

DESCRIPCIÓN

Un método para producir plantas de banano con tolerancia a *fusarium oxysporum cubensis* TR4

5 **Campo tecnológico**

La presente descripción se refiere a la resistencia de las plantas y en particular a un método para producir plantas con tolerancia o resistencia a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4.

10 **Técnica anterior**

A continuación se enumeran las referencias que se consideran relevantes como antecedentes de la materia:

- 15 – Chai, M., y col. “Biotechnology and in vitro mutagenesis for banana improvement”. Banana improvement-cellular, molecular biology and induced mutation. Enfield, NH, EE.UU.: FAO/IAEA/INIBAP, Science Publishers Inc, 2004, 59-77.
- 20 – Akimoto, Keiko, y col. “Epigenetic inheritance in rice plants”. Annals of botany 100.2 (2007): 205-217.
- 25 – Luis Pérez-Vicente y col. “Technical Manual, Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4)” FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, mayo de 2014
- Dita, M. A., y col. “A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium -wilt pathogen.” Plant Pathology 59.2 (2010): 348-357.

El reconocimiento de las referencias anteriores en la presente memoria no debe deducirse como que son de alguna manera relevantes para la patentabilidad de la materia descrita actualmente.

30 **Antecedentes**

La producción mundial de banana está seriamente amenazada por el resurgimiento del marchitamiento por *Fusarium*. La enfermedad, provocada por un hongo que se encuentra en el suelo. *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (FOC) y también conocida como “enfermedad de Panamá”, acabó con la industria bananera Gros Michel en Centroamérica y el Caribe, a mediados del siglo XX. Los efectos de FOC Raza 1 fueron superados por un cambio hacia cultivares resistentes de Cavendish, que actualmente son la fuente del 99 % de las exportaciones de banano. Se cree que más del 80 % de la producción mundial de banano y plátano se basa en germoplasma susceptible a TR4. Esta cepa de FOC ha provocado epidemias en Cavendish en los trópicos diferentes de las infecciones menos graves informadas anteriormente en los subtrópicos. [Luis Pérez-Vicente y col. “Technical Manual, Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4)” FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, mayo de 2014]

45 Las esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* pueden permanecer latentes en el suelo incluso durante 30 años. Las esporas infectan a una planta susceptible a través de las raíces y colonizan los vasos del xilema de la planta, bloqueando el flujo de agua y nutrientes. Esta afección produce los síntomas llamados marchitamiento por *Fusarium*. El síntoma característico del marchitamiento por *Fusarium* es el tejido vascular ennegrecido, descolorido y debilitado dentro de los tallos de la planta. La decoloración varía desde el amarillo pálido en las primeras fases hasta el rojo oscuro y el negro en las fases posteriores. Los síntomas internos se desarrollan inicialmente en las raíces alimentadoras y los rizomas y después en el pseudotallo de la planta.

50 Actualmente, son resistentes a los fungicidas y no pueden eliminarse del suelo mediante ningún tratamiento químico. Por lo tanto, hasta el momento, no existe ningún tratamiento viable y totalmente eficaz del suelo o de las plantas para controlar o curar el marchitamiento por *Fusarium* en el campo.

55 Chai, M., y col. iniciaron un programa para mejorar cultivares de banano mediante mutaciones inducidas. La planta de banana *Pisang Berrangan* (AAA) fue irradiada con rayos gamma en diversas dosis. Se seleccionaron mutantes tolerantes al marchitamiento por *Fusarium* [Chai, M., y col. “Biotechnology and in vitro mutagenesis for banana improvement”. Banana improvement-cellular, molecular biology and induced mutation. Enfield, NH, EE.UU.: FAO/IAEA/INIBAP, Science Publishers Inc, 2004, 59-77].

60 Akimoto, Keiko, y col. muestran que la desmetilación activó un gen de resistencia a enfermedades en la planta de arroz [Akimoto, Keiko, y col. “Epigenetic inheritance in rice plants”. Annals of botany 100.2 (2007): 205-217].

65 Luis Pérez-Vicente y col. revisaron los aspectos principales del marchitamiento por *Fusarium* y desvelaron diferentes protocolos sobre el muestreo, la extracción y el almacenamiento en aislamiento, la inoculación de banano y las

herramientas de extracción molecular y diagnóstico [Luis Pérez-Vicente y col. "Technical Manual, Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4f FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, mayo de 2014],

- 5 Dita, M. A., y col. describen un método rápido de detección de TR4 que se basa en PCR y puede aplicarse *in planta*. [Dita, M. A., y col. "A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. "Plant Pathology 59.2 (2010): 348-357]

10 **Descripción general**

La presente descripción proporciona, según un primero de sus aspectos, un método para producir una planta de banano con tolerancia a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4 comprendiendo el método:

15 (a) exponer uno o más meristemos de banano, en uno o más ciclos de propagación, a un medio que comprende un agente desmetilante para proporcionar de esta manera uno o más meristemos de banano que exhiben expresión y, de esta manera, amplificación de elementos retrotransponibles en su genoma vegetal como se visualiza mediante análisis de hibridación de transferencia Southern, en donde dicha hibridación de transferencia Southern se lleva a cabo con una sonda específica para retrotransposones (RT);

20 (b) enraizar dichos meristemos que exhibieron dicha amplificación y regenerar a partir de ellos una o más plantas de banano regeneradas, teniendo al menos una de dichas plantas de banano regeneradas tolerancia o resistencia a *Fusarium oxysporum Cubensis*.

