



Fortalecimiento de capacidades para la prevención y el manejo de la marchitez por Fusarium de las Musáceas en América Latina y el Caribe - ATN/RF- 18761-RG

Producto 1. Boletín No. 1. Evaluación de métodos de diagnóstico molecular para *Foc* R4T

2023

Diana Burbano, Andrea Lovera, Isabel Patiño, Lorena Mojica, Josefa Sánchez, Francisco Fitoria, Carmen Bieberach, David Ramos, Ruth Mayela Castro Vásquez, Gil Eduardo De Diego Salas, Socorro García, Luis Matos, Pedro Terrero, Mónica Betancourt, Mauricio Soto-Suárez.





Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por: Diana Burbano, Andrea Lovera, Isabel Patiño, Lorena Mojica, Josefa Sánchez, Francisco Fitoria, Carmen Bieberach, David Ramos, Ruth Mayela Castro Vásquez, Gil Eduardo De Diego Salas, Socorro García, Luis Matos, Pedro Terrero, Mónica Betancourt, Mauricio Soto-Suárez.

Copyright © 2023 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

RESUMEN 4

ABSTRACT 4

Introducción 5

Resultados 8

Conclusiones y recomendaciones 14

Referencias Bibliográficas 15

Instituciones participantes 18

RESUMEN

Fusarium oxysporum f. sp. *cupense* (*Foc*) raza 4 tropical (R4T) causante de la marchitez vascular en musáceas, representa una amenaza para la industria bananera mundial. Reportes recientes del patógeno en Colombia (2019), Perú (2021) y Venezuela (2023), demuestran la importancia de fortalecer los protocolos de vigilancia epidemiológica, detección y diagnóstico para contener su dispersión en América Latina y el Caribe. El diagnóstico/detección de R4T está basado en la observación de síntomas en campo, análisis microbiológicos y técnicas de biología molecular. Desde hace más de una década se han desarrollado métodos basados en PCR convencional y PCR cuantitativa para la detección de R4T. Estos métodos están optimizados, en su mayoría, para identificar el patógeno a partir de plantas sintomáticas y posterior aislamiento del hongo. Con la llegada de R4T a América Latina, es necesario estandarizar los protocolos de detección del patógeno y verificar que los marcadores pueden amplificar las variantes del hongo presentes en esta región. En este estudio se plantearon tres objetivos, (i) estandarizar diferentes metodologías basadas en PCR en un laboratorio de referencia para la región (ii) dotar a países de la región con ADN de controles positivos para la detección de R4T, y (iii) estandarizar en cada país metodologías de detección de R4T teniendo en cuenta las diferencias en disponibilidad de reactivos, consumibles y equipos de laboratorio. En este boletín se presentan los resultados obtenidos para cada objetivo, que permitieron finalmente entregar como producto el protocolo de diagnóstico de *Foc* R4T unificado y validado por los seis países ejecutores del proyecto.

Palabras Clave: Marchitez por *Fusarium*, banano, *Foc* R4T, detección, diagnóstico, PCR, marcadores moleculares.

ABSTRACT

Fusarium oxysporum f. sp. *cupense* (*Foc*) tropical race 4 (R4T), which causes vascular wilt in musaceae, represents a threat to the global banana industry. Recent reports of the pathogen in Colombia (2019), Peru (2021) and Venezuela (2023), demonstrate the importance of strengthening epidemiological surveillance, detection, and diagnosis protocols to contain its dispersion in Latin America and the Caribbean. The diagnosis/detection of TR4 is based on the observation of symptoms in the field, microbiological analyzes and molecular biology techniques. For more than a decade, methods based on conventional PCR and quantitative PCR have been developed for the detection of TR4. These methods are mostly optimized to identify the pathogen from symptomatic plants and subsequent isolation of the fungus. With the arrival of TR4 in Latin America, it is necessary to standardize the pathogen detection protocols and verify that the markers can amplify the fungal variants present in this region. In this study, three objectives were set: (i) standardize different PCR-based methodologies in a reference laboratory for the region (ii) provide countries in the region with DNA of positive controls for the detection of TR4, and (iii) standardize TR4 detection methodologies in each country taking into account the differences in availability of reagents, consumables and laboratory equipment. This bulletin presents the results obtained for each objective, which finally made it possible to deliver as a product the *Foc* TR4 diagnostic protocol unified and validated by the six executing countries of the project.


