



Protocolo de vigilancia fitosanitaria, capacitación y detección instrumental y analítica con características metrológicas de Foc R4T

Mónica Patricia David González

Monografía presentada para optar al título de Especialista en Gestión y Aseguramiento de la Calidad de Laboratorios Clínico y de Ensayo

Asesora

Nathalia Andrea Gómez Grimaldos, Ph.D (C) en Biotecnología

Universidad de Antioquia

Escuela de Microbiología

Especialización en Gestión y Aseguramiento de la Calidad de Laboratorios Clínico y de Ensayo

Medellín, Antioquia, Colombia

2024

Cita

(David González & Gómez Grimaldos, 2018)

Referencia

Estilo APA 7 (2020)

David González, M.P., & Gómez Grimaldos, N. A. (2024). *Protocolo de vigilancia fitosanitaria, capacitación y detección instrumental y analítica con características metrológicas de Foc R4T* [Monografía]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.



Especialización en Gestión y Aseguramiento de la Calidad de Laboratorios Clínico y de Ensayo, Cohorte I.



Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

A mi familia.

Agradecimientos

A DIOS.

Trabajo de monografía

Aprobado:

Nathalia A. Gómez G

Asesor

Tabla de contenido

Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
1 Planteamiento del problema	11
2 Justificación.....	13
3 Objetivos	14
4 Marco teórico	15
5 Metodología	19
6 Resultados	20
6.1. Métodos disponibles para la detección de Foc R4T.....	20
6.1.1. PCR convencional.....	20
6.1.2. PCR cuantitativa en tiempo real o qPCR.....	21
6.1.3. PCR Digital por gotas (ddPCR).....	23
6.1.4. Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)	23
6.2. Ventajas, desventajas, diferencias entre los métodos disponibles para la detección de Foc R4T.....	24
6.3. Importancia de la prevención de Foc R4T en el cultivo de banano	26
6.4. Protocolo de bioseguridad y detección de Foc R4T.....	27
7 Discusión	29
8 Conclusiones	31
9 Recomendaciones.....	32
Referencias	33

Lista de figuras

Figura 1 Protocolo de bioseguridad y detección de Foc R4T.27

Siglas, acrónimos y abreviaturas

App	Aplicación de software móvil
ddPCR	Reacción en cadena de la polimerasa digital por gotas
Foc R4T	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> Raza 4 Tropical
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
IGS	Regiones espaciadoras intergenómicas
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle
LOD	Límite de detección
OIRSA	Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria
PhD	Philosophiae Doctor
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
SCAR	Región Amplificada de Secuencia Caracterizada
ssp	Especies por definir
SYBR	Colorante de unión de ADN bicatenario
UdeA	Universidad de Antioquia

Resumen

El banano, *Musa spp.*, es una de las frutas más consumidas a nivel mundial por su alto valor nutricional, siendo este un cultivo relevante para la seguridad alimentaria e importante como fuente de ingreso para familias de países en desarrollo, fortaleciendo la economía local. En Colombia, los principales productores y exportadores de banano, son los departamentos de Antioquia y Magdalena con un área total cultivada de aproximadamente de 53.000 hectáreas, las cuales están amenazadas por la presencia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Raza 4 tropical (Foc R4T) en el país desde el 2019. Este hongo es responsable de la enfermedad denominada marchitez por *Fusarium*, reconocido por generar la muerte de la planta y permanecer en el suelo por largos periodos de tiempo. La propagación de Foc R4T conlleva a elevadas pérdidas económicas, por tanto, es necesario incentivar la cultura y la aplicación de estrategias para evitar, mitigar y contener el hongo en los predios bananeros mediante herramientas basadas en la bioseguridad, la capacitación y la detección oportuna de la enfermedad a partir del uso de técnicas instrumentales moleculares. Presentar un protocolo que integre estos factores hace parte del objetivo de este documento por medio de la recopilación y análisis de información relacionada con la importancia de la detección precisa y oportuna, las normas de bioseguridad y tecnologías implementadas que contribuyen a la protección biológica de la producción en la agroindustria bananera.

Palabras clave: banano, *Fusarium*, enfermedad, bioseguridad, detección.

Abstract

Banana, *Musa spp.*, is one of the most consumed fruits worldwide due to its high nutritional value, being a relevant crop for food security and important as a source of income for families in developing countries, strengthening the local economy. In Colombia, the main producers and exporters of bananas are the departments of Antioquia and Magdalena with a total cultivated area of approximately 53,000 hectares, which are threatened by the presence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Tropical Race 4 (Foc R4T) in the country since 2019. This fungus is responsible for the disease called Fusarium wilt, recognized for causing the death of the plant and remaining in the soil for long periods of time. The spread of Foc TR4 leads to high economic losses, therefore, it is necessary to encourage culture and the application of strategies to avoid, mitigate and contain the fungus in banana farms through tools based on biosafety, training and timely detection of the disease through the use of molecular instrumental techniques. Presenting a protocol that integrates these factors is part of the objective of this document through the collection and analysis of information related to the importance of accurate and timely detection, biosafety standards and implemented technologies that contribute to the biological protection of production. in the banana agroindustry.

Keywords: banana, Fusarium, disease, biosafety, detection.

Introducción

El banano, es una de las frutas más consumidas en el mundo, este cultivo es considerado líder en el comercio agrícola en relación a la demanda de las importaciones como dinamizador de la economía, con una proyección de incremento en producción de 25 mil millones de dólares, es decir, de 4.5 % entre los años 2022 a 2027, según la tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) (Voorra et al., 2023). Colombia ocupa el quinto puesto de países exportadores después de Ecuador, Guatemala, Costa Rica y Filipinas; con un total de 106 millones de cajas exportadas en el año 2022 contribuyendo significativamente al PBI agrícola del país (Adicomex, 2024; Aguirre, 2024).

Actualmente, el cultivo de banano enfrenta desafíos que interfieren directamente o indirectamente con la productividad de la fruta, como la presencia de microorganismos fitopatógenos, control de arvenses, diversidad microbiana, propiedades físicas y química del suelo, entre otros, que hacen parte del conjunto de factores que favorecen la manifestación de enfermedades devastadoras como la marchitez por *Fusarium*, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Raza 4 Tropical (Foc R4T), siendo la Raza 1, el responsable del descenso del cultivo de banano Gros Michel entre las décadas de 1950 y 1960 (Thangavelu et al., 2022).

Pese a esto, con el cambio de mercado asociado a esta fruta, la presencia y amenaza de Foc R4T está vigente en los países productores de banano Cavendish, con lo cual se han empleado herramientas para contener, mitigar y prevenir el ingreso o la dispersión del patógeno en predios bananeros mediante la detección oportuna del mismo y planes de manejo integrado que incluye principalmente prácticas culturales, bioseguridad, cambios del modelo productivo y materiales vegetales de clones promisorios (Rodríguez-Yzquierdo et al., 2023).

La detección temprana y precisa de la enfermedad del cultivo es esencial para implementar estrategias de manejo efectivas y minimizar su impacto en la producción bananera, con base a esto, el objetivo de este trabajo se fundamenta en el desarrollo de un programa integral de bioseguridad teniendo en cuenta la capacitación del personal y la implementación de técnicas de identificación del Foc R4T, como mecanismo de prevención, manejo y control de la enfermedad.

1 Planteamiento del problema

La agricultura en Colombia es una de las actividades económicas más importantes, cultivos como el café, las flores y el banano hacen parte de los productos agrícolas con mayor exportación a nivel nacional. Del cultivo de banano se producen dos tipos, banano criollo o de consumo interno y de exportación, ambos participan activamente en la economía del país, el segundo en mayor medida que el primero, posicionando a Colombia como el quinto país exportador mundial de banano (MinAgricultura & Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales, 2020).

