

**Proyecto: 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 8.1: Memorias Taller regional 1: Diagnóstico del marchitamiento por Fusarium (*Foc R4T*)**  
 17, 18, 19 de noviembre 2021



Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un programa de cooperación administrado por el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), pero con su propia membresía, estructura de gobernabilidad y activos. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo, FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Mónica Betancourt Vásquez y Sindy Lorena Mojica, recogiendo el resumen ejecutivo de las presentaciones desarrolladas en el evento: Taller regional: Diagnóstico del marchitamiento por Fusarium (Foc R4T), 17, 18, 19 de noviembre 2021.

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: [mbetancourt@agrosavia.co](mailto:mbetancourt@agrosavia.co)

**FONTAGRO**

Correo electrónico: [fontagro@fontagro.org](mailto:fontagro@fontagro.org)

[www.fontagro.org](http://www.fontagro.org)



---



## ***Índice de Contenido***

Agradecimientos .....	4
Introducción.....	6
Antecedentes .....	8
Presentaciones.....	11
Lecciones aprendidas .....	28

---

## **Agradecimientos**

Los organizadores del evento agradecen a los ponentes que acompañaron el evento y a sus respectivas instituciones por permitir la participación de estos, especialmente a:

***Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria – ONPFs e Institutos de Investigación – INIAs a nivel de América Latina y el Caribe.***

- Ecuador (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias - INIAP): Johanna Buitrón
- República Dominicana (Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales - IDIAF): Luis Antonio Matos Casado
- Costa Rica (Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria – INTA): Gil de Eduardo de Diego Salas
- Panamá (Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá – IDIAP): David Ramos
- Perú (Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA): Juan Carlos Rojas Llanque
- Nicaragua (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria – INTA): Luz María Flores
- Ecuador (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario – Agrocalidad): Silvia Pachacama
- Costa Rica (Servicio Fitosanitario del Estado – SFE): Luis Valverde
- Panamá (Ministerio de Desarrollo Agropecuario de Panamá – MIDA): Javier Corrales
- México (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria – SENASICA): Lervin Hernández
- Centro América (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria – OIRSA): Nancy Villegas

Adicionalmente se agradece a los investigadores de Agrosavia que diseñaron y ejecutaron este curso de capacitación: Mauricio Soto Suárez, Andrea Lovera, Diana Burbano. A los investigadores Lorena Mojica Ramos, Diego Fernando Avendaño, Sandra Lorena Carmona, Luisa Fernanda Izquierdo, Magda Gómez Marroquín, Diana Marcela Torres, Diana Marcela Burbano y Ruth Yesenia Quiroga, quienes apoyaron la compilación de memorias.

---

## *Instituciones ejecutoras y asociadas en el marco del proyecto:*

### **EJECUTORES**



### **ASOCIADOS**



---

## Introducción

La marchitez por *Fusarium* es una de las enfermedades más devastadoras de las musáceas. El agente causal presenta una gran diversidad genética y patogénica. Se han descrito más de 20 Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCG, siglas en inglés) distribuidos en cuatro razas patogénicas. Las razas han sido identificadas en base a la patogenicidad de las poblaciones de *Foc* a determinados cultivares. La raza 1 (*Foc* R1) que afecta a los cultivares Gros Michel (AAA), Manzano (AAB) y los del subgrupo Pisang awak (ABB) y es reconocida porque causó en América la destrucción de más de 378.000 ha de Gros Michel en la primera mitad del siglo XX. La epidemia de *Foc* R1 en Gros Michel se debió en gran medida al desconocimiento de la epidemiología de la enfermedad, la ausencia de medidas de cuarentena, el empleo de material de siembra infectado y al ciclo de abandonar campos infectados y mover las plantaciones hacia nuevas áreas. A finales de los años 60, se describió una nueva cepa de *Foc* afectando al subgrupo Cavendish en Taiwán. Sin embargo, *Foc* Raza 4 Tropical (*Foc* R4T) no se clasificó e identificó hasta 1994. Por más de 20 años *Foc* R4T estuvo restringido al Este y Sudeste Asiático y al Territorio Norte de Australia. Sin embargo, en los últimos 10 años empezó a dispersarse rápidamente y se ha confirmado su presencia en más de 20 países, incluidos en los últimos dos años, los países latinoamericanos de Colombia y Perú.

Considerando que el 80% del banano de exportación se produce en América Latina, es fundamental contar con métodos de diagnóstico seguros que permitan a los países la detección temprana y la certeza de la confirmación de la presencia del patógeno en caso de que la enfermedad se detecte en un país libre, por esta razón en este curso se plantearon los siguientes objetivos y perfil de asistentes.

Este taller hace parte de los productos comprometidos dentro del proyecto: **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** en el cual se planteó el desarrollo de tres talleres regionales a desarrollar uno por año, con las siguientes temáticas: Producto 8. Talleres de capacitación regionales: 1) diagnóstico molecular de *Foc* R4T (año 1 – 2021), 2) prácticas de manejo y bioseguridad para *Foc* R4T (2023) y 3) Evaluación de la resistencia frente a *Foc* R4T de los materiales (2024). Por lo tanto, con estas memorias se cumple el entregable del primer año.