Keywords: *Fusarium* wilt, banana, *Foc* TR4, detection, diagnosis, PCR, molecular markers.

INTRODUCCIÓN

La marchitez por *Fusarium* es considerada una de las enfermedades más devastadoras para las Musáceas, en especial para el banano de exportación (var. Cavendish). *Foc* R4T se detectó por primera vez en Taiwán en 1967 (Hwang et al., 2004; Su et al., 1977), probablemente después de haber sido introducido en plantas infectadas de Sumatra, Indonesia, y posteriormente se propagó ampliamente en la mayoría de los países productores de banano (Ploetz et al., 2015). *Foc* se clasifica en cuatro razas según los cultivares de banano que infecta. La raza 1 (R1) es patógeno del cultivar Gros Michel (AAA), Silk (AAB) y Pisang Awak (ABB) (Stover et al., 1961). La raza 2 (R2) afecta cultivares de bananos de cocción, como Bluggoe (ABB) y otros plátanos. La raza 3 (R3) afecta principalmente a plantas del género *Heliconia* spp. pero no plátanos ni bananos (Ploetz et al., 2005), por lo que estas poblaciones no se consideran actualmente como parte de la estructura racial de *Foc*. Las poblaciones de la raza 4 (R4) afectan el cultivar Cavendish (AAA), y también todas variedades que son afectadas por las razas R1 y R2. La raza 4 de *Foc* está dividida en raza 4 subtropical (R4S) y raza 4 tropical 4 (R4T). La R4S comprende poblaciones de *Foc* que solo afectan a los bananos Cavendish en los subtrópicos donde las condiciones predisponentes de la enfermedad (como las bajas temperaturas) podrían jugar un papel fundamental. En cambio, R4T comprende una población clonal que afecta gravemente al banano Cavendish (y muchos otros cultivares) tanto en el trópico como en los subtrópicos.

Los métodos de identificación de aislamientos de *F. oxysporum* basados en caracteres morfológicos son poco eficientes y altamente demandantes en trabajo. Por lo tanto, las alternativas de detección molecular se han convertido en la herramienta más eficiente para el diagnóstico de cepas patógenas en el complejo de especies de *F. oxysporum* (van Dam et al., 2017). El método de diagnóstico molecular más utilizado para la identificación de *Foc* R4T está basado en el uso de regiones espaciadoras intergénicas (IGS) del clúster de genes ribosomales nucleares, la cual es eficiente para identificar los aislamientos de R4T (Dita et al., 2010). Adicionalmente, la región IGS se ha utilizado en métodos de diagnóstico para R4T mediante Loop Mediated Isothermal Amplificación (LAMP) (Zhang et al., 2013). Sin embargo, este método no es capaz de distinguir las cepas agrupadas en los grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) 0121 y 0122 (R4), las cuales están relacionadas a R4ST, que también infectan plantas tipo Cavendish, pero se caracterizan por ser moderadamente virulentas comparadas con R4T (Buddenhagen, 2009; Ordóñez et al., 2015; Czislowski et al., 2017; Mostert et al., 2017; Carvalhais et al., 2019).

En otro estudio reportado por Lin et al, (2009), utilizaron marcadores tipo RAPD e identificaron un marcador que amplificaba para el gen del factor de elongación alfa 1 (*EF-1*), el cual permite identificar cepas R4, pero no discrimina para R4T o R4ST. En el año 2019 Carvalhais et al., reportaron un perfil de genes homólogos tipo *SIX* (i.e. Secreted in the Xylem), presentes



únicamente en cepas fitopatógenicas de *F. oxysporum*, el cual es capaz de discriminar mediante PCR e Indels (inserción o delección) entre cepas patogénicas a nivel de razas fisiológicas. Por ejemplo, SIX1a está presente en cepas de R4 y R4T y se pueden diferenciar mediante un Indel en los nucleótidos 561-565 (GG presente en R4T/CC presente en R4). SIX8 es específico de R4ST, mientras que SIX6 es específico de R1, lo que convierte a este perfil de genes SIX en una herramienta de diagnóstico eficiente para identificar cepas fitopatógenicas de *Foc* en musáceas (Carvalhais et al., 2019).

