

## Evaluación de tecnología basada en RNAi para el control de la Sigatoka Negra en el cultivo de banano

Flor Yuranny Canacuan Melo<sup>1\*</sup>; Vicente Emilio Rey Valenzuela<sup>2</sup>; Sebastian Zapata Henao<sup>2</sup>; Juan Gonzalo Morales Osorio<sup>1</sup>; Rafael Eduardo Arango Isaza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, UNALMED; <sup>2</sup>Cenibanano – Augura, Colombia.

**\*Autor de**

**Correspondencia:**

Flor Yuranny Canacuan Melo  
fycanacuanm@unal.edu.co

**Contribución:**

Científica

**Sección:**

Fitosanidad

**Recibido:**

15 Diciembre, 2023

**Aceptado:**

15 Enero, 2024

**Publicado:**

16 Abril, 2024

**Cita:**

Canacuan MFY, Rey VVE,  
Zapata HS, Morales OJG y  
Arango IRE. 2024.

Evaluación de tecnología  
basada en RNAi para el  
control de la Sigatoka  
Negra en el cultivo de  
banano. *Acorbat Revista de  
Tecnología y Ciencia* 1(1):  
26  
[https://doi.org/10.62498/AR  
TC.2426](https://doi.org/10.62498/AR<br/>TC.2426)



### RESUMEN

En este estudio, se investigó el uso de la tecnología de RNAi para controlar la Sigatoka Negra en banano causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*. Se sintetizaron secuencias de dsRNA que silenciaron genes importantes del hongo y se aplicaron en ascosporas y fragmentos miceliales, inhibiendo su crecimiento. Además, las secuencias de dsRNA inhibieron la infección del hongo en hojas de banano cuando se transfirieron directamente al micelio.

**Palabras clave:** banano, RNAi, *Pseudocercospora fijiensis*, Sigatoka negra, sanidad.

### ABSTRACT

In this study, the use of RNAi technology to control Black Sigatoka in bananas caused by the fungus *Pseudocercospora fijiensis* was investigated. Double-stranded RNA sequences were synthesized to silence important genes of the fungus and were applied to ascospores and mycelial fragments, inhibiting their growth. Additionally, the dsRNA sequences inhibited the fungus infection in banana leaves when directly transferred to the mycelium.

**Keywords:** banana, RNAi, *Pseudocercospora fijiensis*, Sigatoka negra, phytosanity.

### INTRODUCCIÓN

El banano es uno de los cultivos más importantes en el mundo tanto para consumo local como para exportación. La producción de este cultivo se ve afectada por la enfermedad llamada Sigatoka negra, la cual es causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*. Esta es considerada como la enfermedad foliar más importante en banano y plátano desde el punto de vista económico (Friesen, 2016). El manejo actual de la enfermedad se basa principalmente en el uso de fungicidas

químicos, los cuales presentan riesgo ambiental y en la salud, además de incrementar notablemente los costos de producción. Adicionalmente, las poblaciones del patógeno generan rápidamente resistencia a algunos grupos de fungicidas, por lo que ya no es posible usarlos para su control (Churchill, 2011; Chong et al., 2016). Debido a lo anterior, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo de esta enfermedad.

El propósito de este trabajo fue evaluar herramientas que permitan mejorar el manejo de la Sigatoka Negra. La tecnología de RNAi para inducir el silenciamiento de genes, se ha explorado en diferentes patosistemas para la protección de los cultivos, mediante la represión selectiva de genes importantes para la patogenicidad en los fitopatógenos (Girard et al., 2016; Wang et al., 2016; Wang et al., 2017). Estos reportes indican que el uso de la tecnología de RNAi puede ser utilizada como alternativa al uso de fungicidas en el control de fitopatógenos.

