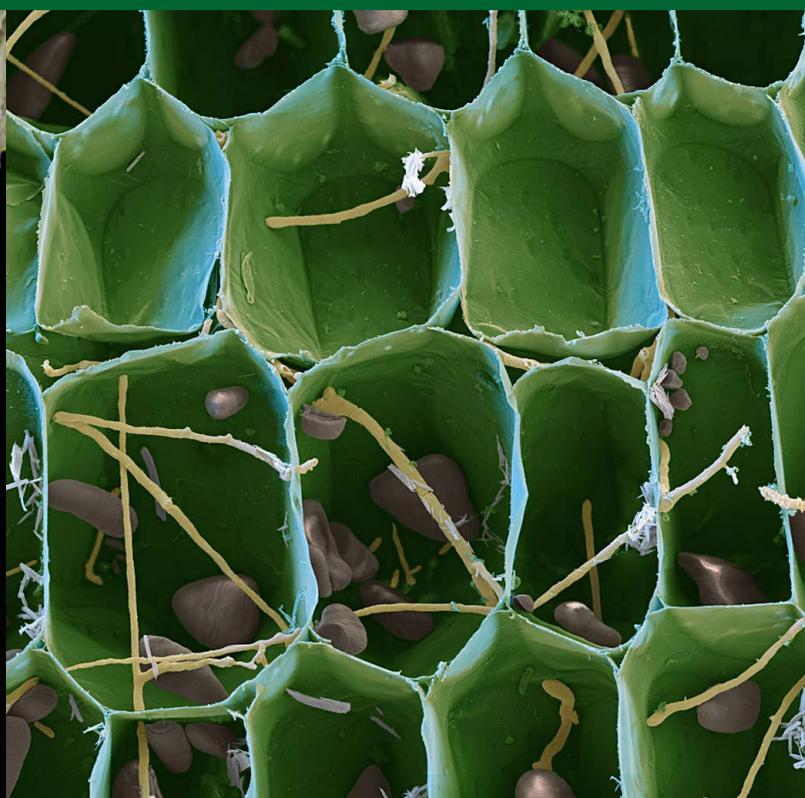
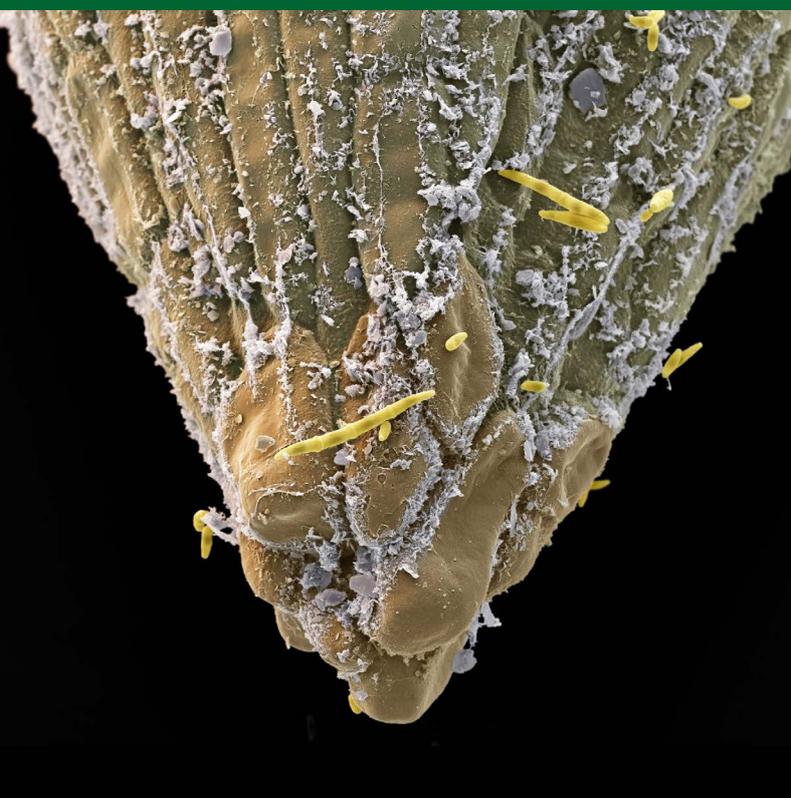




GUÍA ANDINA PARA EL DIAGNÓSTICO DE

# *Fusarium Raza 4 Tropical (R4T)*

*Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (syn. *Fusarium odoratissimum*)  
agente causal de la marchitez por *Fusarium*  
en musáceas (plátanos y bananos)



Bolivia



Colombia



Ecuador



Perú



**SECRETARÍA GENERAL  
DE LA COMUNIDAD ANDINA**

Av. Paseo de la República 3895  
San Isidro, Lima - Perú  
Teléfono: (511) 710 6400  
[www.comunidadandina.org](http://www.comunidadandina.org)

Guía andina para el diagnóstico de *Fusarium*  
Raza 4 Tropical (R4T) *Fusarium oxysporum*  
f.sp. *cubense* (syn. *Fusarium odoratissimum*)  
agente causal de la marchitez por *Fusarium*  
en musáceas (plátanos y bananos)

---

Editado por: Secretaría General de la CAN.

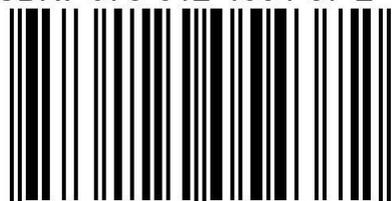
Primera edición, junio de 2020

Diseño y diagramación:  
Lorena Herencia Espinoza

**Fotos para la portada:** Eye of Science & Fernando García.

Izquierda: microscopía electrónica de una raíz de banano siendo atacada por conidias de R4T. Derecha: microscopía electrónica de un corte histológico en un pseudotallo de una planta de banano afectada por R4T.

ISBN: 978-612-4054-37-2



9 786124 054372

GUÍA ANDINA PARA EL DIAGNÓSTICO DE

# *Fusarium Raza 4 Tropical (R4T)*

*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (syn. *Fusarium odoratissimum*)  
agente causal de la marchitez por *Fusarium* en musáceas  
(plátanos y bananos)

Con el apoyo de:







## Autores:

Fernando A. García-Bastidas<sup>1\*</sup>, Silvia Fernanda Pachacama-Gualotuña<sup>2</sup>, David Alejandro Jarrín-Escudero<sup>2</sup>, Mario León Iza-Arteaga<sup>3</sup>, Mariluz Ayala Vásquez<sup>4</sup>, Hernán Emiro Ortiz<sup>4</sup>, Oscar Javier Dix Luna<sup>4</sup>, Judith Echegaray Buezo<sup>5</sup>, Danilo Farfán Menéndez<sup>5</sup>, Ida Bartolini Martínez<sup>6</sup>, Camilo Beltrán Montoya<sup>7</sup>, Geordana Zeballos Céspedes<sup>8</sup>.

1. Investigador en el programa de Musáceas en Wageningen, Consultor en Diagnóstico de *Fusarium* spp. de las Musáceas. KeyGene – Universidad de Wageningen - Agro Business Park 90, 6708 PW Wageningen, Países Bajos.
2. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario - AGROCALIDAD, Laboratorio de Biología Molecular, Av. Interoceánica Km. 14 1/2, La Granja MAGAP, Quito, Ecuador.
3. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias - INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Laboratorio de Biología Molecular, Km. 5 vía Quevedo - El Empalme, Los Ríos, Ecuador.
4. Instituto Colombiano Agropecuario-ICA, Subgerencia de Análisis y Diagnóstico, Dirección Técnica de Análisis y Diagnóstico Agrícola. Av. Calle 26 N° 85B-09. Bogotá, Colombia.
5. Laboratorio de Micología, Unidad Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal, Av. La Molina N° 1915 SENASA -Lima, Perú.
6. Laboratorio de Biología Molecular, Unidad Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal, Av. La Molina N° 1915 SENASA -Lima, Perú
7. Funcionario Internacional en Sanidad Vegetal de la Secretaría General de la Comunidad Andina, Av. Paseo de la Republica 3895, San Isidro 15047- Lima, Perú.
8. Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e inocuidad Alimentaria. SENASAG Santa Cruz. Av. Ejercito Nacional # 141 entre Soliz de Olguín y, Av. Irala, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

\*Tutor del taller, autor de correspondencia.

Fernando.garcia-bastidas@keygene.com / Fernando.garciabastidas@gmail.com



# Presentación

Las actuales circunstancias que afronta el mundo y nuestra región andina a consecuencia del COVID-19, demuestran que la agricultura es fundamental para generar bienestar social, por ello desde la Secretaría General de la Comunidad Andina consideramos prioridad, la atención a las distintas problemáticas que afronta este sector, como es el impacto que generan las plagas frente a las cosechas y la disponibilidad de alimentos.

Resulta necesaria la gestión fitosanitaria de la agricultura como medio, para lograr obtener la cantidad y calidad de los alimentos requeridos para nuestros 111 millones de ciudadanos andinos. Enfrentar las plagas, implementando soluciones integrales y contextualizadas a la realidad, demanda un esfuerzo conjunto, que incluye la participación del sector público y privado, de nuestros agricultores, la comunidad científica, investigadores y profesionales en múltiples áreas de las ciencias.

En medio de esta pandemia y estando en el Año Internacional de la Sanidad Vegetal (AISV), cuyo objetivo es el de concienciar a las personas sobre la importancia de proteger la salud de las plantas y así prevenir la propagación de plagas y enfermedades de los vegetales, la Secretaría General de la Comunidad Andina presenta la “Guía Andina para el Diagnóstico de *Fusarium Oxysporum* f.sp. *cubense* Raza 4 Tropical (R4T) (syn. *fusarium odoratissimum*), agente causal de la marchitez por *Fusarium* en musáceas (plátanos y bananos)”.

Este documento que incluye las herramientas disponibles para el diagnóstico del *Fusarium* Raza 4 Tropical, ha sido logrado gracias al esfuerzo conjunto de las Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria (ONPF) de los Países Miembros de la CAN, diversas instituciones y ciudadanos andinos, que, a través de sus conocimientos en agronomía, biología, biología molecular, biotecnología, entre otras aplicaciones de la ciencia que se requieren para enfrentar el diagnóstico de plagas de alta complejidad, brindaron valiosos aportes; en particular, expresamos nuestro agradecimiento al científico colombiano Fernando García-Bastidas, investigador de la Universidad de Wageningen y Keygene.

Para los países de la Comunidad Andina los plátanos y bananos revisten una alta importancia, no sólo por su valor agroindustrial y exportador, sino por el significado para la seguridad alimentaria de poblaciones indígenas y afrodescendientes. Colombia y Ecuador siendo dos de los más grandes exportadores de banano en el mundo, Perú logrando posicionarse en mercados europeos por la producción orgánica y casos exitosos de implementación de comercio justo; y Bolivia abasteciendo a países del Cono Sur.

Consideramos que el aporte de esta Guía se direccionará a la detección temprana y adecuado diagnóstico del R4T, como base para la toma de decisiones, por parte de las instituciones responsables de la vigilancia fitosanitaria de esta plaga en los Países Miembros de la Comunidad Andina, y que pasando esta crisis, podremos ampliar nuestra capacidad exportadora para convertirnos como CAN en la despensa del planeta.

**Jorge Hernando Pedraza**  
Secretario General de la CAN



# Contenido

	Pág.
<b>1. Antecedentes</b>	<b>11</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>13</b>
2.1. Banano, contexto histórico	13
2.2. Banano: de plantas silvestres a cultivares comestibles	13
2.3. Cultivo e importancia	15
2.4. Marchitamiento por <i>Fusarium</i> (Mal de Panamá) la pesadilla de la industria bananera	15
	<b>19</b>
<b>3. El patógeno y el hospedante</b>	<b>23</b>
<b>4. Diagnóstico de <i>Fusarium</i> asociado a Raza 4 Tropical VCG 1213-16</b>	<b>23</b>
4.1. Observación en campo	23
4.2. Métodos de prediagnóstico	25
4.3. Nuevos métodos: LAMP	27
	<b>27</b>
<b>5. Protocolos</b>	<b>27</b>
5.1. Protocolo para toma de muestras de tejido vegetal y suelo en campo	30
5.2. Manejo de muestras en el laboratorio y pre-diagnóstico	32
5.3. Protocolo para el aislamiento de <i>Fusarium</i> spp. a partir de muestras de suelo	33
5.4. Protocolo de extracción de ADN en Musáceas y <i>Fusarium</i> spp.	35
5.5. Prediagnóstico en ADN proveniente de material vegetal	37
5.6. Prediagnóstico en ADN proveniente de aislamientos del hongo	44
5.7. Prediagnóstico mediante PCR tiempo real Kit	52
5.8. Prediagnóstico mediante técnica LAMP	54
5.9. Producción de colonias de spora única (monospóricas)	58
5.10. Diagnóstico completo para reporte oficial o nueva incursión en país libre de R4T	61
5.11. Medidas de bioseguridad sugeridas para países con introducciones recientes de <i>Fusarium</i> R4T	67
	<b>67</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>67</b>



## 1. Antecedentes

La producción global de plátano y banano se encuentra seriamente amenazada por la rápida dispersión intercontinental del hongo fitopatógeno, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (R4T) el cual ha sido clasificado recientemente como *Fusarium odoratissimum* por Maryani *et al.* (2018). R4T tiene la capacidad de ocasionar, en clones de Cavendish, la enfermedad conocida como Marchitez/Marchitamiento del banano, Fusariosis del banano o coloquialmente Mal de Panamá, capacidad que no tienen las razas 1 y 2, por cuanto los clones Cavendish exhiben, en general resistencia a tales razas.

La dispersión del R4T es un peligro inminente para la industria bananera de América Latina que sustenta la producción de consumo local y la de exportación en materiales del cultivar Cavendish, y también para los pequeños productores de plátano, toda vez que R4T tiene la capacidad de causar enfermedad en otros grupos genéticos (AAB, ABB) incluidos los plátanos (García-Bastidas 2019).

En los Países Miembros de la Comunidad Andina (Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú), el R4T tiene la categoría de Plaga Cuarentenaria, y es una gran preocupación teniendo en consideración que en la región se producen cerca de 10.6 millones de toneladas de banano y 6.9 millones de toneladas de plátano (FAOSTAT, 2019).

R4T ha sido reportado recientemente en Colombia (García-Bastidas *et al.* 2019), y de acuerdo con la notificación oficial realizada por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), mediante su sistema de alertas, R4T es una Plaga Cuarentenaria presente y sujeta a control oficial, restringida al departamento de la Guajira, lugar en el que se ejecutan acciones de cuarentena y contención para prevenir la dispersión, bajo las disposiciones establecidas por dicha institución.

El Comité Técnico Andino de Sanidad Agropecuaria (COTASA) y la Secretaría General de la Comunidad Andina han priorizado el desarrollo de acciones para contribuir con la prevención, a través de acciones que incluyen la comunicación del riesgo y el diagnóstico confiable y oportuno.

La disponibilidad de metodologías de diagnóstico para R4T es un factor crítico para lograr una detección temprana de la enfermedad, que articulada con las acciones de vigilancia fitosanitaria oficial que realizan las Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria (ONPF), sustentan eficazmente la toma de decisiones adecuadas y la aplicación de medidas fitosanitarias para prevenir la dispersión y/o establecimiento de R4T en la región.

En el ámbito regional, se requiere disponer de información para el diagnóstico, que facilite en tiempo y forma las actividades de las ONPF y la toma de decisiones. En virtud de lo anterior la Comisión de la Comunidad Andina, mediante la Decisión 832, aprobó un proyecto para la estandarización regional del diagnóstico de R4T, motivo por el cual, una de las actividades planeadas fue la realización del “Taller regional de nivelación capacidades en diagnóstico para la detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* RAZA 4 TROPICAL (FOC R4T), en la Comunidad Andina (CAN)”, en el cual participaron especialistas en diagnóstico de los laboratorios de las ONPF de la CAN, con el fin de fortalecer la estrategia regional para evitar la dispersión del patógeno que ocasiona la temida enfermedad.

Este documento se concibió con ocasión del mencionado taller, bajo la tutoría y liderazgo del Dr. Fernando García-Bastidas, investigador y consultor experto en diagnóstico egresado de la Universidad de Wageningen y quien actualmente se desempeña como investigador en el área de mejoramiento genético de musáceas en KeyGene (Países Bajos). García-Bastidas facilitó las sesiones prácticas realizadas y proporcionó la base documental para que los especialistas en diagnóstico revisaran y discutieran la información contenida en la presente guía, la cual servirá como base para lograr posteriormente una estandarización regional del diagnóstico para R4T.

La Agencia Ecuatoriana de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario (AGROCALIDAD) del Ecuador fungió como anfitrión del taller en sus laboratorios de Tumbaco, del 6 al 10 de noviembre de 2019, en el cual se realizaron todas las sesiones prácticas.

Lista de participantes del Taller regional de nivelación capacidades en diagnóstico para la detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* RAZA 4 TROPICAL (FOC R4T), en la Comunidad Andina (CAN)”

CONTACTO	INSTITUCIÓN	CARGO	PAÍS
Cristian Marcelo Montero Vallejo	SENASAG	Encargado Biología Molecular	Bolivia
Juan Carlos Camacho	SENASAG	Encargado Oficina local Chimoré	Bolivia
Geordana Zeballos Céspedes	SENASAG	Responsable Nacional Vigilancia Fitosanitaria	Bolivia
Hernán Emiro Ortiz	ICA	Responsable de Laboratorio de Cuarentena Vegetal	Colombia
Oscar Dix	ICA	Director técnico de Análisis y Diagnóstico Agrícola	Colombia
Mariluz Ayala	ICA	Analista del laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario	Colombia
Silvia Pachacama Guolotuña	AGROCALIDAD	Responsable técnico del Laboratorio de Biología Molecular	Ecuador
David Jarrín Escudero	AGROCALIDAD	Responsable técnico del Laboratorio de Biología Molecular	Ecuador
Karla Méndez	AGROCALIDAD	Analista del Laboratorio de Biología Molecular	Ecuador
Hernando Regalado	AGROCALIDAD	Responsable del Laboratorio de Fitopatología	Ecuador
Alexander Toaza	AGROCALIDAD	Analista del Laboratorio de Fitopatología	Ecuador
Jairo Guevara	AGROCALIDAD	Analista del Laboratorio de Fitopatología	Ecuador
Ana Garrido	AGROCALIDAD	Directora de Diagnóstico Vegetal	Ecuador
Johana Buitrón	INIAP	Analista de servicios especializados	Ecuador
Mario Iza	INIAP	Técnico de Laboratorio de Biología Molecular	Ecuador
Freddy Magdama	CIBE-ESPOL	Docente - Investigador	Ecuador
Fernando García-Bastidas	KeyGene – WUR	Investigador y tutor del curso	Holanda
Judith Echegaray Buezo	SENASA	Responsable del laboratorio de micología	Perú
Ida Micaela Bartolini Martínez	SENASA	Responsable del laboratorio de Biología Molecular	Perú
Mcneil Danilo Farfán Menéndez	SENASA	Especialista de Laboratorio de micología	Perú
Camilo Beltrán	SGCAN	Funcionario Internacional en Sanidad Vegetal	Colombia
Ramón Canízares	SGCAN	Funcionario Internacional en Sanidad Vegetal	Bolivia

## 2. Introducción

### 2.1. Banano, contexto histórico

*Texto adaptado al español del documento Panama disease in banana: spread, screens and genes por García-Bastidas (2019)*

Etimológicamente, la palabra banano probablemente se originó cuando los soldados de Medio Oriente introdujeron la fruta en África alrededor del 650 a.C. Los soldados llamaron a la fruta “banan”, que es la variación árabe de la palabra “dedo” (Koeppel 2008). Se afirma también que la palabra banana se pudo haber originado de la palabra wolof de África occidental “banaana”, que luego se incorporó al inglés a través de viajeros españoles o portugueses.

Aunque la fruta eventualmente fue introducida en el mundo occidental a partir de plantaciones indias por soldados bajo el mando de Alejandro Magno (327 a. C.), la evidencia preliminar sugiere que los habitantes de Papúa Nueva Guinea ya cultivaban bananas silvestres 5.000 años antes de Cristo (Price 1995, Denham *et al.* 2003). Alrededor de los años 1500, los bananos fueron llevados al Caribe y se extendieron rápidamente por todo el mundo. Fueron cultivados comercialmente y exportados en un progreso imparable.

Finalmente, el banano ganó una atención significativa en el siglo XX, cuando se convirtió en uno de los frutos más comercializados (Koeppel 2008). Desde un punto de vista botánico, los bananos son hierbas gigantes y no árboles, comúnmente de hasta 3 m de altura, sin tallo. Son hierbas monocotiledóneas perennes del orden Zingiberales, un grupo hermano de las Poales, que también incluye los cereales y los cuales poseen pseudotallos formados por las vainas de las hojas que se superponen fuertemente.

Por lo tanto, no tienen lignificación o el engrosamiento secundario como en los tallos, lo cual es característico de las verdaderas especies de árboles (Tomlinson *et al.* 1969). Carl Linneo desarrolló el género taxonómico *Musa*, que comprende toda la diversidad del banano. Asignó el nombre binomial latino *Musa sapientum* a los tipos de bananos dulces (Ej: Cavendish, Gros Michel) y *Musa para-*

*disiaca* (1753) a los plátanos (Bananos de cocina) (Cheesman 1948). Sin que Linneo lo supiera, los plátanos y bananos que había descrito eran, de hecho, híbridos y no dos especies distintas. Sin embargo, los nombres binomiales latinos actualmente están estrictamente designados para parientes silvestres, de los cuales más de 180 han sido clasificados hasta la fecha (Lescot 2017). Los bananos (incluyendo plátanos) pertenecen a la familia *Musaceae*, que además del género del este asiático *Musa* también incluye el género asiático y africano *Ensete* y el género asiático genéticamente próximo *Musella* (Perrier, 2011).

Linneo no fue el único que luchó con la clasificación del banano. Esta tarea siempre ha sido compleja y también desafía a los botánicos y mejoradores contemporáneos. En las últimas décadas, la clasificación del banano ha experimentado una nueva nomenclatura, teniendo en cuenta los aspectos genéticos y genómicos del banano. Hoy en día, el género *Musa* se divide en cuatro (o cinco) secciones: *Eumusa* y *Rhodoclamys* con un número base de 11 cromosomas y *Australimusa* y *Callimusa* con típicamente 10 cromosomas. La mayoría de los bananos comestibles está incluida en la sección *Eumusa section* (Dolezel and Bartoš 2005). El fallecido botánico finlandés Markku Häkkinen propuso recientemente una simplificación del género *Musa* simplemente dejando las secciones *Callimusa* y *Musa* (Häkkinen 2013). Los híbridos cultivados también se clasifican en grupos y subgrupos de acuerdo con la contribución del genoma relativo de sus parientes silvestres ancestrales. Esta clasificación propuesta por Simmonds and Shepherd (1955) es actualmente el sistema más común para clasificar bananos comestibles, también permite la clasificación de bananos tetraploides, que han sido esencialmente desarrollados por mejoradores en diferentes partes del mundo.

### 2.2. Banano: de plantas silvestres a cultivares comestibles

Dentro de las musáceas cultivadas, hay cuatro genomas conocidos representados por las letras A, B, S y T correspondientes a las especies silvestres de

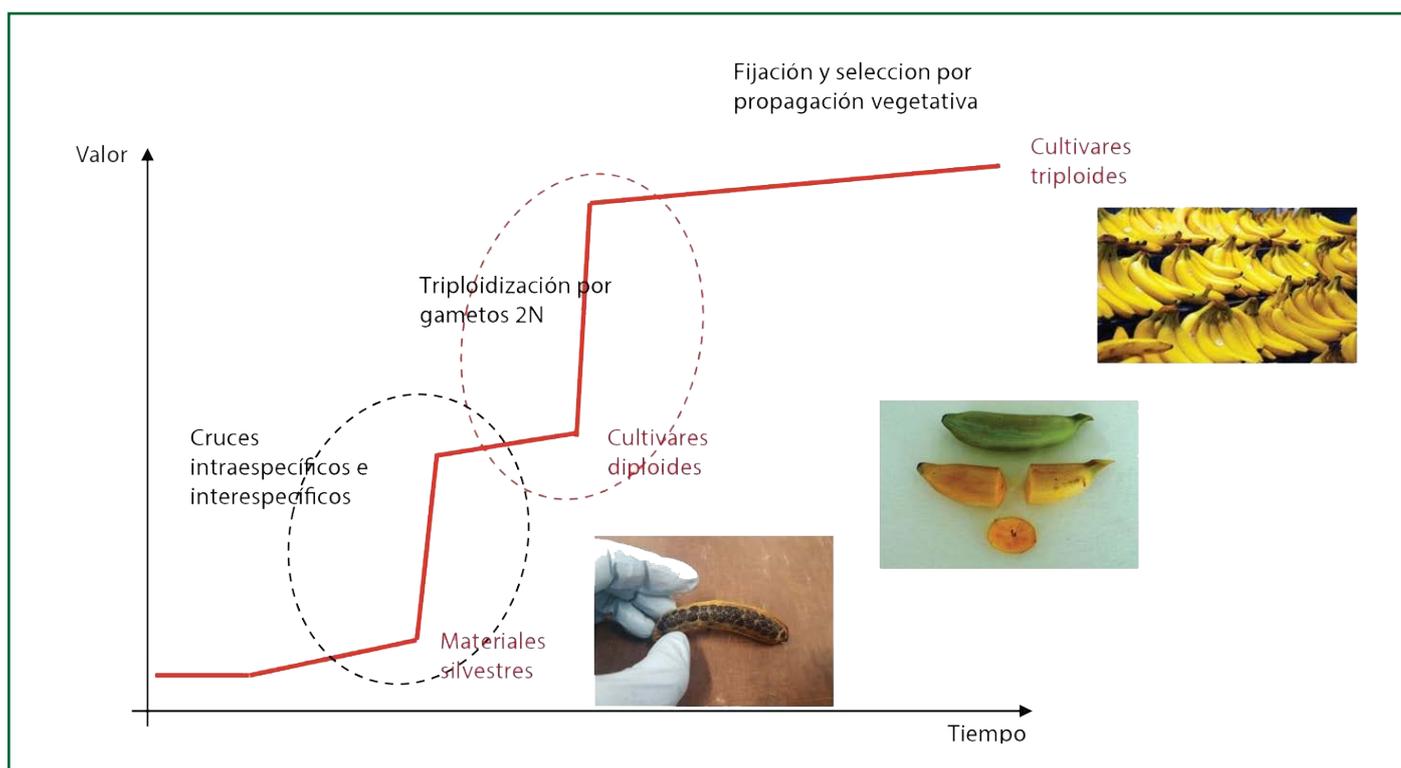
la sección Eumusa (ahora *Musa*): *Musa acuminata*, *M. balbisiana*, *M. schizocarpa* y *M. australimusa*, respectivamente (D'Hont *et al.* 2000). Casi todos los bananos y plátanos comestibles pertenecen al género *Musa* y son híbridos domesticados por el hombre, que se originan a partir de cruces naturales y espontáneos inter e intraespecíficos de los dos ancestros diploides, *M. acuminata* (genoma-AA) y *M. balbisiana* (genoma-BB). El sudeste asiático generalmente se considera el principal centro de origen del banano, particularmente Malasia e Indonesia.