### **Objetivo general:**

Desarrollar capacidades a nivel nacional y regional en ONPFs y Centros de Investigación para el diagnóstico en campo y laboratorio de *Foc* R4T.

### **Objetivos específicos:**

- Fortalecer capacidades en la detección de plantas sospechosas de estar infectadas por la marchitez por *Fusarium* en campo y su discriminación de otras patologías similares
- Fortalecer capacidades sobre estrategias de colecta de muestras y técnicas moleculares de diagnóstico para la detección de *Foc* R4T y otras plagas de importancia económica

- 
- Generar capacidades regionales para la armonización del proceso de diagnóstico oficial y de investigación para la detección de *Foc R4T*

**Dirigido a:**

- Personal científico y técnico responsable de las áreas de diagnóstico de los Centros Nacionales de Investigación (INIAs) y Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitarias (ONPFs) de: Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú y República Dominicana asociados al proyecto: “Fortalecimiento de capacidades para la prevención y el manejo de la marchitez por *Fusarium* de las Musáceas en América Latina y el Caribe”.
- Invitados de Centros Nacionales de Investigación, ONPFRs y/o empresas privadas de otros países que estén involucrados directamente con el diagnóstico fitosanitario.

---

## Antecedentes

La marchitez por *Fusarium* es considerada una de las enfermedades más devastadoras para las Musáceas. en especial del 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) y algunos otros cultivares de tipo local (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 a plátanos (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.

Unas de las herramientas más importantes en los últimos tiempos para diagnóstico de enfermedades están basadas en técnicas moleculares; estas técnicas han permitido una reducción de los tiempos para conocer el resultado, además, 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 *Foc* R4T, que se puede utilizar para la vigilancia y contención, permitiendo un manejo oportuno para evitar la propagación de *Foc* R4T a otros monocultivos de Cavendish. Entre estas herramientas moleculares, la técnica de PCR, que utiliza cebadores específicos para la detección de *Foc* R4T, ha sido desarrollada por diferentes investigadores. El uso de varios marcadores moleculares que se han desarrollado para la detección de *Foc* y la diferenciación entre razas de *Fusarium* permitirá una mayor certeza en el diagnóstico.

En este taller se capacitó a los investigadores líderes y/o responsables del proyecto: **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** en las técnicas moleculares para la detección de *Foc* R4T con el objetivo de que los protocolos sean evaluados y validados en sus países.



---

# Agenda

## **Sesión 1: DIAGNÓSTICO OFICIAL Y AVANCES EN PROCESOS DE INVESTIGACIÓN ASOCIADOS A LA DETECCIÓN DE Foc R4T**

**MIÉRCOLES, 17 DE NOVIEMBRE DEL 2021**

HORA	TEMÁTICA
08:00 -08:30 a. m.	Inauguración del Curso – Objetivos, Resultados esperados, Modalidad Presentación de participantes e instructores Responsables: Agrosavia/ Alianza Bioversity-CIAT / ICA, Líderes ejecutores Proyecto Fontagro
8:30 – 10:00 a. m.	<i>Taller 1A. Línea base del diagnóstico asociado a la investigación en los diferentes países de ALC (INIAs)</i>
	Ecuador (INIAP): Elisa Quiala, Johanna Buitrón
	República Dominicana (IDIAP): Luis Antonio Matos Casado
	Perú (INIA): Juan Carlos Rojas Llanque
	Costa Rica (SFE): Gil de Eduardo de Diego Salas
	Panamá (IDIAP): David Ramos
	Nicaragua (INTA): Luz María Flores
	<i>Preguntas y Discusión</i>
10:00 – 10:15 a. m.	Descanso y refrigerio
10:15- 11:30 a. m.	<i>Taller 1B. Línea base vigilancia y diagnóstico oficial en los diferentes países de ALC (ONPFs)</i>
	Ecuador (Agrocalidad): Silvia Pachacama
	Costa Rica (SFE): Jose Fabián Jiménez
	Panamá (MIDA): Javier Corrales
	México: Lervin Hernández
	República Dominicana: Juan Clase
	Centro América (OIRSA): Nancy Villegas
	<i>Preguntas y Discusión</i>
11:30 – 12:45 m.	Métodos para la detección de Foc R4T asociados a procesos de investigación: muestras ambientales y no sintomáticas – Agrosavia: Mauricio Soto
12:45 – 2:15 p. m.	Almuerzo
2:15 – 3:15 p. m.	Sintomatología de la Marchitez por Fusarium – Foc R4T en campo: aspectos clave para la identificación de plantas sospechosas y la discriminación de otras plagas y enfermedades – Miguel Angel Dita (Alianza CIAT – Bioversity)
3:15 – 4:00 p. m.	Procedimientos oficiales para la toma, manejo y envío de muestras para el diagnóstico de Foc R4T– ICA
4:00 – 4:30 p. m.	Descanso y refrigerio
4:30 – 5:30 p. m.	Análisis de elementos comunes en cada país y de las oportunidades de mejora. Acciones frente a la presencia de un foco sospechoso de Marchitez por Foc R4T de acuerdo con los diferentes sistemas de producción – Mónica Betancourt y Miguel Angel Dita