El cultivo de banano puede verse afectado por problemas fitosanitarios, los cuales generan pérdidas económicas considerables, algunos problemas como, la presencia de las Sigatokas amarilla y negra, los nematodos fitoparásitos, ataque de insectos, pudrición acuosa o bacteriosis, Moko, enfermedades virales y marchitez por *Fusarium* (Drenth & Kema, 2021). Esta última es considerada una de las enfermedades más destructivas de las Musáceas (plátano y banano), la cual es ocasionada por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* Raza 4 Tropical (Foc R4T), una vez éste coloniza la planta causa daños irreversibles. La raza 4 de Foc que actualmente amenaza estos cultivos se ha diseminado en algunos países de Asia, África y América generando pérdidas anuales que han superado los 200 millones de dólares (Fontagro, 2022), motivo por el cual en varios países se adelantan investigaciones con el fin de evitar el ingreso o mitigar la presencia de este fitopatógeno.

El control y la propagación de la enfermedad causada por Foc R4T es uno de los retos que promueve la búsqueda de soluciones, con el fin de evitar principalmente la extinción de las variedades de banano Cavendish, debido a que es un microorganismo que permanece en el suelo durante un largo periodo de tiempo sin perder vitalidad o viabilidad celular (Drenth & Kema, 2021). Es un hongo que se propaga rápidamente, razón por la cual, afecta la producción mundial de banano e incluso de plátano, sumando las estructuras de resistencia que posee Foc R4T para facilitar su permanencia en el suelo hasta por más de 20 de años, inhabilitando los predios para el cultivo de esta fruta o de otras, generando un impacto catastrófico para la agroindustria bananera principalmente (Martínez-Solórzano & Rey-Brina, 2021).

Debido a que hasta la fecha se desconoce un método de erradicación total de este fitopatógeno, los esfuerzos actuales se centran en el reconocimiento exhaustivo de síntomas externos en campo, ya que estos pueden ser confundidos con deficiencias nutricionales de la planta (Parlomas et al., 2022), además de la morfología del cultivo y en la determinación de características microscópicas, como micelio y esporas, sin embargo, estos métodos requieren tiempo y experiencia para indicar la correspondencia de microorganismo asociado a la enfermedad, sin mencionar que carecen de precisión y exactitud (Thangavelu et al., 2022).

Por otro lado, las técnicas moleculares son ampliamente utilizadas, estas se basan principalmente en la extracción y purificación de DNA de buena calidad, para posterior aplicación de métodos de amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por siglas en inglés) convencional, PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), PCR digital por gotas (ddPCR), entre otros, (F. García-Bastidas et al., 2020); sin embargo, la obtención del material genético a evaluar con estas técnicas requiere características específicas y tiempo para una confirmación acertada, en algunos casos es necesario evaluar diferentes cebadores (primers), deltas de temperatura y concentración, lo que puede generar retrasos en la entrega de resultados y asociado a la posible dispersión y expansión de la enfermedad en otras áreas o lotes del cultivo (Parlomas et al., 2022).

En este contexto, se deben analizar las ventajas y desventajas de las técnicas moleculares, como la PCR convencional, qPCR y ddPCR, comparando entre las mismas y con otras técnicas, teniendo en cuenta el tiempo necesario para obtener resultados con cada técnica, así como la precisión y sensibilidad, con el fin de optimizar el proceso de diagnóstico para lograr resultados más rápidos y confiables.

2 Justificación

El eje bananero del Urabá Antioqueño agrupa cuatro municipios, los cuales dinamizan el desarrollo del país; a partir de esta actividad se producen más de 4 millones de toneladas de banano al año, es decir, un estimado de \$1.000 millones USD y se generan cerca de 300.000 empleos directos e indirectos, representando en gran parte el sustento de algunas familias de la región (Tinoco, 2024).

Sin embargo, el cultivo se ve afectado por una variedad de factores como los asociados a la producción; clima, suelo, agua, manejo de cultivo, plagas y enfermedades. La presencia del hongo Foc R4T tiene un impacto devastador en la industria bananera de América Latina y el Caribe, la enfermedad causada por este ha provocado una notable disminución en la producción de banano, lo que se traduce en importantes pérdidas económicas para los productores de la región y el mundo, considerando que esta enfermedad tiene la capacidad de afectar a diferentes variedades de la fruta, lo que podría tener repercusiones en el comercio internacional y la seguridad alimentaria (Rodríguez-Yzquierdo et al., 2023).

Actualmente se buscan estrategias para evitar la dispersión del patógeno, incluyendo metodologías basadas en el diagnóstico a partir de imágenes de espectroscopia (Parlamas et al., 2022) hasta el desarrollo de cultivares resistentes (Zhou et al., 2023); sin embargo, con la premura de un diagnóstico oportuno se realizan estudios detallados sobre técnicas moleculares para análisis genético.

Bajo este panorama, el diagnóstico temprano de Foc R4T es esencial para prevenir la propagación de la enfermedad y minimizar su impacto en la industria bananera, hoy en día se toman medidas de prevención, restricción y contención para evitar la propagación del fitopatógeno, se estima que el costo de implementar cuarentena y bioseguridad durante el primer año en fincas con producción orgánica en el departamento de La Guajira, esta alrededor de 350 USD por ha/año y un costo de mantenimiento 160 USD ha/año, esto teniendo en cuenta que en Colombia Foc R4T fue reportado en 2019 (Martínez et al., 2023).

Con base a esto, es fundamental tomar medidas urgentes para controlar la propagación de Foc R4T y proteger la industria bananera mediante estrategias de manejo efectivas, así como inversiones en investigación y desarrollo, integrando técnicas moleculares para la detección y/o diagnóstico del hongo en plantas sintomáticas, asintomáticas u otras matrices como agua y suelo (Matthews, 2019). El conocimiento de estas técnicas es crucial para diferenciar entre Foc R4T y otras cepas de *Fusarium* que no son tan agresivas, además para rastreo del patógeno en el ambiente, comprender mejor su epidemiología, desarrollar estrategias de manejo más efectivas, monitorear la eficacia de las medidas de control implementadas e identificar la enfermedad de manera temprana y precisa, lo que permite tomar medidas de control oportunas (Magdama et al., 2019).

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Desarrollar un programa integral de bioseguridad para el personal en campo, que ayude a prevenir la presencia de Foc R4T y mitigar su impacto en la producción bananera.

3.2 Objetivos específicos

- Presentar técnicas instrumentales de identificación del Foc R4T eficientes en términos de confiabilidad, tiempo de ejecución y resultados, que se usan para identificar la enfermedad del cultivo del banano.
- Establecer la importancia de la capacitación al personal que realiza labores en campo de la producción bananera, sobre la importancia de la prevención del Foc R4T para fomentar una cultura de bioseguridad y compromiso en la lucha contra esta enfermedad fitosanitaria.
- Especificar las acciones y cultura de bioseguridad que debe desarrollar el personal en campo para prevenir la presencia del Foc R4T y mitigar su impacto en la producción bananera.

4 Marco teórico

El banano y el plátano son pertenecientes al género *Musa*, originarios del Sudeste asiático y pacífico, este es un género muy diverso; las especies *Musa*, *M. acuminata* y *M. balbisiana*, así como sus híbridos son actualmente los más producidos, las diferencias del genoma se identifican como A y B, respectivamente. Con la hibridación natural se han desarrollado frutos diploides, triploides y tetraploides, como ‘Lady Finger’ (AAB), ‘Gros Michel’ (AAA), el llamado banano ‘seda/silk’ (AAB), ‘Pisang awak’ (ABB), entre otros (Drenth & Kema, 2021; F. García-Bastidas et al., 2020).