Es importante mencionar que la mayoría de los protocolos y primers, han sido diseñados para la detección del patógeno en plantas de musáceas sintomáticas, por esta razón en algunos casos pueden observarse falsos positivos con fusarium de otros hospederos y en plantas asintomáticas (Magdama et al., 2019), nuevos métodos basados en PCR digital están siendo utilizados para detectar el patógeno en plantas asintomáticas, pero aún requieren validación en diferentes tipos de muestras y ambientes (Lovera et al., 2023). Otros métodos de diagnóstico desarrollados en los últimos años están basados en PCR, pero básicamente usando las mismas regiones descritas anteriormente.

En la detección/diagnóstico de patógenos, las técnicas moleculares han permitido una reducción de los tiempos para conocer el resultado, además dichas técnicas, presentan una alta especificidad y mayor certeza en la determinación de un amplio número de patologías que afectan tanto animales como plantas. El diagnóstico molecular permite la detección rápida de R4T, que se puede utilizar para la vigilancia y contención, permitiendo un manejo oportuno para evitar la propagación del patógeno a otros monocultivos de Cavendish.

En este estudio, se realizó una selección de marcadores previamente reportados en la literatura (**Tabla 1**), que fueron diseñados para ser específicos en la identificación de *Foc* R4T mediante las técnicas de PCR convencional o en tiempo real (qPCR). Inicialmente, se pusieron a punto cada uno de los juegos de cebadores en el laboratorio seleccionado como referencia en la región, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Agrosavia. Luego, se enviaron muestras de ADN de R4T a las siguientes instituciones para ser usados como controles en la estandarización de los métodos de detección: Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador (INIAP), Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) y el Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria de Costa Rica (INTA). Por último, cada una de las instituciones realizó el proceso de estandarización de la detección de R4T usando sus propios reactivos, consumibles y equipos de laboratorio.

Tabla 1. Marcadores moleculares reportados en la literatura para la detección de *Foc* y R4T los cuales fueron seleccionados para estandarización de protocolos de diagnóstico en este estudio.

Cebadores	Técnica	Referencias
<i>W2987-F/W2897-R</i>	PCR	Li et al. 2013; Magdama et al. 2019
<i>Foc TR4-F/TR4-R</i>	PCR	Dita et al. 2010
<i>TR4-F2/TR4 R1</i>	PCR	Maymon et al. 2020
<i>RT_13.16_F2.5/RT_13.16_R2.5</i>	PCR y qPCR	Matthews et al. 2020
<i>VCG01213/16F1_ /VCG01213/16 R2</i>	PCR	Li et al. 2013
<i>Foc-1/Foc-2</i>	PCR	Lin et al. 2013
<i>SIX1α_266-F/SIX1α_266</i>	PCR	Carvalhais et al. 2019

RESULTADOS

Como parte de un proceso de levantamiento de la línea base en cada una de las instituciones asociadas al estudio, se determinó que, con excepción de INIAP de Ecuador, las demás instituciones carecían de metodologías optimizadas para la detección de R4T por PCR, en la mayoría de los casos contaban con un kit comercial para la detección de R4T, el cual en general aplicaban sin identificar correctamente los pasos e implicaciones del protocolo. Es importante mencionar que los aliados en este proyecto corresponden a institutos de investigación y no a ONPFs (Organización Nacional de Protección Fitosanitaria) y que, por lo tanto, las ONPFs podrían tener optimizadas técnicas de PCR y PCR cuantitativa. En general, de acuerdo legislación de cada uno de los países que hacen parte de este estudio, los laboratorios de institutos de investigación agropecuaria están habilitados para apoyar en procesos de diagnóstico con R4T en caso de que ingrese al país, en el momento en el que el número de muestras procesadas por la respectiva ONPF sobrepase su capacidad de análisis. Por tal razón, es importante las instituciones de investigación como INIAP, INTA, IDIAF e INTA Costa Rica, optimicen metodologías para detección molecular de R4T.