---

## SESIÓN 2: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO: capacitación y entrenamiento

### Jueves, 18 DE NOVIEMBRE DEL 2021

HORA	TEMÁTICA
08:00 – 9:00 a. m.	Proceso de diagnóstico de <i>Foc</i> R4T del ICA en Colombia - ICA
9:00 – 9:30 a.m.	<i>Descanso y refrigerio</i>
9:30 – 12:00 m.	Práctica: <b>1.</b> Manejo de muestras para el aislamiento de <i>Foc</i> (Usando como modelo <i>Foc</i> R1) <b>2.</b> Aislamiento y purificación del hongo <i>Foc</i> R1 <b>3.</b> Obtención de cultivos monospóricos de <i>Foc</i> R1
12:00 – 1:30 p. m.	<i>Almuerzo</i>
1:30 – 4:45 p. m.	<b>4.</b> Amplificación de <i>Foc</i> R4T y <i>Foc</i> R1 por PCR colonia, PCR Punto Final y qPCR
Tiempo de intermedio entre la práctica	<i>Socialización sobre protocolos de extracción y cuantificación de ADN de <i>Foc</i> R1</i>
4:45 – 5:00 p. m.	Balance la jornada y conclusiones

### VIERNES, 19 DE NOVIEMBRE DEL 2021

HORA	TEMÁTICA
8:00 – 12:00 m.	<i>Continuación actividad práctica:</i> <b>5.</b> Amplificación de marcadores molecular usando el método de ddPCR <b>6.</b> Técnica de Secuenciación de ADN (Illumina, Nanopore) demostrativa
12:00 – 1:30 p. m.	<i>Almuerzo</i>
1:30 – 2:15 p. m	Métodos bioinformáticos para el análisis de marcadores moleculares de detección y comparación de genomas de <i>Foc</i> – Mauricio Soto
2:15 – 3:00 p. m.	La diversidad genética de <i>Foc</i> y análisis crítico de los métodos de diagnóstico disponibles – Miguel Angel Dita
3:00 – 3:45 p. m.	<i>Taller:</i> Resumen general de cada país de los compromisos y estrategias a desarrollar de acuerdo con la capacitación recibida
3:45 - 4:00 p. m.	<i>Refrigerio</i>
4:00 – 5:00 p. m.	Lectura y análisis de resultados de ddPCR
5:00 – 5:30 p.m.	<i>Entrega de certificados de participación y controles positivos y negativos, previa verificación de permisos de cada país</i>

---

## Presentaciones

### Taller 1A. Línea base del diagnóstico asociado a la investigación en los diferentes países de ALC (INIAs)

#### PAÍSES EJECUTORES-

---

Johanna Buitron, INIAP - Ecuador. Domingo Rengifo & Luis A. Matos Casado, CENTA-IDIAF, Santo Domingo, República Dominicana, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Gil Eduardo De Diego Salas, INTA -Costa Rica. David Ramos, Instituto de innovación agropecuaria – Panamá. Luz Maria Flores, INTA – Nicaragua.

Representantes de los INIAs de Ecuador, República Dominicana, Costa Rica, Panamá, y Nicaragua socializaron inicialmente aspectos relacionados con la cadena de valor de la industria bananera para cada país, seguido de la priorización dada a investigaciones que ayudan a la definición de la línea base para el diagnóstico de *Foc R4T* e implementación de procesos de control y vigilancia.

Para el caso de Ecuador, país que aporta aproximadamente el 35% del total de banano del mercado mundial, la presencia de *Fusarium* impactaría directamente la disponibilidad de banano y el consumo de esta fruta fresca a nivel mundial, así mismo representa un riesgo directo visualizado como posibles pérdidas de fuentes de empleo,

empobrecimiento en las áreas de influencia de las fincas bananeras, disminución en la actividad portuaria, entre otros impactos, proyectando perdidas hasta de USD 1.352 millones en un año. En República Dominicana, la cadena de valor asociada a banano y plátano son tema de gran relevancia asociado a la seguridad alimentaria del país, donde se ha estimado que 326,000 personas se benefician de forma directa e indirecta en la producción y comercialización. En Costa Rica la producción de banano se concentra en 43.013 hectáreas con exportaciones aproximadas de 2.188.685 toneladas métricas por año, donde para el año 2019 esta industria contribuyo con un 36.3% de las exportaciones agrícolas nacionales y un 2.0% de participación en el PIB nacional. En los países de Panamá y Nicaragua la economía se ve influenciada altamente por la producción de banano y plátano generando ingresos por 120.674.977 millones de dólares para exportaciones de banano y 46.8 millones de dólares pa exportaciones de plátano en Panamá, así mismo en Nicaragua las exportaciones de plátano representan ingresos por 16.73 millones de dólares y 41.8 millones de dólares por exportaciones de banano.



