye los haces vasculares, impidiendo la absorción de agua y nutrimentos, generando marchitez y consecuentemente la muerte de la planta (Dita *et al.*, 2018). De este hongo se conocen 4 razas genéticas y patogénicamente diversas, de las cuales la raza 4 tropical (Foc R4T), es la más destructiva ocasionando pérdidas de rendimiento del 100 % (Ploetz, 2015).

Uno de los problemas que trae consigo esta enfermedad, es la falta de alternativas de control y manejo que minimicen los umbrales de daño. Es importante mencionar que a nivel mundial no existen productos de síntesis química que controlen la enfermedad y las investigaciones están direccionadas a la obtención de material vegetal resistente y estrategias biológicas mediante microorganismo antagonistas. En ese sentido, los micovirus surgen como una de las alternativas promisorias para el manejo de la enfermedad. En la actualidad se han descrito virus con la capacidad de infectar hongos fitopatógenos, donde, su principal caso de infección viral se ha asociado a la alteración de determinados caracteres fenotípicos, siendo el de mayor relevancia la reducción de la virulencia (hipovirulencia) (Torres-Trenas, 2019). La hipovirulencia se describió con éxito por primera vez en poblaciones de *Cryphonectria parasitica*, agente causal del chancro del castaño, la infección por el micovirus CHV-1 resultó en un crecimiento reducido, pigmentación anormal y actividad hipovirulenta (Nuss, 1992). La transmisión de micovirus se puede ver afectada por la incompatibilidad vegetativa (Leslie, 1993), sin embargo, esta puede superarse en el laboratorio mediante el uso de

protoplastos. En la actualidad se ha informado el éxito de la transmisión de dsRNA mediante protoplastos en fitopatógenos fúngicos incluyendo, *Aspergillus*, *Fusarium poae* y *Rosellinia necatrix* (Kanematsu et al., 2010; van Diepeningen et al., 2000, 2006). En este estudio se evidencia que, el proceso de transformación por protoplastos permitió la transferencia de micovirus hipovirulentos a una de las especies fitopatógenas fúngicas de mayor importancia económica en el mundo, además, es el primer reporte de la actividad de hipovirulencia de un micovirus sobre Foc. Esto permitirá generar conocimientos para el desarrollo de nuevas estrategias biotecnológicas para su uso dentro de planes de manejo integrado de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material fúngico. Las cepas fúngicas fueron obtenidas a partir de muestras de tejido vegetal de plantas de Banano Manzano sintomáticas colectado en la región del Urabá - Antioquia. El tejido fue desinfectado mediante Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 2 % durante 60 seg, los fragmentos fueron sembrados en medio Agar papa dextrosa (PDA). Posteriormente, las cepas fueron caracterizadas morfológicamente e identificadas mediante PCR utilizando los *primers* específicos para Foc R1 W1805F (5' GTTGAGTCTCGATAAACAGCAAT'3) y W1805R (3' GACGAGGGGAGATATGGTC'5) propuestos por (Li et al., 2013). Finalmente, del total de cepas identificadas, se seleccionó la que presentó mayor grado de severidad a partir de los resultados obtenidos de las pruebas de patogenicidad en plantas de banano "Gros Michel". Esta cepa fue utilizada para la inserción del micovirus CHV-1 mediante transformación de protoplastos.

Preparación del cultivo y formación de Protoplastos. Se Inocularon 100 mL de Caldo papa dextrosa (PDB) a una concentración de 1×10^8 conidios y se llevaron a incubar durante 11-12 horas a 28 °C y 200 rpm. Posteriormente, se filtraron por membrana Miracloth para recoger germínulas y mezclarlas en 20 mL de Buffer OM (1.2 M MgSO₄ + 10 mM Na₂HPO₄) con 50 mg de Driselasa y 1 g de Extralyse, seguidamente se incubaron durante 3 horas a 28 °C 50 rpm. Al observar formación de protoplastos, se procedió a filtrar con filtro de nylon de 40 µm y lavado con STC (10 mM Tris – HCl pH 7.5, 50 mM CaCl₂, 0.8 M Sorbitol) para coleccionar los protoplastos, finalmente se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm a 4 °C. El Pellet se resuspendió en 300-400 µm de STC. Posteriormente, se realizó el conteo de protoplastos a dilución 1:100 y se centrifugó durante 5 min a 3000 g a 4 °C. El pellet se resuspendió en un volumen adecuado de STC para ajustar concentración a $2-3 \times 10^8$ protoplastos / mL.