25 Se desvela además en el presente documento una planta de banano que comprende al menos un marcador genómico asociado con la tolerancia o resistencia de la planta a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4, exhibiéndose dicha tolerancia o resistencia por una planta de banano que permanece asintomática después de la exposición a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4.

30 **Breve descripción de los dibujos**

Para entender mejor la materia que se describe en la presente memoria y para ilustrar cómo puede llevarse a cabo en la práctica, ahora se describirán las modalidades, solo a modo de ejemplo no limitante, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

35 La **Figura 1** es un diagrama de bloques que describe un método para producir una planta de banano con tolerancia o resistencia a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4, según una realización de la presente descripción.

40 La **Figura 2A-2E** son imágenes de plantas 13 semanas después de la inoculación con el hongo patógeno donde la Fig. 2A muestra que no hay síntomas significativos de la enfermedad, mientras que las Figs. 2B-2E) muestran síntomas típicos y avanzados de la enfermedad.

La **Figura 3** es una imagen de una bandeja que contiene 12 plantas de banano inoculadas, 9 semanas después de la inoculación con 200 ml de inóculo (concentración de 1×10^6 esporas/ml).

45 La **Figura 4** es una imagen de una planta asintomática 13 semanas después de la inoculación.

50 La **Figura 5A-5H** son imágenes de plantas de banano resistentes (**Figuras 5A-5D, 5G**) y susceptibles (**Figura 5E-5F, 5H**), las plantas resistentes obtenidas según la presente descripción, y una comparación directa entre el tejido vascular dentro de los tallos de una planta resistente (Fig. 5G) y una planta susceptible (Fig. 5H).

55 La **Figura 6A-6G** son imágenes de plantas de banano resistentes producidas según la presente descripción en diferentes fases, mostrando las **Figuras 6D-6G** frutas de banana de diferentes hermanos.

La **Figura 7** es una hibridación de transferencia Southern analizada con la sonda Ban-Retro 1, donde *pre* y *post* indica antes o después de la exposición al agente de desmetilación, respectivamente.

60 La **Figura 8** es una estructura putativa de elemento retrotransponible tipo Copia que comprende: repeticiones terminales largas en 5', repeticiones terminales largas en 3', proteína GAG, genes que codifican proteasa (prot.). Integrasa (Intg.), Transcriptasa inversa (RT), ARN H (RN H.).

65 Descripción detallada de las realizaciones

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la exposición de los meristemos de plantas de banano a un agente desmetilante durante 1-2 ciclos de propagación en la fase de micropropagación del cultivo produjo una pluralidad de plantas de banano Cavendish mutantes, entre las cuales algunas exhibieron resistencia al patógeno *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4.

Basándose en el descubrimiento anterior, se ha establecido un método para producir plantas de banano Cavendish con tolerancia o resistencia a *Fusarium oxysporum Cubensis* y específicamente a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4.