En el laboratorio seleccionado como referencia en la región (Agrosavia) se realizó la validación y optimización de tecnologías basadas en PCR para la detección de R4T (**Tabla 1 y Figura 1**), todos los marcadores moleculares evaluados por PCR convencional y qPCR fueron específicos para R4T, comparando con *Foc* R1. Adicionalmente, se usaron algunos ADNs control, entre ellos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) raza 1 (R1), *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol59), *Verticillium dahliae* (VdR2) y *F. oxysporum* f. sp. *physali* (MAP5) y *F. solani* (F.sol). No se observaron amplificaciones en los ADN usados como control negativo (**Figura 1**). Por otra parte, el conjunto de cebadores RT_13.16_F2.5/RT_13.16_R2.5 (Matthews et al., 2020), se evaluaron por qPCR. Para este marcador, se optimizaron las condiciones de PCR, especificidad de los cebadores (temperatura melting) y especificidad sobre ADNs control foráneos (**Figura 1**). Finalmente, desde Agrosavia se compartieron todos los protocolos y condiciones experimentales con los institutos de investigación de la región mencionados anteriormente para que usando sus propios reactivos y equipos de laboratorio evaluaran el desempeño de los marcadores usados para la detección por PCR de R4T.

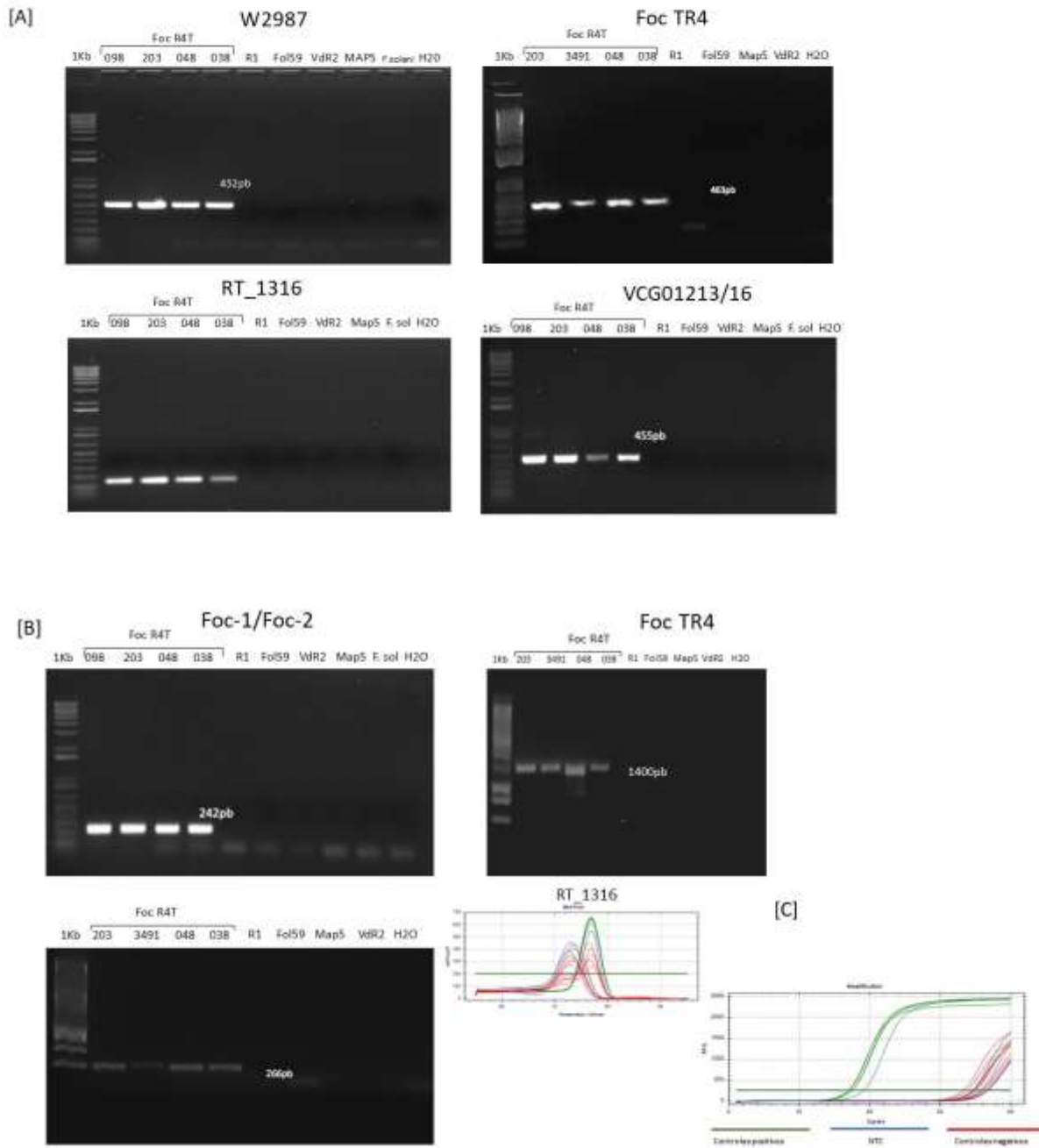


Figura 1. Marcadores moleculares específicos para R4T, comparando con R1 y otros microorganismos entre ellos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol59), *Verticillium dahliae* (VdR2) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali* (MAP5).