Transformación. Se tomó una alícuota de 100 μL de protoplastos y se añadió 10 μL del ADN del plásmido PXH9 (posee el genoma viral de CHV-1) con resistencia a higromicina, se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, se agregó 1 mL de PTC (Polietilenglicol) y se incubó durante 25 min a RT (temperatura ambiente), se centrifugó a 4000 g durante 5 min y el pellet se resuspendió en 600 μL de STC. Para la siembra se tomaron 200 μL de la solución de protoplasto y se mezclaron con el top agar, esto fue vertido al medio de regeneración, y llevado a incubación a 28 °C. Al siguiente día, se adicionó al medio la solución con presión selectiva con 50 μL de higromicina (100 μg / mL). Se incubó a 28 °C entre 4-5 días. Cada transformante fue transferido individualmente a PDA más 50 μL de higromicina y posteriormente se realizó purificación de la colonia.

Transmisión y acumulación del virus. Para evidenciar la inserción del genoma viral en la cepa de Foc Raza 1, se realizó extracción de ADN a partir de material fúngico, la PCR se realizó utilizando los *primers* CHV1F2 (5' AAGTACTTGGTTGGCATGGCGT 3') y CHV1R3 (3' GAATAAACAGCTCGACCCAATGC 5') propuestos por Shapira *et al.* (1991), la cual amplifica un fragmento de 4000 pb. El nivel de acumulación del virus en los transformantes se evaluó mediante la purificación de dsRNA a partir de columnas de celulosa (Cellulose fibers, médium SIGMA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 31 cepas caracterizadas morfológicamente, de las cuales 13 fueron identificadas como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. La cepa 27 que evidencio síntomas característicos de la enfermedad, presentó 100 % de severidad (Figura 1), la cual, fue seleccionada para ser transformada con el micovirus CHV-1.

A partir del proceso de transformación de la cepa 27, se obtuvieron 15 transformantes de Foc raza 1. La inserción del genoma viral de CHV-1 se confirmó mediante la amplificación de un fragmento de 4000 pb (Figura 2).

Para la purificación del dsRNA, se seleccionaron cepas con diferentes niveles de acumulación, evidenciando que los transformantes 7 y 13 mostraron altos niveles de acumulación (Figura 3).