---

Dentro de la priorización de investigaciones definidas y con perspectivas de desarrollo se incluye capacidad de identificación de focos de dispersión, teledetección, evaluación de biocontroladores, fortalecimiento de métodos moleculares para la detección, evaluación y generación de materiales tolerantes. En Ecuador, el equipo de investigadores presenta avances significativos en el diagnóstico molecular referente a procesos de extracción y cuantificación de ADN de *Fusarium oxysporum*, detección

---

***Es de resaltar que el común denominador de los países participantes enmarca la identificación y vigilancia de la dispersión, el diagnóstico (análisis molecular), evaluación de sistemas de biocontrol e implementación de mecanismos interinstitucionales como estrategias de control, vigilancia y contención.***

---

con primers específicos por PCR convencional y PCR tiempo real. Para República Dominicana sus esfuerzos investigativos están orientados en apoyar planes de exclusión y contención, prácticas de manejo orientadas a la salud de los suelos y la supresividad, rotación de cultivos, uso de enmiendas orgánicas, aplicación de fertilizantes bio-orgánicos y agentes biocontroladores, análisis de riesgos para la diseminación de Foc a nivel local y nacional,

efectividad de procedimientos de cuarentena, erradicación, aislamiento de áreas, ante un brote, validación de protocolos eficientes de vigilancia y detección, mejora de protocolos para producción de material de siembra libre de *Foc* vía de cultivo de tejidos, hijuelos y micropropagación.

La investigación actual en Costa Rica frente a *Foc* R4T ha incluido la evaluación de productos de desinfección, diseño de pediluvios, rodaluvios y arcos de desinfección, manejo de pH de suelo, hospederos alternativos, bioseguridad, afianzamiento de acciones en diagnóstico de *Foc* R4T a través de capacitación en identificación y detección de plantas sospechosas, capacitación en toma de muestras para análisis en laboratorio y protocolo de análisis de muestras para el diagnóstico. Por su parte en Panamá las acciones principales de investigación se han concentrado en relación con el diagnóstico por medio de análisis molecular y la implementación de saneamiento y propagación de cultivares de plátano y banano criollos. Finalmente, en Nicaragua los procesos investigativos están siendo abordados al igual que en otros países en conjunto con la entidad de protección y sanidad agropecuaria, focalizando el trabajo en la caracterización de germoplasma existente en el País, mejoramiento genético y validación de variedades tolerantes promisorias, diagnóstico fitosanitario, entre otros.

---

# PERÚ

---

Juan Carlos Rojas Llanque, INIA Perú

Perú cuenta con 170.000 ha de las cuales el 70% se encuentran concentradas en la región Amazónica. El país solo exporta banano orgánico desde el año 2000 con certificado global GAP, la gran mayoría de productores tiene el certificado de comercio justo Fair Trade y ha tenido un crecimiento bastante importante. Dentro de los temas priorizados de investigación se encuentran el mejoramiento genético, salud de suelos, bioseguridad, material genético de calidad y teledetección. A demás, se tiene una agenda de investigación a corto plazo en teledetección, secuenciación del genoma, evaluación de la eficacia de productos comerciales para desinfección, manejo integrado del cultivo, análisis de factores predisponentes, desarrollo de un aplicativo para reportar casos de Fusarium en campo, fortalecimiento de sistemas regionales de innovación en zonas con mayor riesgo y dinámica. A mediano plazo se plantea evaluar el comportamiento agronómico de variedades resistentes, plantines biofortificados, aplicación de microorganismos en plantaciones, inducción de variación genética, microorganismos endófitos y un programa de mejoramiento genético. Se cuenta con un laboratorio de biología molecular y genómica equipado, con la capacidad para el diagnóstico mediante técnicas moleculares: amplificación por PCR de la región genómica W2987 (452 bp). Todavía hay una limitante de recursos financieros para poder desarrollar una agenda de investigación y de transferencia de tecnología.

---

***Se cuenta con un laboratorio de biología molecular y genómica equipado con la capacidad para el diagnóstico mediante técnicas moleculares***

---



---

## REPÚBLICA DOMINICANA

---

Domingo Rengifo y Luis A. Matos Casado, Republica Dominicana

El 52% de la producción del banano se destina a exportación ubicada principalmente en la región central del país, la mayor parte de los productores presentan cerca de 5 ha, siendo principalmente pequeños productores. La investigación se ha enfocado en la exclusión, en el área cuarentenaria. Las prioridades para los próximos cinco y diez años se concentran en el análisis de riesgos para la diseminación de *Foc* a nivel local vía suelo, agua, hombre, material de propagación, partes de plantas, prácticas agrícolas y no agrícolas, determinar la efectividad de los diferentes procedimientos de cuarentena, erradicación, aislamiento de áreas, ante un brote de *Foc*, así como validar protocolos eficientes de vigilancia y detección de *Foc*, mejorar protocolos de producir material de siembra libre de *Foc* vía cultivo de tejidos, hijuelos y micropropagación, evaluación de las medidas de control químico, biológico, físico y cultural contra *Foc*, en busca de un manejo integrado de plagas adecuado, validar protocolos eficientes de desinfección de superficies, herramientas y otros materiales de uso doméstico e industrial que puedan albergar y diseminar *Foc*, mejorar protocolos de producción de material vegetal evaluación de cultivos de banano alternativos que eventualmente puedan reemplazar los tipos Cavendish actuales. Se cuenta con la capacidad de diagnóstico para *Fusarium* y otros microorganismos mediante RT-PCR y PCR convencional, se cuenta con los primers ITS 1 e ITS 4 y los publicados por Dita en 2010 en los cuales se basa actualmente el diagnóstico.