Sin embargo, el subcontinente de la India y África, específicamente para las bananas de las tierras altas de África Oriental (de las siglas en inglés: EAHB East African Highland Bananas), se han considerado como centros secundarios de diversificación (Price 1995, Perrier *et al.* 2011). El proceso de domesticación del banano comenzó hace unos 7.000 años en el sudeste asiático (D'Hont *et al.* 2012). En términos generales, este proceso ocurrió por múltiples hibridaciones espontáneas entre varias especies y subespecies. La domesticación involucró el aborto espontáneo de semillas y la selección de varios di-

ploides y triploides junto con partenocarpia, lo que permitió la propagación vegetativa para una mayor distribución (D'Hont *et al.* 2012) **(Ver Figura 1)**.

Recientemente, estudios multidisciplinarios han revelado nuevas pistas sobre la compleja ruta de la domesticación del banano y las configuraciones geomorfológicas que dieron como resultado la gama contemporánea de cultivares (Perrier *et al.* 2011). En resumen, la domesticación proporcionó a la humanidad un conjunto de germoplasma comestible con combinaciones de genomas AA, BB, AB, AAA, AAB y ABB, que pertenecen a la familia taxonómica de las Musáceas y están disponibles en muchos lugares (Simmonds 1962, D'Hont *et al.* 2000).

Hoy en día, cientos de genotipos comestibles se han identificado con potencial para ser cultivados en todo el mundo. Además, 180 parientes silvestres y al menos 50 tetraploides han sido desarrollados vía mejoramiento genético y están disponibles en colecciones vivas o como muestras criopreservadas en bancos de germoplasma (Lescot 2017) como el Centro Internacional de Tránsito de Bioersity International en Lovaina, Bélgica. Sin embargo, solo una fracción de la diversidad global está disponible



**Figura 1.** Representación de la evolución y domesticación del banano (Adaptado de Bakry and Horry (2014))

en estos repositorios y, asimismo, solo una fracción limitada se consume globalmente según el gusto y las preferencias de cocción (por ejemplo, Cavendish, Gros Michel, Prata, plátanos, etc.)

### 2.3. Cultivo e importancia

Los bananos y plátanos representan el cultivo para alimentación más importante después del arroz, el trigo y el maíz (Bakry *et al.* 2009, Churchill 2011). También son una fuente importante de ingresos en casi 135 países productores. El banano es un cultivo mundial de fruta, cuya producción para el año 2017 se estimó en 125.3 millones de toneladas, mientras que la producción de plátanos y otros similares se estimó en 35.2 millones para el mismo año (FAOSTAT, 2019). Lo anterior indica que los bananos y plátanos, representan uno de los productos más importantes para la seguridad alimentaria y la generación de ingresos.

En Europa y Estados Unidos, los plátanos se conocen principalmente como fruta o merienda (por ejemplo, Cavendish cultivados a nivel mundial se venden en todos los supermercados). Sin embargo, los bananos y plátanos son versátiles y también se pueden cocinar, asar, freír o incluso emplear como materia prima para la producción de bebidas alcohólicas (Perrier, 2011). Por lo tanto, su producción se considera una de las mayores oportunidades de desarrollo para varias economías basadas en la agricultura con un valor estimado de US \$ 35,2 mil millones en áreas tropicales, donde se produce más del 80% de fruta para el consumo local (Churchill 2011). En contraste con la extensa diversidad genética del banano descrita anteriormente, la producción mundial se basa en unos pocos clones que pertenecen esencialmente a tres grupos genéticos y diferenciados ligeramente entre sí, debido a las variaciones somaclonales (Bakry and Horry 2014).

De hecho, de la gran diversidad, solo unos pocos triploides (AAA, AAB, ABB) son responsables de casi el 75% de la producción mundial de banano, que corresponden a los cultivares Cavendish (~ 20 cultivares; 46%), plátanos (~ 120 cultivares; 15%) y los EAHB en África Oriental (~ 150 cultivares; 39%) (Lescot 2017). Claramente, el dominio de los cultivares Cavendish producidos en monocultivos globales deja a las plantaciones extremadamente vul-

nerables a los brotes de enfermedades. Como en cualquier otro cultivo, la diversidad de organismos nocivos que evolucionan conjuntamente con los bananos es enorme. Estos incluyen hongos, virus, bacterias, nematodos e insectos plaga (Wardlaw 1961, Thurston and Pennycook 1997, Jones 1999, Ploetz 2005). Actualmente las principales enfermedades fúngicas del banano son: la Sigatoka amarilla y negra, distribuidas a nivel mundial y son causadas por *Pseudocercospora musae* y *P. fijiensis* (Morelet, *sine die*), respectivamente, y el marchitamiento por *Fusarium*, también conocido como Enfermedad de Panamá o Mal de Panamá, que es causada por una variedad de especies del género *Fusarium* spp. (Maryani *et al.* 2018) el cual amenaza la producción global de banano (Butler 2013).

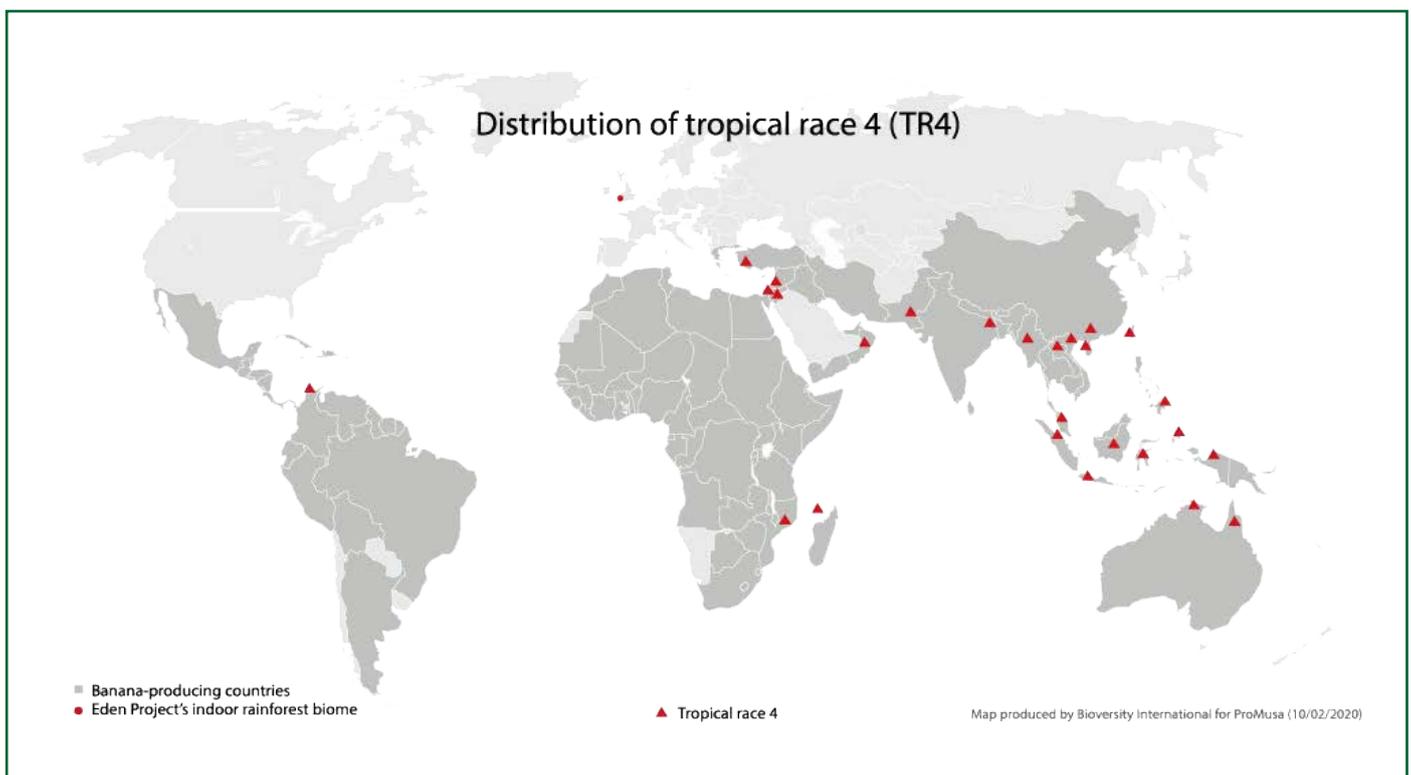
### 2.4. Marchitamiento por *Fusarium* (Mal de Panamá) la pesadilla de la industria bananera

Al no existir opciones de control, la Enfermedad de Panamá se considera la más importante en el sistema productivo del banano, con especial atención en regiones de Latinoamérica y el Caribe (LAC) (Ploetz 2000, Ploetz *et al.* 2015). Es extremadamente destructiva y, en el siglo pasado, causó una epidemia que devastó la industria bananera basada en "Gros Michel-AAA". La enfermedad fue reportada inicialmente en Australia en alrededor de 1870, pero se presume se originó en el sudeste asiático en donde co-evolucionó con el banano. (Bancroft 1876, Maryani *et al.* 2018). El mencionado brote de la enfermedad de Panamá en Gros Michel se asocia a la raza 1 del patógeno (Stover 1962, Ploetz 2006), que a la fecha se encuentra distribuido a nivel mundial destruyendo miles de hectáreas de banano en países tropicales y subtropicales.

Tal situación obligó a la industria bananera a desplegar cultivares resistentes del subgrupo Cavendish (AAA), lo que les permitió a los bananeros continuar plantando en suelos infestados con la raza 1. Sin embargo, la destructiva raza 4 tropical (R4T), clasificada recientemente como *Fusarium odoratissimum* (Maryani *et al.* 2018), surgió en el sudeste asiático, amenazando a los bananos Cavendish y muchas otras variedades locales, en dicho lugar (Ploetz 1994). Actualmente, esta especie es la prin-

principal amenaza para la producción global de banano, ya que se ha extendido a otras regiones fuera del sudeste asiático, incluso a países en el medio este, el subcontinente de la India, África en donde es un alimento de la dieta básica (Ordóñez *et al.* 2015), al igual que en Colombia en donde ha sido recientemente reportado (Ver Figura 2) y la cual es una región de primordial importancia para la industria mundial de exportaciones.

tado una decoloración marrón rojiza de los rizomas y los vasos vasculares presentes en el pseudotallo (Li *et al.* 2012, Pegg *et al.* 2019). Externamente, las plantas exhiben marchitez progresiva con hojas cloróticas de color amarillo brillante que eventualmente colapsan alrededor del pseudotallo junto con un ocasional agrietamiento del pseudotallo (Ploetz 2006) (Ver Figura 3).



**Figura 2.** Distribución de *Fusarium* Raza 4 Tropical, Actualizado a junio de 2020. (Imagen cortesía: Promusa.com)

Sobre los medios de dispersión, se sabe que el material vegetal infectado, el agua contaminada y las herramientas y/o maquinaria con suelo infestado son las principales vías para movilizar el patógeno, particularmente en regiones de grandes monocultivos (Stover 1962, Stover and Ploetz 1990). La infección de una planta comienza con hifas fúngicas que ingresan a las raíces de una planta de banano

La posterior colonización en plantas susceptibles eventualmente causa la oclusión de los vasos del xilema, lo que también se debe a la formación de geles y tíloides por parte de la planta para restringir la expansión del hongo y el colapso celular (Ghag *et al.* 2015, Pegg *et al.* 2019). Esto da como resul-

Las plantas infectadas a menudo mueren antes de producir racimos, por lo tanto, la enfermedad reduce significativamente los rendimientos en los campos afectados (Stover and Ploetz 1990, Dita *et al.* 2010). Adicionalmente, el patógeno produce persistentes clamidosporas que contaminan los suelos durante largos periodos de tiempo (Schippers and Van Eck 1981, Buddenhagen 2009). Se ha reportado supervivencia incluso en ausencia de banano y especies de malezas no hospedantes (Hennessy *et al.* 2005).

Hasta la fecha, no existen cultivares globalmente aceptados que puedan reemplazar a los clones del subgrupo Cavendish y las alternativas para el manejo de la enfermedad son limitadas.

En general, las opciones de control químico y físico no están disponibles y por lo tanto, los esfuerzos se han centrado en las estrategias de control cultural y de exclusión y cuarentena (Ploetz 2015).

Adicionalmente, cabe mencionar que esta enfermedad no solo amenaza la producción mundial basa-

da en Cavendish, sino que también amenaza una gran variedad de cultivares locales destinados a los mercados domésticos, reduciendo así la seguridad alimentaria de los productores económicamente vulnerables (Ploetz *et al.* 2015, Zheng *et al.* 2018, García-Bastidas 2019).



**Figura 3.** Síntomas externos e internos de la enfermedad de la Marchitez por *Fusarium* (Mal de Panamá) causado por *Fusarium* spp. (A) Síntomas externos con un extenso amarillamiento foliar, así como también el colapso de las hojas alrededor del pseudotallo y agrietamiento del pseudotallo; (B-C) síntomas internos mostrando el enrojecimiento de los haces vasculares en el pseudotallo y el cormo (Fotos: García-Bastidas)



### 3. El patógeno y el hospedante

Agronómica y económicamente, *Fusarium* es uno de los géneros de hongos más importantes (Ploetz 2005). Recientemente ocupó el quinto lugar en un listado de los principales patógenos de plantas en función de su importancia científica/económica (Ploetz 2005, Dean *et al.* 2012). En este taxón, *Fusarium oxysporum* es un complejo de especies, que incluye tanto especies no patógenas como patógenos de plantas que causan marchitez vascular, pudriciones de raíces en cientos de plantas hospedantes (Domsch *et al.* 1980, Gerlach and Nirenberg 1982, Nelson and Toussoun, Meldrum *et al.* 2012). Hasta ahora, se han descrito más de 150 formas específicas a huésped de *F. oxysporum* conocidas como *formae speciales* (ff. spp.) (Baayen *et al.* 2000, Hawksworth 2001) y cada *forma specialis* (f. sp.) tiene la capacidad infectar una especie de planta huésped única (Kistler 1997, Baayen *et al.* 2000, Meldrum *et al.* 2012).

Inicialmente, se suponía que los miembros de una *forma specialis* particular estaban relacionados entre sí y habrían surgido de un antepasado común (Kistler *et al.* 2001). Dicha hipótesis fue reconsiderada con base en los últimos datos de la secuencia de ADN que sugieren un origen polifilético del género *Fusarium* (O'Donnell *et al.* 1998, Ploetz 2005, Lievens *et al.* 2009). Esto incluye el previamente reconocido *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) que infecta el banano y que comprende una variedad de genotipos distantes, como son los llamados grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) (Ordóñez *et al.*, 2015).

Sin embargo, recientemente, Maryani *et al.* (2018) ha tomado en consideración esta situación y ha revisado la nomenclatura de todas las especies de *Fusarium* que infectan el banano. Llegando a la conclusión de que la especie asociada al VCG1213 y agente causal de la epidemia actual, pertenece a una especie distinta. Esta situación ha llevado a una nueva clasificación taxonómica para raza 4 tropical, así como también para otras especies asociadas a las razas 1 y 2.

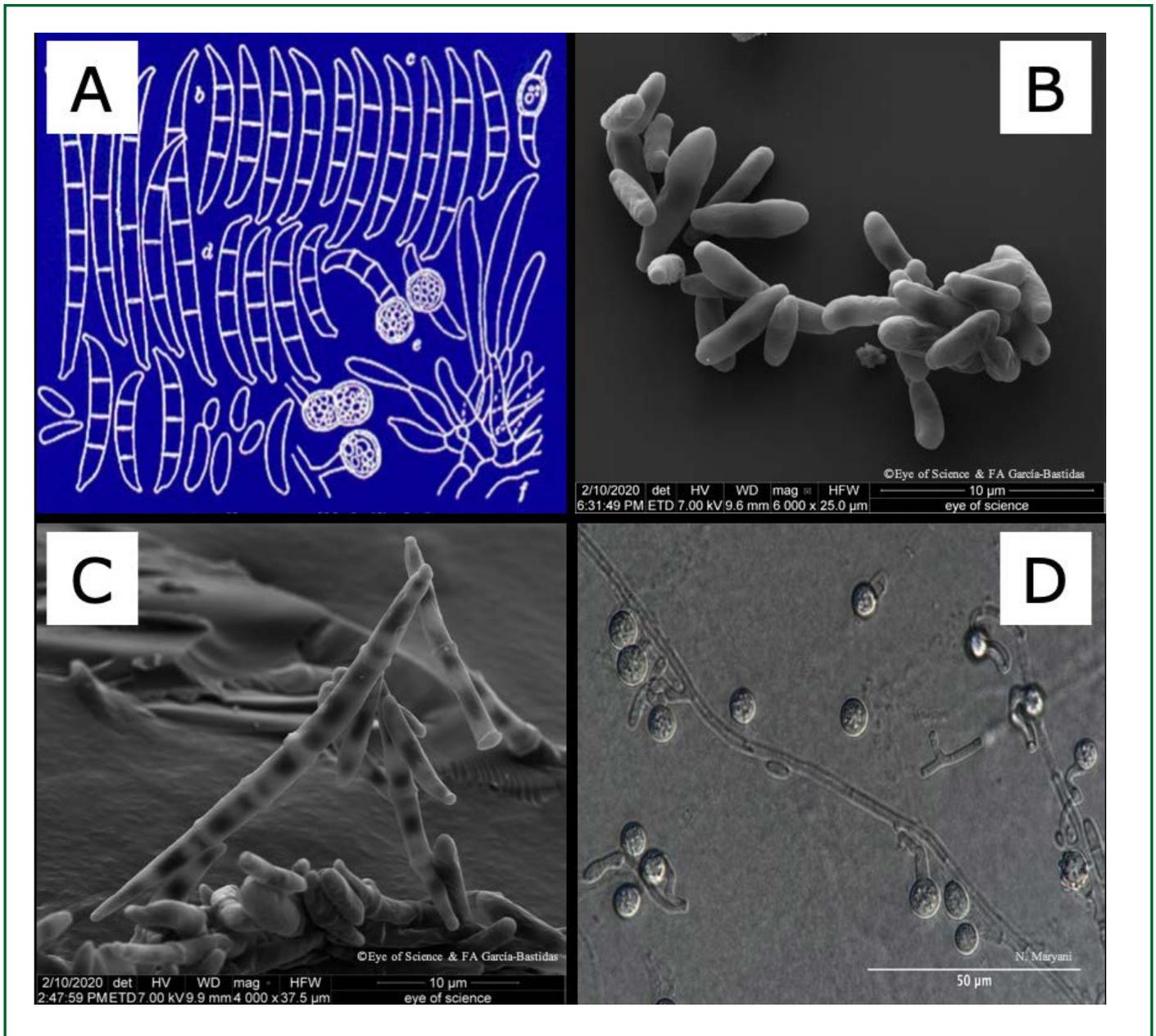
Tradicionalmente, los taxónomos utilizaban bases morfológicas incluyendo la forma de los macroconidios como una base importante para la clasificación de las diversas especies y ff. spp. (Ver Figura 4), pero esto se hizo cada vez más difícil porque los conidios son en su mayoría indistinguibles (Domsch

*et al.* 1980, Gerlach and Nirenberg 1982, Nelson y Toussoun 1983). Aunque nunca se ha observado que los teleomorfos de *Fusarium* spp. afecten el banano, la presencia del *loci* de tipo de apareamiento (*Mat*) sugiere el potencial de reproducción sexual (Booth 1971, Koenig *et al.* 1997). Hasta el momento, se supone que estas especies se reproducen exclusivamente de manera clonal, aunque la fusión somática y la formación de heterocarión podrían dar lugar a la recombinación parasexual y, por lo tanto, a la diversificación (Taylor *et al.* 1999).

La capacidad de las cepas de Foc previamente reconocidas para formar heterocariontes permitió el fenotipado de los VCG (Puhalla 1985, Correll 1991, Ploetz y Pegg 2000). En general, las poblaciones de Foc muestran un gran desequilibrio gamético, lo cual es indicativo de asociación no aleatoria de alelos y, por lo tanto, de ausencia de sexo (Puhalla 1985, Kistler 1997, Koenig *et al.* 1997). Recientes estudios genéticos y moleculares revelaron la relación evolutiva entre diferentes linajes clonales de Foc, lo que resultó en la identificación de 24 VCG (Meldrum *et al.* 2012), con la mayor diversidad en Asia. Esto no es sorprendente, ya que este es el centro de diversidad del banano y, por lo tanto, también de las especies de *Fusarium* spp. asociadas a las musáceas (Maryani *et al.* 2018). En cualquier caso, los aislados de R4T solo están presentes en la nueva especie recientemente identificada como *F. odoratissimum* y están representados por el único VCG1213/16, mientras que otras razas fisiológicas están presentes en varios otros genotipos que actualmente se reconocen como nuevas especies de *Fusarium* (Brake *et al.* 1990, Ploetz 1990, Moore *et al.* 1993, Bentley *et al.* 1998, Meldrum *et al.* 2012).

Desde mediados de la década de 1990, la nomenclatura con base en razas se define por la patogenicidad en algunas accesiones de bananos y plátanos y hasta el momento ha dado como resultado la definición de cuatro razas (Ver Tabla 1) (Stover 1962, Persley y De Langhe 1987). La raza 1 es patógena en el cv. 'Gros Michel' (AAA), así como en el llamado banano 'seda/silk' (AAB), 'Pisang awak' (ABB), 'Abaca' (AA), 'Maqueño' (AAB) y 'Pome' (AAB). La raza 2 es compatible con los genotipos del grupo Bluggoe (ABB), algunos genotipos tetraploides y Ensete (Waite and Stover 1960).

Waite (1963) identificó cepas de *Fusarium oxys-*



**Figura 4.** (A) El clásico dibujo de la monografía: “Die Fusarien” de Wollenweber y Reinking (Wollenweber and Reinking, 1935) que muestra los caracteres morfológicos de los propágulos del hongo de la enfermedad de Panamá conocido hasta ahora como *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (B) micro (C) macro conidias, (D) clamidosporas.

*porum* que afectaron a varias especies de *Heliconia* spp. en las Américas, lo que sugirió la presencia de la raza 3. Desafortunadamente, el material original no se mantiene y, por lo tanto, no se puede verificar. Debido al hecho de que la raza 3 no afecta musáceas, ya no se considera parte del esquema de *Fusarium* spp. que afecta al banano, pero podría considerarse como *F. oxysporum* f. sp. *heliconiae* (Moore *et al.* 2001, Ploetz 2006).

Antes de 1990, los aislamientos clasificados como raza 4 solo causaban graves pérdidas de rendimiento en los genotipos Cavendish en las áreas subtropicales de Australia, las Islas Canarias y Taiwán, particularmente durante un estrés abiótico. Sin embargo, la esperanza de que el hongo no afectara regularmente a los genotipos tipo Cavendish se hizo añicos a principios de la década de 1990 (Ploetz 2005), cuando la incidencia y la gravedad de la enfermedad aumentaron independientemente del estrés abiótico y dieron como resultado una pérdida de rendimiento imprevista en las plantaciones comerciales de Cavendish en el sur de Asia oriental, particularmente en Taiwán (Ploetz 2000, Ploetz 2005, Ploetz 2006). Finalmente, se identificó como el agente causal una nueva raza que se llamó raza

4 tropical (R4T), mientras que la variante más leve que causó la enfermedad en los subtropicales después del estrés abiótico se llamó raza 4 subtropical (R4ST). R4T es extremadamente virulento en el germoplasma de banano en ambientes tropicales y subtropicales, incluidas muchas variedades locales de banano y plátano (Ordóñez *et al.* 2015, Maryani 2018, García-Bastidas 2019).