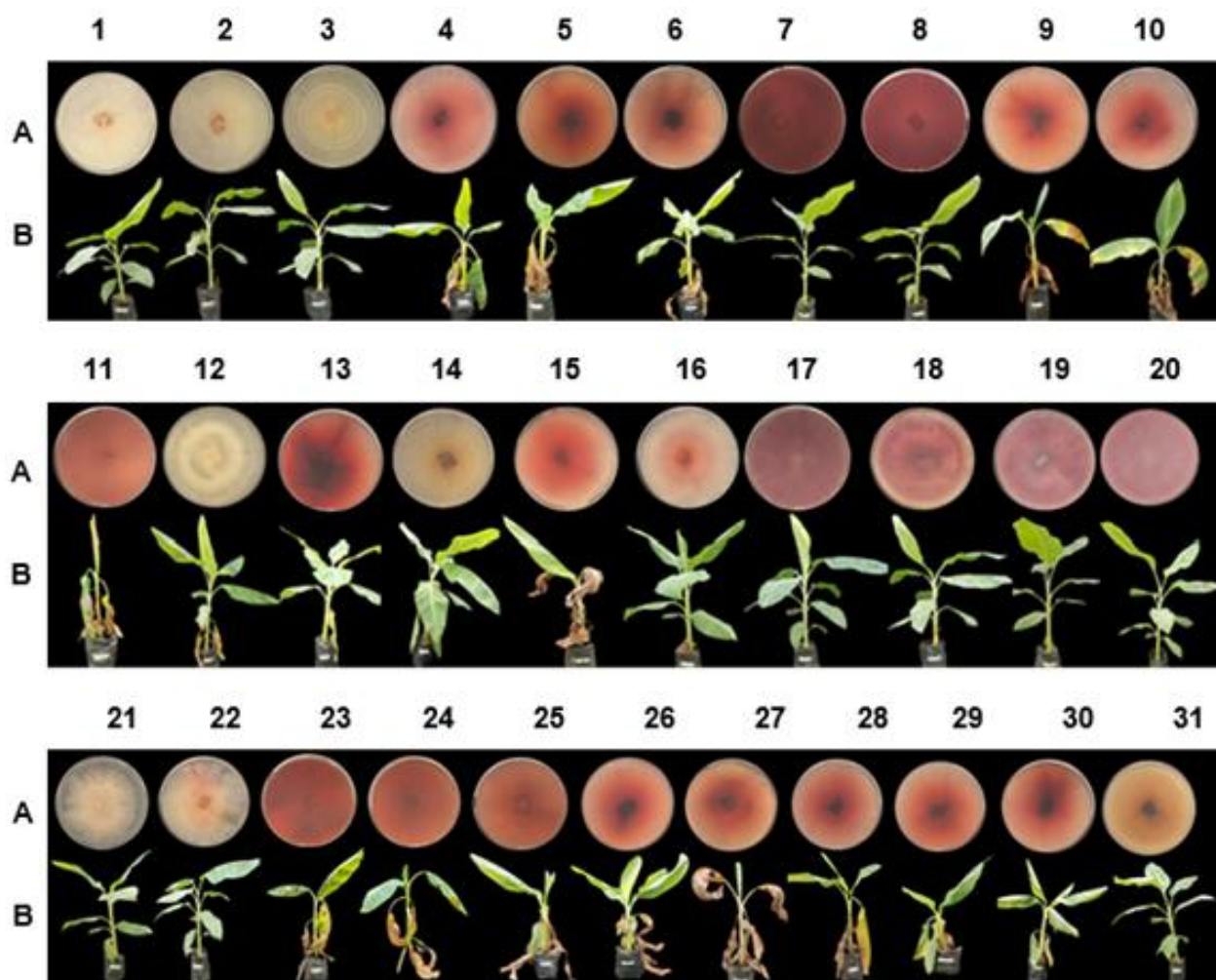


Figura 1. Morfología y pruebas de patogenicidad de los 31 aislados identificados en la región del Urabá. **A.** Morfología de las cepas crecidas en medio PDA durante 7 días a una temperatura de 26 °C. **B.** Prueba de patogenicidad de las cepas en plantas de Banano “Gros Michel”.

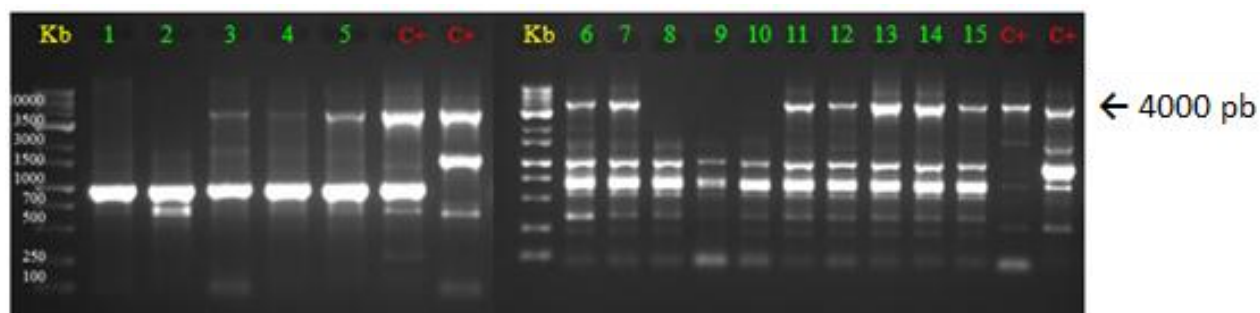


Figura 2. Productos amplificados de CHV-1 a partir de las cepas transformantes de Foc raza 1. Carril Kb: Marcador molecular de ADN. Carril 1-15 transformantes. Carril C+: Control positivo (Cepas de *Fusarium verticillioides* y *Fusarium solani* con CHV-1).