Como parte de la estrategia para estandarizar en cada país metodologías para la detección molecular de R4T, representantes de cada una de las instituciones mencionadas anteriormente compartieron experiencias teórico-prácticas sobre temáticas como diagnóstico y epidemiología asociadas a Foc R4T (**Figura 2**). Durante el desarrollo del taller teórico-práctico, los asistentes conocieron de primera mano y se entrenaron en el uso de los protocolos para la detección molecular de R4T (presentados en la Figura 1). En el **Anexo 1.1** Se describen los protocolos que fueron entregados y validados entre países y que posteriormente serán la base para la estructuración de un manual de laboratorio para la detección de Foc R4T.



Figura 2. Taller teórico-práctico sobre diagnóstico y epidemiología en Foc R4T realizado en las instalaciones de Agrosavia-Tibaitatá, Colombia. Funcionarios de instituciones como INIAP, INTA, IDIAF, INTA Costa Rica, ICA y Agrosavia compartieron experiencias en métodos moleculares para la detección del patógeno.

Una vez compartidos los conocimientos, experiencias, protocolos y controles de ADN para la detección molecular de R4T con las instituciones de investigación ejecutoras de cada país, dichas instituciones iniciaron en sus laboratorios los procesos de estandarización de detección por PCR

de R4T usando sus propios reactivos, consumibles y equipos de laboratorio. Los resultados de estandarización de detección molecular para R4T se presentan en la **Figura 3**.