Actualmente, el concepto de raza es discutible y ambiguo. Sin lugar a dudas, el pequeño conjunto de germoplasma, así como las condiciones de campo variables son, en términos generales, inadecuados para clasificar y describir con precisión la variación patogénica y no refleja la variación genética en *Fusarium* spp. afectando Musaceas. Por ejemplo, Ploetz (2005) menciona aislamientos provenientes del este de África y el sudeste asiático que afectan a “Gros Michel” y Bluggoe, pero no clones del subgrupo Cavendish. Adicionalmente, los VCGs 0124 y 0121 han sido reportados afectando plantaciones de Cavendish, lo que sugiere una diversidad patogénica mucho mayor (Daniells *et al.* 2009, Fourie *et al.* 2009, Thangavelu and Mustaffa 2010, Fourie *et al.* 2011).

**Tabla 1.** Respuesta de clones del germoplasma de banano, plátano y *Heliconia* spp. a las razas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. hasta ahora identificadas. Adaptado de (Orjeda 1998)

Cultivar	Respuesta a Foc				
	Cultivar/accesión	ITC <sup>1</sup> code	Raza 1	Raza 2	Raza 3
Gros Michel (AAA)	ITC1122	S	R	R	S
Bluggoe <sup>3</sup> (ABB)	ITC0643	R	S	R	ND
Cavendish <sup>4</sup> (AAA)	ITC0365	R	R	R	S
<i>Heliconia</i> spp.	NA	R	R	S	ND

<sup>1</sup> International Transit Center, Bioversity International, <sup>2</sup> Raza 4 se subdivide en Raza 4 Tropical (R4T) y Raza 4 Subtropical. <sup>3</sup>Bluggoe ‘Cachaco’; <sup>4</sup>Cavendish cv ‘Williams’ or ‘Grand Naine’, S: Susceptible, R: Resistente, ND: No definido



## 4. Diagnóstico *Fusarium* asociado a la Raza 4 Tropical VCG 1213-16

Como se mencionó con brevedad anteriormente, varios estudios han mostrado que las razas asociadas a las especies responsables de la enfermedad del Mal de Panamá no están genéticamente relacionadas y que aparentemente no comparten un ancestro común (O'Donnell *et al.* 1998, Fourie *et al.* 2009, Fourie *et al.* 2011, Ordoñez *et al.* 2018). De hecho, actualmente es aceptado que Foc está compuesto de varios linajes independientes con una estructura clonal (Ordoñez *et al.*, 2015, Maryani *et al.*, 2018). La diversidad de *Fusarium* se ha distribuido en grupos de compatibilidad vegetativa (24 VCGs descritos hasta el momento). Dentro de estos, el VCG 1213/16 agrupa los aislados asociados a R4T. Actualmente, aislados de esta cepa han sido descritos en varios países (Thangavelu and Mustafa 2010, Butler 2013, García-Bastidas *et al.* 2014, Ordoñez *et al.* 2015, Chittarath *et al.* 2017, Hung *et al.* 2017, Maymon *et al.* 2018, Zheng *et al.* 2018, García-Bastidas *et al.* 2019, Ozarslandan and Akgül 2019, Maymon *et al.* 2020) y de hecho desde la primera aparición en Jordania, fuera del área correspondiente al sudeste asiático en 2013 (García-Bastidas *et al.*, 2014), el número de nuevas incursiones ha pasado de seis a más de veinte y actualmente se ha reportado en todos los continentes (García-Bastidas 2019).

Una de las principales razones de la rápida distribución del hongo podría obedecer a que el hongo pasó inadvertido, pero también al hecho de que los síntomas externos no se revelan ya que la raza 1 es omnipresente, y R4T podría haber saltado en plantas infectadas de la raza 1 y ser indetectable hasta el momento en que las plantas de *Cavendish* empezaron a mostrar síntomas. Por este motivo, cualquier marchitamiento sospechoso en cultivares del grupo Cavendish debe ser propia y prioritariamente atendido. Esto debe ir acompañado por medidas de contención y un muestreo adecuado para la rápida identificación del agente causal evitando así su posible diseminación hacia otras áreas. Tradicionalmente el diagnóstico de R4T se ha basado en la observación de síntomas en el campo (externa e internamente) en plantas susceptibles actualmente existen herramientas que contribuyen a esto, seguido por un análisis de VCG y el uso de técnicas moleculares basadas principalmente en PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Sin embargo, estos

métodos son propensos a falsos positivos o falsos negativos; y, en el caso de los VCGs, su evaluación puede causar retrasos significativos en la entrega de resultados, cuando el número de muestras es considerable.

### 4.1. Observación en campo

Es muy importante que los técnicos y personal a cargo de las fincas, así como también los trabajadores cuenten con entrenamiento avanzado en la identificación de síntomas en campo para de esta manera contribuir a la identificación de posibles casos sospechosos. Actualmente existen herramientas que facilitan una mayor precisión a la hora de identificar posibles brotes, como es el caso del uso del internet para referenciar y comparar síntomas así como la rápida comunicación entre diferentes puntos de la finca, el uso de drones e incluso aplicaciones basadas en inteligencia artificial (IA) que contribuyen al monitoreo rápido de posibles problemas asociados a factores bióticos en campo incluyendo problemas asociados al marchitamiento por *Fusarium* (Selvaraj *et al.* 2019). Estas herramientas son muy útiles para ayudar al personal de la finca a identificar riesgos potenciales. Sin embargo, si bien es cierto que el diagnóstico empieza en el campo, es bien sabido que los síntomas asociados al marchitamiento por *Fusarium* son muy comunes y similares a los ocasionados por agentes tanto bióticos y abióticos. Incluso entre cultivares y grupos genéticos (ej: AAA, AAB, ABB) las diferentes razas del patógeno causan síntomas similares y una raza 4 tropical podría ser mal interpretado si es observado en un genotipo distinto a Cavendish. Por tal motivo, ninguna herramienta visual reemplaza una prueba basada en ADN. Dichas herramientas nunca deben ser consideradas como una prueba de diagnóstico final.

### 4.2. Métodos de prediagnóstico

Considerando que la estrategia de exclusión es la mejor opción para los países libres de R4T, y, ante la falta de medidas efectivas de manejo del patógeno, el diagnóstico temprano y confiable es crucial. El diagnóstico debe ser adecuado para la evalua-

ción no solo de tejido vegetal sospechoso sino también para la evaluación de suelo/agua que podrían contener propágulos del hongo. Es esencial verificar todo tipo de material que pudiese contener suelo especialmente adherido a calzado de visitantes o incluso contenedores, maquinaria y herramientas. Durante la última década, varios métodos basados en ADN han sido desarrollados y probados para la detección de especies de *Fusarium* spp. asociadas a la enfermedad. La mayoría se han enfocado en la rápida identificación de la raza 4, incluyendo VCGs asociados a la razas tropical y subtropical (Lin *et al.*, 2009, Dita *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2013b, Lin *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2013, Peng *et al.*, 2014, Yang *et al.*, 2015, Lin *et al.*, 2016). De este grupo, los más utilizados son los primers conocidos como W2987 F W 2987 R reportados por Li *et al.* (2013b), los cuales codifican una proteína hipotética que permite la discriminación de algunos genotipos asociados a Foc. Así mismo, han sido los primers reportados por Dita *et al.* (2010) conocidos como Foc R4T F y R4T R, que tienen como blanco la región IGS (*del inglés: Intergenic Spacer (IGS) and Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal operon*).

Aguiar *et al.* (2017) reportaron el desarrollo de una prueba en PCR en tiempo real para detectar los VCGs 01213/16 y 0121, basada en un gen putativo de virulencia descrito previamente por (Lin *et al.* 2013). La prueba fue optimizada para detectar el hongo en material vegetal evaluando parámetros de reproducibilidad y especificidad lo cual la hace una

prueba útil para la identificación rápida del hongo.

Las metodologías mencionadas anteriormente han sido incluidas como parte inicial de un prediagnóstico en plantas presintomáticas y sintomáticas y han sido consideradas como parte del diagnóstico en un gran número de reportes y artículos científicos, incluyendo las más recientes incursiones de la Raza 4 Tropical (Chittarath *et al.*, 2018, Garcia-bastidas *et al.*, 2014, Hung *et al.*, 2018, Ordoñez *et al.*, 2016, Zheng *et al.*, 2018). Sin embargo, el buen uso de estas metodologías depende de la habilidad y precisión de los individuos que realizan el diagnóstico, que es fundamental para prevenir falsos positivos o lo que es peor, falsos negativos.

Adicionalmente, un kit comercial desarrollado por *Clear Detections, Netherlands*, ha sido desarrollado a partir de los primers reportados por Dita *et al.*, (2010), destacándose que los fabricantes reportaron una modificación para brindar una mayor especificidad de los primers.

Recientemente, Carvahais *et al.* (2019) presentaron ensayos de diagnóstico basados en PCR convencional, apuntados hacia blancos presentes en los genes *SIX* (*del inglés: Secreted in Xilem*). De acuerdo con los autores, los primers presentados en este trabajo amplifican regiones específicas en los genes *SIX6* en especies de *Fusarium* spp. asociados a raza 1, *SIX1* en R4T y *SIX8* en raza 4 subtropical, *SIX9/10* para el VCG 0121, y *SIX13* para el VCG 0122. Este diagnóstico propone el uso de la técnica

**Table 1**

Primer sequences designed in this study based on *SIX* gene sequences generated in Cziolowski *et al.*, (2017).

Race	VCG	Targeted <i>SIX</i> gene	Primer name	Sequence (5' → 3')	Primer annealing position within gene	Product length (bp)	Anneal. temperature (°C)	Restriction digestion	Restriction enzyme recognition site
All Foc	All	<i>SIX9a</i>	<i>SIX9_Foc_F</i> <i>SIX9_Foc_R</i>	ATCGCTGAAGCCCAAGAA TTCTGTCCGTGATCGTTCC	46–65291–305	260	58	No	N/A
R1	0123, 01210, 01217, 01218, 0124, 0124-5, 0124-22, 0125, 0128, 01220	<i>SIX9b</i>	<i>SIX9b_210_F</i> <i>SIX9b_210_R</i>	ACGCTCCCAATACCGTCTGT AAGTTGGTAGTATCAATGC	181–201371–390	210	55	No	N/A
TR4	01213/16	<i>SIX7a</i>	<i>SIX1a_266_F</i> <i>SIX1a_266_R</i>	GTGACCAGAACTTGCCACA CTTTGATAAGCACCATCAA	442–461689–707	266	55	HpyAV	124 bp/142 bp CCITTC(5)6
STR4	0120, 0120-15, 0129, 01211, 01215-0126*	<i>SIX8b</i>	<i>SIX8b_206_F</i> <i>SIX8b_206_R</i>	GCCTGCATAACAGGTGCGGGT TTCTCACCTCACCCGGCAGGATTC	267–287448–472	206	62	No	N/A
R4#	0121	<i>SIX7a</i>	<i>SIX10a_309_F</i> <i>SIX10a_309_R</i>	CCACTGGCACCAAGACTTG CGATGGGGTACTGGTTGA	62–81351–370	309	58	No	N/A
R4#	0122	<i>SIX7c</i>	<i>SIX13c_343_F</i> <i>SIX13c_343_R</i>	CAGCCTCCTAGCGTCGAAAA CCGTGATGGGGTACGTTGTA	91–110414–433	343	57	Eag102	124 bp/241 bp CGGCCG

*Nucleobases in the primer sequences represented in bold correspond to polymorphic sites in the target gene homolog. 'N/A' stands for not applicable.*

*\*The race of VCG 0126 is arguable as isolates are phenotypically and genetically similar to race 4 (e.g., ability to synthesize odorous aldehydes on media) (Draze *et al.*, 1991; Dals *et al.*, 2017). However, there is limited evidence to suggest that VCG 0126 is capable of infecting Cavendish and is therefore often considered race 1 based on its host range (Zhang, 2014).*

*\*The classification of VCGs 0121 and 0122 as tropical or subtropical race 4 is arguable. Isolates of these VCGs are not as aggressive as those of VCG 01213/16 on Cavendish banana, which suggests that predisposing conditions may need to be in place for symptoms to be expressed. We thus opted for classifying these VCGs as R4, abstain from giving a further sub-classification and point out here that this is a matter of debate which needs further clarification.*

**Figura 5.** Secuencia de los primers propuestos por Carvahais *et al.* (2019)



**Figure 2.** Unique TR4 sequence (SeqA) showing the location of developed LAMP TR4 primers: F3, B3, FIP (F1c-F2), BIP (B1c-B2), Loop F and B. The arrows indicate the 5' to 3' direction of extension.

**Figura 6.** Secuencia única (SeqA) indicando la localización de los primers desarrollados. Las flechas indican la dirección de extensión 5' - 3'.

con primers individuales o incluso en multiplex. Sin embargo, en el caso de *SIX1* y *SIX3*, procesos de restricción enzimáticos son requeridos (Ver sección de protocolos), (Ver Figura 5).

### 4.3. LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle

Ordóñez *et al.* (2019) exploraron la tecnología DArTseq (del inglés: *Diversity Arrays Technology Sequencing*) para identificar marcadores únicos presentes en aislados del genotipo R4T. DArTSeq es una tecnología de genotipado aplicada para realizar análisis de diversidad (Alves *et al.* 2014 Cruz *et al.* 2013). La tecnología incorpora secuenciación de alto rendimiento y se basa en polimorfismos para detectar cientos de *locis* genómicos que resultan en cientos de marcadores y SNPs (polimorfismo de un solo nucleótido). Para el desarrollo de estos primers se secuenciaron 27 genotipos los cuales comprenden los 24 VCGs previamente reportados y tres aislados de R4T. Las secuencias se utilizaron para diseñar primers tipo LAMP (del inglés: *Loop-Mediated Isothermal Amplification*), que ha sido definida como una técnica robusta y efectiva disponible para uso directo en campo.

La técnica LAMP utiliza de cuatro a seis primers que reconocen entre seis y ocho regiones blanco, lo cual proporciona mayor especificidad comparado con

otras técnicas (Notomi *et al.* 2015) (Ver Figura 6, ver detalles en la sección de protocolos). En adición, estos primers fueron diseñados en una región diferente a la IGS reportada por Dita *et al.*, (2010) y por (Li *et al.* 2013), siendo una prueba independiente adicional y/o complementaria a las pruebas de PCR para prediagnóstico más utilizadas.

La validación de esta técnica consistió en la evaluación satisfactoria de 22 aislados asociados a Raza 4 Tropical y 45 controles adicionales incluyendo aislados fúngicos y bacteriales. Los primers fueron evaluados igualmente en plantas infectadas, tanto en campo como en condiciones de invernadero. La tecnología LAMP parecería ser una técnica efectiva y robusta disponible para uso directo en campo.

Si bien todas estas técnicas son una gran herramienta, no son infalibles (Magdama *et al.* 2019) y están sujetas a mejoramientos a partir de nuevas tecnologías y del mayor conocimiento de la diversidad del hongo, por lo tanto deben ser consideradas únicamente para la fase de prediagnóstico y en caso de un resultado positivo, una confirmación de prioridad máxima debe ser acompañada de un proceso de diagnóstico completo, que incluye tres etapas: i) prediagnóstico molecular, ii) análisis de VCG o secuenciación completa de genoma (No fragmentos de amplificación) y, iii) pruebas de patogenicidad (pasos explicados en detalle en la sección de protocolos).



## 5. Protocolos

### 5.1. Protocolo para tomar muestras de tejido vegetal y suelo en campo

#### 5.1.1 Procedimiento para muestreo en plantas sintomáticas y/o asintomáticas

*Estandarizado por F.A. García-Bastidas, G. Nakasato, P. Robert y G.H.J. Kema (2014)*

El proceso de diagnóstico inicia con la inspección de síntomas externos de la planta y con la colección de la muestra en campo. Un resultado de diagnóstico adecuado dependerá en gran medida de los procesos de selección del tejido, embalaje y transporte de la muestra al laboratorio. Así mismo, los protocolos empleados para la toma de muestras incidirán directamente sobre los riesgos de propagación de los patógenos asociados a las mismas, es por esto que para el caso de enfermedades cuarentenarias y de fácil dispersión, como es el caso de R4T, el personal encargado de realizar esta labor deberá contar con el conocimiento y con los elementos necesarios para realizar adecuadamente el proceso de muestreo, aplicando los criterios técnicos y las medidas de bioseguridad pertinentes, que deben ser establecidas por la Organización Nacional de Protección Fitosanitaria (ONPF) correspondiente de acuerdo al estatus fitosanitario de cada país. A continuación, se describen las recomendaciones generales para realizar una toma adecuada de muestras.

**Nota:** el acceso para toma de muestras en áreas de producción con plantas bajo sospecha de R4T deberá seguir las recomendaciones establecidas por la ONPF de cada país. Los responsables deberán proveer calzado, indumentaria adecuada y en lo posible suministrar material nuevo para realizar el proceso de recolección.

#### Materiales:

- Botas y vestimenta adecuada para las personas que llevarán a cabo el muestreo.
- Cuchillo
- Guantes
- Desinfectantes (Amonio cuarentenario-Hipoclorito de sodio)
- Tijeras
- Bolsas o sobres de papel/tubos de plástico o

- cristal
- Marcadores
- Rotuladores
- Cinta adhesiva (50mm)
- Cámara fotográfica
- Bisturí
- Caja de poliestireno o similar para transportar muestras (en lo posible con gel refrigerante)
- Libreta de campo

#### Procedimiento:

Las muestras colectadas corresponderán a segmentos de pseudotallo. Idealmente se sugiere obtener muestras de donde se observen las hebras del tejido vascular con signos de la enfermedad (**Ver Figura 7**). Adicionalmente muestras de rizoma (Cormo) pueden ser colectadas de ser posible.

1. Identifique la planta que será sujeto de análisis y haga un registro fotográfico.
2. Siguiendo las recomendaciones de acceso hacia áreas sospechosas o infectadas proceda hacia la planta a través de la entrada única. Seleccione el área de corte en el pseudotallo, este debe estar a una altura de entre 50 a 60 cm a partir de la base del mismo.
3. Haciendo uso de guantes y con un cuchillo desinfectado, proceda a realizar una incisión en forma de cuadrado de aproximadamente 5 x 8 cm. Haga un corte profundo con el fin de alcanzar varias de las capas internas.
4. Tome la segunda o tercera capa e identifique áreas que presenten coloración rojiza.
5. La muestra debe ser cortada en piezas pequeñas y secadas en papel toalla o filtro inmediatamente. **Nota:** alternativamente puede conservar las muestras en la dimensión 5 x 8 cm.
6. Envuelva la muestra en toallas de papel absorbente y luego consérvelas en bolsas de papel (sobres de papel o tubos de vidrio o plástico, o en una caja de poliestireno. **Nota:** evite utilizar bolsas de plástico si las muestras no van a ser analizadas en un lapso de 2 a 3 días después del muestreo.
7. Codifique la muestra. Tome todos los datos co-

respondientes asociados al muestreo incluyendo:

- Numero de muestra, fecha y persona a cargo.
  - Nombre de la variedad, incluyendo nombres locales y composición genética, por ejemplo: Banano Cavendish cv Williams –AAA.
  - Estado de la planta (Sintomática-asintomática).
  - Coordenadas geográficas.
  - Datos generales y que puedan representar información valiosa para estudios de epidemiología posteriores al muestreo, por ejemplo: si la planta está situada cerca de canales de desagüe, cerca de vías transitadas, número de plantas infectadas, si la planta está siendo afectada por otros problemas fitosanitarios, etc.
  - Edad de la plantación o fecha de instalación del campo.
8. Una vez tomada la muestra, procure cubrir la herida utilizando las capas de pseudotallo no muestreadas y proteja la herida con cinta adhesiva.

9. No olvide desinfectar herramientas y calzado antes de visitar la siguiente planta.
10. Descartar los guantes usados. Usar nuevos si va a muestrear más de una planta dentro del mismo campo.

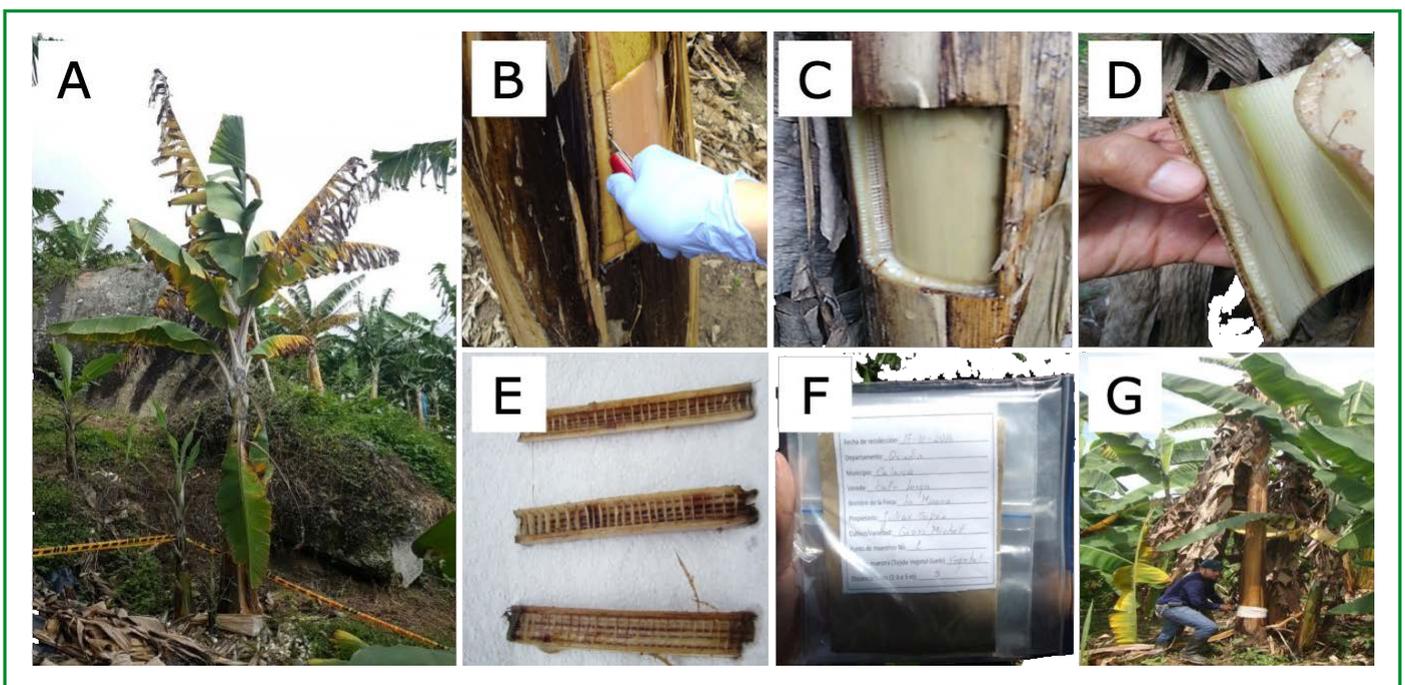
### 5.1.2 Procedimientos para muestreo de suelo

#### Materiales:

- Botas y vestimenta adecuada para las personas que llevarán a cabo el muestreo
- Pala o palín
- Bolsas de papel o cubetas plásticas de capacidad para 1k
- Sobres o bolsas de papel 200g
- Tubos de 50 ml

#### Procedimiento:

Una vez tomada la muestra de tejido vegetal de la planta seleccionada proceder al muestreo de suelo. Tres distancias a 1, 3 y 5 metros serán destinadas a la evaluación a partir de áreas en donde se encuentren las plantas sospechosas (**Ver Figura 8 y 9**). En el caso de no encontrar plantas con síntomas



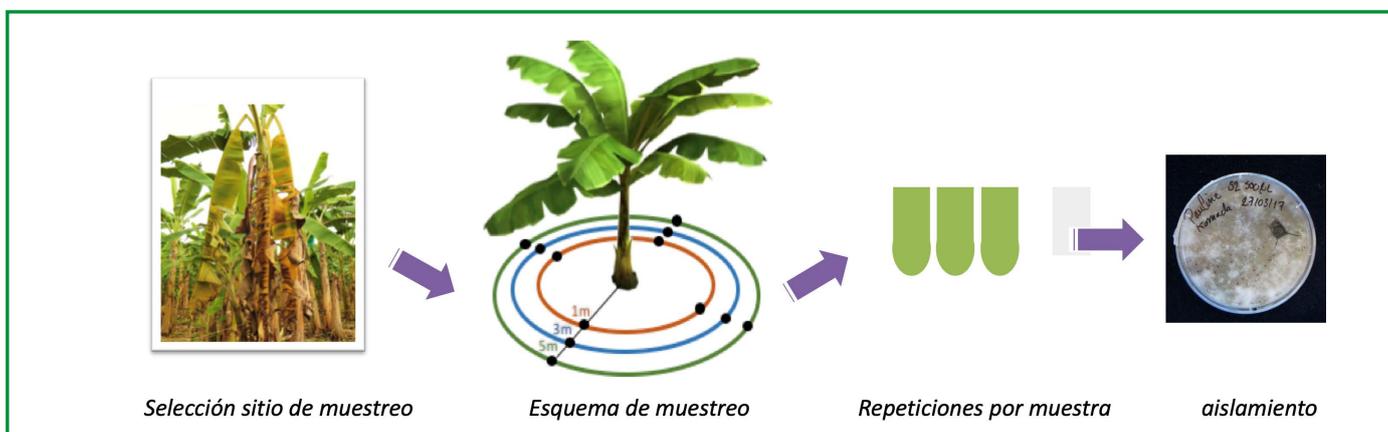
**Figura 7.** Procedimiento para el muestreo de tejido vegetal de plantas sintomáticas afectadas por *Fusarium* spp. en áreas libre de R4T A. Selección de la planta objeto de estudio y registro fotográfico, B - D. Corte del fragmento a evaluar, E. Selección de hebras de tejido vascular presentando descoloramiento rojizo típico de la enfermedad, F. Preparación de la muestra para análisis, G. Cierre de la zona de muestreo en el pseudotallo (Fotos ICA, Colombia)

evidentes de marchitamiento por *Fusarium* spp. se tomarán plantas al azar.