La amenaza sobre este cultivo asociada a *Foc* es constante, debido principalmente a la coevaluación del género *Musa* con fitopatógenos, con base a esto, se considera que la cepa de *Foc* Raza 1 se introdujo desde Asia hasta América mediante el transporte de material vegetal para el inicio de la producción bananera. El primer reporte fue en Australia en 1874, sin embargo, luego de dieciséis años, en la década de 1890 se observó por primera vez la marchitez por *Fusarium* en Panamá y Costa Rica, con posterior extensión a Centro y Sur América, establecida en Colombia desde 1929, afectando principalmente las plantaciones de Gros Michel, una variedad altamente susceptible (Drenth & Kema, 2021; F. García-Bastidas et al., 2020; Martínez-Solórzano et al., 2020).

En las décadas 1950 y 1960 la Raza 1 de este fitopatógeno, causó daños tan severos a nivel mundial en la producción de banano Gros Michel que la industria bananera se vio obligada a cambiar a la variedad Cavendish (*Musa* AAA), resistente al hongo, lo cual generó cambios y adaptación del mercado a los nuevos clones, siendo esta variedad (AAA) una de las de mayor producción y comercialización actualmente, con un estimado de exportación de 22,3 millones de toneladas por un valor de 13,8 mil millones de dólares al año en el 2022. A pesar de que esta era una alternativa para el aseguramiento de la agroindustria bananera, la evolución del fitopatógeno ha permanecido en el tiempo sin encontrar hasta la fecha formas de erradicación (Martínez-Solórzano et al., 2020; Thangavelu et al., 2022).

La patogenicidad de Foc radica en la división fisiológica de razas, Foc raza 1, raza 2, raza 3 y raza 4, esta última se puede dividir en raza subtropical 4 (STR4) y raza tropical 4 (R4T o TR4, según siglas en Inglés). La primera de estas afecta los clones de los subgrupos Silk (banano Manzano, Musa AAB), Gros Michel (Musa AAA), Pisang awak (ABB), Abaca (AA), Maqueño (AAB) y Pome (AAB); la raza 2 ataca los bananos de cocción, clones del subgrupo Bluggoe (ABB) y algunos tetraploides (AAAA); la raza 3 afecta diferentes especies de *Heliconia* spp., esta no afecta el banano por lo tanto no se considera dentro del esquema de *Fusarium* spp. que afecta el banano. Finalmente, la raza 4 dividida en raza 4 subtropical (SR) y tropical (TR), según la zona donde causa enfermedad afecta los clones de Cavendish, en este caso, Foc R4T es fitopatógeno en ambas condiciones (F. García-Bastidas et al., 2020; García-Velasco et al., 2020; Zhou et al., 2023).

Dentro de esta raza se considera que Foc R4T presenta mayor virulencia que la raza subtropical debido a que puede colonizar en presencia o ausencia de condiciones de estrés abiótico. Este fitopatógeno es transmitido por el suelo permaneciendo en esta matriz por largos periodos de tiempo debido a la producción de estructuras resistencias, clamidosporas. Al permanecer latentes son estimuladas para germinar cuando se generan exudados de la raíz en la planta independiente de que sea huésped o no; la penetración de los tubos germinativos a las raíces secundarias o terciarias ocurre directamente o a través de heridas y posteriormente invade el sistema vascular, una vez se instala en la zona vascular de las raíces laterales, se produce infección en el rizoma obstruyendo la absorción de nutrientes y el transporte de agua desde el pseudotallo hasta las hojas (M. Dita et al., 2018; Martínez-Solórzano et al., 2020).

En los clones de banano Cavendish se identificó por primera vez Foc R4T en Taiwán en 1989, posteriormente se identificó en Malasia e Indonesia, sudeste asiático, de donde se considera es originario. En esta zona y norte de Australia se identificó en 1990 la presencia del fitopatógeno, permaneciendo confinado por más de 20 años generando cuantiosos daños. La extensión llegó hasta el Medio Oriente en 2013, a partir de ese momento se reportaron casos en partes de la India, África y Europa. A pesar de la contención en 2019 se reportó por primera vez en América Latina, puntualmente en Colombia, alertando a los países productores y exportadores cercanos a este a tomar medidas, no obstante, en 2021 y 2023 se reportó en Perú y Venezuela, respectivamente (García-Bastidas, 2022; Martínez et al., 2023).

El primer caso de Foc R4T en Colombia proviene del departamento de la Guajira, extendiéndose hasta la fecha en el Magdalena (ICA, 2023), situación que generó la implementación de medidas estrictas de bioseguridad en las fincas bananera como desinfección de herramientas y equipos, uso de ropa y calzado exclusivo para la finca, control del movimiento de personas y vehículos, restricción del acceso a áreas infectadas. Adicionalmente, se han creado planes y convenios para combatir Foc R4T que incluyen vigilancia epidemiológica, capacitación a productores, investigación y desarrollo de nuevas tecnologías y fortalecimiento de la bioseguridad (ICA, 2021).

El uso de desinfectantes es una herramienta para la gestión integrada del manejo de la enfermedad, este reduce el riesgo de introducción en fincas sanas o prevenir la propagación del hongo dentro de una finca afectada, disminuyendo la cantidad de inóculo presente principalmente en superficies. Sin embargo, se debe tener en cuenta la naturaleza del producto debido a que algunos de estos son corrosivos y se inactivan en presencia de suelo, de igual forma se debe considerar el tiempo de exposición, frecuencia de aplicación, tipo de esporas, entre otros (Meldrum et al., 2013; Nguyen et al., 2019; Salacinas et al., 2022).

Considerando este como un método preventivo para el manejo de Foc R4T, se puede confirmar la eliminación o supervivencia del hongo mediante técnicas moleculares instrumentales, lo cual contribuye a las estrategias de control y bioseguridad al evaluar la eficacia de las medidas de desinfección. Las técnicas de diagnóstico molecular permiten identificar la presencia del fitopatógeno en sus primeras etapas, incluso antes de que aparezcan síntomas visibles, además de rastrear la dispersión del hongo dentro de una región o país (Ullah, 2019).

El primer caso reportado en Colombia se realizó inicialmente a partir de un aislado del hongo proveniente de tejido vegetal, una vez obtenido este fueron analizadas diferentes regiones del genoma aplicando inicialmente la metodología descrita por M. A. Dita et al., (2010), luego las indicaciones descritas en el kit comercial Clear®Detections TR4, y posterior ensayo de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), seguido de pruebas de patogenicidad y secuenciación del ADN (García-Bastidas, 2022). La investigación avanza en pro de identificar

marcadores moleculares específicos en el genoma de Foc R4T, permitiendo el desarrollo de técnicas más precisas y específicas para su detección, además de aumentar la sensibilidad y reducir el tiempo de análisis, adaptándose así a las necesidades específicas de la vigilancia y el control de la enfermedad en las regiones bananeras (Martínez-Solórzano et al., 2020).

5 Metodología

La metodología utilizada en esta monografía se centra en la recopilación y análisis de información relevante relacionada con la importancia del diagnóstico certero y oportuno de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* Raza 4 Tropical 4 (Foc R4T), un hongo que afecta el cultivo de banano, mediante técnicas moleculares como la PCR convencional, PCR en tiempo real, PCR por gotas, entre otras. Para ello, se llevó a cabo una revisión exhaustiva de la literatura científica disponible en bases de datos como PubMed, Google Scholar y Web of Science, utilizando términos de búsqueda específicos relacionados con el tema. Se seleccionaron estudios relevantes asociados a la detección y caracterización de Foc R4T mediante técnicas moleculares, incluyendo investigaciones que evalúan la sensibilidad, especificidad y eficacia de estas técnicas en diferentes contextos.