- 5 *Fusarium oxysporum Cubensis* es una enfermedad de marchitamiento vascular típica que produce varios síntomas llamados marchitamiento por *Fusarium*. Los síntomas pueden dividirse en síntomas internos y síntomas externos.
- 10 El síntoma interno característico del marchitamiento por *Fusarium* es la decoloración vascular, que varía de amarillo pálido en las primeras fases a rojo oscuro o casi negro en fases posteriores. Los síntomas internos se desarrollan primero en las raíces alimentadoras, que son los sitios de infección iniciales. El hongo se propaga al rizoma y después al pseudotallo.
- 15 Los síntomas externos incluyen marchitamiento y coloración amarillenta de las hojas más viejas alrededor de los márgenes. Las hojas amarillas pueden permanecer erectas o colapsar en el pecíolo. Finalmente, todas las hojas caen y se secan. Otro síntoma común es la división de la base del pseudotallo. Otros síntomas incluyen márgenes irregulares y pálidos en las hojas nuevas y arrugas y distorsión de la lámina de la hoja.
- 20 Por lo tanto, en el contexto de la presente descripción, cuando se hace referencia a *tolerancia*, debe entenderse que la planta está infectada por el hongo, pero permanece viable y productiva en términos de rendimiento de fruto. En este sentido, la planta puede o no presentar uno o más síntomas de la enfermedad. En algunas realizaciones, la planta no muestra síntomas externos de la enfermedad, pero exhibe síntomas internos de la enfermedad. En algunas otras realizaciones, la planta muestra síntomas leves (externos y/o internos) de la enfermedad, pero aún permanece viable.
- 25 Además, en el contexto de la presente descripción, al hacer referencia a *resistencia*, debe entenderse que la planta no presenta ninguno de los síntomas característicos, es decir permanece asintomática, de la enfermedad.
- 30 El método desvelado en el presente documento es para producir una o más plantas de banano mutantes con tolerancia o resistencia a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4.
- 35 En algunas realizaciones, la tolerancia o la resistencia se determina por la ausencia de uno o más síntomas de la enfermedad. En algunas realizaciones, el uno o más síntomas incluyen al menos uno de, a veces una combinación de, marchitamiento de las hojas, amarilleamiento de las hojas y ennegrecimiento del sistema vascular de la planta.
- 40 Específicamente, el método desvelado en el presente documento para producir plantas de banano con tolerancia o resistencia a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4 comprende:
- 45 (a) exponer uno o más meristemos de banano, en uno o más ciclos de propagación, a un medio que comprende un agente desmetilante para proporcionar de esta manera uno o más meristemos de banano que exhiben expresión y, de esta manera, amplificación de elementos retrotransponibles en su genoma vegetal como se determina mediante análisis de hibridación de transferencia Southern, en donde dicha hibridación de transferencia Southern se lleva a cabo con una sonda específica para retrotransposones (RT),
- 50 (b) enraizar dichos meristemos que exhibieron dicha amplificación y regenerar a partir de ellos una o más plantas de banano regeneradas, teniendo al menos una de dichas plantas de banano regeneradas tolerancia o resistencia a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4.
- 55 Los explantes de *meristemo de banano* empleados por el método de la presente descripción son normalmente, pero no exclusivamente, un meristemo apical del brote. El explante de meristemo de banano se coloca en un medio de cultivo y se deja propagar.
- 60 Como se aprecia, la propagación es necesaria para multiplicar el número de células del mismo explante individual. El proceso de multiplicación implica una pluralidad de ciclos de micropagación, implicando cada ciclo el reemplazo del medio de cultivo. Normalmente, los medios de cultivo contienen, como mínimo, sales inorgánicas, nutrientes, reguladores del crecimiento (auxinas y citoquininas), preparaciones naturales complejas y materiales de soporte inertes. Cada ciclo no usa necesariamente el mismo medio de cultivo que el anterior, y el tipo de medio de cultivo o cualquier suplemento añadido a un medio de cultivo dependerá de la fase particular de la propagación del meristemo.
- 65 Los meristemos del banano se cultivan normalmente empleando una pluralidad de ciclos de propagación. Según la presente descripción, al menos uno, a veces, 1-3 ciclos de propagación están en un medio que comprende un agente desmetilante. La exposición al medio que comprende el agente desmetilante se produce después de la multiplicación suficiente de las células meristemáticas en el cultivo.
- 70 En el contexto de la presente descripción, cuando se hace referencia a un *agente desmetilante* debe entenderse como un agente que comprende uno o una combinación de compuestos que inhibe la metilación del ácido nucleico. En

algunas realizaciones, el compuesto es un inhibidor de la ADN metil transferasa. Una lista no limitante de inhibidores de la ADN metiltransferasa incluye azacitidina y 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina).

5 En algunas realizaciones preferidas, el agente de desmetilación comprende decitabina. En algunos aspectos la cantidad de decitabina está entre 0,1-50 pM.

10 En algunas realizaciones preferidas, el agente de desmetilación comprende decitabina. En algunos aspectos la cantidad de decitabina es una cualquiera de 1, 10, 15, 30 o 45 pM, representando cada cantidad un aspecto diferente de la invención.

15 En algunas realizaciones preferidas, el agente de desmetilación comprende decitabina. En algunos aspectos la cantidad de decitabina es 30 pM.

20 La exposición de los meristemos en propagación a un agente de desmetilación normalmente tiene lugar después de al menos 10 ciclos de propagación. En algunos aspectos, la exposición a un medio suplementado con el agente desmetilante se produce después de al menos 15 ciclos de propagación.

25 La exposición al agente desmetilante puede producirse en un solo ciclo de propagación, pero también en más de un ciclo de propagación. En algunos aspectos, la exposición de uno o más meristemos al agente desmetilante es durante al menos dos ciclos de propagación, normalmente secuenciales. La determinación de cuántos ciclos deben estar en presencia del agente desmetilante puede basarse en el nivel de expresión y, por lo tanto, de amplificación de elementos retrotransponibles en su genoma vegetal, como se determina mediante análisis de hibridación transferencia Southern, como se analiza más adelante.

30 30 En algunas realizaciones, durante la fase de propagación y, normalmente antes de la exposición al agente desmetilante, los tejidos meristemáticos se propagan, al menos en un ciclo de propagación, en un medio que comprende una sustancia similar a citoquinina. Se conocen en la técnica sustancias similares a las citoquininas, y los ejemplos no limitantes incluyen isopentenil adenina (2iP), kinetina (KIN), 6-Benciladenina (BA) y 6-Bencilaminopurina (BAP), 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea (TDZ).

35 En una realización preferida, la sustancia similar a la citoquinina es TDZ, que se descubrió que proporciona la mejor tasa de multiplicación.