Para cada distancia cuatro muestras independientes y equidistantes serán tomadas. Las muestras corresponden a muestras colectadas con una pala desinfectada a una profundidad de aproximadamente 30 cm. Las cuatro muestras deberán ser mezcladas en una bolsa o contenedor. Una muestra representativa de aproximadamente 100 g se transfiere a una bolsa de papel previamente rotulada y

asociada a la muestra vegetal. El suelo se puede distribuir en cantidades de 20 gr en tubos de 50 ml y se pueden conservar a temperatura ambiente o a 4 -7°C hasta el momento del análisis o envío hacia laboratorios oficiales.

Las muestras tanto de suelo como de tejido vegetal deberán ser enviadas lo antes posible a un laboratorio con las capacidades básicas para prediagnóstico/diagnóstico. De existir una primera confirmación positiva las muestras deberán ser enviadas



**Figura 8.** Representación esquemática del procedimiento de muestreo de suelo.



**Figura 9.** Procedimiento para el muestreo de tejido de suelo A. Selección de la planta del área en donde se procederá a tomar muestras de suelo y registro fotográfico, B. Delimitación del área. C - D. Ahoyado de las diferentes zonas, E - F. Toma de las muestras y mezcla, G. Toma muestra representativa. H. Cierre de la zona de muestreo y desinfección de material. I. Envío de muestras (Fotos ICA-Colombia)

a un segundo laboratorio independiente. En el caso de muestras de tejido vegetal, estas deberán ser enviadas a un laboratorio en un país en donde el patógeno no sea cuarentenario.

## 5.2. Manejo de muestras en el Laboratorio y prediagnóstico

Estandarizado por F.A. García-Bastidas y G.H.J. Kema (2014)

Una vez colectadas las muestras, es muy importante que puedan ser analizadas tan pronto como sea posible. Se deberá tomar la precaución de NO lavar las muestras en lugares donde los procesos de degradación se aceleran en el tejido extraído.

Durante el proceso de recolección y análisis se debe evitar el lavado de los tejidos, máxime si existe riesgo de que estos remanentes líquidos puedan llegar a fuentes o cuerpos de agua, que se constituyen como una de las principales vías de efluentes generados sean liberados sin un tratamiento previo ya que esto ocasionaría la dispersión del patógeno.

### Materiales:

- Papel filtro
- Pinzas
- Bisturí
- Hipoclorito al 1 -3%
- Cronómetro
- Platos de Petri o recipientes pequeños de no más de 50 ml
- Platos de Petri con PDA<sup>1</sup> y antibióticos o medio Komada<sup>2</sup>
- Tubos de 2 ml o viales debidamente rotulados

**Nota:** todos los materiales deben estar debidamente esterilizados.

1. Potato Dextrose Agar .

2. Medio selectivo Komada (1L): D-galactose 10.0 g, L-Asparagina 2.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, KCl 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, FeNa EDTA 10.0 mg, Agar 20.0 g, Distilled H<sub>2</sub>O 900 mL. Autoclave. Ajuste el pH a 3.8. cuando el medio tenga una temperatura de aproximadamente 50°C adicione 100 mL de la siguiente mezcla: Streptomycin sulfate 0.3 g, Oxgall 0.5 g, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>· 0.5 g, PCNB (75% PH) 0.9 g

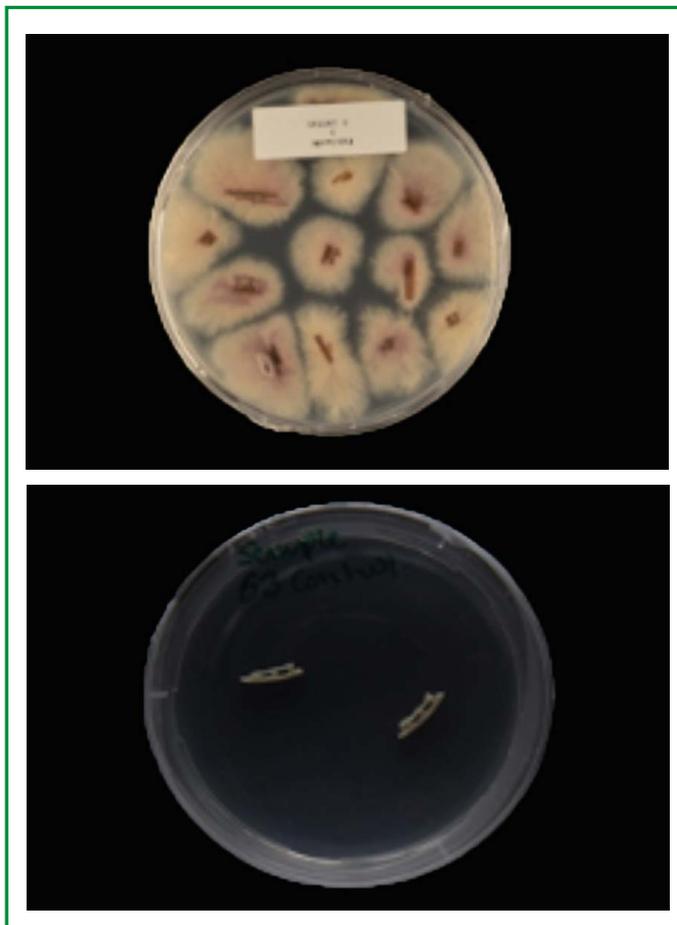
### 5.2.1 Aislamiento del hongo a partir de tejido vegetal

1. Disponga tres sets de platos Petri (o recipientes) por muestra. Múltiples muestras pueden ser evaluadas simultáneamente si se toman las medidas adecuadas para prevenir contaminación (Ver Figura 10)
  - a. Plato 1. Esterilización del material (contiene hipoclorito 1.- 3%)
  - b. Plato 2. Lavado (contiene agua estéril)
  - c. Plato 3. Papel filtro rotulado estéril



**Figura 10.** Disposición del área de trabajo para aislamiento del hongo a partir de tejido vegetal y preparación de muestras para prediagnóstico en planta.

2. Haga cortes pequeños del material vegetal incluyendo hebras de los haces vasculares con posible presencia del hongo. Los fragmentos deben ser de no más de 3 x 5 mm.
3. Seleccione un número de aproximadamente 20 fragmentos al azar y deposítelos en el plato 1 durante aprox. 1 minuto.
4. A continuación, transfiera los fragmentos hacia el plato 2. Esperar un minuto adicional y pasar al plato 3. Las muestras pueden permanecer en el papel filtro por varios minutos hasta que están totalmente secos.
5. Continúe con la siguiente muestra y repita desde el paso 1. No olvide esterilizar la superficie del bisturí y las pinzas cada vez que procese



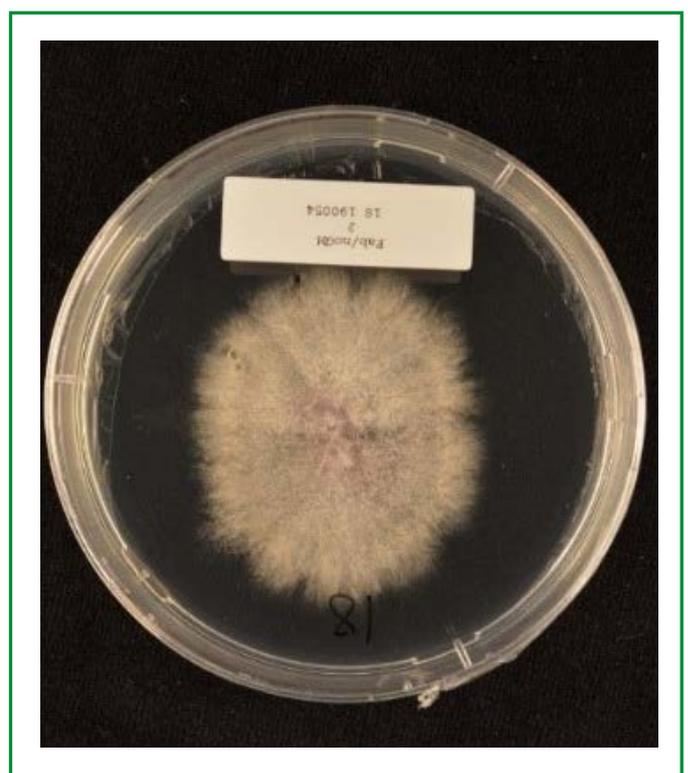
**Figura 11.** Arriba plato contiene hongo fenotípicamente similar a *Fusarium* spp. obtenido a partir de plantas sintomáticas, abajo, muestra proveniente de una planta sana, notar que no existe ningún crecimiento de hongo o de otro microorganismo.

una muestra diferente. Utilice platos y materiales nuevos o estériles en cada oportunidad.

6. Descarte los líquidos en un recipiente único y los platos usados, colóquelos en bolsas autoclavables para posteriormente ser esterilizados. Los desechos del laboratorio deben ser correctamente gestionados para evitar que se conviertan en una eventual fuente de inóculo. En particular, los líquidos NO deben ser descartados en cañerías.
7. Una vez las muestras estén totalmente secas proceda a disponer múltiples piezas de tejido vegetal en platos de Petri con PDA o Medio Komada si es posible. Por lo menos 5. Cada plato representa una repetición. **(Ver Figura 11)**
8. Reserve la mitad de las muestras para el primer

test molecular en planta. Para esto, deposite las muestras en el microtubo (continuar con el protocolo de extracción de ADN pág. 33).

9. Los platos de Petri con PDA deberán ser incubados por un lapso de 3 a 5 días a 25-27 °C
10. Una vez se observen crecimientos de micelio existen dos posibilidades:
  - a. Extracción de ADN directo o
  - b. Re siembra del hongo en nuevos platos con PDA
11. En el caso de obtener colonias limpias proceder con el protocolo de extracción de ADN Pág. 33
12. Si se opta por la resiembra del hongo el procedimiento es el siguiente:
  - a. Seleccionar colonias que fenotípicamente se asemejen a *Fusarium* spp. Hacer marcas visibles en el plato Petri y codificar colonias individuales
  - b. Transferir piezas de micelio a nuevos platos con PDA y repetir paso 8 **(Figura 12)**.



**Figura 12.** Plato Petri mostrando crecimiento micelial de hongo transferido de un plato con múltiples muestras.

### 5.3. Protocolo para el aislamiento de *Fusarium* spp. de muestras de suelo

Estandarizado por F.A. García-Bastidas (2019)

**Nota:** este protocolo es apropiado para cualquier tipo de muestra de suelo, incluyendo suelo proveniente de vehículos, contenedores, calzado, etc.

1. Una vez que las muestras han sido secadas en condiciones asépticas, deposite 10 a 20 gr de suelo en tubos de 50 ml.
2. Adicione agua estéril<sup>3</sup> y agite por un minuto, deje reposar por 5 a 10 minutos **(Ver Figura 13)**

3. Hacer diluciones 10X es altamente recomendado.
4. Tome 1 ml de la dilución y espárzalo directamente en el medio seleccionado PDA o Medio selectivo Komada<sup>4</sup>. En muestras de suelo funciona PDA con antibióticos, pero se recomienda el uso del medio Komada para mejores resultados
5. Incubar los platos a una temperatura de entre 25 a 27°C en condiciones de oscuridad .
6. Después de 24 - 48 horas replicar las colonias que se asemejen al fenotipo<sup>5</sup> de *Fusarium* spp. **(Ver Figura 14).**



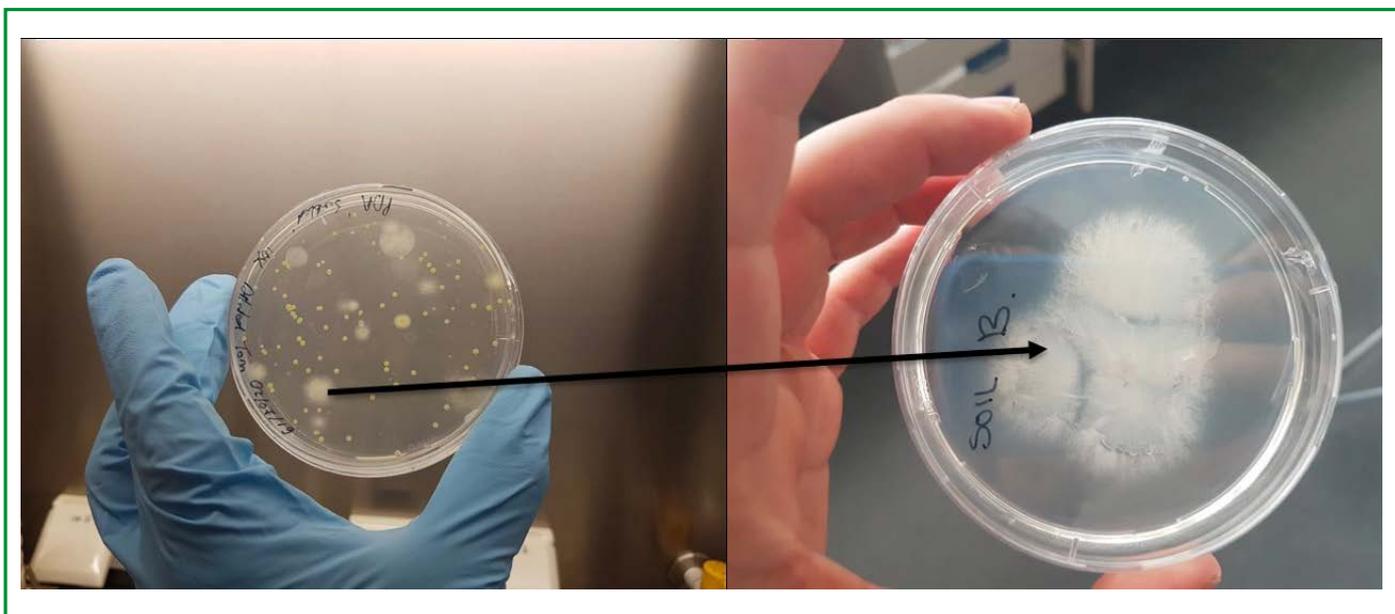
**Figura 13.** Manejo de las muestras de suelo en el laboratorio y dilución de la muestra.

3. Opcionalmente, la dilución de la muestra de suelo se puede realizar en 50 ml de pirofosfato de sodio al 0.1% (Sigma, USA) y agitar. Las diluciones se hacen a continuación, en ¼ solución Ringers (Honeywell Fluka, Germany) y finalmente se esparce sobre medio Komada o PDA con antibióticos.

4. Medio selectivo Komada (1L): D-galactose 10.0 g, L-Asparagina 2.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, KCl 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, FeNa EDTA 10.0 mg, Agar 20.0 g, Distilled H<sub>2</sub>O 900 mL. Autoclave.

Ajuste el pH a 3.8. cuando el medio tenga una temperatura de aproximadamente 50°C adicione 100 ml de la siguiente mezcla: Streptomycin sulfate 0.3 g, Oxgall 0.5 g, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>· 0.5 g, PCNB (75% PH) 0.9 g

5. Se recomienda revisar el documento: "Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense in the Indonesian centre of origin de Maryani et al., 2018". Para reconocer fenotipos asociados a la enfermedad causada por este patógeno.



**Figura 14.** Manejo de las muestras de suelo en el laboratorio y dilución de la muestra.

7. Continuar con protocolo de extracción de ADN.

### 5.4. Protocolo de extracción de ADN

En caso de no disponer de kits comerciales para extracción de ácidos nucleicos (ADN), tales como DNAsy de Qiagen, Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food de Promega, Clear Detections entre otros, que han sido evaluados y validados satisfactoriamente tanto para tejido vegetal como para material fúngico, se describen a continuación dos protocolos estandarizados con reactivos de fácil adquisición.

#### 5.4.1 Extracción de ADN de Musáceas y *Fusarium spp.*

*Estandarizado por F.A. García-Bastidas 2013 - Adaptado de Bernatzky y Tanksley, 1990)*

##### Materiales:

- Mortero y pistilo, nitrógeno líquido (equipo de liofilizado, perlas de circonio)
- Tubos para microcentrifuga
- Baño María o plancha de calentamiento
- Pipetas y puntas de 1000, 200 y 10 µl
- Racks
- Marcadores

- Guantes
- Toallas

##### Material vegetal o micelio/esporas:

1. Introduzca por lo menos 100 mg de material en un tubo de 2 ml debidamente rotulado.
2. Aplicar nitrógeno líquido dentro del tubo y macerar con ayuda de un pistilo (mortero, liofilización o cualquier otro procedimiento de lisis son aceptados).
3. Inmediatamente adicione en 320 µl del **Buffer De Extracción Sorbitol<sup>6</sup>** + 100 µl de **buffer Sarcosine<sup>7</sup>** + 320µl de **buffer de Lisis nuclear**

6. 350 mM de Sorbitol (63,77g/1L); 100 mM de Trizma base (12,10 g/1L); 5 mM de EDTA (1,86 g/1L); 0,2% de β-mercaptoetanol (2 mL/1L). Prepare 1 L en ddH<sub>2</sub>O y ajuste a pH 8,2. No requiere autoclave. Conserve a temperatura ambiente y pre-enfríe a 4°C antes de usar.

7. N-Lauroyl Sarcosine al 5%.

8. 55 mM de CTAB (20 g/1L), 200 mM de Trizma base (24,22 g/1L), 50 mM de EDTA (18,61 g/1L), 2 M de NaCl (116,88 g/1L). Prepare 1L con ddH<sub>2</sub>O y ajuste a pH 7.5. No requiere autoclave. Conserve a temperatura ambiente.

**CTAB**<sup>8</sup> agitar durante unos minutos y realizar un spin en la centrifuga, con el fin de concentrar todo el contenido en el fondo.

4. Precaliente el baño María a una temperatura de 65°C y sumerja los tubos en flotadores durante una hora (30 minutos mínimo) con agitación por inversión cada 15 minutos. (procure vigilar que los tubos no se abran), terminado este procedimiento dejar enfriar antes de continuar.
5. En la cámara de extracción de gases agregue **Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)** en proporción 1:1 al homogenizado, aproximadamente 620µl (a partir de este momento es muy importante que el tubo esté debidamente marcado, los reactivos utilizados de ahora en adelante pueden borrar la marcación fácilmente).
6. Centrifugue durante 10 a 15 minutos a ~13000 rpm.
7. Tomar la fase acuosa (620 µl aprox.), trasladarla a un nuevo tubo de 1.5 mL y realizar de nuevo el lavado con 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico. Agitar por inversión.
8. Centrifugar a la máxima velocidad por 20 minutos. Tomar la fase acuosa y transferirla a un tubo nuevo.
9. Adicionar 1 volumen de **isopropanol en relación 1:1 y 50µl de acetato de potasio 5M, pH 5.5 (opcional)**. Mezclar una vez suavemente por inversión.
10. Incubar de 5-30 minutos a -20°C a -30 °C. Si se observan hebras de ADN cieno minutos serán suficiente (No exceder límite de tiempo para evitar degradación de ADN).
11. Mezclar por inversión y centrifugar a máxima velocidad por 15 minutos.
12. Descartar el isopropanol. A continuación, realizar un lavado con etanol absoluto y un lavado con etanol al 70% con 500 µl. Centrifugar a la máxima velocidad por 6-10 minutos entre cada lavado, desprendiendo el pellet del tubo antes de centrifugar.

13. Dejar secar el pellet toda la noche o el tiempo necesario para evaporar los residuos de etanol. Alternativamente, el uso del SpeedVac es recomendado.
14. Resuspender el ADN en 100-200 µl de agua tipo PCR estéril o **Buffer TE**<sup>9</sup>. de acuerdo con el tamaño del pellet (a mayor tamaño mayor cantidad de agua) y 2-3 µl de RNasa (4 mg/ml). Incubar por 30 minutos a 37°C +/- 0.5 °C.
15. Almacenar el ADN extraído en congelador de -20°C a -30 °C.
16. Para garantizar la calidad del ADN obtenido se debe cuantificar con el método disponible en cada uno de los laboratorios. Alternativamente se puede chequear la integridad del ADN en un gel de agarosa al 0.8% 55 V constantes durante 90-120 minutos.

#### **5.4.2. Extracción de ADN a partir de micelio Protocolo adaptado de (Bruns and Gardes 1993)**

**(Tiempo estimado: 1 hora)**

1. Pasados 3-4 días raspar el micelio y depositarlo en tubos de 2 ml con 2 perlas de acero inoxidable o circonio.
2. Llevar los tubos destapados a una incubadora a 30°C durante mínimo 24 h. También es posible llevarlos a una termocupla con sílica gel, conectada a una bomba de vacío, durante 12 h.
3. Pasado el tiempo, sumergir los tubos tapados en nitrógeno líquido.
4. Pulverizar el micelio en un homogenizador o amalgamador (para el caso del homogenizador se recomienda a 1400 rpm/3 min).
5. Adicionar al micelio pulverizado 700 µL de **buffer de lisis** y darle vórtex para resuspender el polvo micelial.

---

9. 10 mM de Trizma base (0,1211 g/100 mL); 1 mM de EDTA (0,0372 g/100 mL); pH 8,0. Autoclave y conserve a temperatura ambiente.

6. En la cabina de extracción de gases adicionar 700 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1), agitar por inversión por 3-4 veces (en su defecto usar cloroformo).
7. Centrifugar por 10 min a 13.000 rpm.
8. En la cabina de extracción transferir la fase superior o sobrenadante (~350 µL) a un nuevo tubo de 2 mL (tratar de remover el mismo volumen para todas las muestras).
9. Precipitar el ADN con 350 µL (es decir un volumen igual) de isopropanol almacenado bajo refrigeración a -20°C. Invertir varias veces los tubos (en la mayoría de los tubos puede ser visible el pellet).
10. Centrifugar a 13.000 rpm por 1-2 min.
11. Descartar el sobrenadante y cuidadosamente lavar el pellet con 300 µL etanol al 70%.
12. Centrifugar por 2-3 min a 13.000 rpm.
13. Cuidadosamente descartar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta (no extraer el pellet).
14. Evaporar los remanentes de etanol a temperatura ambiente o SpeedVac.
15. Resuspender el pellet en 50 µL de agua grado biología molecular o TE pH 8.
16. Almacenar a -20°C.
17. Cuantificar y verificar integridad en gel de agarosa.

## 5.5. Prediagnóstico en ADN proveniente de material vegetal

Una vez verificado y cuantificado el ADN proveniente de tejido vegetal, se realiza la PCR correspondiente de acuerdo con las necesidades y preferencias del laboratorio. En general concentraciones de por lo menos 20 -30 ng de ADN genómico serán requeridas.

De acuerdo a las facilidades y preferencias del laboratorio a continuación se recomiendan y se explican en detalle protocolos para el prediagnóstico de R4T de acuerdo a primers que han sido utilizados por varios investigadores en los reportes iniciales de la enfermedad en varios países .

### 5.5.1 Prediagnóstico molecular con primers *FocR4T* (Dita et al.,2010\*)

Región blanco	<i>Fusarium</i> spp.	Secuencias (5' - 3')	Fragmento esperado
Inter-genic Spacer (IGS) and Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal operon	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cupense</i>	5'- CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG-3'	463pb
	Raza 4 Tropical ( <i>Fusarium odoratissimum</i> )	5'-GCCAGGACTGCCTCGTGA - 3'	

\*Verificar el uso de la versión corregida ([Ver enlace](#))

### Parámetros de PCR para un volumen final de 25ul

ADN Molde	2 µL (30 ng)
primer FocR4T-F	1.0 µL (10 µM)
primer FocR4T-R	1.0 µL (10 µM)
Buffer Taq	1.0 µL (10 µM)
dNTPs	0.5 µL (4 µM)
Taq DNA Pol	0.25 µL
Water	17.75 µL.

### Perfil térmico de amplificación

95°C por 5 min  
30 ciclos de amplificación

- 95°C por 1min.
- 60°C por 1min.
- 72°C por 3 min.

Final 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se analizan en un gel de agarosa 1 a 1.5% con 1x buffer TBE.

### Primers control para ADN de planta:

Región Blanco	Nombre	Secuencias	Fragmento esperado
Actine	BanActin2-F	5'-ACAGTGTCTGGATTGGAGGC-3'	217 pb.
	BanActin2-R	5'-GCACTTCATGTGGACAATCG-3'	

Las condiciones de PCR son las mismas y la PCR se puede hacer en dúplex o por separado.



**Figura 15.** Izquierda: tipo de muestras de material vegetal que pueden ser evaluadas, centro: trozo de pseudotallo mostrando señal positiva a R4T, derecha: gel de agarosa mostrando un resultado en multiplex amplificación del segmento asociado a R4T (463 pb) ausencia de banda en Raza 1 (R1). Adicionalmente se observa la presencia de la banda asociada al control positivo para ADN de planta (BanActine2 217 pb) presente en muestras que dieron positivo para R4T como para R1(Fotos García-Bastidas).