Posteriormente, se analizaron los datos recopilados para identificar tendencias, patrones y conclusiones relevantes sobre la importancia del diagnóstico molecular para el manejo efectivo de Foc R4T en los cultivos de banano. Se realiza la comparación de las diferentes técnicas moleculares utilizadas o sus modificaciones, así como a su aplicación práctica en la detección temprana y la prevención de la propagación de la enfermedad. Además, se discuten posibles áreas de mejora en las técnicas de diagnóstico molecular y se exploran nuevas tendencias y desarrollos en este campo.

Así mismo, se realizó la búsqueda de la información asociada a la necesidad de implementar herramientas de bioseguridad y programas de capacitación de personal, basada principalmente en artículos técnicos, informes de organizaciones nacionales e internacionales, informes de prensa, análisis estadísticos, entre otros, para finalmente consolidar, comparar y sintetizar los principales hallazgos.

6 Resultados

6.1. Métodos disponibles para la detección de Foc R4T.

6.1.1. PCR convencional.

Técnica molecular ampliamente utilizada para el diagnóstico de Foc R4T. Esta técnica se basa en la amplificación de una región específica del ADN del hongo mediante la acción de una enzima llamada ADN polimerasa. La amplificación de este ADN permite detectar la presencia del patógeno proveniente principalmente de tejido vegetal; para esto se utilizan primers específicos diseñados para amplificar regiones genéticas específicas del patógeno, es decir secuencias de ADN únicas que están presentes en el genoma de Foc R4T, permitiendo diferenciarlo de otras razas de Foc y de otros patógenos. La PCR convencional implica ciclos de amplificación repetidos y una detección final de los productos de PCR mediante electroforesis en gel permitiendo visualizar el tamaño y la cantidad de los fragmentos de ADN amplificados (Mackay, 2004).

A pesar de ser uno de los métodos más utilizados, se pueden presentar casos de falsos positivos o falsos negativos, lo cual conlleva al empleo de otras técnicas como complemento para un análisis confiable (F. García-Bastidas et al., 2020; Garcia-Bastidas, 2022); este tipo de situaciones genera sobrecostos, pérdidas de producción, propagación de la enfermedad, entre otros. En el caso del análisis de grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) se presentan mayores dificultades, dado que, a pesar que sea el patógeno de interés, en algunos casos no es posible amplificar los aislados de Foc con los primers convencionales debido a variaciones del genoma, puntualmente en las cepas de Foc R4T Indias, lo que genera el desarrollado de marcadores moleculares específicos dirigidos a los genes efectores para la detección precisa del fitopatógeno (Thangavelu et al., 2022). En Ecuador se han realizado análisis filogenéticos basados en regiones TEF e IGS, aunque estudios previos reportan incongruencia entre ambos, los análisis basados en PCR de ambas regiones sugirieron que los aislados de Ecuador comparten un único ancestro común, es decir, comprenden un solo linaje clonal en Foc Raza 1 (Magdama et al., 2020).

En Colombia y parte del mundo el VCG más estudiado corresponde al VCG 01213/16, este fue identificado por primera vez en Taiwán afectando los bananos Cavendish (Garcia-Bastidas,

2022). Con base en esto se han empleado los primers Foc R4T F y Foc R4T R asociados a la región del espaciador intergénico (IGS) y al espaciador interno transcrito (ITS) (M. Dita et al., 2010); también los primers W2987 F y W298 R que codifican una proteína hipotética diferencial de otros genotipos relacionados con Foc, los cuales fueron desarrollados a partir de una cepa mutante y una PCR entrelazada asimétrica térmica (TAIL-PCR) para aislar la secuencia desconocida que esta adyacente de una conocida (Li et al., 2013).

Adicional a estos, se conoce la importancia de los genes secretados en el xilema (SIX) debido a que comprenden la única familia conocida de efectores en *F. oxysporum*, a partir de esto se evalúa si con la variación de secuencia de los genes SIX es posible detectar razas o diferentes VCG asociadas al marchitamiento por Fusarium. Carvalhais et al., (2019), propone el método de validación basado en los estándares internacionales propuestos en las “Directrices para la validación y verificación de métodos de prueba cuantitativos y cualitativos”. Los autores incluyen la especificidad analítica inter e intraespecífica, sensibilidad, robustez, repetibilidad y reproducibilidad.

Para validar la especificidad del ensayo, evaluaron diferentes primers con varias especies de Fusarium incluyendo distintas formas especiales de *F. oxysporum* y VCG de Foc. La sensibilidad se realizó a partir de un control positivo diluido en serie, por otro lado; para determinar la robustez se utilizaron 2 enzimas Taq Polimerasa y termocicladores diferentes; adicionalmente los autores garantizan la repetibilidad y reproducibilidad con el mismo y diferente operador, respectivamente, sin olvidar las comparaciones con los métodos convencionales de PCR, para finalmente concluir que el método cumple con los criterios evaluados (Carvalhais et al., 2019).

6.1.2. PCR cuantitativa en tiempo real o qPCR

La PCR en tiempo real, también conocida como qPCR o cuantificación por PCR, es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) a tiempo real. A diferencia de la PCR convencional, que solo determina la presencia o ausencia de ADN al final del proceso, la PCR en tiempo real ofrece una medición continua de la cantidad de ADN a medida que

se produce la amplificación mediante el uso de fluoróforos específicos que se unen al ADN amplificado durante el proceso de PCR y emiten fluorescencia en proporción a la cantidad de ADN presente. Se considera esta técnica como altamente sensible y específica, es decir que puede detectar incluso cantidades mínimas de material genético objetivo en la muestra y discriminar entre secuencias genéticas muy similares (Mackay, 2004).

Actualmente la qPCR es utilizada para la detección de Foc R4T a partir de raíces y cormo, incluso se considera la determinación de la biomasa como la cuantificación genómica del número de copias de genes mediante esta técnica (Zhou et al., 2023). Para verificar la infección de plantas por este patógeno se puede realizar una PCR múltiple con dos pares de Primers en simultáneo y una qPCR empleando SYBR Green con el kit comercial para diagnóstico molecular ClearDetections TR4 (Fernando. García-Bastidas et al., 2019). Este kit permite la detección rápida del hongo, para esto se utilizan primers específicos diseñados por (M. A. Dita et al., (2010) basados en una única mutación de la Región Intergénica Espaciadora (IGS), sin embargo, dada la variabilidad genética de Foc R4T para análisis en Indonesia se sugiere emplear otro método de diagnóstico como complemento a este (F. García-Bastidas et al., 2020).

La principal amenaza para el cultivo de banano en condiciones climáticas tropicales o subtropicales está asociado al VCG 01213/16, sin embargo, se ha considerado el VCG 0121 como potencialmente peligroso, razón por la cual se desarrolló una prueba de PCR en tiempo real para detectar con precisión ambos grupos. Para esto, las investigaciones realizadas se basan en la secuencia de un supuesto gen de virulencia descrito previamente por Lin et al. 2013, con el fin de desarrollar una combinación específica de sonda de hidrólisis/primers para la detección de cepas tropicales de raza 4 de Foc (F. García-Bastidas et al., 2020).