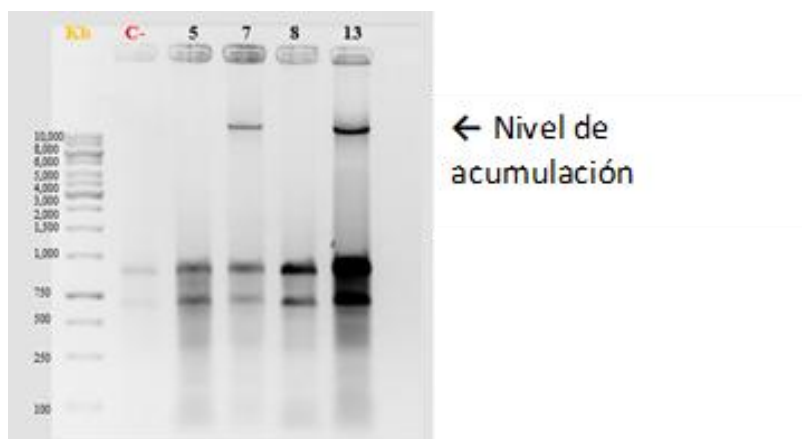


Figura 3. Purificación de dsRNA a partir de columnas de celulosa. Carril Kb: Marcador molecular de ADN. Carril C-. Control negativo (Foc R1 cepa 27 libre de virus) Carril 5,7,8,13. Diferentes niveles de acumulación de transformantes de Foc R 1 con CHV-1.

Por lo general los micovirus con acción hipovirulenta ocasionan en su huésped fúngico alteraciones a nivel morfológico como cambios en su pigmentación y disminución en el crecimiento radial (Torres-Trenas, 2019), los transformantes evaluados mostraron alteraciones en la pigmentación (Figura 4). A su vez, el crecimiento radial del micelio, evidenció disminución comparado con la cepa libre del virus (Figura 5).



Figura 4. Cambios en la pigmentación de los transformantes. De izquierda a derecha los transformantes 5,7,8, 13 y el control negativo libre de virus (Cepa 27).

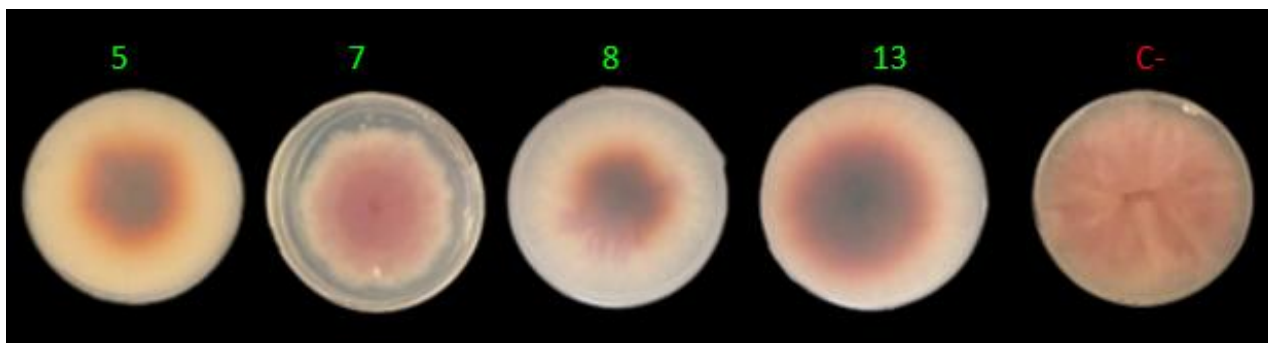


Figura 5. Alteración de la tasa de crecimiento radial del micelio. De izquierda a derecha los transformantes 5,7,8, 13. C- Control negativo libre de virus.