40 La presencia de TDZ en los medios de cultivo se encuentra en cantidades muy bajas, normalmente en el intervalo de 0, 1 ppm. Esta cantidad es suficiente para inducir la división celular deseada.

45 La siguiente fase del método descrito implica el enraizamiento de los meristemos que exhiben un nivel deseado de expresión de elementos retrotransponibles. Como se indicó anteriormente, el nivel de expresión puede determinarse mediante análisis de hibridación de transferencia Southern. En una realización, se determina que la expresión y la amplificación son suficientes cuando el nivel alcanza una meseta.

50 Como se aprecia, los elementos retrotransponibles (o retrotransposones, o RT) son secuencias de ADN que experimentan transcripción en ARN y posteriormente se convierten nuevamente en secuencias de ADN que se insertan nuevamente en el genoma. El aumento de la expresión (la amplificación) de los elementos retrotransponibles es indicativo del aumento del número de copias de la secuencia insertada nuevamente en el genoma.

55 La expresión y la amplificación de los retrotransposones pueden determinarse mediante diversas técnicas de detección de ADN, por ejemplo, mediante *Hibridación de transferencia Southern*.

50 Pueden usarse diversas sondas en el análisis de hibridación de transferencia Southern de retrotransposones. Estas incluyen, por ejemplo, sondas específicas para retrotransposones, por ejemplo, Ban-1, una porción del gen que codifica la transcriptasa inversa del elemento retrotransponible Copia 1.

La secuencia de Ban-1 se proporciona a continuación y se denomina SEQ ID NO: 1:

```
ggaggaggat gtatatgatg caacctgagg gattcatgtc caagaactgc ccagataagg
tgtgttagtt gcttagatcc atttagggac taaagcaagc ttcccgaaagt tggaacataa
gatttgatga ggcaatcaga tcttatgact tcgttaagaa cgaagatgag ctttgttat
acagaaaggt aagtgggagc gctatttagct ttttgggttt atatgttagat gacatcctcg
tctttggaa tgacatagga atgctatcca caataaaggc ttggtttatct agacacttct
ccatgaagg
```

Para realizar el análisis de transferencia Southern, se toma una muestra de ADN del medio de cultivo. Para verificar cuándo la expresión ha alcanzado el nivel deseado, pueden tomarse muestras de ciclos de proliferación secuenciales, sometiéndose cada vez a un análisis transferencia Southern y una vez determinado el nivel deseado, el método puede avanzar a la siguiente fase.

5 Se conocen en la técnica métodos de propagación y enraizamiento, por ejemplo, como se describe en Cronauser S. S. y col.: *Annals of Botany* 53 (1984) 321-328. Generalmente, las plantas se colocan en un medio de enraizamiento y regeneración, opcionalmente medio Murashige y Skoog (MS), durante un tiempo suficiente para obtener la planta regenerada. [Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.]

10 Una vez que se desarrollan grupos de plantas (plantas que se originan de la misma planta en el ciclo anterior y, normalmente, 5-8 plantas por grupo hermano), estos se separan para endurecerlos y plantarlos. Como se aprecia, el endurecimiento es un proceso de exposición de las plantas, después del cultivo de tejidos, a condiciones ambientales que las mantendrán con alta humedad y temperatura suave para que no sufran un choque una vez que se exponen a las condiciones ambientales "duras". Como se apreciará además, la plantación puede ser en campo abierto o en un invernadero.

15 20 Pueden seleccionarse plantas tolerantes o resistentes a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4. Esto puede hacerse mediante técnicas de selección conocidas.

25 Normalmente, la selección y el cribado de aquellas plantas regeneradas tolerantes o resistentes a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4 se realiza mediante la inoculación (exposición) de las plantas a un inóculo que contiene esporas de *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4 y análisis visual de las plantas después de un crecimiento adicional. Las plantas que se identifican como asintomáticas se usan después para establecer la siguiente generación de plantas tolerantes/resistentes (cultivo de tejidos y regeneración de plantas).

30 35 40 La **Figura 1** proporciona un diagrama de bloques de etapas para obtener plantas de banana según una realización de la presente descripción. Específicamente, se usa un clon de meristemo de banano como punto de partida para la mutagénesis *in vitro*. El clon se produce normalmente a partir de un meristemo de una banana de interés comercial (por ejemplo, que tiene un alto rendimiento de fruta, etc.). Después el clon se somete a la etapa de mutagénesis *in vitro*, donde el clon se expone a un medio que comprende un agente desmetilante para proporcionar de ese modo varios hermanos (hermanos 1 a N), algunos de los cuales exhiben expresión y, por lo tanto, amplificación de elementos retrotransponibles en su genoma vegetal (lo que puede determinarse mediante análisis de hibridación de transferencia Southern). En esta fase, se lleva a cabo la selección para resistencia a la cepa TR4 de *Fusarium oxysporum f. sp. Cubensis* como se describe en el presente documento, seguido de una evaluación de campo que incluye, entre otros, rendimiento, así como cualquier otra característica fenotípica que pueda ser de interés comercial, según pueda ser determinada por aquellos versados en la materia.