Aguayo y colaboradores (2017), optimizan condiciones y parámetros de la qPCR, como concentración, tiempo, temperatura, entre otros; adicionalmente, evalúan parámetros de desempeño como especificidad analítica, sensibilidad analítica, robustez, reproducibilidad y repetibilidad, teniendo en cuenta la norma a norma PM7/98 de la Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO). Para el desarrollo de las pruebas se realizan múltiples extracciones de ADN, seguido de diluciones, comparaciones, evaluación de métodos y

réplicas, y análisis de datos; con resultados satisfactorios éste es un referente para aplicaciones de pruebas reglamentarias en material vegetal de banano (Aguayo et al., 2017).

6.1.3. PCR Digital por gotas (ddPCR)

El principio de la técnica se basa en la división de la muestra en múltiples reacciones individuales, para esto la dispersión del ADN se realiza uniformemente entre las gotas generadas mediante la emulsión con aceite, posteriormente estas moléculas son amplificadas y cuantificadas individualmente. Cada fracción podrá contener o no la secuencia de interés, finalmente las únicas gotas que amplifican y producen una señal fluorescente son aquellas que contienen el fragmento objetivo, consideradas como gotas positivas. Posterior a esto se cuenta y analiza el porcentaje de gotitas positivas durante el paso de detección de la señal de fluorescencia teniendo en cuenta la distribución de Poisson para determinar la cantidad absoluta de los ácidos nucleicos de interés (Hou et al., 2023).

Esta técnica ha sido probada con el fin de obtener una cuantificación sensible y precisa de Foc R4T a partir de muestras de tejido vegetal, suelo y agua; no obstante, las muestras de agua de drenaje, pediluvio y suelo, aunque fueron inoculadas artificialmente requieren un desarrollo del método completo, teniendo en cuenta la concentración y compuestos degradadores que causan inhibición de la técnica. En el caso de plantas sintomáticas y asintomáticas inoculadas artificial o naturalmente los resultados son positivos para la detección de Foc R4T incluso en bajas concentraciones (Lovera et al., 2023).

6.1.4. Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

Esta técnica por su nombre en inglés, Loop-Mediated Isothermal Amplification, se basa en el principio de la síntesis de ADN por desplazamiento de hebras autocíclica realizada por la ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst) para detectar una secuencia de ADN específica, generalmente esta utiliza de cuatro a seis primers para reconocer seis y ocho regiones de interés. Los productos de amplificación LAMP también se pueden detectar mediante electroforesis en gel, sin embargo, este procedimiento reduce la idoneidad para la aplicación en campo por lo cual se

caracteriza (Li et al., 2013). La inspección visual directa del producto LAMP con SYBR Green a simple vista o bajo luz ultravioleta es frecuentemente utilizada y permite determinar fácilmente resultados positivos y negativos, incluso en muestras de suelo, sugiriendo esta técnica como altamente específica para la detección y seguimiento de Foc R4T en el campo (Zhang et al., 2014).

El desarrollo de esta técnica se valida con la realización de pruebas de especificidad, sensibilidad y repetibilidad; teniendo en cuenta el diseño de primers y la evaluación de estos con todos los VCG. Para las pruebas de especificidad se utilizan diferentes cepas asociadas a Foc R4T y aislados fúngicos y bacterianos como controles adicionales; en el caso de la sensibilidad se realizan diluciones seriadas del ADN puro y en cuanto a la repetibilidad, las pruebas se realizan varias veces con diferentes operadores. En respuesta a estos parámetros se indica que LAMP puede detectar hasta $1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN y los resultados son consistentes en ensayos inoculados de forma artificial o natural (Ordóñez et al., 2019).

6.2. Ventajas, desventajas, diferencias entre los métodos disponibles para la detección de Foc R4T.

Las técnicas antes mencionadas han sido empleadas como herramienta para el diagnóstico de Foc R4T, ya que, aunque la identificación visual de síntomas en campo es importante, no se considera suficiente para confirmar la presencia del patógeno como una prueba genética. No obstante, estas metodologías son consideradas parte inicial del prediagnóstico según F. García-Bastidas et al., (2020) debido a que pueden depender de las habilidades del personal generando así falsos positivos o negativos, por tanto, se requiere especificidad de los diagnósticos para la detección inequívoca del patógeno.

Esto sugiere que los métodos empleados deben ser repetibles, altamente específicos, robustos y sensibles al patógeno, incluso se considera el uso de estas técnicas como una alternativa para acortar el tiempo en la entrega de resultados, es decir, sin necesidad realizar aislamiento, cultivo y purificación del hongo, disminuyendo a una o dos semanas el tiempo asociado a la eficiencia en la respuesta (M. Dita et al., 2010; Lovera et al., 2023). Igualmente se resalta la importancia de la identificación de los marcadores moleculares basados en una amplificación

aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), región Amplificada de Secuencia Caracterizada (SCAR), la región IGS, genes de virulencia, entre otros; para el completo y exitoso desarrollo de estas técnicas, vinculando a estas el uso de primers específicos relacionados con diferentes locus genéticos para detectar Foc R4T (Carvalhais et al., 2019; Li et al., 2013).

En términos de técnicas moleculares la qPCR ofrece mejores resultados a nivel de sensibilidad, especificidad y rapidez que la PCR convencional, lo cual es vital para la detección de fitopatógenos cuarentenarios como Foc R4T, teniendo en cuenta que la qPCR permite la cuantificación del ADN de interés. A su vez, en cuanto a la metodología LAMP, a pesar de que se utiliza principalmente como detección de primera instancia porque se puede realizar en campo y no necesita equipo especial de ciclo térmico, esta puede ser menos sensible en comparación con la qPCR y es posible que se pasen por alto muestras positivas debido a la mala calidad de los extractos de ADN según Aguayo et al., 2017.

Al igual que la qPCR, con la ddPCR es posible una cuantificación absoluta del ADN mediante fluorescencia, con la diferencia que en esta última se fracciona la muestra en varias moléculas, permitiendo la amplificación y cuantificación individualmente. Adicionalmente, la ddPCR o PCR de tercera generación no requiere una curva estándar para la cuantificación, también puede tener resistencia a sustancias inhibidoras de la PCR que están presentes en muestras ambientales y demostrar mayor sensibilidad, así como precisión en la cuantificación del ADN objetivo. Finalmente, al comparar el límite de detección entre la PCR convencional, qPCR y ddPCR en ADN de Foc R4T, se observa que la ddPCR ofrece una ventaja significativa, presentando un LOD con un orden de magnitud menor que qPCR y PCR (Lovera et al., 2023).

Por otro lado, aunque autores validan los resultados de las pruebas de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad mediante la técnica LAMP y estas sean positivas para diagnóstico *in situ* del hongo en el campo de plantas sospechosas (Ordóñez et al., 2019), al igual que la ddPCR, se requieren estudios que exploren la aplicabilidad de estas técnicas para comprender mejor el desempeño de estas debido a que la información es limitada respecto a Foc R4T.

6.3. Importancia de la prevención de Foc R4T en el cultivo de banano

Las técnicas moleculares mencionadas anteriormente son de gran valor y proporcionan información valiosa sobre el patógeno, sin embargo, el establecimiento de planes de vigilancia y erradicación son fundamentales para evitar la dispersión del patógeno, con base a esto es primordial la identificación de síntomas por parte del personal de las fincas bananeras como el marchitamiento de hojas adultas desde el margen de la hoja hacia la nervadura central y el enruanamiento de hojas, es decir doblez por la nervadura central (ICA, 2020).

La marchitez por *Fusarium* es una enfermedad latente, la cual también toma importancia en países miembros del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, OIRSA, (México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y República Dominicana), en donde, se destaca la elaboración de planes de contingencia para llevar a cabo acciones dirigidas a la identificación, erradicación, contención y manejo adecuado de Foc R4T (OIRSA, 2013).