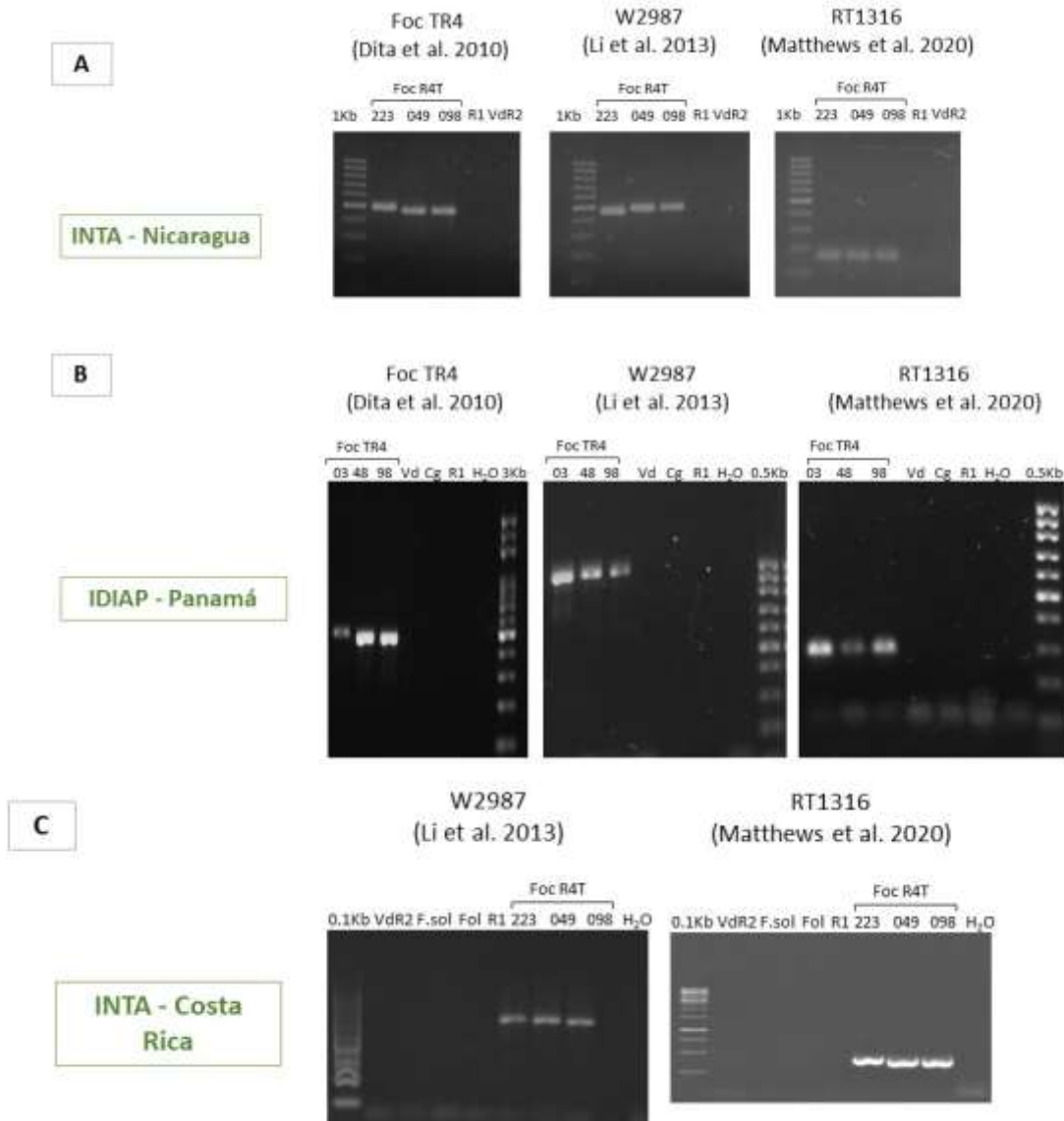
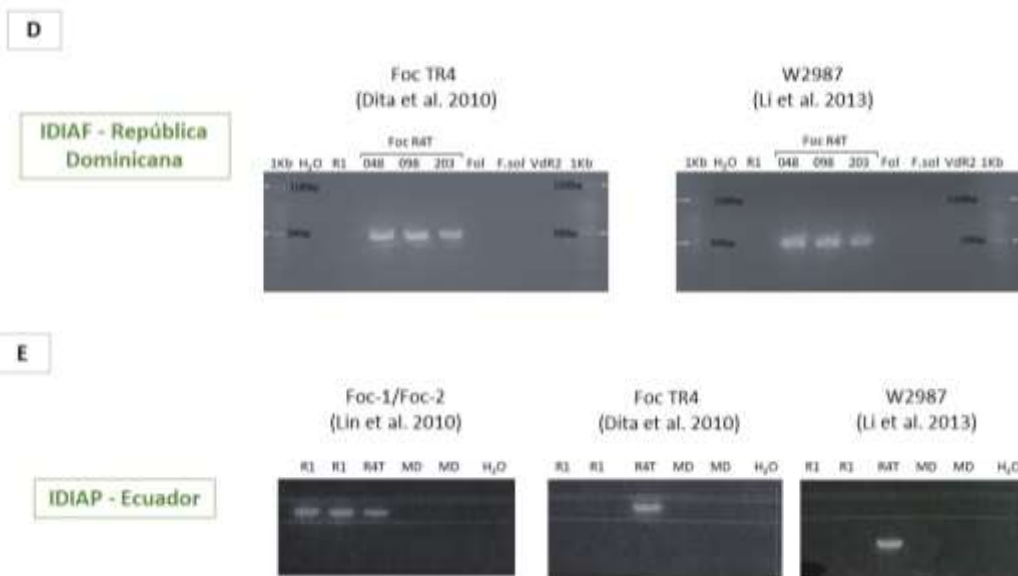


Figura 3. Marcadores moleculares reportados en la literatura para la detección de Foc y R4T. Se muestran las bandas de amplificación por PCR convencional con tamaños esperados según cada marcador molecular. Los protocolos y condiciones PCR fueron optimizados en cada laboratorio de instituciones de investigación ejecutoras de cada país de forma individual. [A] INTA, Nicaragua; [B] IDIAP, Panamá; [C] INTA, Costa Rica;



Continuación Figura 3. Marcadores moleculares reportados en la literatura para la detección de Foc y R4T. Se muestran las bandas de amplificación por PCR convencional con tamaños esperados según cada marcador molecular. Los protocolos y condiciones PCR fueron optimizados en cada laboratorio de instituciones de investigación ejecutoras de cada país de forma individual. [D] IDIAF, República Dominicana; [E] INIAP, Ecuador.