En este contexto, en este trabajo se investigó el uso de las secuencias de dsRNA para la inducción de silenciamiento en *P. fijiensis* y su evaluación en la protección de la enfermedad en las plántulas de banano susceptibles. En este proyecto se sintetizaron secuencias de RNA de doble cadena (dsRNA) homólogas a los genes *PfFUS3* y *PfCYP51* que previamente se identificaron como genes importantes en la patogenicidad del hongo. Las secuencias se aplicaron en ascosporas para evaluar su efecto en la inhibición del crecimiento del tubo germinativo y se transfectaron en *P. fijiensis* utilizando el método de LiCl para evaluar su efecto en la inhibición del crecimiento micelial y la inhibición de la expresión de estos genes por PCR en tiempo real. Además, los micelios transfectados con las secuencias de dsRNA fueron aplicados en plantas de banano susceptibles para evaluar su efecto en la protección de la Sigatoka negra en ambiente controlado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Diseño y síntesis de moléculas específicas de dsRNA.** Se eligieron como blanco los genes *Fus3* y *CYP51* en función de su potencial para el control de la enfermedad. El gen *PfCYP51* (XM\_007930561.1) se ha identificado como gen diana del uso de fungicidas inhibidores de la desmetilación (DMI) (Canas-Gutierrez et al., 2009) y *PfFus3* (XM\_007929802.1) se ha identificado como gen importante para la patogenicidad celular y la virulencia en *P. fijiensis* (Onyilo et al., 2018). El diseño de las secuencias de dsRNA se realizó mediante la búsqueda de primers para cada gen usando el programa en línea primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>), para amplificar un

producto de PCR de 300-600 pb de longitud. Se realizó blast con los transcritos de *Musa acuminata* AAA -(taxid:214697) y con los de *P. fijiensis* (taxid:383855) para evitar secuencias con efecto off-target. Para la síntesis de las secuencias de dsRNA se utilizó el kit MEGAscript™ RNAi (Thermo Scientific), siguiendo las condiciones del fabricante.

**Pruebas de silenciamiento *in vitro* en diferentes estructuras.** Se realizaron ensayos de silenciamiento *in vitro* en micelio y en esporas de *P. fijiensis*. Los ensayos se realizaron con las secuencias de dsRNA para cada gen. Se realizaron 3 réplicas en tiempos diferentes para cada gen. Para evaluar el efecto de las secuencias de dsRNA en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *P. fijiensis*, se aplicaron 20 µL de las secuencias de dsRNA directamente sobre ascosporas descargadas sobre agar granulado al 2%. Luego se incubó por 40 horas y se tomaron fotografías con el fin de medir la longitud del tubo germinativo, de al menos 30 ascosporas por cada tratamiento, usando el software ImageJ. El efecto de las secuencias de dsRNA sobre el crecimiento micelial se evaluó en platos de 96 pozos utilizando el método de PEG/LiCl (Moazeni et al., 2012). Se evaluó las secuencias de dsRNA a una concentración de 100 ng/mL, 200 ng/mL, 500 ng/mL y 1000 ng/mL. Como control negativo se utilizó la suspensión micelial sin las secuencias de dsRNA. Los microplatos fueron incubados a 25 °C por 11 días, y el crecimiento micelial fue medido mediante lectura de absorbancia a 595 nm en lector de ELISA. Para confirmar el silenciamiento de los genes, se realizó cuantificación relativa de los niveles de mRNA de los genes evaluados mediante q-PCR.

**Experimentos de infección en invernaderos para probar el efecto de RNAi y la administración en hojas de banano:** Se preparó una suspensión de fragmentos miceliares de la cepa de *P. fijiensis* de 15 días de crecimiento en medio PDA, realizando un raspado con pincel y agua destilada estériles. La suspensión se filtró y se ajustó la concentración a  $1 \times 10^6$ . Para facilitar el ingreso de las secuencias de dsRNA a la célula se utilizó el método modificado de Polietilenglicol, reportado por Moazeni, Khorramizadeh (16). Al día siguiente, se centrifugaron los fragmentos miceliares y se resuspendieron en 10 mL de gelatina microbiológica al 2%.