## 5.6. Prediagnóstico en ADN proveniente de aislamientos del hongo

### 5.6.1. Prediagnóstico molecular con primers FocR4T (Dita et al., 2010\*)

Región blanco	<i>Fusarium</i> spp.	Secuencias (5' - 3')	Fragmento esperado
Inter-genic Spacer (IGS) and Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal operon	<i>Fusarium oxysporum</i>	5'- CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG-3'	463pb
	f.sp. <i>ubense</i> Raza 4 Tropical ( <i>Fusarium odoratissimum</i> )	5'-GCCAGGACTGCCTCGTGA -3'	

\*Verificar el uso de la versión corregida ([Ver enlace](#))

#### Parámetros para PCR de un volumen final de 25ul

ADN Molde	2 µL (30 ng)
primer FocR4T-F	1.0 µL (10 µM)
primer FocR4T-R	1.0 µL (10 µM)
Buffer Taq	1.0 µL (10 µM)
dNTPs	0.5 µL (4 µM)
Taq DNA Pol	0.25 µL
Water	17.75 µL.

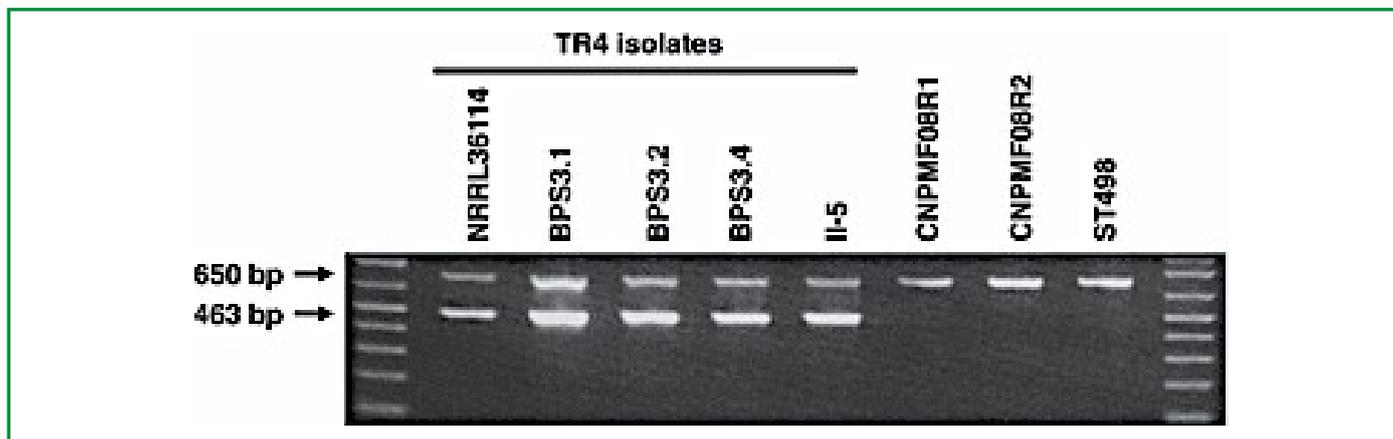
#### Perfil térmico de amplificación

95°C por 5 min

30 ciclos de amplificación

- 95°C por 1min.
- 60°C por 1min.
- 72°C por 3 min.

Final 72°C por 10 min.



**Figura 16.** visualización de productos de PCR amplificados con primers específicos. Panel superior: R4T (463pb) y factor de elongación (EF1α-1/EF1α-2) (650pb). (tomado de Dita et al., 2010)

## 5.6.2 Prediagnóstico molecular con primers W2987 (Li et al. 2013)

Región blanco	<i>Fusarium</i> spp.	Secuencia (5' - 3')	Fragmento esperado
Gen desconocido codificando una proteína hipotética	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> Raza 4	5'- TGCCGAGAACCACTGACAA-3'	452pb
	Tropical ( <i>Fusarium</i> <i>odoratissimum</i> )	5'- GCCGATGTCTTCGTCAGGTA- 3'	

Artículo no esta disponible en Open Access resumen puede ser revisado [\(Ver enlace\)](#)

### Parámetros para un volumen final de 25ul

ADN Molde	20 – 50 ng
primer FocR4T-F	(0.4 µM)
primer FocR4T-R	(0.4 µM)
Buffer Taq	1X (2.5mM MgCl <sub>2</sub> )
dNTPs	(0.2 mM)
Taq DNA Pol	1 U
Water	25

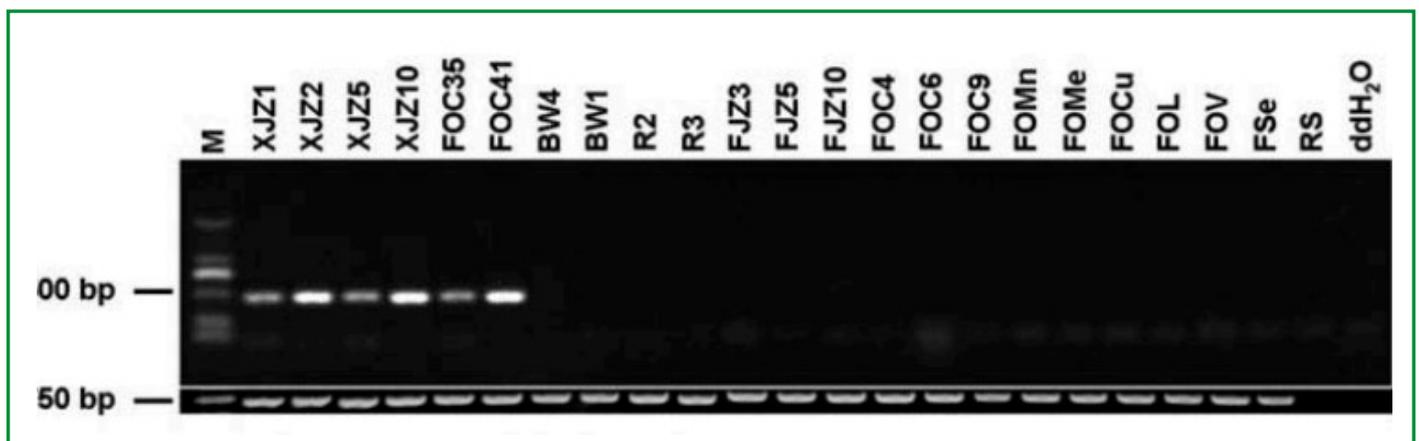
### Perfil térmico de amplificación

95°C por 2 min

30 ciclos de amplificación:

- 94°C por 40 seg.
- 55°C por 40 seg
- 72°C por 1 min.

Final 72°C por 10 min.



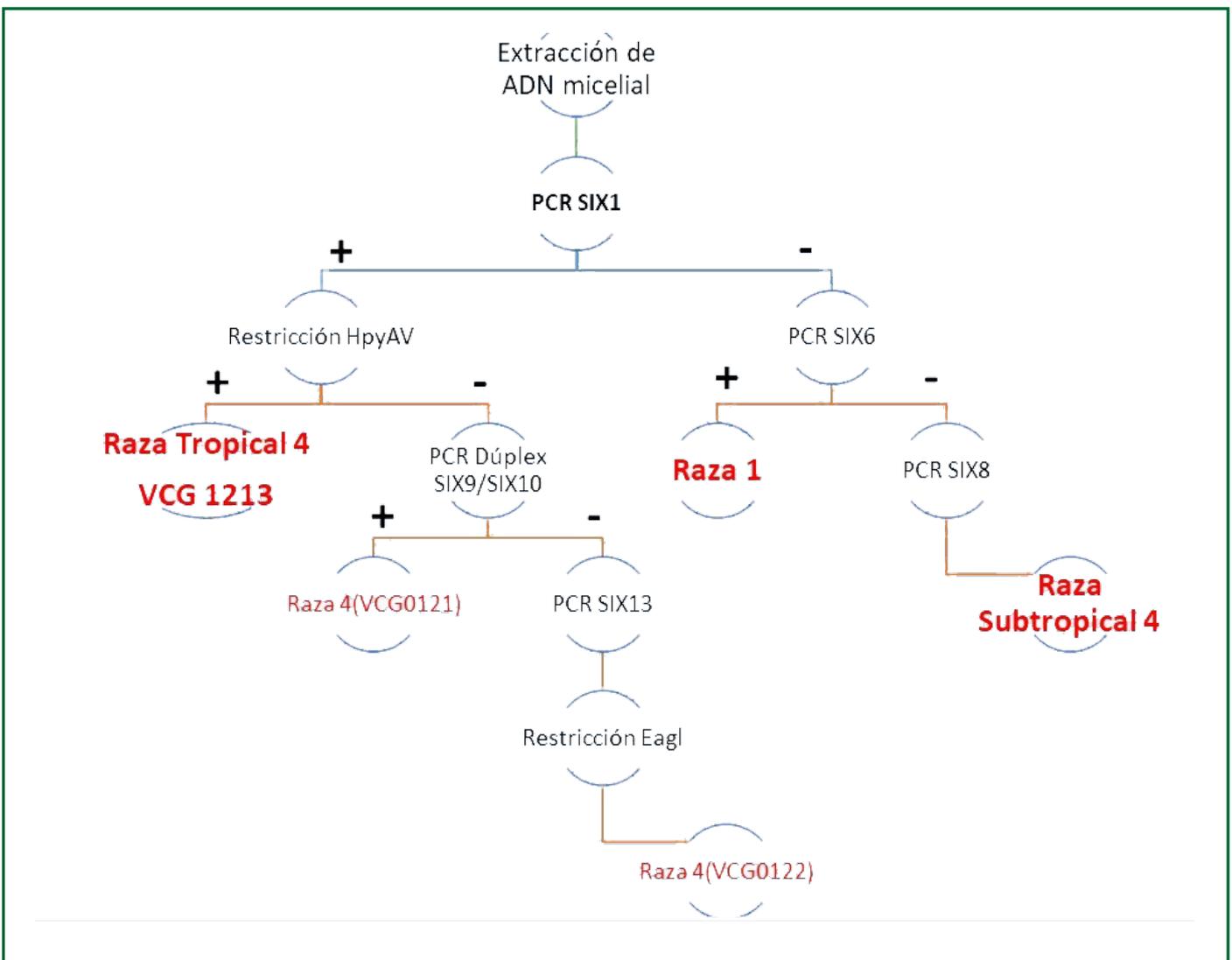
**Figura 17.** Visualización de productos de PCR amplificados con primers específicos para R4T. bandas superiores representan los amplicones asociados a R4T mientras que las bandas inferiores representan el control positivo para ADN EF1α-1/EF1α-2 (Li et al. 2013)

### 5.6.3 Prediagnóstico molecular con primers SIX

Como se mencionó anteriormente, otra alternativa para el diagnóstico de R4T (VCG1213) ha sido recientemente publicada por Carvalhais *et al.* 2019 y es útil para identificar diferentes razas relacionadas con la Enfermedad de Panamá, amplificando regiones de los genes SIX (Secreted in Xylem) que codifican proteínas relacionadas con procesos de virulencia mediante PCR punto final, con pasos adicionales de restricción enzimática. En la **Figura 17**

se observa el esquema analítico descrito en el estudio en mención.

Como se evidencia en el esquema, inicialmente se debe proceder con el análisis de R4T (VCG1213) mediante la utilización de los primers SIX1 que amplifican un fragmento de 266pb. El amplicón obtenido se debe someter a un proceso de restricción con la enzima HpyAV, con el que se deben obtener dos fragmentos de 142 pb o 124 pb, a través de los que se confirma la presencia de R4T.



**Figura 18.** Esquema analítico propuesto por Carvalhais *et al.* (2019) para la identificación de R4T y otras razas asociadas al Mal de Panamá en banano.

En el caso de que el fragmento no sea digerido por la enzima, se debe realizar una amplificación por PCR dúplex con los primers *SIX9/SIX10* para confirmar la presencia del VCG 0121(R4), obteniéndose dos bandas de 260 y 309 pb respectivamente, o alternativamente se debe proceder con una PCR con los primers *SIX13* diseñados para la identificación del VCG 0122 (R4) (produciendo un amplicón de 343 pb) y finalizar con una restricción enzimática con la enzima *EagI* para visualizar dos bandas de 102 y 241 bp.

Si no se obtienen amplificaciones para las muestras procesadas con los primers *SIX1*, se puede proceder opcionalmente a realizar una PCR con los primers *SIX6* para R1 o *SIX8* para SR4T, aunque esta última está limitada a regiones subtropicales.

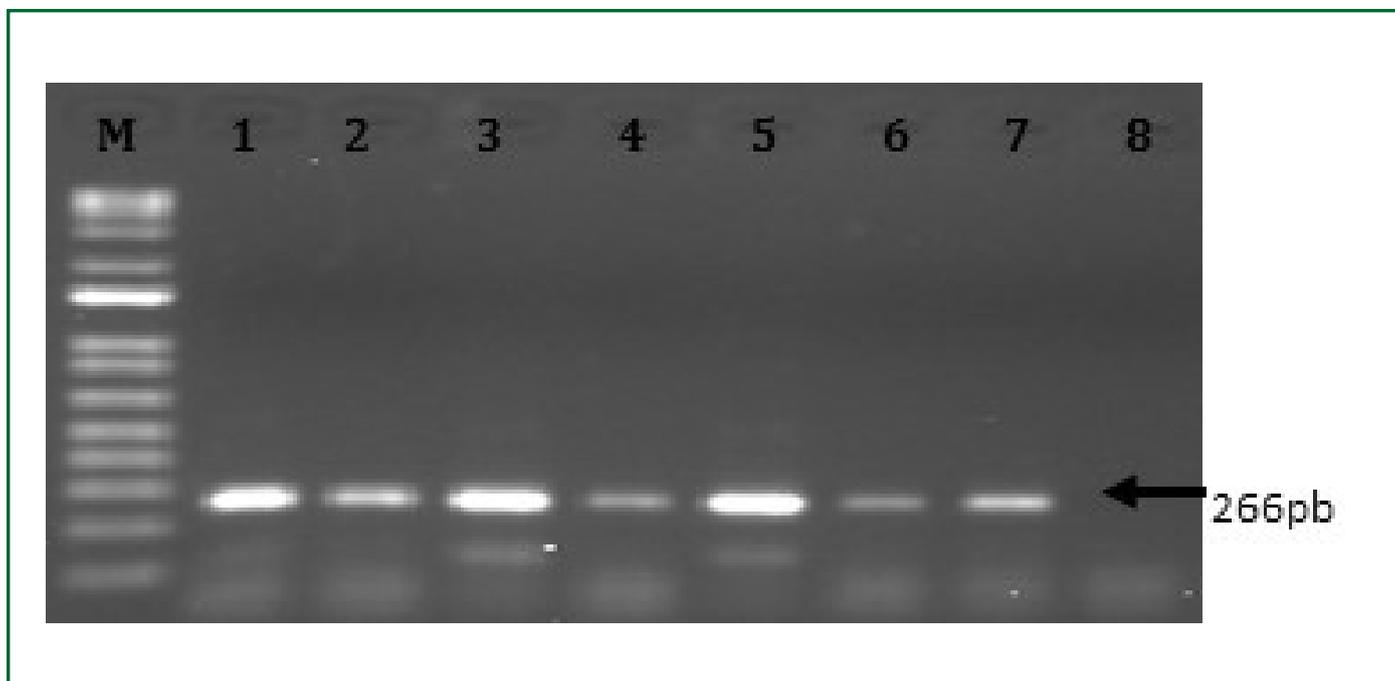
Las secuencias de los primers, tamaño de los fragmentos amplificados y de los productos de restricción se describen a continuación:

Región blanco	<i>Fusarium</i> spp.	Secuencias (5' - 3')	Tamaño banda	Restricción enzimática	Productos de restricción
Genes <i>SIX</i>	R4T (VCG 1213716)	SIX1_266_F 5'- GTGACCAGA A C T T G C C C A C A -3'	266 pb.	HpyAV	142 y 124 pb
		SIX1_266_R 5'- C T T T G A T A A G C A C C A T C A A -3'			
	R4 (VCG 0121)	SIX9_Foc_F 5'- A T C G C T G A A G C C C A G A A C A A -3'	260 pb.	Control interno	N.A
		SIX9_Foc_R 5'- T T C T G T C C G T C G A T C G T T C C -3'			
		SIX10_309_F 5'- C C A C T G G C A C C A A A G A C T T G -3'	309 pb.	N.A	N.A
		SIX10_309_R 5'- C G A T G C G G A G T A C T G G T T G A -3'			
	R4 (VCG 0122)	SIX13_343_F 5'- C A G C C T C C T A G C G T C G A A A A -3'	343 pb.	EagI	102 y 241 pb
		SIX13_343_R 5'- C C G T G A T G G G G T A C G T T G T A -3'			
	SR4T	SIX8_206_F 5'- G C C T G C A T A A C A G G T G C C G G T -3'	260 pb.	N.A	N.A
		SIX8_206_R 5'- T T C C T C A C C T C A C C C G G C A G G A T T C -3'			
Raza 1	SIX6_210_F 5'- A C G C T T C C C A A T A C C G T C T G T -3'	210 pb.	N.A	N.A	
	SIX6_210_R 5'- A A G T T G G T G A G T A T C A A T G C -3'				

Las concentraciones de reacción requeridas y perfiles términos asociados al análisis de genes SIX, se detallan a continuación.

**Parámetros de PCR para las reacciones de amplificación con los primers SIX1, SIX13, SIX8 y SIX6**

ADN Molde	2 µL (15-30 ng)
primer SIX-F	1.0 µL (10 µM)
primer SIX-R	1.0 µL (10 µM)
Buffer Taq	5.0 µL (5X)
dNTPs	0.7 µL (10 µM)
MgCl <sup>2</sup>	1.5 µL (25mM)
Taq DNA Pol	0.25 µL (5U/ul)
Agua	13.55 µL.
Vol Final	25 µL



**Figura 19.** Amplificación con primers SIX1 de ADN micelial, obtenido de muestras sospechosas. M: Marcador 100pb. 1-7: amplificaciones

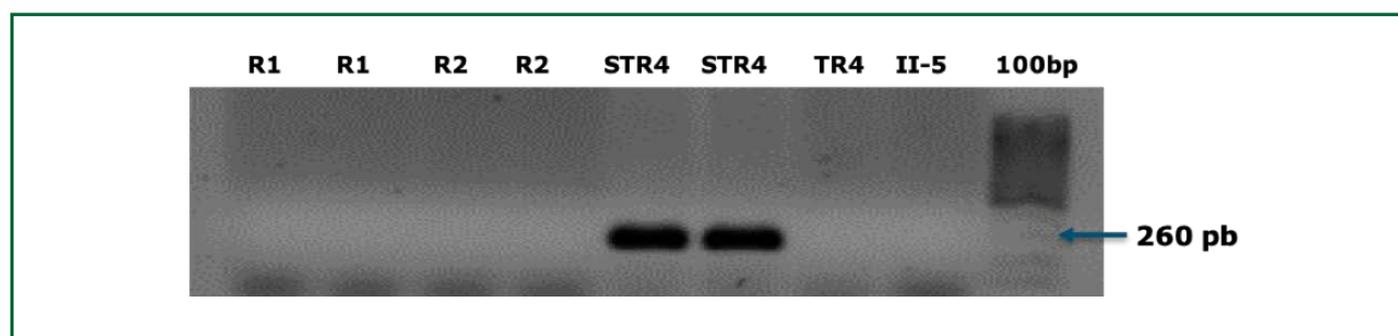
### Parámetros para la PCR dúplex con los primers SIX9/SIX10

ADN Molde	2 µL (15-30 ng)
primer SIX9-F	1.0 µL (10 µM)
primer SIX9-R	1.0 µL (10 µM)
primer SIX10-F	1.0 µL (10 µM)
primer SIX10-R	1.0 µL (10 µM)
Buffer Taq	5.0 µL (5X)
dNTPs	0.7 µL (10 µM).
MgCl <sup>2</sup>	1.5 µL (25mM)
Taq DNA Pol	0.25 µL(5U/ul)
Water	11.55 µL.
Vol Final	25 µL

### Perfiles térmicos

El Perfil térmico para la amplificación con los primers SIX es el siguiente:

SIX1 y SIX6	SIX13	SIX9/SIX10	SIX8	SIX13	SIX9/SIX10
95°C por 2 min					
30 ciclos de amplificación • 95°C por 0.75 min. • 55°C por 0.75 min. • 72°C por 1 min.	30 ciclos de amplificación • 95°C por 0.75 min. • 57°C por 0.75 min. • 72°C por 1 min.	30 ciclos de amplificación • 95°C por 0.75 min. • 58°C por 0.75 min. • 72°C por 1 min.	30 ciclos de amplificación • 95°C por 0.75 min. • 62°C por 0.75 min. • 72°C por 1 min.	30 ciclos de amplificación • 95°C por 0.75 min. • 57°C por 0.75 min. • 72°C por 1 min.	30 ciclos de amplificación • 95°C por 0.75 min. • 58°C por 0.75 min. • 72°C por 1 min.
Final 72°C por 5 min					



**Figura 20.** Amplificación con primers SIX8 a partir de ADN obtenido de aislamientos procedentes de la región subtropical.

Los productos de PCR pueden ser analizados en un gel de 1 a 1.5% agarosa con 1x buffer TBE.

- 37°C por 60 min
- 65°C por 20 min.

**Condiciones para las restricciones enzimáticas con las enzimas HpyAV y EagI**

Water	3.8 µL
Buffer enzima	1.0 µL (5X µM)
Enzima	0.2 µL (U)
ADN	5.0 µL
Vol Final	10 µL

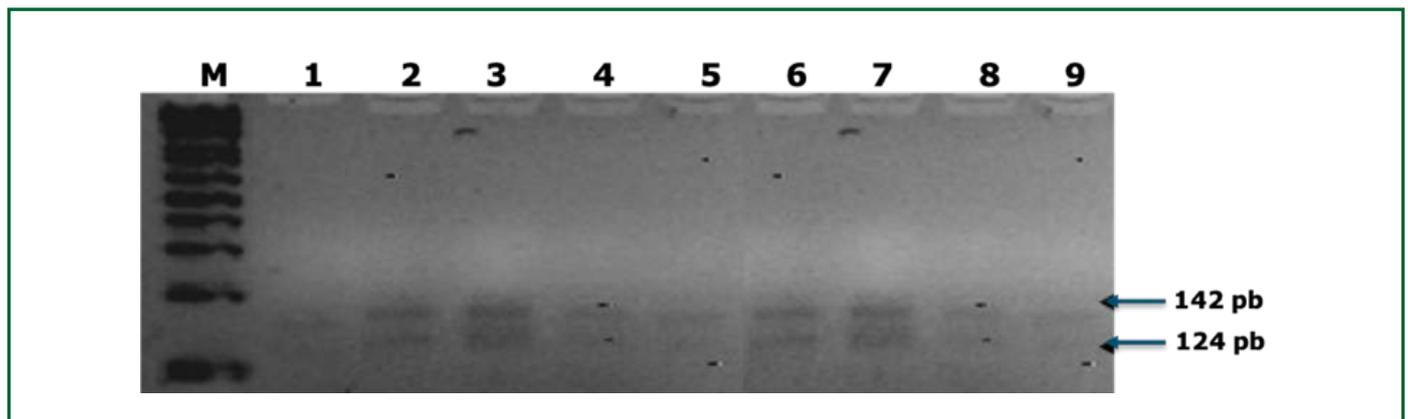
El perfil térmico para la restricción con las enzimas HpyAV y EagI es el siguiente:

Los productos de PCR deben ser analizados en un gel de 3% agarosa con 1x buffer TBE para lograr una mejor resolución de los productos digeridos. **(Figura 21)**

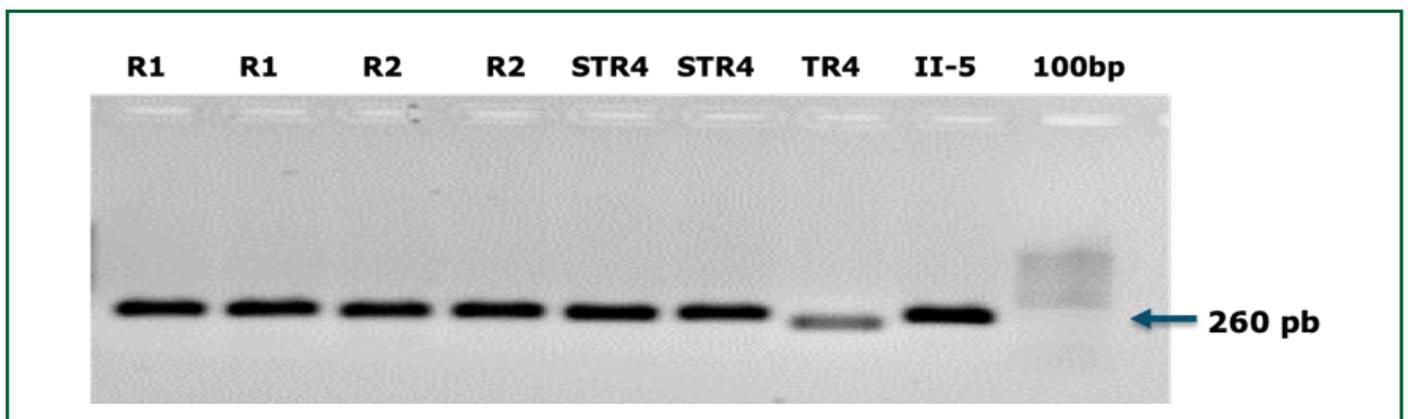
**Opcional:**

Los primers SIX9 pueden ser utilizados opcionalmente como controles internos para corroborar la calidad de las extracciones, ya que detectan a Foc.