Cada una de las instituciones logró estandarizar por lo menos dos técnicas de detección de R4T basadas en PCR. Es importante resaltar que los protocolos de detección fueron optimizados con los reactivos a los cuales cada institución tenía acceso comercial (**Tabla 2**). Este resultado es de gran interés, puesto que para América Latina y el Caribe los proveedores locales no pueden asegurar en todos los casos que se adquieran los mismos reactivos con los que fueron reportados los marcadores moleculares para R4T en las publicaciones originales.

Debe destacarse que con dos las instituciones asociadas al proyecto específicamente con Agrocalidad de Ecuador e INIA de Perú se desarrolló un proceso de capacitación similar a los desarrollados con las entidades ejecutoras y también se les entregó controles positivos del patógeno lo que permitió aumentar el número de instituciones que desarrollaron el proceso de validación de la metodología de diagnóstico.



Tabla 2. Métodos estandarizados de detección por PCR de R4T usando los reactivos accesibles de acuerdo con proveedores locales en cada país

Institución	Técnica	Marcador molecular	Reactivo y marca
INTA, Nicaragua	PCR convencional	FocTR4, W2987, RT1316	DreamTaq PCR Master Mix (2X) - Thermo Fisher Scientific
IDIAP, Panamá	PCR convencional	FocTR4, W2987, RT1316	Taq DNA Polymerase (5U/ μ L) – Omega Bio-tek
INTA, Costa Rica	PCR convencional	W2987, RT1316	DreamTaq PCR Master Mix (2X) - Thermo Fisher Scientific
IDIAF, República Dominicana	PCR convencional	FocTR4, W2987	GoTaq Green Master Mix - Promega
IDIAP, Ecuador	PCR convencional	Foc-1/Foc-2, FocTR4, W2987	Invitrogen Taq DNA Polymerase - Thermo Fisher Scientific




CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES


La coordinación acertada y dinámica entre instituciones de países en América Latina y el Caribe potencia la capacidad de preparación y reacción frente a emergencias fitosanitarias. En estudio, producto de un esfuerzo coordinado entre instituciones de investigación en Colombia, Panamá, Nicaragua, Costa Rica, República Dominicana y Ecuador se logró la estandarización de diferentes metodologías basadas en PCR para el diagnóstico de *Foc R4T*. Adicionalmente, se compartieron experiencias de investigación a nivel teórico-práctico y se estrecharon lazos de colaboración entre instituciones.

Finalmente, en las discusiones realizadas entre instituciones asociadas se resaltó la necesidad de avanzar en la estandarización de metodologías que permitan una completa caracterización de *Foc R4T* en caso de ingreso a un nuevo país de la región, entre ellas, secuenciación completa de genomas y métodos moleculares capaces de detectar *Foc R4T* en muestras complejas como aguas y suelos, con el fin de estar preparados para desarrollar actividades de vigilancia y estudios epidemiológicos en cada país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguayo, J., Mostert, D., Fourrier-Jeandel, C., Cerf-Wendling, I., Hostachy, B., Viljoen, A., & loos, 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), e0171767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171767>.
- Buddenhagen, I. W. (2009). Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense and history of introduction of “Tropical Race 4” to better manage banana production. *Acta Hort.* 828:193-204.
- Carvalhais, L. C., Henderson, J., Rincon-Florez, V. A., O’Dwyer, C., Czislowksi, E., Aitken, E. A. B., & Drenth, A. (2019). Molecular Diagnostics Of Banana Fusarium Wilt Targeting Secreted-In-Xylem Genes. *Frontiers In Plant Science*, 10, 547. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00547>.
- Czislowksi, E., Gardiner, D., Batley, J., Edwards, D., Mitter, N., & Aitken, E. (2017). Investigating the molecular mechanisms of pathogenicity of the banana pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.
- Dita, M. A., 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>
- Hwang, S. C., & Ko, W. H. (2004). Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant disease*, 88(6), 580-588.
- 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>
- Li, M., Shi, J., Xie, X., Leng, Y., Wang, H., Xi, P., Zhou, J., Zhong, S., & Jiang, Z. (2013b). 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.
- Li CY, Mostert, Zuo CW, Beukes I, Yang QS, Sheng O, Kuang RB, Wei YR, Hu CH, Rose L, Karangwa P, Yang J, Deng GM, Liu SW, Gao J, Viljoen A and Yi GJ (2013c) Diversity and Distribution of the Banana Wilt Pathogen *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense in China. *Fungal Genom Biol* dx.doi.org/10.4172/2165-8056.1000111.
- Lin, Y. H., Chang, J. Y., Liu, E. T., Chao, C. P., Huang, J. W., & Chang, P. F. L. (2009). Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp.