---

***Los esfuerzos en investigación están dirigidos a la salud del suelo para poder enfrentar en mejores condiciones la problemática e irnos preparando para una eventual llegada de raza 4***

---



## Taller 1B. Línea base del diagnóstico asociado a las Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria en los diferentes países de ALC (ONPF)

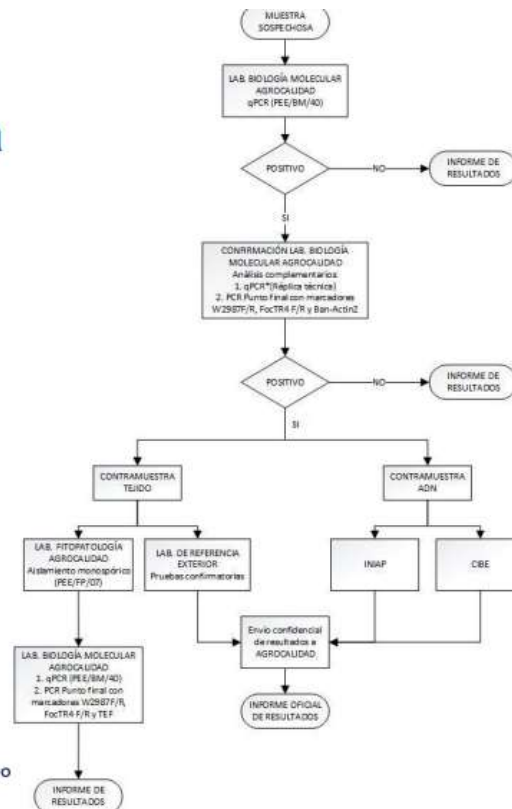
### ECUADOR

Silvia Pachacama – Agrocalidad

Para el diagnóstico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (Foc R4T), la agencia de regulación y control fito y zosanitario “AGROCALIDAD”, cuenta con dos laboratorios de Fitopatología y Biología Molecular regulados bajo la norma ISO 17025. El laboratorio de Fitopatología tiene metodologías estandarizadas para el aislamiento del patógeno y conservación de cepas y el laboratorio de Biología Molecular realiza la extracción, cuantificación de ADN a partir del aislado del patógeno (Laboratorio de Fitopatología) o de muestras y realiza PCR en tiempo real (identificación del hongo), PCR convencional basada en regiones IGS y el marcador W2987 con la implementación de controles internos a partir de aislados de hongos (Factor de elongación) o muestras de tejido vegetal.

AGROCALIDAD cuenta con una red de laboratorios para el diagnóstico y con la alianza de tres instituciones: OIRSA, INIAP (3 estaciones experimentales) y el centro de biotecnología “ESPOL” que es una universidad de Guayaquil. Además, ha diseñado un diagrama para la confirmación y detección del patógeno. En el momento que se tenga un primer caso positivo, se involucran a cada uno de los laboratorios en convenio y sus metodologías de diagnóstico para realizar la confirmación de un posible caso.

### Diagrama de confirmación para primer positivo



Agencia de Regulación y Control Fito y Zosanitario



---

## COSTA RICA

---

Luis Valverde – Servicio Fitosanitario del Estado

La estrategia general de Costa Rica para evitar el ingreso de *Fusarium oxysporum f. sp. Cubense* (Foc R4T). Está centrada primero en la exclusión, como una actividad principal y con enfoque prioritaria, la cual cuenta con el respaldo legal por parte de la organización Nacional Fitosanitaria de Protección (ONFP), mediante una ley y sus decretos respectivos para la prevención del patógeno, las resoluciones de importación de artículos reglamentados, vías de ingreso, pasajeros, materiales de siembra. Hace ya varios años en conjunto con CORBANA y el apoyo de OIRSA inició con estas estrategias, las cuales se han intensificado debido a la alerta en los países de Colombia y Perú. El segundo se enfocada en la detección temprana, y cuenta con laboratorios oficiales de servicio fitosanitario especializado (SFE) y CORBANA, personal capacitado para realizar diferentes análisis y la tercera el tener un material vegetativo tolerante o resistente.