En Colombia, con la llegada del patógeno se han intensificado las medidas que evitan o disminuyen la propagación del hongo, para esto, durante el 2023 se realizaron capacitaciones a 450 personas en temas relacionados con Bioseguridad de Foc R4T, en estos eventos participan productores y técnicos de cooperativas, fincas independientes y comercializadoras (AUGURA, 2023a). Para el reconocimiento de plantas sospechosas se sugiere seguir las indicaciones de la Resolución ICA 17334 “Por medio de la cual se establece el plan de bioseguridad y vigilancia fitosanitaria para la Marchitez por *Fusarium* en predios de producción de plátano y banano registrados ante el ICA para la exportación en fresco”, señalando que los predios de banano y plátano deben realizar como mínimo cuatro monitoreos al año, es decir, uno trimestral, con su respectivo informe fitosanitario.

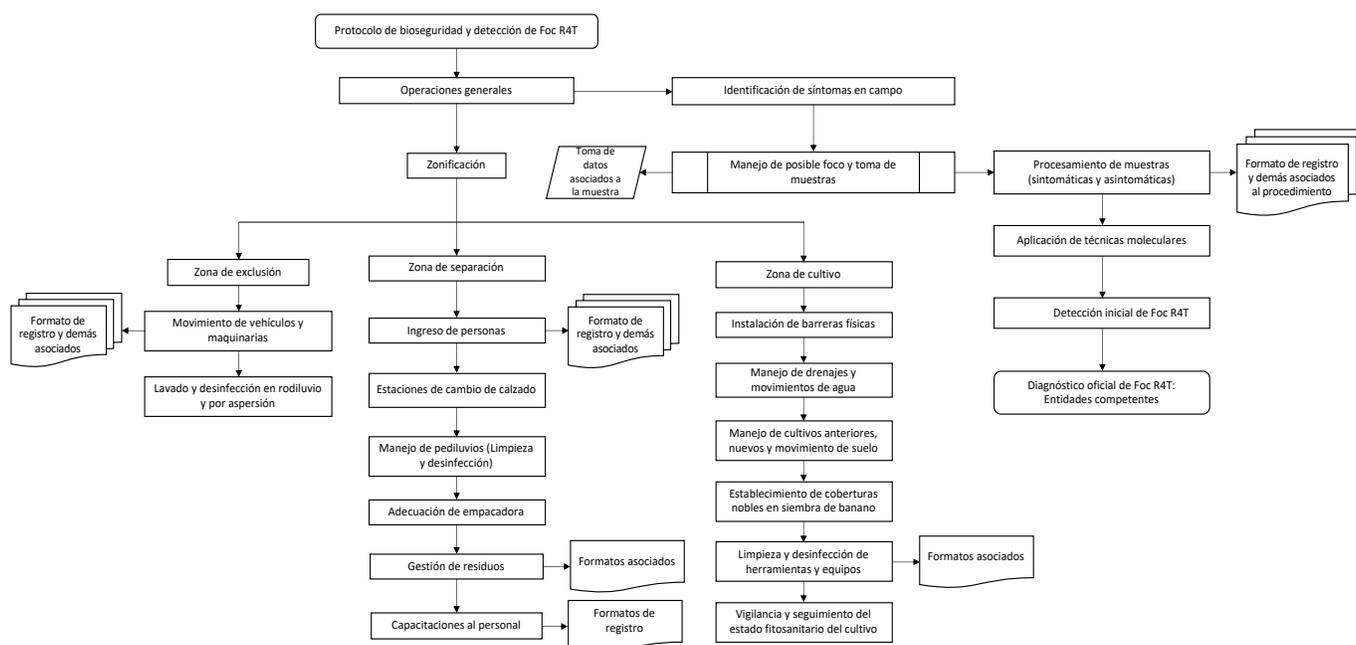
Con base en lo anterior, se crea una herramienta que facilita el manejo de la información mediante la web y una aplicación (app) móvil gratis, que no requiera datos móviles en campo, permitiendo conocer la trazabilidad sanitaria no solo de Foc R4T si no de otras enfermedades como

moko y diferentes plagas del cultivo, esto acompañado de capacitaciones teórico – prácticas al personal encargado (AUGURA, 2023b).

6.4. Protocolo de bioseguridad y detección de Foc R4T

La implementación de un protocolo de bioseguridad en los predios bananeros es esencial para evitar el ingreso o la dispersión de Foc R4T, estas acciones son fundamentales para prevenir grandes pérdidas económicas, proteger los cultivos y garantizar la sostenibilidad de la producción, para esto se debe contemplar la delimitación de áreas, control de movimientos de personas, vehículos y materiales, manejo adecuado de residuos, protocolos de desinfección y monitoreo constante (Figura 1).

Figura 1
Protocolo de bioseguridad y detección de Foc R4T.



La vigilancia y seguimiento de la plantación, se realiza mediante inspección visual por parte de personal de las fincas, personal capacitado en identificación de síntomas que sugieran la presencia del patógeno, además de esto se incluye la revisión oportuna por parte del personal del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) como método de detección temprana para la toma de

medidas pertinentes. La toma de muestras de tejido vegetal la realiza el ICA para análisis posteriores mediante técnicas moleculares y el respectivo diagnóstico, permitiendo confirmar la presencia o ausencia de Foc R4T con resultados confiables y contribuir de esta forma con la protección del cultivo de banano mediante decisiones rápidas y efectivas para contener la enfermedad y evitar la propagación.

7 Discusión

A nivel mundial, la producción de banano e incluso de plátano es amenazada por el hongo Foc R4T, situación sobre la cual se centran los esfuerzos de organizaciones internacionales con el fin de evitar pérdidas económicas y materiales devastadoras que acaben con los cultivos como sucedió con la producción de banano Gros Michel entre las décadas de 1950 y 1960 (Thangavelu et al., 2022).

Actualmente investigadores realizan estudios y ensayos en identificar y desarrollar cultivares resistentes a Foc R4T con diferentes programas de mejoramiento genético, no obstante, se requieren investigaciones precisas teniendo en cuenta las condiciones ambientales, requerimientos nutricionales, tiempo de producción, entre otras características, las cuales se integran y hacen parte finalmente del éxito de la comercialización del fruto. Aunque estos esfuerzos sea un panorama promisorio, todavía no se encuentran soluciones eficaces disponibles para el sistema agrícola del cultivo de banano (León Alcívar, 2022; Mintoff et al., 2021), razón por la cual, la constante búsqueda o modificaciones de nuevas tecnologías generan avances que facilitan la detección y prevención del patógeno.

En el caso puntual relacionado con el análisis de cepas aisladas provenientes de Ecuador asociadas a Foc R4T y a la raza subtropical (Foc SR4T), mediante métodos moleculares basados en PCR, los autores indican que es posible obtener falsos positivos sugiriendo que los marcadores empleados no son confiables para la identificación del microorganismo, así mismo se confirmó con el análisis filogenético, las pruebas VCG, la comparación de secuencias y las pruebas de patogenicidad, que los aislados comparten regiones genómicas con cepas patógenas pero que carecen de patogenicidad verdadera para el banano (Magdama et al., 2019).

Por otro lado, se debe tener en cuenta que el diagnóstico oficial de Foc R4T se considera a partir de la ejecución de tres etapas, la primera es contemplada como etapa molecular o de pre diagnóstico, la segunda requiere secuenciación, análisis filogenético y pruebas de compatibilidad entre diferentes VCG, finalmente, la tercera etapa, incluye pruebas de patogenicidad y verificación con los postulados de Koch (Matos et al., 2023). Estudios recientes incluyen dentro de los análisis

de patogenicidad, pruebas en hoja adherida y hoja desprendida, además de la evaluación de producción de enzimas que degradan la pared celular, ensayos de invasión de membrana, microscopia electrónica de barrido y análisis con PCR de transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR) para la obtención de resultados veraces y confiables (Tamang et al., 2024).