Las inoculaciones se realizaron en plantas susceptibles de banano del cultivar Williams, rociando las primeras tres hojas de cada planta desde una distancia de aproximadamente 20 cm. Después de la inoculación, las plantas se colocaron en cámara de infección con una temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , humedad relativa del 95% y un fotoperiodo de 12 h luz / 12 h oscuridad. Todas las pruebas de invernadero (todos los

tratamientos, incluidos los controles) siguieron un diseño de bloques al azar completo. Los experimentos se establecieron en un período de 49 días después de la inoculación del patógeno.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

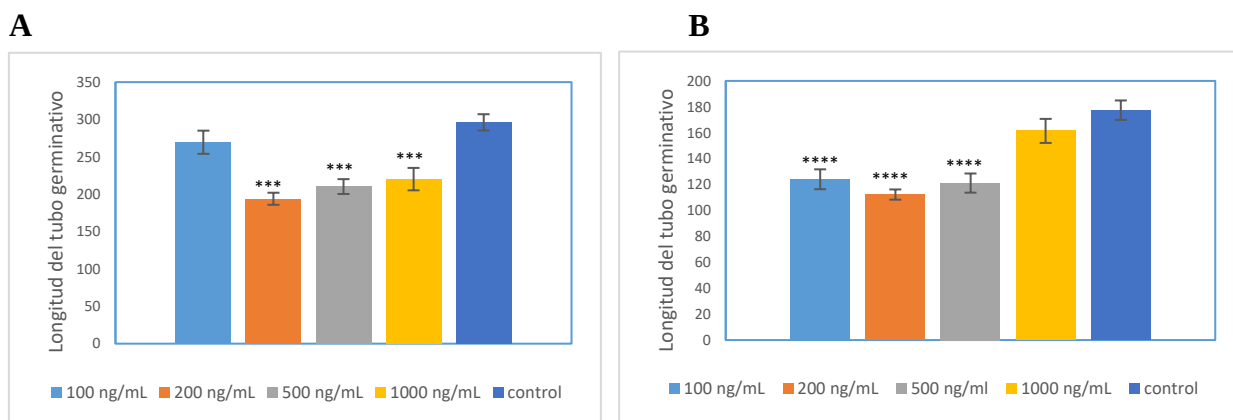
**Diseño y síntesis de moléculas específicas de dsRNA:** Se sintetizaron un total de 5 secuencias de dsRNA homologas a la región codificante de cada gen con un tamaño de 146-363 pb, sin offtargets en banano ni en *P. fijiensis*. Se sintetizaron 2 secuencias de dsRNA homólogas al gen *PfFus3* y 3 secuencias homólogas al gen *PfCYP51* (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Primers utilizados en la síntesis de dsRNA