Costa Rica y la región requieren de un trabajo articulado a nivel nacional e internacional (SFE, INTA, CORBANA, OIRSA, FAO, FONTAGRO y VIGIMUSA) y para ello, han reactivado convenios internacionales para realizar investigaciones conjuntas (CORBANA-EMBRAPA), posibles instalaciones de centros de tránsito y de multiplicación *in vitro* con alta Bioseguridad. Es importante destacar, que a nivel país tiene una regulación para el ingreso de material reproductivo vegetal.

---

***Uno de nuestros retos es mejorar en capacidad de diagnóstico: “Más siempre será mejor”***

---

Dentro de las acciones implementadas para combatir Foc R4T en puntos de ingreso, se han instalado sistemas de fumigación con presiones apropiadas en todos los arcos del país, alfombras de desinfección para limpieza de calzado de pasajeros, ubicadas en aeropuertos, puntos de ingreso terrestre y terminales para uso de tripulaciones de naves. Por otro lado, ha implementado la capacidad de inspección no intrusiva mediante unidades caninas (entrenadas) y equipos de Rayos X. Con la vigilancia para Foc R4T se han analizado cerca de 445 muestras, encontrando Raza 1 y 2 y otras enfermedades que se pueden confundir con este patógeno, debido a su similitud en síntomas. Sin embargo, las muestras han resultado negativas; adicionalmente, se realiza una lista de chequeo de acuerdo con la resolución que obliga a todos los productores de musáceas a cumplir con las medidas de bioseguridad en fincas productoras, definiendo entre 15 y 20 medidas que incluyen aspectos de producción. Sin embargo, estas medidas han sido implementadas en mayor medida por los productores con mayores recursos, mientras que los pequeños son un eslabón más débil en el cumplimiento de estas.

Se tienen como retos aumentar las unidades caninas, mejorar capacidades de vigilancia (aplicación de tecnologías de información), la producción de semilla sana de musáceas (norma técnica) y la regulación del movimiento local de material propagativo (resolución), permitiendo así el fortalecimiento de las capacidades de los micro, pequeños y medianos productores de musáceas.



---

# PANAMÁ

---

Javier Corrales. Dirección Nacional de Sanidad vegetal-Panamá. [jcorrales@mida.gob.pa](mailto:jcorrales@mida.gob.pa)

Actualmente Panamá, se encuentra en proceso de adopción de una plataforma informática propuesta por OIRSA para la vigilancia fitosanitaria en el país y busca como objetivo ser oportuno y preciso para mantener la integridad del país y de la región. Una vez que el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (Foc R4T), fue reportado en Colombia se inició la reforma a las leyes a través de una resolución para impedir la introducción de material vegetal de países con esta situación; con el objetivo de que el patógeno no ingresara al país, y si ingresará, se iniciaría rápidamente con el plan de contención, por lo cual se asegura que el material que ingrese al país provenga de países libres de este patógeno.

Dentro de las acciones de prevención tomadas, se han realizado dos simulacros para mantener la vigilancia, abarcando cerca de 522 hectáreas y 83 lotes de tras patio inspeccionados, buscando evidenciar que el patógeno no está presente. Dada la amplia sintomatología de *Foc* R4T, se ha ampliado el rango de visualización mediante el apoyo de drones para evaluar sitios donde se es difícil acceder por la ubicación de las zonas. La vigilancia y el muestreo son los aliados principales de un laboratorio. Hasta el momento no se ha detectado ninguna muestra positiva para *Fusarium* R4T en el país.

---

***La Dirección Nacional de Sanidad vegetal se encuentra en proceso de adoptar una plataforma informática para la vigilancia fitosanitaria propuesta por OIRSA***

---

El Laboratorio de Micología, verifica que la información de las muestras sea correcta, que se encuentre en buenas condiciones para su análisis, son manejadas bajo custodia, el tiempo de diagnóstico dependerá del tipo de muestra y son eliminadas, una vez se haya terminado el periodo de análisis. A demás han realizado talleres para afianzar el uso de protocolos de Extracción CTAB DNA Ag *F. Oxysporum* y otros patógenos de importancia en la región, involucrando al personal técnico del departamento con el objetivo de implementar de manera rutinaria las técnicas moleculares para la detección de FocR4T y otros patógenos que afectan a la región y al país.

Además, realizan pruebas Inter laboratorios para fortalecer la confiabilidad y reproducibilidad de las técnicas, generando alianzas con el sector privado principalmente. Finalmente, es importante mantener una vigilancia y diagnóstico constante, orientada al plan de contingencia implementado en el país.

---

# MÉXICO

---

Levín Hernández Ramos-Lab. De Micología. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF)- Correo: [lervin.hernandez@senasica.gob.mx](mailto:lervin.hernandez@senasica.gob.mx)

En México la producción de banano aproximadamente es de 80.000 hectáreas, de Cavendish principalmente; concentrada en la zona costera del Golfo y del Pacífico (Tabasco, Chiapas y Veracruz). De acuerdo con la NIMF No. 8 se ha catalogado a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (*Foc* R4T), como una plaga ausente en México: no hay registros de la plaga debido a que se han analizado más de 600 muestras, siendo negativas. El Laboratorio de Micología ha trabajado con la primera versión de diagnóstico (2013), debido a la importancia de este hongo, se ha catalogado como un patógeno de vigilancia activa. Dentro de este plan de vigilancia se cuenta con estrategias en campo, al observar plantas sospechosas con síntomas de *Fusarium*, se debe tomar la muestra y enviarla al laboratorio de micología, para su análisis.