El hallazgo y la identificación temprana del patógeno depende de pruebas de diagnóstico confiables, es decir, el ensayo molecular está relacionado directamente con el rigor de las validaciones según los estándares predeterminados. Para esto es importante garantizar el diagnóstico preciso de Foc R4T, desarrollar y validar los ensayos moleculares teniendo en cuenta los criterios de desempeño como inclusividad, exclusividad, sensibilidad, selectividad, precisión, reproducibilidad, repetibilidad y robustez, de esta forma es posible conocer las limitaciones de la técnica de detección y evitar diagnósticos erróneos (Roberts et al., 2024).

Lo anterior es a nivel instrumental, con métodos analíticos y bioquímicos, sin dejar de lado la ciencia de la medición "la metrología" para que sea un diagnóstico confiable y en un futuro muy cercano, trazable. Sin embargo, es importante la vigilancia fitosanitaria del cultivo, la experiencia en reconocimiento y observación del personal en campo, así como del "diagnóstico" visual, sin restarle importancia a la cultura y aplicación de la herramientas, así como acciones de bioseguridad, que ayudan a prevenir el ingreso y la diseminación del patógeno a los cultivos sanos.

8 Conclusiones

La implementación de un protocolo de bioseguridad en las fincas bananeras es una herramienta vital para prevenir el ingreso y dispersión de Foc R4T, las medidas preventivas como control de movimiento de personas, desinfección de herramientas, uso de pediluvios y rodiluvios, entre otras, junto con la adecuada capacitación del personal administrativo, técnicos y operarios, conforman una estrategia integral para iniciar una respuesta rápida y eficaz frente a la seguridad del cultivo.

El análisis de laboratorio mediante técnicas moleculares es necesario para la confirmación y cuantificación de Foc R4T, con estas es posible detectar la presencia del hongo a nivel genético, incluso cuando las plantas aún no presentan síntomas visibles, es decir, en etapas tempranas de infección, contribuyendo significativamente a la protección del cultivo del banano. Por tanto, este debe ser rápido, preciso y exacto para proporcionar resultados confiables, primordiales en la toma de decisiones sobre el manejo de la enfermedad.

El conjunto de estas medidas es imprescindible para preservar el cultivo frente a la latente amenaza que representa Foc R4T; la implementación de un protocolo de bioseguridad, la vigilancia activa, detección y erradicación temprana de brotes son fundamentales para mantener la sostenibilidad de la producción bananera.

9 Recomendaciones

1. Es clave la capacitación y sensibilización al personal en campo y en las comunidades aledañas que basan su economía en este cultivo para el reconocimiento y tratamiento *in situ* para la no diseminación del hongo Foc R4T.

2. Es importante una constante vigilancia en la prevención y dispersión mecánica, aérea y por corrientes húmedas del patógeno en los cultivos.

3. Las técnicas moleculares aún no son un diagnóstico definitivo, por lo cual es recomendable emplear el uso de varias herramientas en la prevención y reconocimiento, así como experiencia del observador, por la variabilidad e identificación filogenética del microorganismo en mención. Ya que es necesario tener, a nivel analítico e instrumental, locus genéticos más específicos para que sea una detección más confiable.

4. Aún se requieren más esfuerzos gubernamentales, sociales e instituciones a nivel global para desarrollar herramientas más eficaces y eficientes.

5. Las técnicas instrumentales son buenas; sin embargo, estas técnicas pueden ser ineficientes actualmente, debido a que se cuenta con poco personal capacitado, que tenga una cultura de trabajo que evite la dispersión del microorganismo, aunado a los tiempos de comunicación, gestión de la detección en campo y toma de muestras, análisis y detección fiable del patógeno.

6. Se recomienda desarrollar otras herramientas que sean más rápidas, como pruebas tipo POCT (point of care testing), conocidas como pruebas rápidas, pero con confiabilidad y trazabilidad metrológica.

7. Se recomienda seguir o desarrollar protocolos que ayuden a hacer más eficiente la vigilancia fitosanitaria, el diagnóstico, la prevención y la mitigación con el fin de que los esfuerzos sean enfocados en la disminución de aparición y diseminación del patógeno.

Referencias

- Adicomex (2024). Exportaciones de banana cayeron 24% en 2023: Bananeros de Urabá y Magdalena en alerta. En *Adicomex* (Asociación de comercio exterior).
<https://acortar.link/1fvivD>
- Aguayo, J., Mostert, D., Fourrier-Jeandel, C., Cerf-Wendling, I., Hostachy, B., Viljoen, A., & Ioos, R. (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).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171767>
- Aguirre, E. (2024). La industria bananera Colombiana aspira a un crecimiento del volumen del 5% en 2024. En *Fresh Plaza*. <https://bit.ly/3yIJu1w>
- AUGURA, (2023a). *Informe de gestión 2023*. <https://acortar.link/GMKJTr>
- AUGURA. (2023b). *Informe de investigaciones 2019-2023*. <https://acortar.link/n6N3Gd>
- Carvalho, L. C., Henderson, J., Rincon-Florez, V. A., O'Dwyer, C., Cziślowski, E., Aitken, E. A. B., & Drenth, A. (2019). Molecular diagnostics of banana *Fusarium* wilt targeting decreed-in-xylem genes. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00547>
- Dita, M., Waalwijk, C., Buddenhagen, I. W., Souza, J. T., & Kema, G. H. J. (2010). A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. *Plant Pathology*, *59*(2), 348–357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02221.x>
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S. G., & Staver, C. P. (2018). *Fusarium* wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 871). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>
- Drenth, A., & Kema, G. (2021). The vulnerability of bananas to globally emerging disease threats. In *Phytopathology* (Vol. 111, Issue 12, pp. 2146–2161). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0311-RVW>
- Fontagro. (2022). Fortaleciendo capacidades en identificación de síntomas de Foc R4T. En *Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria*. <https://acortar.link/p0s3ya>
- García-Bastidas, F. (2022). *Fusarium oxysporum f.sp. cubense Tropical race 4 (Foc TR4)*.
- García-Bastidas, Fernando., Van der Veen, A. J. T., Nakasato-Tagami, G., Meijer, H. J. G., Arango-Isaza, R. E., & Kema, G. H. J. (2019). An improved phenotyping protocol for Panama Disease in banana. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01006>