Las condiciones de amplificación son las iguales que las descritas para la PCR dúplex que utiliza los mismos primers. **(Figura 22)**



**Figura 21.** Restricción enzimática de fragmentos amplificados con los primers SIX1 con la enzima HpyAV. M: marcador de 100pb. 1-9: fragmentos digeridos de 124 y 142 pb.



**Figura 22.** Amplificación con los primers SIX9 de diferentes cepas asociadas a diferentes razas de *F. oxysporum* f. sp. *cupense*.

### Primers utilizados como control de ADN del hongo para asegurar la calidad de los resultados

Con el fin de verificar la calidad del ADN obtenido, se recomienda correr primers control individualmen-

te o en dúplex de ser posible.

A continuación, se presentan las secuencias de los primers control utilizados para *Fusarium* spp.

Nombre	Secuencias	Tamaño esperado	Programa termociclador	Especie	Referencias
PFO2 PFO3	5'-CCCAGGGTATTACACGGT-3' 5'-CGGGGGATAAAGGCGG-3'	70 bp	1 ciclo: 3 min 95 °C 29 ciclos: 30s a 95 °C 30s a 62 °C 30 S a 72 °C 1 ciclo: 3 min a 72°C	Fo	(Edel <i>et al.</i> 2000)
CWF1 CWR1	5'-CCTGATACCCAGACGGCTAA-3' 5'-CTGTCCGGCTTCACCGTTATT-3'	286 bp	1 ciclo 5min 95 °C 29ciclos: 1min a 95 °C 30s a 55 °C 30s a 72 °C 1 ciclo 10 min a 72°C	Foc	(Islam <i>et al.</i> 2015)
EF-1 EF-2	5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3' 5'-GGAGGTACCAGTGATCATGTT-3'	650 bp	Usar junto a FocR4T primers o por separado.	Fungi	(O'Donnell <i>et al.</i> 1998)
SIX9_Foc_F SIX9_Foc_R	5'-ATCGCTGAAGCCCAGAACAA-3' 5'-TTCTGTCCGTCGATCGTTCC-3'	260pb	Ver protocolo	Foc	(Carvalhais <i>et al.</i> 2019)

## 5.7. Prediagnóstico mediante PCR tiempo real

### 5.7.1. Kit comercial de Clear®Detections

La qPCR se realiza por medio de la utilización del Kit **Clear®Detections - R4T DNA identification by Real-Time PCR**, el cual permite una sensible y rápida detección de *Fusarium* Raza 4 Tropical. La especificidad de los primers ClearDetections Foc R4T, está basada en una única mutación de la Región Intergénica Espaciadora (IGS). Los fabricantes han

realizado mínimas modificaciones en las secuencias de los primers diseñados por Dita *et al.* (2011) para brindar una mayor especificidad. El kit incluye un ensayo independiente para la detección del gen de la citocromo oxidasa (COX), presente en el tejido de las plantas de banano, para ser utilizado como un control de extracción.

Teniendo en cuenta la variabilidad genética del hongo en Indonesia, centro de origen, los fabricantes hacen la siguiente salvedad: *“Este kit es confiable para la detección de Raza 4 Tropical fuera de Indonesia. El uso del kit de diagnóstico para RT4 de ClearDetections dentro de Indonesia debe complementarse con otros métodos de diagnóstico.”*

A continuación, los pasos de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (ver el protocolo original en los anexos)

### Materiales

- Centrifuga ya sea para tubos de microcentrífuga o para placas de 96 pocillos.
- Pipetas y puntas de filtro correspondientes para volúmenes de 5-1000 µl.

- Tubos de microcentrífuga o placas de 96 pocillos para dilución de ADN.
- Placas y sellos para PCR o tubos para PCR.
- Máquina para PCR en tiempo real\*.
- Agua libre de nucleasa.
- Vortex.

\*Colorante de referencia pasivo:

- Las mezclas de PCR ClearDetections no contienen un colorante de referencia pasivo. Si es el caso, por favor, desactive cualquier opción de colorante de referencia pasiva en su software PCR en tiempo real.

### Componentes:

RT-F-0901-050 Real-Time PCR Diagnostic Kit for FOC R4T		
Components	Code	Storage
All-inclusive ClearDetections FOC R4T PCR mix †	PMD_0901_050	Room temp*
FOC R4T Positive Amplification Control (FOC R4T PAC)	PAC_0901_02	Room temp*
Resuspension buffer	RSB_2	Room temp
RT-F-0902-050 Real-Time PCR Diagnostic Kit for FOC R4T including Banana Cox gene extraction control		
Components	Code	Storage
All-inclusive ClearDetections FOC R4T PCR mix †	PMD_0901_050	Room temp*
FOC R4T Positive Amplification Control (FOC R4T PAC)	PAC_0901_02	Room temp*
Resuspension buffer	RSB_2	Room temp
All-inclusive ClearDetections Banana COX PCR mix †	PMD_2601_050	Room temp*
Banana Cox gene Positive Amplification control (COX PAC)	PAC_2601_02	Room temp*

\*Se suministran como reactivos liofilizados. Deberán ser almacenados en su embalaje original a temperatura ambiente en un ambiente seco. Después de la resuspensión, guardar a -20°C hasta su siguiente uso. Si se almacenan adecuadamente, los componentes del kit pueden ser utilizados hasta la fecha de caducidad impresa en la caja.

### 5.7.2 Preparación de muestras de ADN y reactivos para PCR en tiempo real

Diluir extractos de ADN es un **paso necesario** para reducir aún más la presencia de compuestos que inhiben la PCR en tiempo real. Frecuentemente se encuentran trazas de inhibidores en materiales a partir de los cuales se aísla el Foc RT4.

La dilución de cada extracto de ADN **20 veces** (e.g., 1 µl de ADN en 19 µl de agua libre de nucleasa) normalmente garantizará un rendimiento adecuado de la PCR en tiempo real. En raras ocasiones, son necesarias diluciones adicionales si el extracto de ADN contiene una alta concentración de inhibidores (**véase Resolución de problemas**).

#### Resuspensión de los componentes de la PCR en tiempo real

1. Golpee suavemente los frascos que contienen la mezcla para PCR de Foc RT4 ("Foc R4T PCR mix") y Banana COX ("Banana COX PCR mix"), para acomodar, precipitar cualquier contenido que se pueda haber movido durante el envío.
2. Desenrosque la tapa de los frascos de mezcla de Foc RT4 y Banana COX para PCR y deseche los tapones de goma.
3. Añadir 790 µl de buffer de resuspensión a cada frasco.
4. Cerrar los frascos e incubar cinco minutos a temperatura ambiente.
5. Desenrosque las tapas de los tubos CAP de Foc RT4 (Foc R4T PAC) y CAP de Banana COX (Banana COX PAC).
6. Añadir 300 µl de buffer de resuspensión a cada tubo.
7. Cerrar los tubos e incubar cinco minutos a temperatura ambiente.

8. Homogenizar la solución con vórtex y realizar un spin al contenido de los tubos.

**Nota:** tenga presente que una inadecuada homogenización de los componentes puede disminuir los rendimientos del análisis. Adicionalmente realice alícuotas de todos los reactivos resuspendidos para evitar la contaminación accidental de las mezclas maestras.

#### Foc RT4 y Banana COX

Ambos ensayos se pueden realizarse simultáneamente en una sola ejecución de PCR.

**Nota:** Un ensayo de COX positivo indica una extracción exitosa de ADN de tejido de planta de banana. 4

1. Diseñe su montaje experimental de PCR en tiempo real: dos pocillos para cada muestra para ser examinados para Foc RT4 y Banana COX ADN más cuatro pocillos para los siguientes controles:
  - Foc RT4 Control de amplificación negativo, Foc RT4 CAN.
  - Foc RT4 Control de amplificación positivo, Foc RT4 CAP.
  - Banana COX Control de amplificación negativo, Banana COX CAN.
  - Banana COX Control de amplificación positivo, Banana COX CAP.
2. Agite con vórtex los frascos que contienen las mezclas para Foc RT4 y Banana COX para PCR durante 1 - 2 seg.
3. Pipetear 15 µL de mezclas en cada pocillo.
4. Agite con vórtex los tubos de CAP de Foc RT4 y CAP de Banana COX durante 1 - 2 seg.
5. Centrifugar el contenido de los tubos de CAP.
6. Pipetear 5 µL de cada CAP en cada pocillo CAP.

Asegúrese de sellar bien los controles para evitar la contaminación de los pocillos vecinos.

- Pipetear 5 µL de agua libre de nucleasa en cada pozo CAN.
- Pipetear 5 µL de cada muestra de ADN diluida en su pocillo designado.

El volumen final en cada pocillo debe ser de 20 µL.

- Sellar la placa y centrifugar durante 1 minuto a velocidad máxima. Asegurarse de precipitar al fondo del tubo toda la mezcla de modo que no queden gotas en la tapa o en las paredes del tubo.

Finalmente, transfiera la placa a la máquina de PCR en tiempo real e inicie la ejecución utilizando los siguientes ajustes:

Etapa		Tiempo	Temperatura
Activación enzimática		3 min	95°C
Amplificación (40 ciclos)	Desnaturalización del ADN	10 seg	95°C
	Hibridación del primer	60 seg	63°C
	Extensión del primer *	30 seg	72°C
Curva de disociación*		0.2 - 0.5°C etapas	72°C → 95°C

\*Medir la señal fluorescente, utilizando el canal FAM o SYBR/FAM, después de cada ciclo y después de cada incremento de temperatura de la curva de disociación de PCR.

### 5.7.3. Interpretación de resultados

**Nota importante:** para una correcta interpretación de los resultados, siempre:

- Comprobar si los resultados de los controles prueban

- Combinar los análisis de curvas de amplificación con los análisis de curvas de disociación.
- Confirmar que las temperaturas de disociación de las muestras coinciden con las temperaturas de disociación de los CAP.

#### Esquema de análisis rápido de resultados

- Comprobar los valores de Cq en los pocillos CAP y CAN

Pocillo	Intensidad de la señal (Cq)	Interpretación
Foc RT4 CAP	25 o menos	Aprobado
	Sobre 25 (o no Cq)	Error*
Foc RT4 CAN	No Cq	Aprobado
	Menos de 40	Error*
Banana COX CAP	25 o menos	Aprobado
	Sobre 25 (o no Cq)	Error*
Banana COX CAN	No Cq	Aprobado
	Menos de 40	Error*

### Si los resultados de CAP y CAN son válidos



2) Comprobar los valores de Cq en los pocillos de muestra

Pocillo	Intensidad de la señal (Cq)	Interpretación
Foc RT4	40 o menos	<b>Aprobado</b>
	No Cq	<b>No se detecta Foc RT4</b>
Banana COX	35 o menos	Aprobado
	Sobre 35 (o no Cq)	Falló*



3) Ver temperatura de disociación

Pocillo	Td	Interpretación
Foc RT4	Td difiere no más de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ de Td de CAP	<b>Foc RT4 detectada</b>
	Td difiere más de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ de Td de CAP	<b>Foc RT4 no detectada</b>
Banana COX	Td difiere no más de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ de Td de CAP	<b>COX detectada</b>
	Td difiere más de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ de Td de CAP	<b>COX no detectada</b>

\* Ver resolución de problemas

### Interpretación

#### **Pocillo de control de amplificación positivo (CAP)**

Si el ensayo se realizó correctamente, una señal del pocillo CAP debería tener un valor de Cq de 25 o menos.

#### **Pocillo de control de amplificación negativo (CAN)**

Una señal del pocillo de CAN indica la contaminación de ADN de la mezcla de PCR o pocillo de CAN.

#### **Pocillos de muestra**

Una señal de amplificación del ensayo Foc RT4 indica que el ADN del hongo está presente en la muestra. La detección de Foc RT4 debe confirmarse mediante el análisis de la curva de disociación.

La ausencia de una señal indica que no había ADN del Foc RT4 en la muestra.

Una señal de amplificación del ensayo Banana COX indica que el ADN del tejido vegetal está presente en la muestra. La detección de COX del ba-

nano debe ser confirmado mediante el análisis de la curva de disociación.

La ausencia de una señal indica la inhibición o una falla en la preparación del ADN.

**Nota:** a una señal de amplificación más débil corresponde un pico de la curva de disociación más débil.

#### **Temperatura de disociación**

Es esencial comprobar la temperatura de disociación de cada señal para confirmar la detección de Foc RT4 y Banana COX. Esta característica de la tecnología de PCR en tiempo real permite una detección confiable del patógeno del banano.

Una temperatura de disociación que difiere del PAC por más de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  indica que la muestra no contiene ADN de Foc RT4 o tejido de planta de banano. La señal debe ser tratada como "No Cq" (Foc RT4 o Banana COX no detectado). Una señal cuya temperatura de fusión no se puede determinar, también debe ser tratada como "No Cq".

**Recuerde:** ¡Cuanto más bajo es el valor de Cq, más fuerte es la señal!

#### 5.7.4. Prediagnóstico molecular mediante PCR tiempo real con primers FocR4T primers y sonda FWB-R4T

Estandarizado de Aguayo et al. (2017)

Esta PCR fue diseñada para detectar el VCG 01213/16 y 0121 basado en el locus del mutante W2987 desarrollado por Li et al., (2013). Se tienen indicios de que este gen puede estar involucrado en la patogenicidad del R4T, pero más pruebas son requeridas para confirmar. Usando este gen putativo de patogenicidad, se realizó el diseño de los primers y la sonda. Se realizaron pruebas de optimización usando el método Taguchi para posteriormente validarlos según el estándar PM7/98 de la Organización de Protección Vegetal de Europa y el Mediterráneo (EPPO). La validación determinó la especificidad, sensibilidad, reproducibilidad. Adicionalmente se incluye un control interno cuyos primers y sonda, 18S, están diseñados sobre una región altamente conservada dentro del ADN ribosómico en plantas y hongos, por lo tanto, servirá para verificar la calidad de las extracciones en ambos casos (loos et al. 2009).

A continuación, los requerimientos para ejecución del ensayo del qPCR.

#### Materiales

- Centrifuga de microtubos y placas de 96 pocillos
- Pipetas y puntas de filtro correspondientes para volúmenes de 1-1000µl
- Tubos de microcentrífuga
- Placas y sellos para qPCR o tubos para qPCR
- Máquina para PCR en tiempo real
- Agua libre de nucleasas
- Vortex

Las condiciones de montaje de la reacción y manipulación deben ser llevadas a cabo en cabina de flujo, así como el flujo de trabajo debe proveer las mejores condiciones para el ensayo.

A continuación, se presentan las secuencias de los primers y sondas usados para la amplificación en el locus W2987 y del control interno 18S del ADN (planta u hongo).

Región blanco	Nombre	Secuencias (5'-3')	Fragmento esperado
Gen codifica para hipotética proteína (W2987)	FWB-R4T F	5'- CGGTCTCGGCCAAATCTGATT - 3'	180pb
	FWB-R4T R	5'- ACGACTTATCTAGCGGTTGATGTG - 3'	
	Sonda FWB-R4T P	5'- ACCCTTCAACTCCACTC GATCGCA - 3'	
18S ribosomal (planta u hongo)	18S uni F	5'- GCAAGGCTGAACTTAAAGGAA - 3'	150pb
	18S uni R	5'- CCACCACCCATAGAATCAAGA - 3'	
	18S uni P	5'- ACGGAAGGGCACCAC CAGGAGT - 3'	

#### Parámetros PCR para un volumen final de 20µl

Reactivo	Concentración final
H <sub>2</sub> O	-
Mix tiempo real	1X
Primer FWB-R4T F	0.3 µM
Primer FWB-R4T R	0.3 µM
Sonda* FWB-R4T P	0.3 µM
ADN Molde	10-50 ng
Volumen final	20 µL

\* FAM

Reactivo	Concentración final
H <sub>2</sub> O	-
Mix tiempo real	1X
Primer 18S uni F	0.3 µM
Primer 18S uni R	0.3 µM
Sonda* 18S uni P	0.3 µM
ADN Molde	10-50 ng
Volumen final	20 µL

\* JOE

Los parámetros de corrida son una recomendación del Laboratorio de Biología Molecular de la Agencia de Regulación y control Fito y Zoonosanitario de Ecuador, sin embargo, son adaptables a las condiciones propias de cada laboratorio según su disponibilidad

de equipos y reactivos.

Ambos ensayos (R4T y 18S) se pueden realizar simultáneamente en una sola ejecución de PCR en tubos separados.

### Perfil térmico

Nº de ciclos	Temperatura °C	Tiempo min: seg
1	95	10:00
45 veces	95	00:10
	60 (Captación de fluorescencia)	00:40
1	40	00:10

### Resultados esperados

Pocillo	Intensidad de señal (Cq)	Interpretación
Control Positivo FOC R4T	≤ 35	Aprobado
	> 35 o no Cq	Error*
Control Negativo FOC R4T	No Cq	Aprobado
	< 40	Error*
Control Positivo 18S	≤ 40	Aprobado
	> 40 o no Cq	Error*
Control Negativo 18S	No Cq	Aprobado
	< 40	Error*

**Si los resultados de CAP y CAN aprueban**

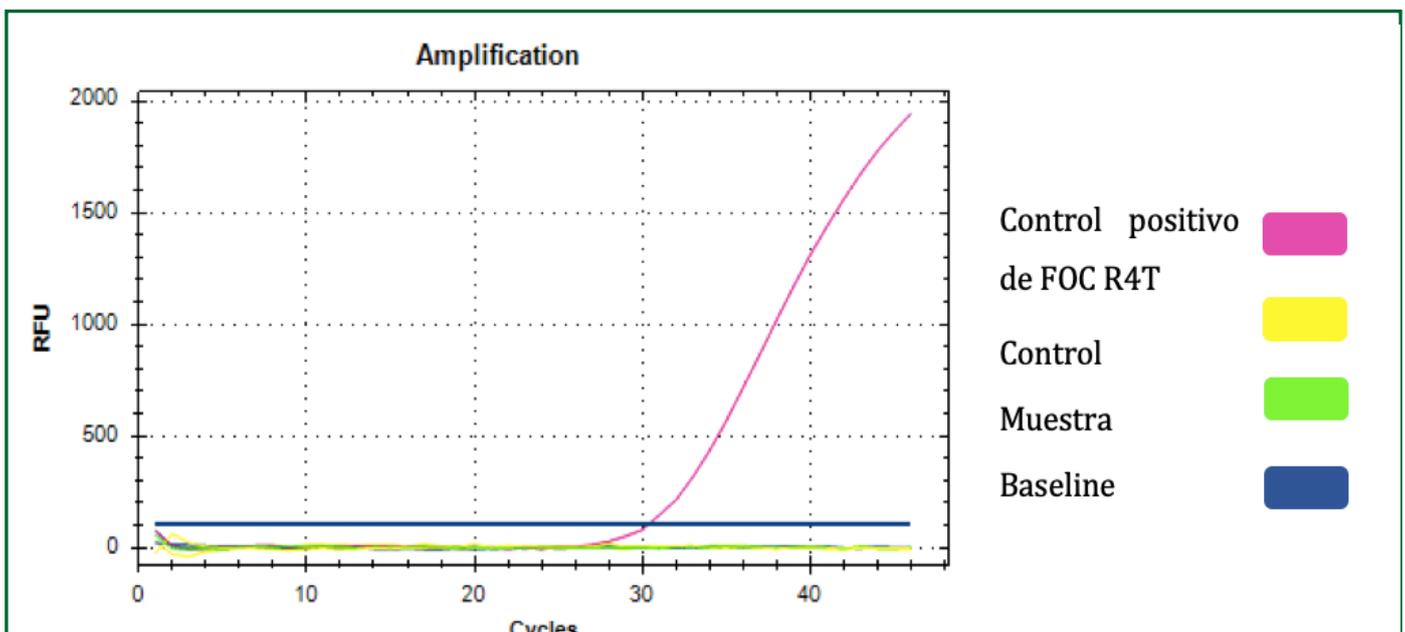


Comprobar los valores de Cq en los pocillos de muestra

Pocillo	Intensidad de señal (Cq)	Interpretación
FOC R4T	≤ 40	POSITIVO
	No Cq	NEGATIVO
18S	≤ 40	Aprobado
	> 40 o no Cq	Error*

Los resultados se aceptarán cuando:

- El control positivo de Foc R4T presente una curva de amplificación de forma sigmoidea con valores de Cq ≤ 35.
- El control positivo para 18S presente una curva de amplificación de forma sigmoidea con valores de Cq ≤ 40
- Los controles negativos(CAN) tanto de Foc R4T y 18S, no presenten curva de amplificación, es decir, Cq = 0
- Una muestra resultará positiva cuando presente una curva de forma sigmoidea con un valor de Cq ≤ 40 para Foc R4T y 18S.
- Una muestra resultará negativa cuando no presente curva de amplificación, es decir, Cq = 0 para Foc R4T y presente una curva de amplificación de forma sigmoidea con un valor de Ct ≤ 40 para 18S.



**Figura 23:** qPCR Aguayo *et al.*, 2017 primers FWB-R4T F / R y sonda FWB-R4T P.

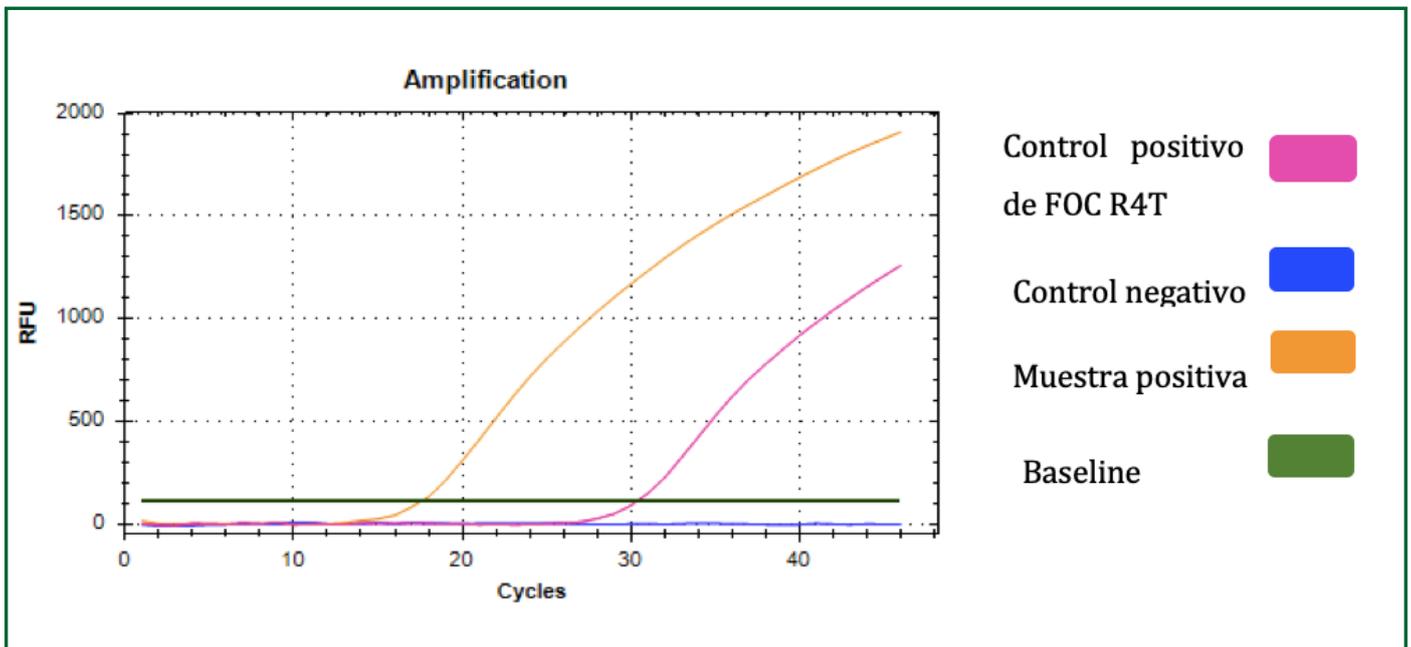


Figura 24: qPCR loos *et al.*, 2009 primers 18S uni F/ R y sonda 18S uni P

### 5.8. Prediagnóstico mediante técnica LAMP

Protocolo original en inglés suministrado amablemente por el equipo LAMP de la Universidad de Wageningen .

Después de la extracción de ADN utilizando el protocolo recomendado por los desarrolladores del kit LAMP o la obtención de ADN por cualquier otro protocolo. La prueba suministra resultados en un promedio de tiempo de entre 25 a 30 minutos. La interpretación de los resultados es bastante simple. Un ejemplo real de la amplificación obtenida para el caso de Colombia se puede observar en la figura 32C.

User protocol for the detection of *Fusarium odoratissimum* Tropical Race 4 (R4T) using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

#### Precautions:

- Read the protocol carefully before the first-time use.
- Store all kit components at the recommended storage temperature.
- Mix the Extraction buffer and Chelex resin always before every pipetting step (Chelex quickly sediments).
- Wear gloves when following the extraction pro-



Figura 25: Imagen del equipo utilizado para ejecutar protocolo LAMP ara R4T

protocol and dispose of these gloves as biological waste afterwards. Do not touch samples directly if possible to prevent cross contamination. If not possible and gloves and samples come into contact then change gloves between every sample.

- Do not touch the bottom of the Genie reaction strips with bare hands.
- Never open the Genie reaction strips after the LAMP reaction has been carried out.
- This kit is for research purposes only (RUO).