El laboratorio recibe muestras vegetales principalmente haces vasculares (cormo), este diagnóstico inicial permite una caracterización del patógeno. Sin embargo, *Foc* R4T posee una condición de hospedante y razas, dada su amplia morfología. Por lo cual, se ha empezado a usar técnicas moleculares, mediante métodos de extracción de ADN de forma directa en tejido vegetal o a partir de cultivos monospóricos; mediante una evaluación de protocolos de extracción caseros y kits comerciales de diferentes marcas, se determinó que todos los métodos son funcionales para la extracción de ADN en tejido vegetal y cultivos Monospóricos. Sin embargo, algunos parámetros de calidad catalogan al Kit de PROMEGA, como rápido, mayor cantidad y calidad de ADN para el análisis. Se ha planteado evaluar cuatro tipos de herramientas basadas en dos criterios: primero evaluar cuatro técnicas distintas e independientes, PCR punto final, PCR en tiempo real con sonda TaqMan, Factor de virulencia SIX1 (PCR + RFLP) y Marcadores DArTseq Amplificación isotérmica LAM.

---

***El Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), plantea la conformación de red de laboratorios para apoyar en el diagnóstico de *Foc* R4T***

Se realizó una validación interna de los protocolos de detección y diagnóstico para *Foc* R4T, usando los métodos descritos anteriormente con 9 aislamientos provenientes de las zonas bananeras de México (Raza 1 y 2) y se ha planteado una quinta técnica para la detección, en caso de obtener un caso positivo, denominada MLST (Multilocus sequence typing). Finalmente, para el diagnóstico se cuenta con una red de laboratorios aprobados y en capacidad de diagnóstico oficial fitosanitario. Debido a que los laboratorios, están ubicados en zonas aisladas, el manejo de las muestras es más complejo, por lo cual se ha planteado la conformación de una red laboratorios coadyuvantes para apoyar en el diagnóstico directamente en la zona para la detección, reduciendo así los tiempos de respuesta y evitando la movilidad de las muestras a otras zonas. Además, se han realizado eventos de transferencia en los 11 laboratorios aprobados y se cuenta con una versión actualizada de los protocolos.

---

## CENTRO AMÉRICA

---

Nancy Villegas. OIRSA-Coord Regional de Análisis de Riesgo

En el contexto de esta amenaza de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (Foc R4T), el organismo internacional regional de sanidad agropecuaria (OIRSA), ha realizado dos actualizaciones sobre el análisis de riesgo de plagas cuarentenarias, emergentes y reemergentes en Musáceas con énfasis en las transportadas por materiales propagativos, publicado en el 2018 y otro a raíz de la detección realizada en Colombia, para nueve países desde México, Centroamérica y República Dominicana en el Caribe.

Actualmente, se trabaja en el análisis de riesgo asociado a enfermedades de las musáceas, emergentes, reemergentes y de importancia cuarentenaria, cuyos patógenos son vigilados al interior de los nueve países que conforman la región del OIRSA, con el objetivo de conocer el estado, la detección, comportamiento, manejo y expectativas de riesgo frente al posible ingreso de *Foc R4T*, Banana Bunchy Top Virus (BBTV) y *Xanthomonas musacearum*.

Adicionalmente, se está construyendo un mapa de riesgo por enfermedad y un análisis de costo beneficio, en colaboración de los países aliados. Como resultado de estos análisis de riesgo se han recomendado medidas de exclusión y prevención como primera barrera, enfocadas en implementar medidas cuarentenarias, para no permitir el ingreso de fuentes contaminadas con estructuras de resistencia de *Fusarium*. OIRSA, ha conformado un grupo de expertos en temas de diagnóstico, identificación, análisis de riesgos, manejo integrado, vigilancia fitosanitaria, cuarentena y protección vegetal de países como: Colombia, Mexico (SENASICA), Costa Rica (CORBANA). Por otra parte, cuenta con un protocolo para la importación de materiales clonales con resistencia, particularmente en alianza con Taiwan y CTD, promoviendo en los países de Nicaragua y Guatemala el manejo de la cuarentena, para la importación de estos materiales y la evaluación de su comportamiento en sitio.

Dentro del programa de capacitaciones en la región del OIRSA, se han realizado 4 talleres de diagnóstico molecular, entrega de Kits positivos de diagnóstico, de acuerdo con los publicados por Dita en 2010, además de cursos virtuales (FAO y Agrosavia), conferencias internacionales, reuniones con directores de cuarentena, grupos de Sanidad vegetal de Centroamérica, Caribe y Sudamérica, para apoyar en la elaboración de protocolos de bioseguridad a nivel de cuarentena y finca.