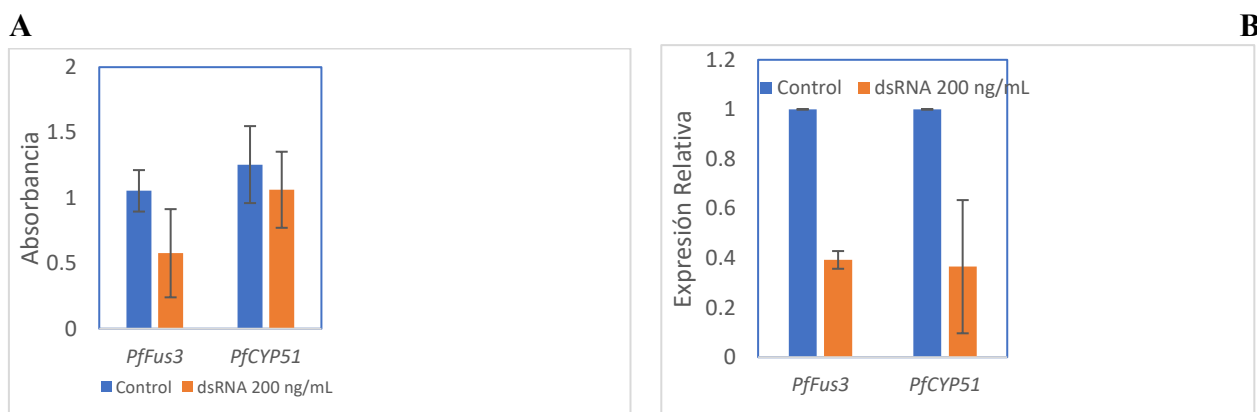
| Gen            | Secuencia de los primers                           | Tamaño del amplicón | Eficiencia esperada |
|----------------|----------------------------------------------------|---------------------|---------------------|
| <i>PfFus3</i>  | Forward: taatacgactcactatagggtacgtcgcaactcgatggta  | 306                 | 49.72               |
|                | Reverse: taatacgactcactatagggtcaagagccaagtgcgaag   |                     |                     |
|                | Forward: taatacgactcactatagggtgctggaacgtcatatccaa  | 315                 | 50.37               |
|                | Reverse: taatacgactcactatagggtgggcatagcagattcagg   |                     |                     |
| <i>PfCYP51</i> | Forward: taatacgactcactatagggccgtgttgcttaacgtgttg  | 363                 | 52.72               |
|                | Reverse: taatacgactcactataggaggtgaggccatatttgacg   |                     |                     |
|                | Forward: taatacgactcactatagggatggcggaagtctacacagc  | 317                 | 51.38               |
|                | reverse: taatacgactcactatagggtcggcggtacgttaactcctt |                     |                     |
|                | Forward: taatacgactcactataggggaccacacactccctccttg  | 146                 | 47.22               |
|                | Reverse: taatacgactcactatagggcctccttgacatgctttggt  |                     |                     |

**Pruebas de silenciamiento *in vitro* en diferentes estructuras:** Se encontró que una de las secuencias de dsRNA homólogas al gen *PfCYP51*, causó la inhibición de la longitud del tubo germinativo a concentraciones de 200 ng/mL, 500 ng/mL y 1000 ng/mL en comparación con el control (Figura 1). Las dos secuencias homólogas al gen *PfFus3* lograron una inhibición de la longitud del tubo germinativo en comparación al control cuando se aplicaron a concentraciones de 100 ng/mL, 200 ng/mL, 500 ng/mL (Figura 1). Las secuencias de dsRNA que tuvieron efecto en el crecimiento del tubo

germinativo, lograron además inducir la inhibición en el crecimiento micelial, y la reducción en los niveles de mRNA comparado con el control (Figura 2).



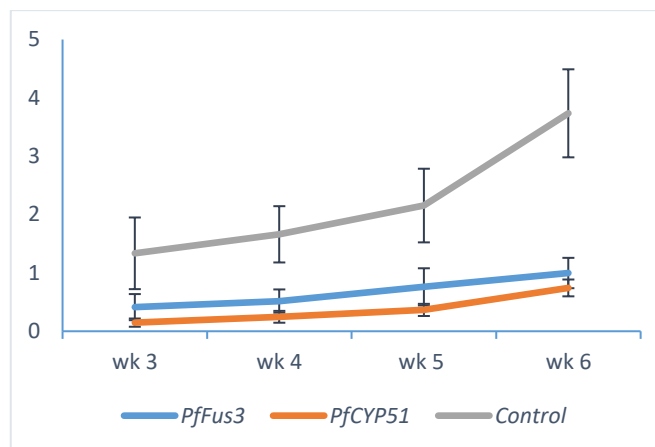
**Figura 1.** Tamaño del tubo germinativo en  $\mu\text{m}$  de ascosporas tratadas con secuencias de dsRNA homologas a los genes A. *PfCYP51* y B. *PfFus3*



**Figura 2.** A. Absorbancia a 595 nm correspondiente al crecimiento de los micelios transfectados con las secuencias de dsRNA. B. Niveles relativos de expresión génica en micelios después de la exposición a las secuencias de dsRNA.