45 50 55 Las plantas de banano desveladas en el presente documento tienen características únicas que también pueden identificarse a nivel molecular. Específicamente, las plantas de banano comprenden al menos un marcador genómico asociado a la tolerancia o resistencia de una planta a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4. Por lo tanto, también se desvela en el presente documento un método para identificar plantas de banano con tolerancia o resistencia a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4, comprendiendo el método identificar el marcador genómico que está asociado a la tolerancia o resistencia de la planta.

60 En los Ejemplos no limitantes proporcionados a continuación, y que forman parte de la presente descripción, se probaron dos lotes, en un primer lote alrededor de 4500 plantas de banano mutantes se aclimataron con éxito y posteriormente se inocularon con la cepa TR4 de *Fusarium oxysporum f. sp. Cubensis*. Estos se dividieron en tres grupos de estudio. Del total de plantas de banano mutadas, al menos 153 plantas (3,4 %) se determinaron ser asintomáticas tras la inoculación con las esporas del hongo, y en un segundo lote, de 5200 plantas mutantes, se determinó que 262 (5,0 %) eran asintomáticas tras la inoculación con las esporas del hongo.

55 **Descripción detallada y ejemplos no limitantes**

Preparación del cultivo de meristemos

60 Se seleccionaron veinte clones del cultivar GAL en el campo por su alto rendimiento; cada clon recibió un número de registro. Los excipientes se colocaron en cultivo según un procedimiento convencional.

65 70 En el ciclo 7**^ de propagación se añadió 0,1 ppm de Tidiazurón (TDZ) al medio. En los ciclos 20 y 21, se esterilizaron por filtración 30 pM de 5-Aza-2-Desoxicitidina (un compuesto de desmetilación) y se añadió al medio después de la solidificación.

Enraizamiento y regeneración

En el ciclo 22 las plantas se colocaron en medio de enraizamiento y regeneración.

5 Aislamiento de ADN y análisis de transferencia Southern

10 Se tomaron muestras de ADN del ciclo 0, 5, 21, 22 y se analizaron mediante hibridación de transferencia Southern, sondadas con Ban -1.

15 10 Se recogieron muestras (2,5 g) de tejido de la lámina foliar completamente expandida y se molieron con mortero y maja bajo nitrógeno líquido. Las muestras se homogeneizaron en 25 ml de tampón de extracción que contenía el 4 por ciento (p/v) de CTAB, Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 1,4 M y EDTA 20 mM. Los extractos se colocaron a 65 grados centígrados durante 30 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió un volumen igual de cloroformo y alcohol amílico (20:1) y después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se filtró a través de 5 capas de estopilla y se añadió un volumen igual de isopropanol helado al filtrado. Después de añadir NaCl a una concentración final de 0,1 M, las muestras se mantuvieron a -20 grados centígrados durante una hora y posteriormente se centrifugaron durante 15 min a 11.000 rpm a 40 grados centígrados. El sedimento resultante se resuspendió en 3 ml de alcohol etílico al 70 por ciento, la mezcla se centrifugó como se indicó anteriormente y el sedimento resultante se resuspendió en 0,5 ml de agua destilada. Se digirieron alícuotas de diez micro g de ADN con EcoRI y se separaron en un gel de agarosa al 1,2 por ciento, se tiñeron con bromuro de etidio y se transfirieron a una membrana Nytran. La transferencia de ADN y la hibridación se realizaron según [Sambrook J. y col.: Molecular Cloning, A laboratory Manual. Cold Spring Harbor N.Y., Coldspring Harbor Laboratory Press].

20 25 Despues de 24 ciclos, el grupo de plantas (plantas originadas de la misma planta en el ciclo anterior (aproximadamente 5-8 plantas por grupo hermano) se dividió en dos lotes. Un lote se usó para evaluación en una plantación comercial en Israel y el segundo lote se envió para analizar su resistencia en la Universidad de Wageningen (Holanda).

30 Selección de planta de banano con resistencia a la cepa TR4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubensis

35 30 El primer lote de plantas se plantó en el campo en Israel y después se evaluaron sus características agronómicas incluyendo la altura de la planta en la floración del segundo ciclo de fruta, el número de dedos en el racimo, el peso del racimo, la longitud de los dedos, etc.

40 35 A continuación se desvela una descripción botánica detallada de la planta, que incluye su apariencia general, pseudotallo y retoños, pecíolo, nervadura central, hoja, inflorescencia y yema masculina, bráctea floral, flor masculina y fruto. Esta descripción se basa en observaciones de especímenes cultivados en Galilea Occidental, Israel, 20 meses después de la plantación. La plantación está a 30 m sobre el nivel del mar, aproximadamente a 1200 m al este del mar Mediterráneo, adyacente a la ciudad de Shiomí. La descripción se basa en una observación de aproximadamente 50 plantas cultivadas en una plantación comercial. Los datos se recopilaron en 2012/2013. Los descriptores presentados en el presente documento están de acuerdo e incluyen la totalidad de las 117 normas internacionales contenidas en "Descriptors for Banana (Musa spp.)" elaborado por CIRAD/INIBAP/IPGRI. La terminología del color está según la Tabla de colores de la Royal Horticultural Society del Reino Unido, 2001. Ploidía: Triploide (AAA). Hábito de las hojas: Caído.