- 
- cubense race 4. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 353-365.
- Lin, Y. H., Su, C. C., Chao, C. P., Chen, C. Y., Chang, C. J., Huang, J. W., & Chang, P. F. L. (2013). A Molecular Diagnosis Method Using Real-Time PCR For Quantification And Detection Of *Fusarium Oxysporum* F. Sp. Cubense Race 4. *European Journal Of Plant Pathology*, 135(2), 395–405. <https://doi.org/10.1007/S10658-012-0096-0>.
 - Lovera, A., Rodríguez, E., Simbaqueba, J., Burbano-David, D., Carmona, S. L., Izquierdo-García, L. F., ... & Soto-Suárez, M. 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*.
 - Magdama F (2019) Comparative analysis uncovers the limitations of current molecular detection methods for *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense race 4 strains. *PLoS ONE* 14(9): e0222727. [Doi. Org/10.1371/journal.pone.0222727](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222727).
 - Maymon, M., Shpatz, U., Harel, Y. M., Levy, E., Elkind, G., Teverovsky, E., Gofman, R., Haberman, A., Zemorski, R., Ezra, N., Levi, Y., Or, G., Galpaz, N., Israeli, Y., & Freeman, S. (2018). First Report Of *Fusarium Oxysporum* F. Sp. Cubense Tropical Race 4 Causing *Fusarium* Wilt Of Cavendish Bananas In Israel.
 - Matthews MC (2020) Quantitative detection of economically important *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense strains in Africa in plants, soil and 2áter. *PLoS ONE* 15(7): e0236110. [Doi.org/10.1371/journal. Pone.0236110](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236110).
 - Mostert, D., Molina, A. B., Daniells, J., Fourie, G., Hermanto, C., Chao, C. P., ... & Viljoen, A. (2017). The distribution and host range of the banana *Fusarium* wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, in Asia. *PLoS One*, 12(7), e0181630.
 - Ordoñez, N., García Bastidas, F., Laghari, H. B., Akkary, M. Y., Harfouche, E. N., al Awar, B. N., Frères, D., and Kema, G. H. J. (2015). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 causing Panama disease in Cavendish bananas in Pakistan and Lebanon. *Plant Dis*.
 - 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.
 - Ploetz, R. C. (2005). Panama disease: An old nemesis rears its ugly head: Part 1. The beginnings of the banana export trades. *Plant Health Progress*, 6(1), 18.
 - Ploetz, R., Freeman, S., Konkol, J., Al-Abed, A., Naser, Z., Shalan, K., ... & Israeli, Y. (2015). Tropical race 4 of Panama disease in the Middle East. *Phytoparasitica*, 43, 283-293.
 - Stover, R. H., Hildreth, R. C., & Thornton, N. C. (1961). Studies on *Fusarium* Wilt of Bananas:

- 
- Vii. Field Control. *Canadian Journal of Botany*, 39(1), 197-206.
- Su, H. J., Chuang, T. Y., & Kong, W. S. (1977). Physiological race of fusarial wilt fungus attacking Cavendish banana of Taiwan. *Taiwan Banana Res. Inst. Spec. Publ*, 2(21), 814-818.
 - 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(1), 53.
 - van Dam, P., Fokkens, L., Ayukawa, Y., van der Gragt, M., Ter Horst, A., Brankovics, B., ... & Rep, M. (2017). A mobile pathogenicity chromosome in *Fusarium oxysporum* for infection of multiple cucurbit species. *Scientific Reports*, 7(1), 9042.
 - Zhang, X., Zhang, H., Pu, J., Qi, Y., Yu, Q., Xie, Y., & Peng, J. (2013). 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(12), e82841.

INSTITUCIONES PARTICIPANTES

EJECUTORES



ASOCIADOS



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org