**Experimentos de infección en invernaderos para probar el efecto de RNAi y la administración en hojas de banano:** Se utilizó una concentración de dsRNA de 200 ng/mL en todos los experimentos. Las infecciones se realizaron por aspersión de los fragmentos miceliares en la superficie de la hoja. Las lesiones necróticas se contaron a las semanas 3, 4, 5, y 6 después de la infección. Se calculó el porcentaje de infección y se realizó un análisis de medidas repetidas usando el programa R. Las plántulas de

banano infectadas con micelio de *P. fijiensis* transfectados con las secuencias de dsRNA tuvieron menos síntomas de enfermedad que las plantas control, estas diferencias fueron estadísticamente significativas (valor  $p < 0.001$ , Figura 3).



**Figura 3.** Porcentaje de infección y progreso de la enfermedad causada por *P. fijiensis* en plantas de banano tratadas con micelios transfectados con secuencias de dsRNA homólogas a los genes *PfFus3* y *PfCYP51*.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que el silenciamiento por RNAi puede ser inducido en *P. fijiensis* a través de la aplicación directa y la transfección de moléculas dsRNA homólogas a genes del hongo. Las secuencias de dsRNA *PfFus3* y *PfCYP51* utilizadas, lograron con éxito la inhibición del crecimiento miceliar y del tubo germinativo en el hongo. Además, la inducción del silenciamiento puede disminuir la patogenicidad del hongo en plantas de banano susceptibles. La efectividad en la inducción del silenciamiento en *P. fijiensis* mediante la aplicación directa de las secuencias de dsRNA, abre la posibilidad de usar la tecnología de RNAi para combatir la Sigatoka negra. Esta estrategia es una alternativa que tiene ventajas sobre el uso de compuestos químicos. A diferencia de los últimos, los dsRNA son compuestos biocompatibles, biodegradables y la evolución de la resistencia mediante la selección de mutaciones de la secuencia diana de dsRNA es poco probable.

## REFERENCIAS

1. Chong, P., J. Essoh, R. Arango, L. C. Keizer, I. Stergiopoulos, M. Seidl, M. Guzman, J. Sandoval, P. Verweij, G. Scalliet, H. Sierotzski, Gert H. J., and G. H. Kema. 2016. 'Global analysis of reduced sensitivity to azole fungicides in the banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*', *Submitted to PLoS One*.
2. Churchill, A. C. 2011. '*Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control', *Mol Plant Pathol*, 12: 307-28.
3. Friesen, T. L. 2016. 'Combating the Sigatoka Disease Complex on Banana', *PLoS Genet*, 12: e1006234.
4. Girard, I. J., A. G. McLoughlin, T. R. de Kievit, D. W. Fernando, and M. F. Belmonte. 2016. 'Integrating Large-Scale Data and RNA Technology to Protect Crops from Fungal Pathogens', *Frontiers in Plant Science*, 7: 631.
5. Moazeni, M., M. R. Khoramizadeh, P. Kordbacheh, Z. Sepehrizadeh, H. Zeraati, F. Noorbakhsh, L. Teimoori-Toolabi, and S. Rezaie. 2012. 'RNA-mediated gene silencing in *Candida albicans*: inhibition of hyphae formation by use of RNAi technology', *Mycopathologia*, 174: 177-85.
6. Wang, M., N. Thomas, and H. Jin. 2017. 'Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection', *Curr Opin Plant Biol*, 38: 133-41.
7. Wang, M., A. Weiberg, F. M. Lin, B. P. Thomma, H. D. Huang, and H. Jin. 2016. 'Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection', *Nature Plants*, 2: 16151.