45 45 Selección e identificación de un marcador genómico asociado a la cepa TR4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubensis

50 50 Las segundas plantas *in vitro* se endurecieron en Holanda en un invernadero según el protocolo de endurecimiento convencional. Después de 6 semanas, las plantas fueron transferidas a macetas de 1000 cm³ que contenían un medio inerte a base de turba. Seis semanas después las plantas fueron inoculadas según un procedimiento usado rutinariamente para la selección de resistencia en la UoW Holland. Aproximadamente 9.000 clones (1-3 plantas por clon) se inocularon con 200 ml de inóculo en una concentración de 1x 100 esporas ml-f. Además de las plantas mutadas, el experimento también incluyó 100 plantas de control que fueron inoculadas y una planta de cada clon se mantuvo sin inocular. Todas las plantas se cultivaron en macetas durante 15 semanas. Las plantas se examinaron para detectar síntomas entre 13-15 semanas después de la inoculación. Las plantas fueron analizadas visualmente (amarilleamiento y marchitamiento de las hojas más viejas y ennegrecimiento del sistema vascular interno después de cortar el cormo a 4-5 cm del suelo). Se encontraron ciento cincuenta y tres clones asintomáticos del primer lote (4100 clones). Los clones asintomáticos se colocaron en cultivo de tejidos y se repropagaron a una cantidad de 100 plantas por clon para el ensayo de campo.

60 60 La **Figura 1** proporciona un diagrama de bloques del método de producción de plantas de banano como se describe anteriormente.

65 65 Las **Figuras 2A-2E** muestran plantas ilustrativas 13 semanas después de la inoculación. Específicamente, la Figura 2A es una imagen de una planta sin síntomas significativos de la enfermedad (por lo tanto, esta planta se seleccionó para conformación y ensayos de campo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) internos). Las

Figuras 2B-2E son imágenes de plantas que muestran más del 60 % de amarilleamiento o división externa. Estas plantas por lo tanto se descartaron.

5 La **Figura 3** es una imagen de una bandeja que contiene 12 plantas de banano inoculadas, 9 semanas después de la inoculación con 200 ml de inóculo (concentración de 1×10^6 esporas/ml). Esta figura muestra específicamente que las plantas inoculadas eran altamente susceptibles a la enfermedad. Los síntomas son amarilleamiento de las hojas más viejas y marchitamiento.

10 La **Figura 4** es una imagen de una planta asintomática 13 semanas después de la inoculación. Las plantas no expresan síntomas visuales de la enfermedad.

15 Las Figuras 5A-5H son imágenes de plantas de banano resistentes (**Figuras 5A-5D**) y susceptibles (**Figura 5E-5F, 5H**), las plantas resistentes obtenidas según la presente descripción. Las **Figuras 5G y 5H** muestran una comparación entre plantas resistentes (**Figura 5G**) obtenidas según la presente descripción y plantas susceptibles (**Figura 5H**), y el ennegrecimiento del tejido vascular de los tallos se muestra en la **Figura 5H** pero no en la **Figura 5G**.

20 Las **Figuras 6A-6G** muestran plantas de banano producidas mediante el método descrito en el presente documento. Como se muestra, no se evidencian síntomas de enfermedad y las plantas producen frutos de alto rendimiento y comercialmente viables.

25 La **Figura 7** es una hibridación de transferencia Southern analizada con la sonda Ban-Retro 1. El ADN genómico de banano extraído de hojas de plantas cultivadas en tejidos antes de la activación de elementos retrotransponibles (carriles 1, 2 marcados *pre*) y después de la activación (carriles 3-10, marcados *post*). Los carriles 2, 4, 6, 8 y 10 representan ADN genómico cortado con la enzima de restricción EcoRI mientras que los carriles 1, 3, 5, 7 y 9 representan ADN sin cortar. Los fragmentos de ADN se hibridaron con la sonda Ban-Retro 1 marcada. Cada carril contiene 10 pg de ADN. Todas las muestras que se muestran en la figura se recolectaron de ciclos sucesivos de cultivo de tejidos del mismo explante. El patrón de bandas en la figura revela claramente la activación de elementos retrotransponibles y la intensificación de los elementos en loci específicos.

30 Finalmente, la **Figura 8** proporciona una estructura putativa de elemento retrotransponible tipo Cpia que comprende: repeticiones terminales largas en 5', repeticiones terminales largas en 3', proteína GAG, genes que codifican proteasa (prot.). Integrasa (Intg.), Transcriptasa inversa (RT), ARN H (RN H).