En la transformación de protoplastos de las cepas de *Fusarium asiaticum* y *Fusarium graminearum* infectadas por el micovirus *Fusarium standiirus* evidenciaron tasas de crecimiento reducidas y una mayor pigmentación en relación con las cepas libres de virus, sin embargo, en *F. oxysporum* infectado con el virus las alteraciones morfológicas fueron mínimas. En ensayos de virulencia en *Fusarium oxysporum* las cepas infectadas por el virus eran menos virulentas que las cepas libres de virus (Lee *et al.*, 2011). En este estudio demostramos la efectividad de la utilización de protoplastos como vía para la transferencia de micovirus hipovirulentos con posible acción biológica. Es importante resaltar que la incorporación de genomas virales por medio de protoplastos puede ocasionar alteraciones mínimas del fondo genético y fisiología por lo que el comportamiento entre especies puede divergir (Kim *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2011), es por ello que se hace necesario evaluar si las cepas con acumulación del virus logran disminuir la severidad de la enfermedad en condiciones de invernadero, y con ello establecer la eficacia y el potencial de los micovirus como agentes de control biológico.

CONCLUSIONES

Estos resultados demuestran que la transformación mediante protoplastos es una herramienta viable para la incorporación de micovirus con acción hipovirulenta en fitopatógenos fúngicos, además, permite evaluar las alteraciones que estos pueden ejercer mediante mínimos cambios a nivel genómico y fisiológico. Cabe mencionar que este es el primer reporte de micovirus con actividad de hipovirulencia sobre Foc. Sin embargo, se requieren mayores investigaciones con el fin de comprender las interacciones entre virus-hongo-planta y como estos pueden tener aplicabilidad dentro de un manejo integrado de enfermedades.

REFERENCIAS

1. Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S. G., & Staver, C. P. (2018). Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>
2. FAO. (2019). *Foro Mundial Bananero*. <https://www.fao.org/world-banana-forum/es/>
3. Kanematsu, S., Sasaki, A., Onoue, M., Oikawa, Y., & Ito, T. (2010). Extending the Fungal Host Range of a Partitivirus and a Mycoreovirus from *Rosellinia necatrix* by Inoculation of Protoplasts with Virus Particles. *Phytopathology*®, 100(9), 922–930. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-9-0922>
4. Kim C, Choi EC, & Kim BK. (1997). Protoplast fusion between *Lentinula edodes* and *Coriolus versicolor*. *Arch of Pharm Res. Arch of Pharm Res*, 20, 448–453.
5. Lee, K.-M., Yu, J., Son, M., Lee, Y.-W., & Kim, K.-H. (2011). Transmission of *Fusarium boothii* Mycovirus via Protoplast Fusion Causes Hypovirulence in Other Phytopathogenic Fungi. *PLoS ONE*, 6(6), e21629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021629>
6. Leslie, J. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annu Rev Phytopathol*, 31, 127–150.
7. Li, M., Shi, J., Xie, X., Leng, Y., Wang, H., Xi, P., Zhou, J., Zhong, S., & Jiang, Z. (2013). Identification and application of a unique genetic locus in diagnosis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(4), 482–493. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.828321>
8. Nuss, D. L. (1992). Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiological Reviews*, 56(4), 561–576.
9. Ploetz, R. C. (2015). Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Protection*, 73, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.007>
10. Shapira, R., Choi, G. H., & Nuss, D. L. (1991). Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. *The EMBO Journal*, 10(4), 731–739. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb08004.x>
11. Torres Trenas, A. (2019). *Micovirus en aislados de Fusarium oxysporum f. sp dianthi: caracterización genómica y biológica. (Doctoral dissertation, Universidad de Córdoba (ESP))*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=249971>
12. van Diepeningen, A. D., Debets, A. J. M., & Hoekstra, R. F. (2006). Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* populations. *Fungal Genetics and Biology*, 43(6), 446–452. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.01.014>
13. van Diepeningen, A. D., Debets, A. J. M., Slakhorst, S. M., Fekete, C., Hornok, L., & Hoekstra, R. F. (2000). Interspecies virus transfer via protoplast fusions between *Fusarium poae* and black *Aspergillus* strains. *Fungal Genetics Reports*, 47(1), 99–100. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1216>