- García-Bastidas, F., Pachacama-Gualotuña, S., Jarrín-Escudero, D., Iza-Arteaga, M., Ayala Vásquez, M., Ortiz, H., Dix, O., Echegaray, J., Farfán, D., Martínez, I., Beltrán, C., & Zeballos, G. (2020). *Guía Andina para el diagnóstico de Fusarium Raza 4 Tropical (R4T) agente causal de la marchitez por Fusarium (plátanos y bananos)*. www.comunidadandina.org
- García-Velasco, R., Portal-González, N., Santos-Bermúdez, R., Rodríguez-García, A., & Companioni-González, B. (2020). Genetic improvement for resistance to Fusarium wilt in banana. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 39(1), 122–146. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2008-2>
- Hou, Y., Chen, S., Zheng, Y., Zheng, X., & Lin, J. M. (2023). Droplet-based digital PCR (ddPCR) and its applications. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 158, Issue 116897). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116897>
- ICA. (2020). Lo que usted debe saber sobre la marchitez por Fusarium Raza 4 Tropical – Foc R4T. En *Instituto Colombiano Agropecuario*. <https://acortar.link/b8tq3n>
- ICA. (2021). Nuevo convenio ICA - AUGURA para proteger la producción bananera, las exportaciones y el empleo en el campo. En *Instituto Colombiano Agropecuario*. <https://acortar.link/jq9Xsd>
- ICA. (2021). No hay nuevos focos de Fusarium Raza 4 Tropical en Colombia. En *Instituto Colombiano Agropecuario*. <https://acortar.link/R7p11h>
- León Alcívar, B. A. (2022). *Aplicación de la minería genómica en banano para la búsqueda de genes de resistencia a Fusarium oxysporum*. Universidad Regional Amazónica IKIAM.
- Li, B., Du, J., Lan, C., Liu, P., Weng, Q., & Chen, Q. (2013). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 4. *European Journal of Plant Pathology*, 135(4), 903–911. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0136-9>
- Lovera, A., Rodríguez, E., Simbaqueba, J., Burbano-David, D., Carmona, S. L., Izquierdo-García, L. F., Gómez-Correa, J. C., Leon-Pacheco, R. I., Parra-Fuentes, M., Rodríguez-Yzquierdo, G., Betancourt, M., Zuluaga, P., & Soto-Suárez, M. (2023). Development and application of a droplet digital PCR assay for the detection of Fusarium oxysporum f. sp. cubense Tropical Race 4 from different biological samples. *Plant Pathology*, 001(13). <https://doi.org/10.1111/ppa.13813>

- Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 10, Issue 3, pp. 190–212). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., Onofre, J. G., & Jiménez-Gasco, M. D. M. (2020). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, the *Fusarium* wilt pathogen of banana, in Ecuador. *Plants*, 9(1133), 1–18. <https://doi.org/10.3390/plants9091133>
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., Sosa, D., Geiser, D. M., & Jiménez-Gasco, M. del M. (2019). Comparative analysis uncovers the limitations of current molecular detection methods for *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Race 4 strains. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222727>
- Martínez, G., Olivares, B. O., Rey, J. C., Rojas, J., Cardenas, J., Muentes, C., & Dawson, C. (2023). The advance of *Fusarium* wilt tropical Race 4 in Musaceae of Latin America and the Caribbean: Current situation. *Pathogens*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens12020277>
- Martínez-Solórzano, G. E., & Rey-Brina, J. C. (2021). Bananas (*Musa* AAA): Importance, production and trade in Covid-19 times. *Agronomía Mesoamericana*, 32(3), 1034–1046. <https://doi.org/10.15517/AM.V32I3.43610>
- Martínez-Solórzano, G. E., Rey-Brina, J. C., Pargas-Pichardo, R. E., & Enrique-Manzanilla, E. (2020). *Fusarium* wilt by tropical race 4: Current status and presence in the American continent. *Agronomía Mesoamericana*, 31(1), 259–276. <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37925>
- Matos, A. E. P., González, X. C., Villarini, R. I. B., Resto, T. O., González, G. C., & González, N. A. (2023). *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense Tropical Race 4 (Foc TR4): Latent risk for banana and plantains crops in Puerto Rico. *Current Agriculture Research Journal*, 11(3), 761–780. <https://doi.org/10.12944/carj.11.3.07>
- Matthews, M. C. (2019). *The development of novel molecular diagnostic assays for Fusarium oxysporum f.sp.cubense* [University Stellenbosch]. <https://scholar.sun.ac.za>
- Meldrum, R. A., Daly, A. M., Tran-Nguyen, L. T. T., & Aitken, E. A. B. (2013). The effect of surface sterilants on spore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. *Crop Protection*, 54, 194–198. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.08.014>
- MinAgricultura, & Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. (2020). *Cadena de Banano*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

- Mintoff, S. J. L., Nguyen, T. V., Kelly, C., Cullen, S., Hearnden, M., Williams, R., Daniells, J. W., & Tran-Nguyen, L. T. T. (2021). Banana cultivar field screening for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense tropical race 4 in the Northern Territory. *Journal of Fungi*, 7(627). <https://doi.org/10.3390/jof7080627>
- Nguyen, T. V., Tran-Nguyen, L. T. T., Wright, C. L., Trevorrow, P., & Grice, K. (2019). Evaluation of the efficacy of commercial disinfectants against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1 and tropical race 4 propagules. *Plant Disease*, 103(4), 721–728. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0453-RE>
- OIRSA. (2013). *Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de Fusarium oxysporum f.sp. cubense en un país de la región del OIRSA*.
- Ordóñez, N., Salacinas, M., Mendes, O., Seidl, M. F., Meijer, H. J. G., Schoen, C. D., & Kema, G. H. J. (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. <https://doi.org/10.1111/ppa.13093>
- Parlomas, S., Goetze, P. K., Humpal, D., Kurouski, D., & Jo, Y. K. (2022). Raman spectroscopy enables confirmatory diagnostics of *Fusarium* wilt in asymptomatic Banana. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.922254>
- Roberts, J. M., Carvalhais, L. C., O'Dwyer, C., Rincón-Flórez, V. A., & Drenth, A. (2024). Diagnostics of *Fusarium* wilt in banana: Current status and challenges. In *Plant Pathology* (Vol. 73, pp. 760–776). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/ppa.13863>
- Rodríguez-Yzquierdo, G., Olivares, B. O., Silva-Escobar, O., González-Ulloa, A., Soto-Suarez, M., & Betancourt-Vásquez, M. (2023). Mapping of the susceptibility of Colombian Musaceae lands to a deadly disease: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4. *Horticulturae*, 9(757). <https://doi.org/10.3390/horticulturae9070757>
- Salacinas, M., Meijer, H. J. G., Mamora, S. H., Corcolon, B., Gohari, A. M., Ghimire, B., & Kema, G. H. J. (2022). Efficacy of disinfectants against Tropical Race 4 causing *Fusarium* Wilt in Cavendish bananas. *Plant Disease*, 106(3), 966–974. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1814-RE>
- Tamang, P., Kumar, P., Chauhan, A., Rastogi, S., Srivastava, S., & Jena, S. N. (2024). Molecular insights into the variability and pathogenicity of *Fusarium odoratissimum*, the causal agent of

- Panama wilt disease in banana. *Microbial Pathogenesis*, 190(106594). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106594>
- Thangavelu, R., Edwinraj, E., Gopi, M., Pushpakanth, P., Sharmila, K., Prabakaran, M., Loganathan, M., & Uma, S. (2022). Development of PCR-Based Race-specific markers for differentiation of Indian *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, the causal agent of Fusarium wilt in Banana. *Journal of Fungi*, 8(53). <https://doi.org/10.3390/jof8010053>
- Tinoco, J.S. (2024). El sector bananero del país exportó USD\$1.000 millones y generó 300.000 empleos. En *Agronegocios*. <https://acortar.link/ttpNud>
- Ullah, S. (2019). *The treatment of Fusarium Oxysporum f.sp. cubense in soil and water*. <https://scholar.sun.ac.za>
- Voora, V., Bermúdez, S., Farrell, J. J., Larrea, C., & Luna, E. (2023). *Banana prices and sustainability. Market Overview*.
- Zhang, X., Zhang, H., Pu, J., Qi, Y., Yu, Q., Xie, Y., & Peng, J. (2014). Development of a Real-Time Fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4 in soil. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/annotation/8a1fd6a3-754f-42e2-a906-9d224167344e>
- Zhou, G. D., He, P., Tian, L., Xu, S., Yang, B., Liu, L., Wang, Y., Bai, T., Li, X., Li, S., & Zheng, S. J. (2023). Disentangling the resistant mechanism of Fusarium wilt TR4 interactions with different cultivars and its elicitor application. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1145837>