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una planta de banano con tolerancia o resistencia a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4 comprendiendo el método:
 - 5 (a)exponer uno o más meristemos de banano, en uno o más ciclos de propagación, a un medio que comprende un agente desmetilante para proporcionar de esta manera uno o más meristemos de banano que exhiben expresión y, de esta manera, amplificación de elementos retrotransponibles en su genoma vegetal como se determina mediante análisis de hibridación de transferencia Southern en donde dicha hibridación de transferencia Southern se lleva a cabo con una sonda específica para retrotransposones (RT),
 - 10 (b)enraizar dichos meristemos que exhibieron dicha amplificación y regenerar a partir de ellos una o más plantas de banano regeneradas, teniendo al menos una de dichas plantas de banano regeneradas tolerancia o resistencia a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho agente desmetilante es un inhibidor de la ADN-metiltransferasa.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho agente desmetilante se selecciona del grupo que consiste en azacitidina y decitabina.
4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho agente desmetilante es decitabina.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende exponer dichos uno o más meristemos al agente desmetilante en dos o más ciclos de propagación.
6. El método de la reivindicación 4 o 5, en donde dicha exposición a dicho agente desmetilante se produce hasta que dicha amplificación alcanza una meseta.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, en donde dicha sonda es Ban-1.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichos uno o más meristemos se someten a uno o más ciclos de micropropagación con 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea (TDZ) antes de exponer los mismos a un agente desmetilante.
- 35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde al menos una de dichas plantas de banano regeneradas es tolerante o resistente a *Fusarium oxysporum Cubensis* TR4.
10. 40 El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha tolerancia o resistencia está determinada por la ausencia de uno o más de marchitamiento de las hojas, amarilleamiento de las hojas o ennegrecimiento del sistema vascular de la planta.