### Supplied Materials:

- Extraction buffer (store at -20°C before first use, store one month at 4°C once thawed).
- Chelex resin (mix with thawed extraction buffer before first use).
- Extraction tube (red cap)
- Sample dilution buffer (clear cap)
- Enzyme mix (Purple cap, store at 4°C)
- Resuspension buffer (Green cap, store at 4 °C)
- Test strip “R4T assay” (store at 4°C)
- Test strip “Cox assay” (internal control) (store at 4°C)

### Materials not included:

- Genie II LAMP device (OptiGene Limited).
- Water bath or dry heat block suitable for the provided 5 mL extraction tubes.
- Pipettes and tips for volumes 5-1000 µL.
- Negative control (PCR grade water)

### Preparations:

- Annotate where which sample is located in the strip(s). One kit is sufficient for 6 samples.

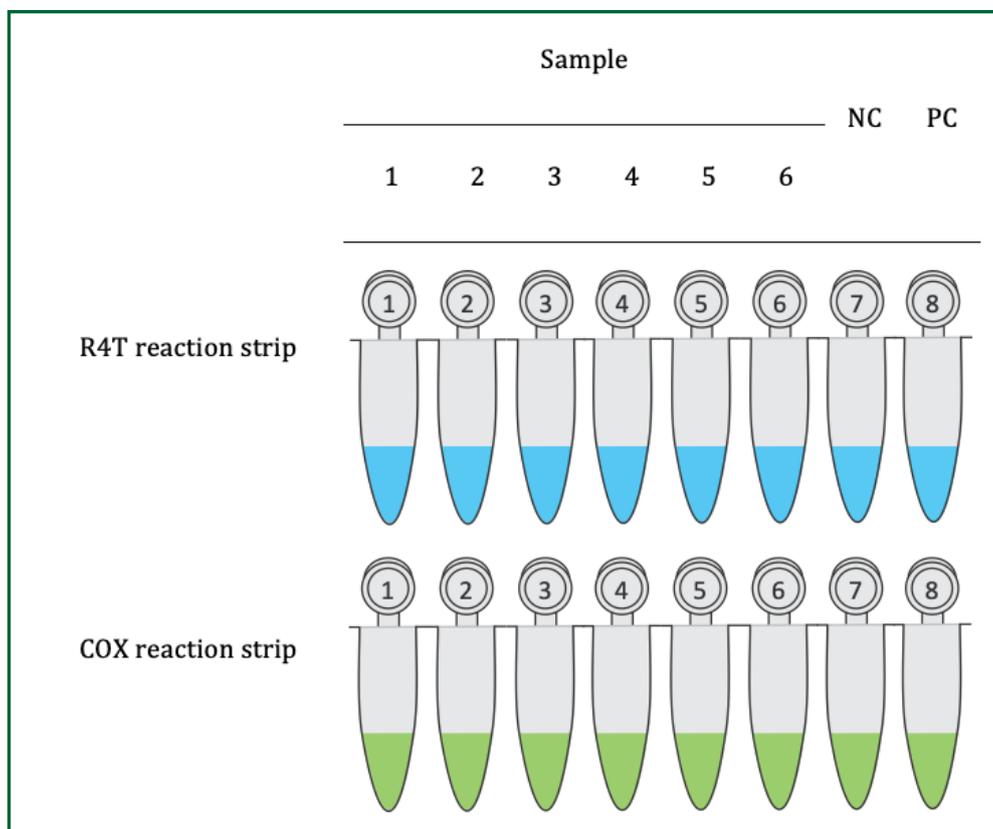
- Before first use of the kit, fully thaw the extraction buffer. Mix Chelex resin with extraction buffer (0.1g/ml) and mix thoroughly, the prepared buffer can be stored for 1 month at 4 °C.
- Pre-heat the water bath or heating block to 95 °C.

### Extraction protocol:

1. For each sample transfer 1 mL of prepared extraction buffer to an extraction tube (red cap).
2. Add up to 1 cm<sup>3</sup> of banana plant material to the extraction tube and shaking the tube thoroughly by hand for 60 seconds.
3. Incubate the extraction tube for 20 minutes in the 95 °C water bath or heating block.
4. Mix the contents of the extraction tube and pipet 60 µL of extracted sample into a sample dilution buffer tube (clear cap). This creates diluted sample required for the LAMP reaction.
5. Continue with the LAMP protocol.

### LAMP protocol:

1. Rehydrate the two tubes with enzyme mix by pipetting 200 µl resuspension buffer (green cap) to the tubes with enzyme mix (purple cap).
2. Take the test strips out of the sealed black bags, place the strip in the strip holders and open the tubes (strips can be marked on the protruding edges).
3. When the enzyme mix is clear, mix the solution gently and add 20 µl to well 1 to 6 of the strips. Use different pipette tips for the R4T and Cox strips.
4. For each sample or control, add
  - a. 5 µL diluted sample to one well in the R4T strip.
  - b. 5 µL diluted sample to the same well in the COX strip.
  - c. 25 µl enzyme mix to well 7 and 8 of the strip. Use different pipette tips for the R4T and Cox strips.



Example pipetting scheme of both R4T and COX LAMP reaction strips.

5. Close the Genie reaction strips fully by firmly pressing on the lids. Never open the Genie reaction strips after this step.
6. Mix the contents of the strips by flicking the strips. Then make sure that the reaction mix is located in the bottom of the wells, for example by tapping the top of the lids. Do not touch the bottom of the wells with bare hands.
7. Place both strips in the Genie II device and run the LAMP + annealing protocol.

#### Waste disposal guidelines:

- When the LAMP run is finished dispose of the strips in a closed container to prevent contamination with amplicon.
- The extraction tubes with the homogenized plant material need to be discarded as biohazard waste. After making the dilution the extract cannot

be re-used or stored due to the high pH of the extraction buffer.

The diluted samples can be stored at 4 °C for one week and at – 20 °C for up to one year. When storage of the diluted sample is not desired then diluted samples should be discarded as biohazard waste

See the output of a real example on Figure 32 B.

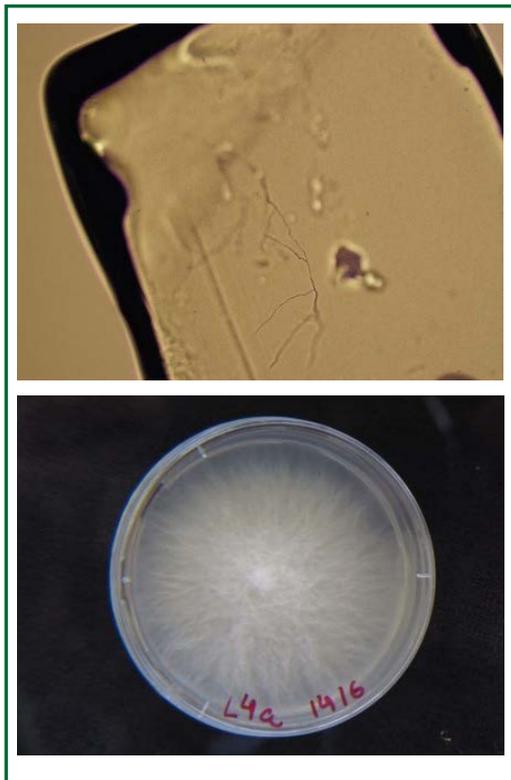
### 5.9. Producción de colonias de espora única (monospóricas)

*Estandarizado por Fernando García-Bastidas, Emiro Ortiz, Mariluz Ayala, Oscar Dix.*

#### Método tradicional “rayado”

A partir de colonias frescas creciendo en PDA recoja una raspa de hifas esporuladas utilizando una punta para micropipeta, un palillo de dientes o un loop de laboratorio.

1. Deposite la punta en 1.000 ml de agua destilada
2. Pipetear directamente sobre platos de **water agar**<sup>11</sup> o utilice un loop (bucle) de laboratorio y haga un rayado.
3. Incubar los platos con el water agar durante 24 horas a 25°C.
4. Revise los platos bajo el microscopio y marque las esporas germinadas que desea seleccionar.
5. Los conidios seleccionados se transfieren con una aguja estéril o un bisturí hacia un nuevo plato con PDA (**Figura 26**).

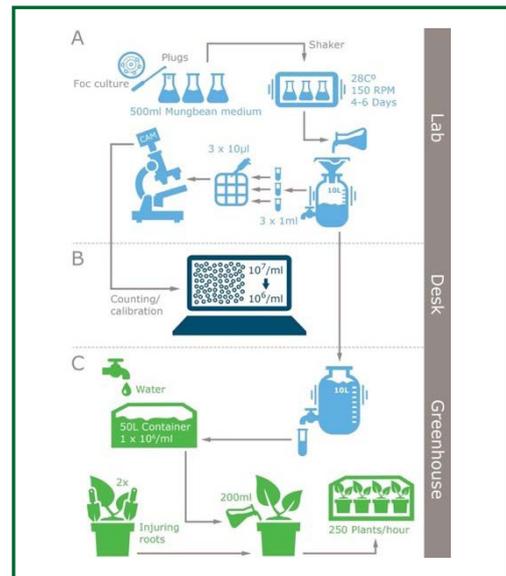


**Figura 26.** Arriba, espóra única germinando en un trozo de PDA transferido hacia un plato de Petri nuevo. Abajo, Petri con crecimiento micelial proveniente de una espóra única después de 10 días.

11. 1.5 o 2% agar: 15 gr de agar por litro de agua desionizada.  
 12. Adicione 2 g de Mung beans por cada 400 mL de agua destilada, Autoclave. A temperatura ambiente, inocule el medio con piezas de PDA colonizado por *Fusarium* spp. Incubar por 3 días a 27°C. Filtre y cuantifique el número de esporas bajo el microscopio.

### Método esporas en medio líquido

6. Para este procedimiento es necesario producir una suspensión de esporas, el método recomendado es el uso del caldo de cultivo utilizando Mung beans<sup>12</sup> (García-Bastidas et al., 2019) (**Figuras 27 y 28**).



**Figura 27.** Esquema de producción masiva de esporas para inoculaciones, extracción de ADN o producción de esporas únicas (monosporicos).

Una vez se obtenga el filtrado hacer una dilución 10X y esparcir en el plato con water agar.



**Figura 28.** Esporas únicas germinando a partir de medio líquido.

**Nota:** una vez se obtengan colonias de espóra única, se debe realizar otra ronda de pre-diagnóstico para garantizar que la espóra seleccionada corresponde a R4T.

### Método esporas con incubación vertical

Este método es muy efectivo para conseguir una separación adecuada de las esporas y facilitar su selección individual. Se debe seguir el siguiente protocolo

1. Obtener un cultivo puro del hongo a analizar en PDA (debe estar libre de bacterias u otros hongos contaminantes).
2. Una vez la colonia pura tenga 3-5 días de siembra, en la cabina de flujo laminar realizar un raspado del micelio con un asa estéril (aproximadamente  $\frac{1}{4}$  de la colonia).
3. Transferir el raspado de micelio a un tubo de ensayo con 10 ml de agua estéril y mezclar con un vórtex o una agitación rápida al tubo de ensayo.
4. Hacer una señal con un marcador en un extremo de una caja de Petri con agar agua (garantizar que la lámina de agar sea delgada) para indicar el punto en donde se adicionará la suspensión

conidial.

5. Vertir parte del volumen de suspensión conidial en el sitio marcado del agar agua (puede ser directamente o con ayuda de una micropipeta).
6. Colocar la caja en posición vertical de tal manera, que el punto marcado quede localizado hacia arriba (**Figura 28**), decantando la suspensión conidial, de tal manera que el líquido se disperse sobre la superficie del medio. Si se presenta un exceso de líquido en el borde inferior de la caja, eliminarlo con la ayuda de papel absorbente.
7. Sellar las cajas con vinipel o parafilm e incubarlas en posición vertical, a temperatura ambiente durante 6 -24 horas.
8. Pasado el tiempo, observar al microscopio las cajas por el revés y marcar con un punto las esporas germinadas que se encuentren más separadas.



**Figura 29.** Medio agar agua dispuesto en posición vertical. La flecha roja indica el área de descarga de la suspensión conidial

9. Abrir las cajas donde se hayan detectado esporas germinadas y localizarlas con la ayuda del microscopio. Observar de menor a mayor aumento (**Figura 29**). (Nota: es importante que el microscopio este ubicado en un sitio que evite la contaminación de los cultivos, así mismo, se debe trabajar con tapabocas).



**Figura 30.** Localización de esporas individuales germinadas con el microscopio (4X): arriba a las 6 horas; abajo a las 24 horas.

10. Girar el condensador de tal manera que se cierre el campo de luz sobre una de las esporas germinadas (**Figura 30**).
11. Con la ayuda de un asa bacteriológica flameada, marcar el círculo en donde se encuentre la espora germinada.
12. Cortar con el asa flameada el círculo de agar que contiene la espora germinada (alternativamente se puede hacer con ayuda de un bisturí).

13. Transferir el bloque de agar a una nueva caja con medio de cultivo SNA para conservación e - Incubar a 25°C bajo oscuridad de 48-72 horas.



**Figura 31.** Haz de luz localizado sobre una espora germinada.

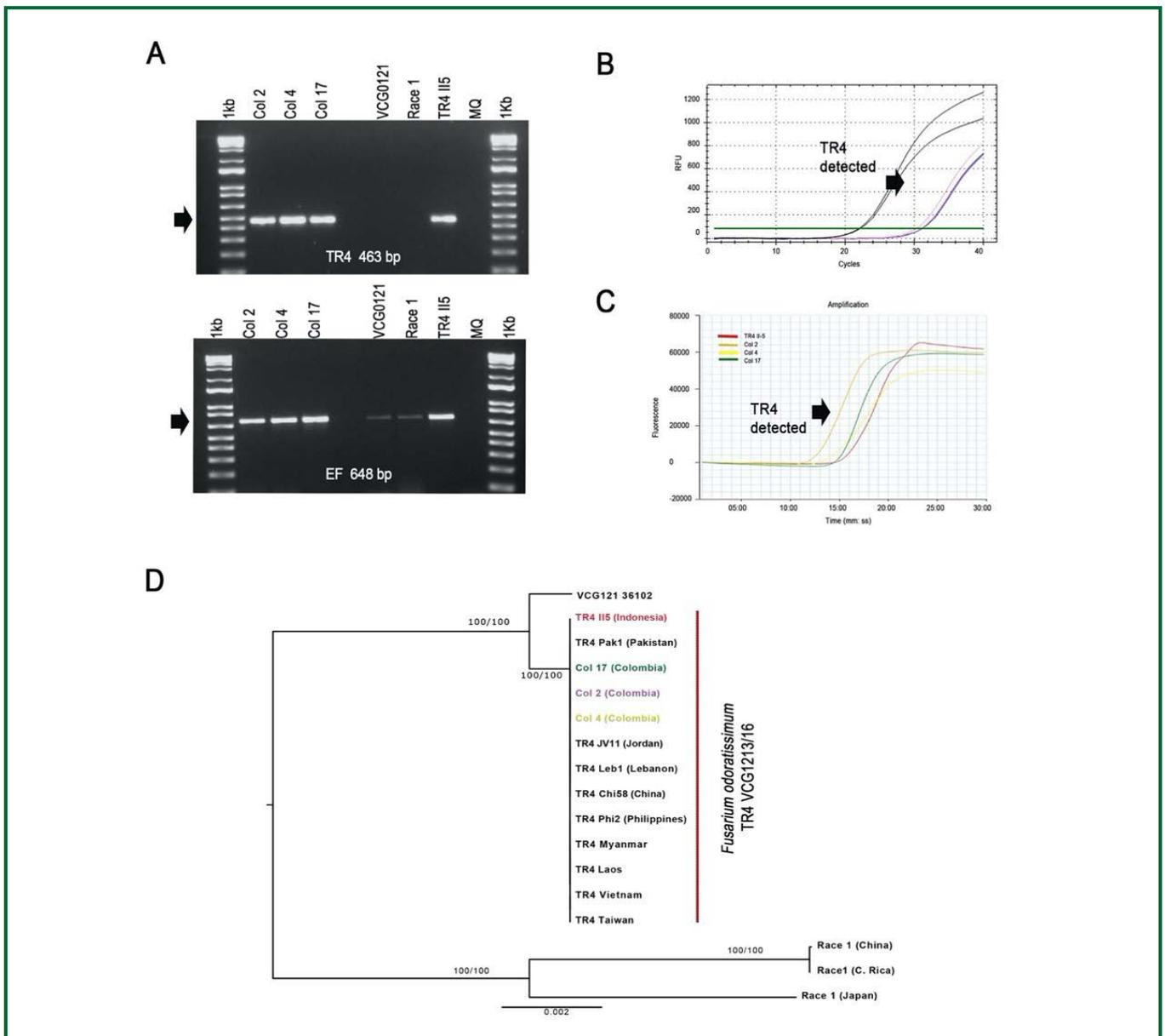
## 5.10. Diagnóstico completo para reporte oficial o nueva incurción en país libre de R4T

### Etapa 1.

Prediagnóstico Molecular (pruebas de PCR y similares)

El diagnóstico inicial se lleva a cabo utilizando los

primers para PCR tiempo final disponibles para detección de R4T ver sección protocolos. **De ser positivas las muestras se verificarán con por lo menos dos pruebas adicionales independientes para reducir la posibilidad de falsos positivos**, así: i) PCR convencional y PCR en tiempo real y, ii) la prueba LAMP. Las pruebas se pueden realizar en material vegetal, pero se recomienda realizar test sobre colonias de espora única (**Ver protocolos y figura 32 A - C**).



**Figura 32.** Pruebas para diagnóstico de Fusarium Raza 4 Tropical. A. Pruebas PCR convencional, B. Pruebas de PCR en tiempo real C. Prueba LAMP. D. resultado del árbol filogenético basado en secuenciación de genomas de cepas de Raza 4 Tropical en distintas localidades. tomado de (Garcia-Bastidas *et al.* 2019)

## Etapa 2.

### Secuenciación y análisis filogenético o prueba de compatibilidad vegetativa (VCGs)

Teniendo en cuenta que *Fusarium* Raza 4 Tropical pertenece a un linaje clonal asociado única y exclusivamente al VCG01213/16, la estrategia seleccionada por nuestro grupo para una confirmación precisa y rápida es la secuenciación del genoma completo. Las pruebas de VCG también son válidas para el reporte oficial.

Los aislados individuales positivos en el prediagnóstico se destinan a producción de micelio o esporas para la obtención de ADN para la secuenciación. Tres a seis microgramos de ADN son necesarios. Cualquier plataforma de secuenciación de nueva generación es adecuada, se recomienda secuenciación de fragmentos cortos (Illumina). Para el caso de Illumina, el ADN genómico de las muestras se utiliza como material inicial para la preparación de librerías. Las librerías se generan utilizando el kit de Illumina Nextera DNA Flex. Por cada muestra 100ng de ADN genómico se utiliza en combinación con 5 ciclos de PCR siguiendo instrucciones del fabricante. Las librerías con código de barras se agrupan de manera equimolar y se realiza un ciclo de qPCR para el control de calidad. Posteriormente, las muestras se secuencian utilizando el kit MiSeq reagent Kit v3 con 2 x 150 pb. Los datos se demultiplexan en archivos. fastq individuales por muestra.

Los datos obtenidos se analizan por comparación utilizando genomas de *Fusarium* spp. disponibles que corresponden a las incursiones de la Raza 4 Tropical diagnosticada en Jordania, Indonesia, Pakistán, Las Filipinas, Líbano, China, Vietnam, Laos and Myanmar. Adicionalmente, se incluyen cepas control como el Foc NRRL36102 asociado a raza 4 subtropical, cepas asociada a la raza 1 y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* 4287 el cual es un hongo patógeno del patosistema Fusarium-Tomate (**Figura 32D**) (Zheng *et al.*, 2018, García-Bastidas *et al.*, 2019).

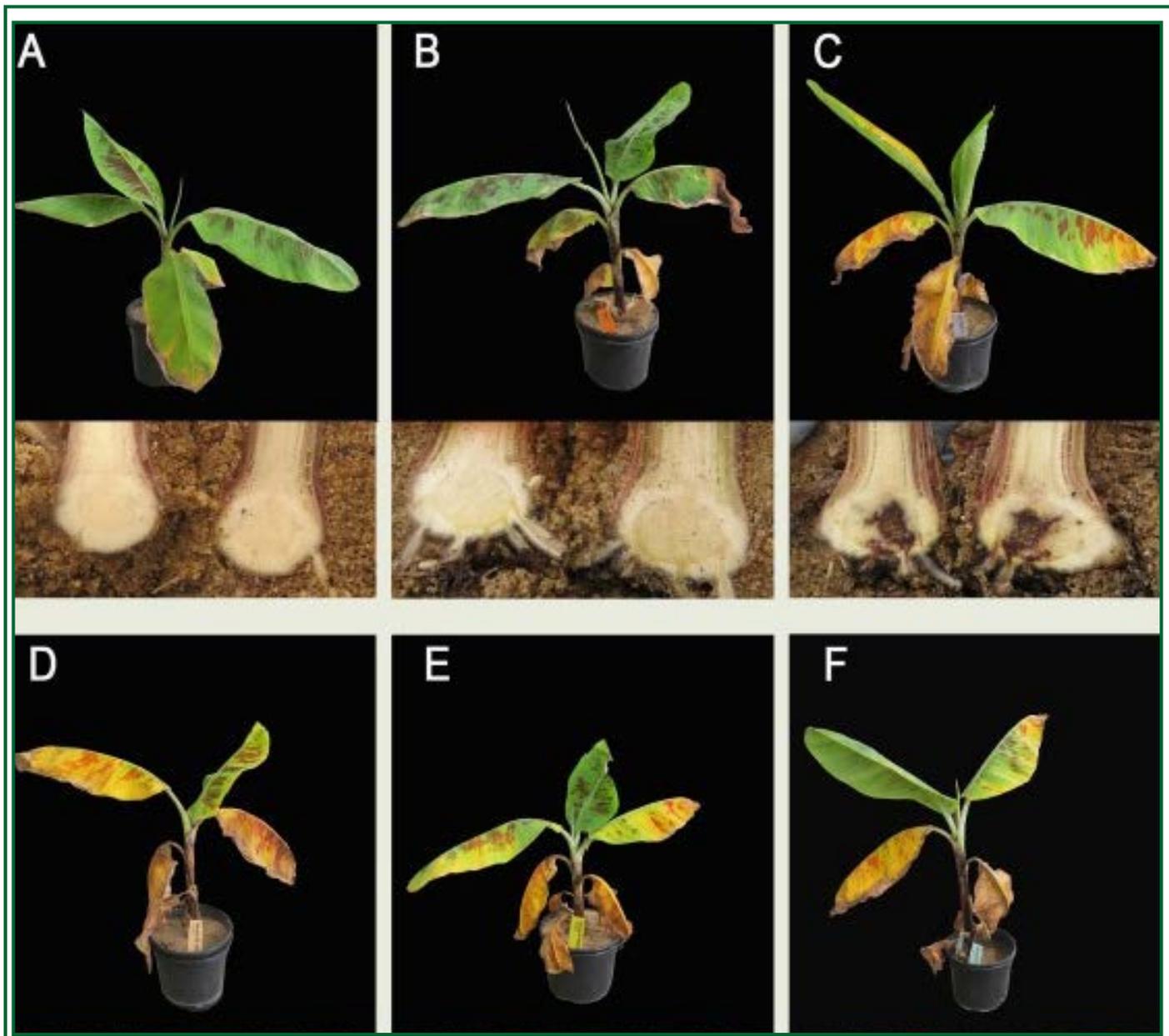
## Etapa 3.

### Pruebas de patogenicidad

Con el fin de verificar la virulencia de las cepas aisladas y completar los postulados de Koch, serán seleccionadas plantas sanas de la variedad 'Grand Naine' (Cavendish-AAA) o cualquier otro cultivar del grupo Cavendish, para su inoculación.

Adicionalmente las plantas inoculadas con la Raza 4 Tropical de referencia (II-5 Indonesia) son usadas como control positivo y las cepas asociadas a la raza 1 control negativo. Las plantas tratadas con agua serán un control negativo adicional.

Por lo menos tres plantas de entre 1.5 a 3 meses de edad y con apariencia similar serán seleccionadas e inoculadas siguiendo las indicaciones reportadas en (García-Bastidas *et al.*, 2019). Después de la inoculación, las plantas se monitorean semanalmente. Cinco a seis semanas después de la inoculación las plantas se evalúan por síntomas externos e internos. Las muestras provenientes de plantas inoculadas con raza 1, Raza 4 Tropical y controles serán tomadas para otra ronda de prediagnóstico (**Figura 33**).



**Figura 33.** Resultado de la prueba de patogenicidad para un reporte inicial de la enfermedad. A y B controles negativos agua y raza 1 respectivamente. C. control positivo (R4T indonesia II-5) y D – F cepas bajo estudio. (Tomado de García-bastidas *et al.*, 2019)

## 5.11. Medidas de bioseguridad sugeridas para países con introducciones recientes de *Fusarium* R4T

### 5.11.1. Bioseguridad en campo

- No ingresar o transportar plantas o partes de éstas (semillas, cormos, frutos, tallos, etc.) a cualquier área de producción agrícola, sin los permisos fitosanitarios de la Organización Nacional de Protección Fitosanitaria (ONPF).
- No movilizar suelo o sustratos de uso agrícola.
- No ingresar o movilizar artesanías elaboradas con material vegetal, sin la autorización de la ONPF.
- No ingresar especímenes de animales (artrópodos) o de microorganismos en cualquiera de sus formas o presentaciones, sin los permisos previos de la ONPF y/o las autoridades competentes.
- No llevar la misma ropa y calzado utilizado para visitar otros sistemas productivos o en el extranjero.
- Si va a visitar un sistema productivo en cualquier región del país, solicite botas de caucho y elementos de bioseguridad requeridos según el caso (overoles desechables) para el ingreso y entréguelos al final de su visita para su destrucción o disposición final. De no contar con la bioseguridad adecuada, absténgase de ingresar a las áreas productivas.
- Siga todos los procesos de limpieza y desinfección que le indiquen para el ingreso y durante la visita a cualquier área productiva.
- No tome muestras vegetales o animales, ni manipule plantas o partes de estas dentro de las áreas productivas, sin ser previamente autorizado y sin los elementos de protección adecuados según el caso (guantes, overoles, etc.).

### 5.11.2. Bioseguridad en el laboratorio

De forma general, en los laboratorios de diagnóstico fitosanitario no son implementados sistemas de bioseguridad propios de la contención de microorganismos de importancia cuarentenaria. Sin embargo, es necesario que se considere la adopción de un sistema con un nivel de bioseguridad más alto para los procesos que impliquen la manipulación de organismos cuarentenarios que posean potenciales de dispersión y grados de agresividad tan altos como los de *Fusarium* R4T. Se debería elaborar un plan de contingencia que establezca las medidas de contención en los laboratorios, que permitan una rápida adopción, y esto debe ser incluido dentro del plan general de contingencia del país.

Es importante tener presente que, si se están manipulando organismos cuarentenarios no presentes en el país, se deben extremar las medidas de bioseguridad y las restricciones de acceso al laboratorio. Considerando las prácticas de bioseguridad básicas que se alcanzan a implementar en los laboratorios de Fitopatología, es recomendable destinar una pequeña área del laboratorio que pueda ser de uso exclusiva para la manipulación de organismos cuarentenarios con alto grado de virulencia, de modo que se pueda dar cumplimiento a prácticas correspondientes a un Nivel II y se garantice la contención de los organismos manipulados. A continuación, se describen algunos aspectos para ser considerados en los planes de contención que los laboratorios deben tener disponibles.

- Establecer un área exclusiva dentro del laboratorio donde se puedan desarrollar por lo menos las actividades de inspección de muestras, aislamiento del patógeno, y manipulación del micelio en las fases iniciales de extracción de ADN, que representa un factor crítico frente al riesgo de dispersión.

**Nota:** Es importante que el área de contención disponga de una esclusa<sup>13</sup> que permita la contención de los microorganismos y transferencia segura de elementos con las áreas externas.

13. Compartimento con puerta de entrada y de salida cuyo objetivo es controlar el acceso a áreas de seguridad

- Restringir el acceso al área de contención solo al personal implicado en los procesos de diagnóstico de estos organismos. El mismo, que debe haber sido previamente capacitado en la implementación de las medidas de bioseguridad correspondientes.
- Controlar el acceso al área por medio de formas de registro de ingreso. Si personal diferente al involucrado en las actividades analíticas requiere ingresar, debe ser acompañado por personal autorizado en todo momento. No se permitirá el ingreso de personal ajeno al área de contención mientras se desarrollen actividades analíticas.
- Prohibir la entrada de cualquier elemento de papelería, equipos de fotografía, equipos de cómputo, abrigos, sombreros, mochilas, carteras, etc., en las áreas de contención, ya que estos elementos pueden facilitar el escape o liberación de microorganismos nocivos.
- Eliminar insectos y animales indeseables en el laboratorio (por ejemplo, artrópodos o roedores) que puedan aumentar el riesgo de dispersión en la instalación.
- Para la manipulación de la muestra, el analista deberá contar con elementos de protección personal desechables (overol, cofia, polainas y guantes). Todo ello se debe descartar al terminar la actividad y disponer para autoclavado, así como todos los elementos y materiales que entren en contacto con la muestra.
- Se debe garantizar que los visitantes y empleados usen bata de laboratorio desechable en el área de contención. Estos elementos deben ser desechados al salir del área de contención dentro del laboratorio.
  - o Si hay sospechas de liberación de inóculo al ambiente, asegúrese de que el personal y los visitantes se duchen completamente antes de salir del área o laboratorio. En ese caso limpie y desinfecte la instalación, sus muebles y su equipo con hipoclorito o un desinfectante similar.

### Ingreso de muestras

- El auxiliar administrativo recibe la muestra y la mantiene bajo custodia permanente hasta su codificación y la entrega en manos del analista asignado, manteniendo la custodia permanente.
- Únicamente se deben manipular las bolsas con guantes de un solo uso y por ningún motivo deben ser abiertas en áreas diferentes a la de contención. Los guantes deben ser descartados de manera inmediata en bolsas color rojo, que se dispondrán para manejo como residuo biológico peligroso.
- Al recibir las muestras en el laboratorio se debe proceder a verificar que la caja que contiene la(s) muestra(s) se encuentra completamente sellada, de no ser así, se debe reportar la observación de manera escrita para establecer los riesgos de dispersión asociados al proceso de transporte. Realizar un registro fotográfico del estado general del paquete recibido.
- La bolsa con la muestra debe trasladarse siempre en recipiente (cava) al Laboratorio donde permanecerá mientras deba ser conservada.

### 5.11.3. Manipulación durante el proceso analítico

- La apertura del envío y la revisión de las muestras será responsabilidad del analista designado por el responsable de laboratorio previamente entrenado, dicho procedimiento solo se podrá realizar dentro del laboratorio, en el sitio dispuesto para ello.
- Considerando el riesgo que representa el patógeno, la revisión y el preprocesamiento de las muestras, deberá realizarse dentro de una cabina de seguridad biológica, esta debe ser rigurosamente descontaminada previo y posteriormente al proceso de aislamiento del patógeno.
- Inmediatamente después de desempacar las muestras, se deben autoclavar los elementos

de embalaje, de igual forma se deben desinfectar externamente, con una solución de alcohol o hipoclorito, los elementos que se requieran conservar para el almacenamiento de las muestras. Se recomienda utilizar cajas plásticas desechables, tubos plásticos y demás material que sea de un solo uso.

- Los cultivos y subcultivos de los hongos sospechosos o confirmados se deben guardar dentro de la incubadora previamente dispuestos en cajas con tapa segura, de manera que se reduzca el riesgo de deslizamientos o rupturas accidentales. Los mismos, deben permanecer y ser transportados en dichas cajas hasta que se emitan los resultados. Para el desplazamiento utilizar carro de laboratorio.
- Los cultivos obtenidos, a partir del aislamiento del patógeno, deberán sellarse cuidadosamente y disponerse dentro de bolsa de cierre hermético. Al final del proceso analítico, todos los cultivos deberán ser inactivados por dos ciclos de esterilización en autoclave. En este punto se recomienda tener un especial cuidado con los elementos de protección personal, que deben disponerse tal como se describió antes.
- Para la primera fase del proceso de Extracción de ADN, concerniente a la adición del Buffer, es importante realizar la manipulación en cabina de bioseguridad, ya que en este punto el organismo se encuentra aún vivo.
- Los aislamientos y procedimientos que impliquen la manipulación del microorganismo únicamente se ejecutarán dentro de cabina de seguridad clase IIA (flujo laminar vertical).
- Durante el procedimiento no se podrán emplear documentos, bolígrafos o libros que vayan a ser utilizados en las áreas exteriores (únicamente diligenciamiento de formas propias del laboratorio).
- Se deben extremar las medidas de bioseguridad, teniendo especial cuidado para lavar manos antes de salir del laboratorio, evitar tocar

partes del cuerpo con los guantes, entre otras.

#### 5.11.4 Custodia de las muestras

- La muestra se mantendrá permanentemente bajo la custodia del analista designado, quien, además, deberá controlar y mantener cuantificadas las muestras y los cultivos, indicando en su bitácora claramente los duplicados, réplicas y cajas Petri con el hongo que se han producido y su estado.
- Se debe registrar quién entra al área de contención, hora de ingreso y salida, pero dejando afuera el documento y los esferos.
- Las cavas con muestra y las cajas contenedoras de los cultivos deberán ser rotuladas de manera visible indicando el riesgo biológico existente y el nombre de la plaga. De ser posible se incubarán /almacenarán en incubadora/nevera separada y bajo llave y custodia del analista encargado de su procesamiento.
- Para los procesos de aislamiento, todo el material vegetal remanente, así como los recipientes, materiales y demás, que estuvieron en contacto con la(s) muestra(s), deberán ser dispuestos para esterilización. La esterilización se llevará a cabo mediante tratamiento por calor húmedo en autoclave a 121°C durante 30 minutos, realizando dos ciclos continuos.
- Si durante el proceso de inspección y aislamiento de la muestra se generan residuos líquidos, estos no se deben descartar bajo ninguna circunstancia por el grifo o agua corriente. Todo desecho líquido debe ser colectado en un recipiente con tapa que tenga tres veces la capacidad en volumen del líquido a contener de manera que pueda ser autoclavado sin riesgo de desbordar, y posteriormente se debe disponer con la empresa gestora.
- Luego del trabajo con la muestra y/o los aislamientos siempre se realizará limpieza completa de la cabina y esterilización mediante UV duran-

te 45 minutos.

- La muestra y las cajas Petri con cultivos deben ser esterilizados en autoclave una vez se finalice el procedimiento y solo se conservarán aislamientos para usos con autorización expresa previa del Director Técnico.
- Todas las superficies empleadas durante el procedimiento se deben limpiar con Virkon S en dilución 1:100 mínimo (1%) dejando actuar el producto durante un minuto.
- Destruya todos los remanentes de las muestras y cultivos del organismo.
- Si es necesario preservar el organismo aislado es necesario preservarlos en viales con tapa de rosca o equivalente en glicerol al 25% y a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Todo material que haya estado en contacto con la muestra debe ser esterilizado como material de riesgo biológico, de manera inmediata una vez finalice su uso.



## Agradecimientos:

Los autores expresan su mayor gratitud a todos los que directa e indirectamente han contribuido al desarrollo de este trabajo. Los autores agradecen especialmente a la Secretaría General de la Comunidad Andina, liderada por el Secretario General, Jorge Hernando Pedraza, así mismo al Embajador Clarems Endara, a cargo de la Dirección General 1 y a Ramón Canizares por la colaboración brindada durante el taller en la región.

De la misma manera los autores expresan su agradecimiento a:

- Las Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria de los Países Miembros de la Comunidad Andina, destacándose el apoyo de los ingenieros: Jorge Hernán Palacino del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Luisa Betty Mattos y Julio Ernesto Marín del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) del Perú; y, Luis Sánchez Shimura del Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria (SENASAG) de Bolivia.
- La Agencia Ecuatoriana de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD), en cabeza de su Director Ejecutivo, el Ing. Patricio Almeida, así como a la Ing. Mónica Gallo Lara - Coordinadora General de Sanidad Vegetal y la Ing. Carla Moreno – Coordinadora General de Laboratorios, quienes hicieron posible que el Ecuador fungiera como anfitrión del taller.
- Los funcionarios de AGROCALIDAD, en particular de la Ing. Ana Garrido – Directora de Diagnóstico Vegetal, la Lic. Sabrina Méndez – Analista Lab. Biología Molecular, el Ing. Hernando Regalado - responsable técnico del Lab. Fitopatología, a Andrea Bastidas del área de Relaciones Internacionales, a los ingenieros Alexander Toaza y Jairo Guevara, Analistas del Lab. de Fitopatología, por su invaluable ayuda en la organización del taller y la hospitalidad brindada.
- La colaboración de la Universidad de Wageningen en cabeza del Dr. Gert Kema y colaboradores por la facilitación del equipo y reactivos suministrados para la prueba LAMP, en especial se agradece al Equipo de “Biointeractions and Plant Health”: Dr. Jose van Beckhoven, Dr. Cor Schoen, ing. Willem Stol, ing. Yvonne Griekspoor, ing. Stefan Aanstoot, ing. Odette Mendes .
- Clear Detections por facilitar material de manera gratuita para la prueba de prediagnosis con el kit en tiempo real .
- A Los Doctores Arjen Van Tunen, Anker Sørensen y Rene Hosftede de KeyGene en Holanda, por el apoyo y el tiempo brindado al tutor para desplazarse al sitio del taller y brindar el tiempo para finalizar este documento.



## 6. Bibliografía

### REFERENCIAS CITADAS

- Aguayo, J., *et al.* (2017). "Development of a hydrolysis probe-based real-time assay for the detection of tropical strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4." *PLoS ONE* **12**(2): e0171767.
- Baayen, R. P., *et al.* (2000). "Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease." *Phytopathology* **90**(8): 891-900.
- Bakry, F., *et al.* (2009). Genetic improvement of banana. *Breeding plantation tree crops: tropical species*. Springer: 3-50.
- Bakry, F. and J.-P. Horry (2014). *Advances in genomics: applications to banana breeding*. XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): IX 1114.
- Bancroft, J. (1876). "Report of the board appointed to enquire into the cause of disease affecting livestock and plants." *Votes and Proceedings* 1877.(3): 1011-1038.
- Bentley, S., *et al.* (1998). "Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense analyzed by DNA fingerprinting." *Phytopathology* **88**(12): 1283-1293.
- Booth, C. (1971). "The genus *Fusarium*." *The genus Fusarium*.
- Brake, V., *et al.* (1990). "Vegetative compatibility groups within Australian populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, the cause of Fusarium wilt of bananas." *Crop and Pasture Science* **41**(5): 863-870.
- Bruns, T. and M. Gardes (1993). "Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi—taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi." *Molecular ecology* **2**(4): 233-242.
- Buddenhagen, I. (2009). "Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense and history of introduction of 'tropical race 4' to better manage banana production." *Acta Horticulturae* **828**: 193-204.
- Butler, D. (2013). "Fungus threatens top banana." *Nature* **504**(7479): 195-196.
- Carvalho, L. C., *et al.* (2019). "Molecular diagnostics of banana Fusarium wilt targeting Secreted-in-Xylem genes." *Frontiers in Plant Science* **10**: 547.
- Cheesman, E. (1948). "Classification of the bananas." *Kew bulletin*: 17-28.
- Chittarath, K., *et al.* (2017). "First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 (VCG 01213/16) associated with Cavendish bananas in Laos." *Plant disease*(ja).
- 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." *Molecular plant pathology* **12**(4): 307-328.
- Correll, J. (1991). "The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*." *Phytopathology* **81**(9): 1061-1064.
- D'Hont, A., *et al.* (2012). "The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants." **488**(7410): 213-217.
- D'Hont, A., *et al.* (2000). "The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA in situ hybridization." **100**(2): 177-183.
- Daniells, J., *et al.* (2009). *Banana varieties and Fusarium oxysporum f. sp. cubense in Indonesia-observations from Fusarium wilt disease databases*. V International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Global Perspectives on Asian Challenges 897.
- Dean, R., *et al.* (2012). "The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology." *Molecular plant pathology* **13**(4): 414-430.
- Denham, T. P., *et al.* (2003). "Origins of agriculture at Kuk Swamp in the highlands of New Guinea." *Science* **301**(5630): 189-193.
- Dita, M., *et al.* (2010). "A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana Fusarium wilt pathogen." *Plant pathology* **59**(2): 348-357.
- Dolezel, J. and J. Bartoš (2005). "Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size." *Annals of Botany* **95**(1): 99-110.
- Domsch, K. H., *et al.* (1980). *Compendium of soil fungi*. Volume 2, Academic Press (London) Ltd.
- Edel, V., *et al.* (2000). "Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum*." *Mycological Research* **104**(5): 518-526.
- FAOSTAT (2019). <http://faostat.org/>.
- Fourie, G., *et al.* (2009). "Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense vegetative compatibility groups." *Applied and Environmental Microbiology* **75**(14): 4770-4781.
- Fourie, G., *et al.* (2011). "Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae speciales cubense within the *Fusarium oxysporum* complex." *Infection, Genetics and Evolution* **11**(3): 533-542.
- García-Bastidas, F., *et al.* (2014). "First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 associated with Panama disease of banana outside Southeast Asia." *Plant disease* **98**(5): 694-694.
- García-Bastidas, F., *et al.* (2019). "First report of *Fusarium* wilt Tropical Race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia." *Plant disease*(ja).
- García-Bastidas, F. A. (2019). Panama disease in banana: Spread, screens and genes. (Doctoral dissertation). Wageningen University.
- Gerlach, W. and H. Nirenberg (1982). "The genus *Fusarium* a pictorial atlas." *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* (209).
- Ghag, S. B., *et al.* (2015). "Fusarium wilt of banana: biology, epidemiology and management." *International Journal of Pest Management* **61**(3): 250-263.
- Häkkinen, M. (2013). "Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae)." *Taxon* **62**(4): 809-813.
- Hawksworth, D. L. (2001). "The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited." *Mycological research* **105**(12): 1422-1432.
- Hennessy, C., *et al.* (2005). "Weed hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 in northern Australia." *Australasian Plant Pathology* **34**(1): 115-117.
- Hung, T. N., *et al.* (2017). "First report of *Fusarium* wilt on Cavendish bananas, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 (VCG 01213/16), in Vietnam." *Plant disease*(ja).
- Loos, R., *et al.* (2009). "Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry." *Phytopathology* **99**(5): 582-590.
- Islam, M. S., *et al.* (2015). "Establishment and Characterization of An Unique *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Collection From Affected *Musa* Cultivars in Peru."
- Jones, D. R. (1999). *Diseases of banana. abacá and enset*. CABI publishing.
- Kistler, H. (1997). "Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*." *Phytopathology* **87**(4): 474-479.
- Kistler, H., *et al.* (2001). Evolution of host specificity in *Fusarium oxysporum*. *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*, APS Press St Paul MN.
- Koenig, R., *et al.* (1997). "*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages." *Phytopathology* **87**(9): 915-923.
- Koeppel, D. (2008). *Banana: The fate of the fruit that changed the world*. Penguin.
- Lescot, T. (2017). "Banane. Diversité génétique." *Fruitrop (Ed. Française)*(248): 102.
- Li, C., *et al.* (2012). "Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4." *BMC Genomics* **13**(1): 374.
- Li, M., *et al.* (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.
- Lievens, B., *et al.* (2009). "Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales." *FEMS microbiology letters* **300**(2): 201-215.

- Lin, Y.-H., *et al.* (2013). "A molecular diagnosis method using real-time PCR for quantification and detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4." *135(2)*: 395-405.
- Magdama, F., *et al.* (2019). "Comparative analysis uncovers the limitations of current molecular detection methods for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 strains." *PLoS ONE* **14**(9).
- Maryani, N. (2018). "A complex relationship: banana & Fusarium wilt in Indonesia." *Wageningen University*.
- Maryani, N., *et al.* (2018). "Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin." *Studies in mycology* **92**: 155-194.
- Maymon, M., *et al.* (2020). "The origin and current situation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in Israel and the Middle East." *Scientific Reports* **10**(1): 1-11.
- Maymon, M., *et al.* (2018). "First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 causing Fusarium wilt of Cavendish bananas in Israel." *Plant disease* **102**(12): 2655.
- Meldrum, R. A., *et al.* (2012). "Presence of putative pathogenicity genes in isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Australia." *41(5)*: 551-557.
- Moore, N., *et al.* (2001). *Fusarium wilt of banana: global problems and perspectives*. International Workshop on the Banana Fusarium Wilt Disease, Genting Highlands Resort (Malaysia), 18-20 Oct 1999.
- Moore, N., *et al.* (1993). "Vegetative compatibility and distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Australia." *Animal Production Science* **33**(6): 797-802.
- Nelson, P. and T. Toussoun (1983). "WF 0. Marasas. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification." *Pennsylvania State Univ. Press, University Park* **193**: 109-110.
- Notomi, T., *et al.* (2015). "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects." *Journal of Microbiology* **53**(1): 1-5.
- O'Donnell, K., *et al.* (1998). "Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(5): 2044-2049.
- Ordóñez, N., *et al.* (2015). "First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 causing Panama disease in Cavendish bananas in Pakistan and Lebanon." *Plant disease*.
- Ordóñez, N., *et al.* (2019). "A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on unique markers derived from genotyping by sequencing data for rapid in planta diagnosis of Panama disease caused by Tropical Race 4 in banana." *Plant pathology* **68**(9): 1682-1693.
- Ordóñez, N., *et al.* (2018). The phylogeography of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. 2018, Wageningen University & Research. **Ph.D. degree**.
- Ordóñez, N., *et al.* (2015). "Worse Comes to Worst: Bananas and Panama Disease—When Plant and Pathogen Clones Meet." *PLoS pathogens* **11**(11).
- Orjeda, G. (1998). *Evaluation of Musa germplasm for resistance to Sigatoka diseases and Fusarium wilt*. IPGRI/INIBAP.
- Ozarstandan, M. and D. S. Akgül (2019). "First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4 Causing Fusarium Wilt Disease of Banana in Turkey." *Plant disease*.
- Pegg, K. G., *et al.* (2019). "The epidemiology of Fusarium wilt of banana." *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Perrier, X., *et al.* (2011). "Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(28): 11311-11318.
- Persley, G. and E. De Langhe (1987). "Summary of discussions and recommendations." *Banana and Plantain Breeding Strategies*. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) Proc(21): 9-17.
- Ploetz, R. and K. Pegg (2000). "Fusarium wilt." *Diseases of Banana, Abaca and Enset*. *CAB International*.
- Ploetz, R. C. (1990). *Population biology of Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Fusarium wilt of banana*, APS Press.
- Ploetz, R. C. (1994). "Panama disease: return of the first banana menace." *International Journal of Pest Management* **40**(4): 326-336.
- Ploetz, R. C. (2000). "Panama disease: A classic and destructive disease of banana." *Plant Health Progress* **10**: 1-7.
- Ploetz, R. C. (2000). "PeggKG: Fungal diseases of the root, corm and pseudostem." *Diseases of banana, abaca and enset*.
- Ploetz, R. C. (2005). "Panama Disease: An Old Nemesis Rears its Ugly Head (Part 1: The Beginnings of the Banana Export Trades)." *ASPNet Feature Story*.
- Ploetz, R. C. (2005). "Panama Disease: An Old Nemesis Rears its Ugly Head Part 2. The Cavendish Era and Beyond." *APSnet Feature*. October.
- Ploetz, R. C. (2006). "Fusarium Wilt of Banana Is Caused by Several Pathogens Referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*." *Phytopathology* **96**(6): 653-656.
- Ploetz, R. C. (2015). "Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4." *Crop Protection* **73**: 7-15.
- Ploetz, R. C., *et al.* (2015). "Impact of diseases on export and smallholder production of banana." *Annual review of phytopathology* **53**: 269-288.
- Price, N. S. (1995). *The origin and development of banana and plantain cultivation*. *Bananas and plantains*, Springer: 1-13.
- Puhalla, J. E. (1985). "Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility." *Canadian Journal of Botany* **63**(2): 179-183.
- Schippers, B. and W. Van Eck (1981). "Formation and survival of chlamydospores in *Fusarium*." *Fusarium: disease, biology, and taxonomy*. Penn State University Press, University Park: 250-260.
- Selvaraj, M. G., *et al.* (2019). "AI-powered banana diseases and pest detection." *Plant Methods* **15**(1): 92.
- Simmonds, N. W. (1962). *The Evolution of the Bananas*, Longman: 101–131.
- Simmonds, N. W. and K. Shepherd (1955). "The taxonomy and origins of the cultivated bananas." *Botanical Journal of the Linnean Society* **55**(359): 302-312.
- Stover, R. (1962). *Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute*.
- Stover, R. and R. Ploetz (1990). *Fusarium wilt of banana: some history and current status of the disease*. *Fusarium wilt of banana*, APS Press.
- Taylor, J., *et al.* (1999). "The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification." *Annual review of phytopathology* **37**(1): 197-246.
- Thangavelu, R. and M. Mustafa (2010). "First report on the occurrence of a virulent strain of *Fusarium wilt* pathogen (Race-1) infecting Cavendish (AAA) group of bananas in India." *Plant disease* **94**(11): 1379-1379.
- Thurston, H. D. and S. Pennycook (1997). "Tropical plant diseases." *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **25**(3): 308-308.
- Tomlinson, P. B., *et al.* (1969). *Anatomy of the Monocotyledons: Commelinales-zingiberales*, Clarendon Press.
- Waite, B. (1963). "Wilt of *Heliconia* spp. caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 3." *Tropical Agriculture (Trinidad)* **40**: 299-305.
- Waite, B. and R. Stover (1960). "Studies on *Fusarium wilt* of bananas: VI. variability and the cultivar concept in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*." *Canadian Journal of Botany* **38**(6): 985-994.
- Wardlaw, C. W. (1961). "Banana diseases, including plantains and abaca." *Banana diseases, including plantains and abaca*.
- Wollenweber, H. W. and O. A. Reinking (1935). *Die fusarien, ihre beschreibung, schadwirkung und bekämpfung*, P. Parey.
- Zheng, S.-J., *et al.* (2018). "New geographical insights of the latest expansion of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 into the Greater Mekong Subregion." *Frontiers in Plant Science* **9**: 457.



**COMUNIDAD  
ANDINA**  
SECRETARÍA GENERAL



Av. Paseo de la República N°3895  
San Isidro, Lima 27- Perú  
Tel.: (511) 710 6400  
[www.comunidadandina.org](http://www.comunidadandina.org)

Síguenos en:



Búscanos como **Comunidad Andina**