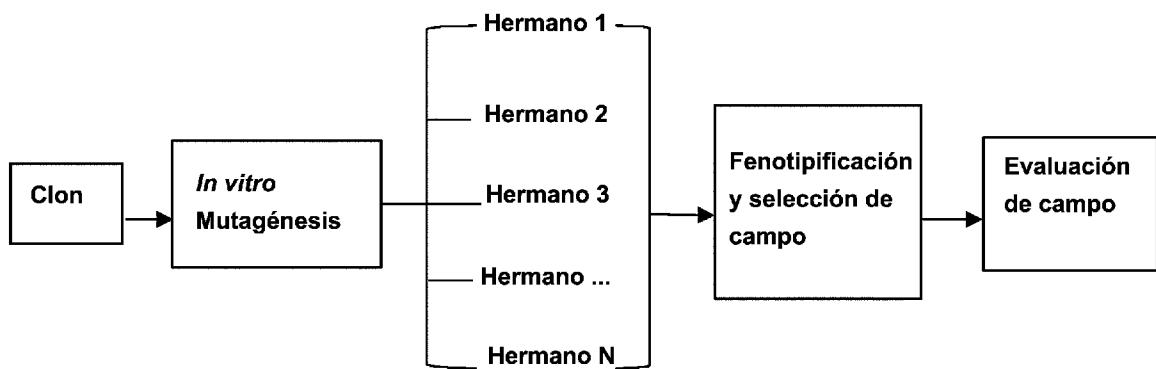


Figura 1

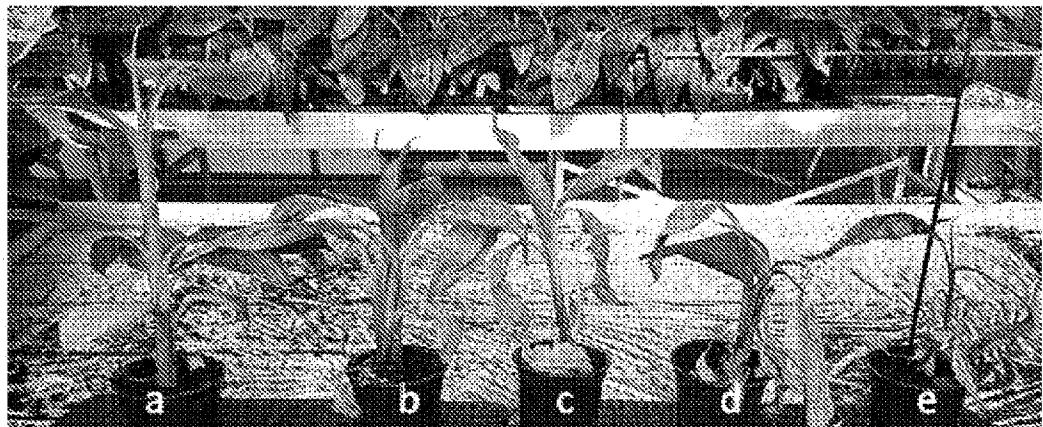


Figura 2A

Figura 2B

Figura 2C

Figura 2D

Figura 2E



Figura 3



Figura 4



Figura 5A



Figura 5B

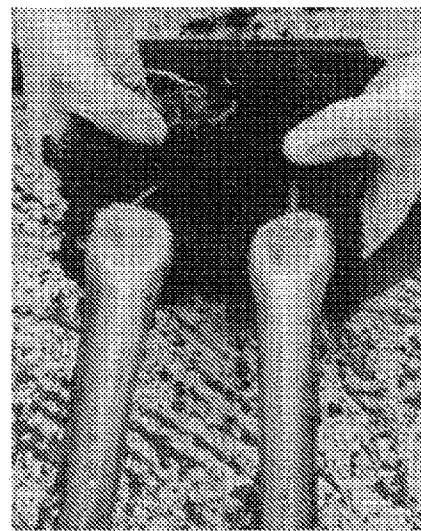


Figura 5C



Figura 5D



Figura 5E

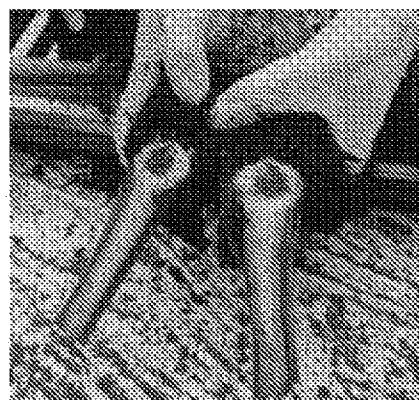


Figura 5F

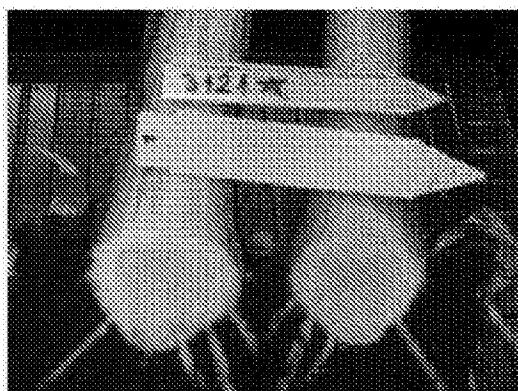


Figura 5G



Figura 5H



Figura 6A

ES 2 993 136 T3



Figura 6B



Figura 6C



Figura 6D



Figura 6E



Figura 6F



Figura 6G

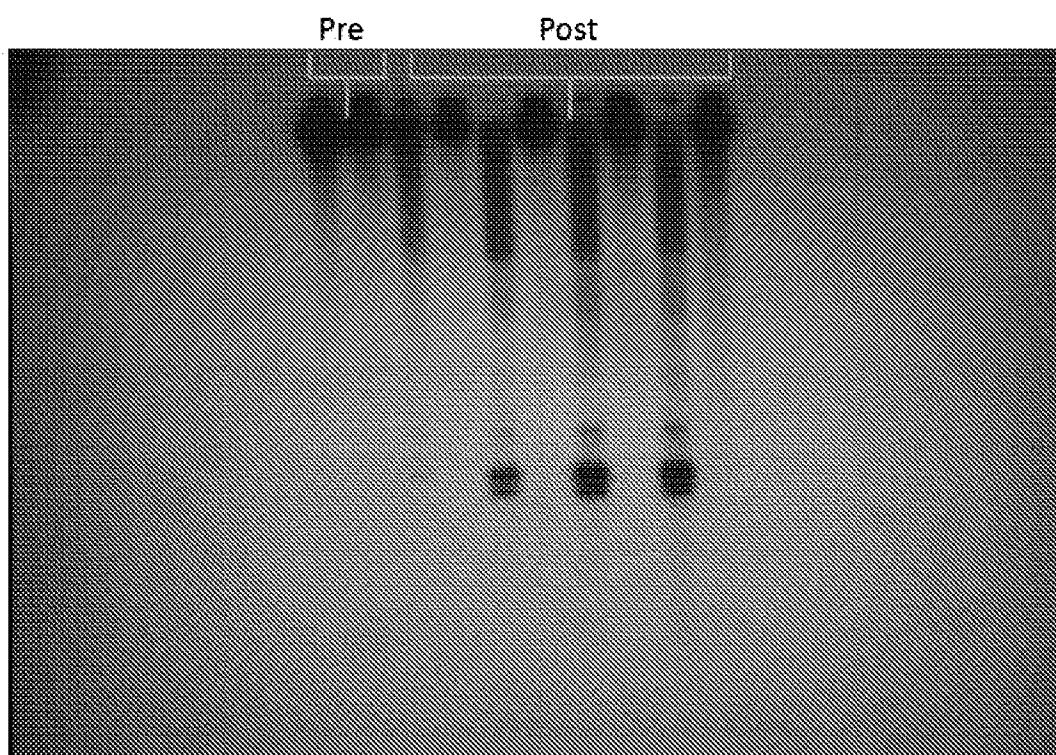


Figura 7

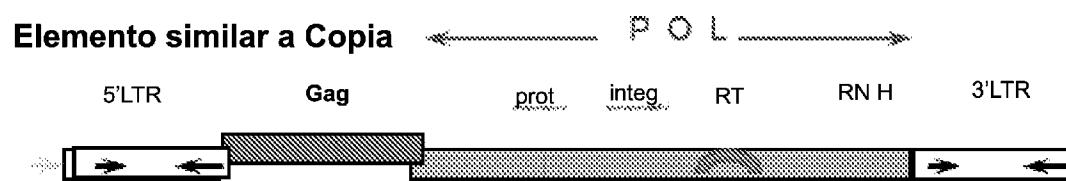


Figura 8