---

*Investigaciones en modelaje espacial  
permitirán determinar áreas de riesgo  
en los países de la región OIRSA*

---

El protocolo de diagnóstico de *Fusarium* se basa en el “Plan de contingencia ante un brote de la Raza 4 Tropical *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* en un país de la región del OIRSA” (2016) y actualizado en 2019, en donde se han trabajado protocolos de diagnóstico, ya aprobados y difundidos con el apoyo de expertos. Mediante las capacitaciones en los nueve países, se considera que se encuentran con capacidad de realizar un diagnóstico presuntivo, aunque no confirmativo. Por lo cual, las alianzas con instituciones internacionales, permitirán una confirmación del patógeno o de cualquier posible sospecha. Finalmente, es importante fomentar el intercambio de experiencias y la preparación en medidas sanitarias y de bioseguridad para mitigar el ingreso del patógeno a la región OIRSA.

---

## Métodos para la detección de *Foc R4T* asociados a procesos de investigación: muestras ambientales y no sintomáticas

---

Mauricio Soto-Suárez. Investigador PhD Asociado, Agrosavia – Colombia. Correo: [msoto@agrosavia.co](mailto:msoto@agrosavia.co)

Uno de los primeros requerimientos al descubrir la incursión de un patógeno en una región, es la caracterización de sus poblaciones y la estandarización de los métodos de diagnóstico. Los métodos de diagnóstico pueden tener diferentes enfoques, desde análisis morfológicos mediante técnicas de microbiología convencional hasta técnicas moleculares como amplificación de genes de interés empleando diferentes tipos de PCR y técnicas de secuenciación de primera, segunda y tercera generación, estas últimas cada vez más sensibles y específicas. Dentro de las actividades de respuesta a la presencia de un patógeno cuarentenario como *Foc R4T*, uno de los aspectos más importantes es la implementación de técnicas que permitan la detección temprana en material vegetal sintomático o asintomático, así como también en muestras ambientales complejas como suelo y agua, lo cual representa un avance importante en el monitoreo de las poblaciones del patógeno.



como el uso de imágenes espectrales y térmicas para la detección de patógenos y su sintomatología como una alternativa para detección de *Foc R4T* en el cultivo de banano.

Los avances en la caracterización del patógeno mediante la secuenciación de genoma completo empleando la tecnología de Oxford Nanopore han permitido comparar la información de genomas actualmente disponibles a nivel mundial con la información de tres aislamientos que se obtuvieron en el departamento de La Guajira, este análisis de genómica comparativa se realizó con el fin de hacer aproximaciones sobre el posible origen del patógeno, así como una caracterización de la epidemiología de *Foc R4T* en Colombia. Finalmente, existen tecnologías que permiten hacer una detección directa en campo empleando tecnologías de PCR y secuenciación portátil, así

---

***Trabajamos en convenio con ICA para fortalecer los procesos de diagnóstico frente a *Foc R4T* y mejorar y desarrollar nuevos métodos de detección.***

---

## Sintomatología de la Marchitez por Fusarium – Foc R4T en campo: aspectos clave para la identificación de plantas sospechosas y la discriminación de otras plagas y enfermedades

---

Miguel Angel Dita (Alianza CIAT – Bioversity). Correo: m.dita@cgiar.org

Para el diagnóstico de la enfermedad es importante entender la epidemiología de esta, cualquier factor biótico o abiótico que pueda contener suelo transmite la enfermedad; además el agua y el material de siembra que es el principal factor de enfermedad. Las clamidosporas son uno de los principales factores en epidemiología de la enfermedad, también los arvenses asintomáticos, el largo periodo de incubación también juega un factor importante. Los síntomas típicos externos se observan inicialmente en hojas inferiores dobladas en la base del peciolo siendo uno de los síntomas más importante en el reconocimiento de plantas afectadas además de la clorosis y la marchitez. Algunas veces el amarillamiento característico no se observa este es conocido como “síndrome verde”, en plantas con síntomas no típicos se puede presenciar aborto del fruto y hoja apical entrecortada. Las condiciones ambientales y la presión de inóculo también influyen en la expresión de los síntomas. No es tan frecuente observar los síntomas en plantas jóvenes, pero se pueden presentar cuando hay una alta presión de inóculo en el suelo, algunas veces se observa rajadura del pseudotallo.

En los síntomas internos característicos se observa necrosis continua en haces vasculares, la parte central de las plantas sanas la mayoría de las veces es blanca, pero esto depende del estadio fenológico de la planta, también se observan puntos negros o bolsones negros por acumulación de tilosas que no son tan

### Resumen de síntomas Marchitez por Fusarium del banano



comunes, en síntomas muy avanzados se puede observar esporulación sobre el tejido, muchas veces no se observan aún en pseudotallo por ello es importante hacer un análisis integrado de los síntomas, observar síntomas en el rizoma.

---

Es importante hacer la distinción entre el marchitamiento causado por *Foc* y otros patógenos como *Ralstonia* causante de Moko, *Erwinia* causante de la pudrición blanda que pueden presentar síntomas similares. En plantas afectadas con moko es difícil hacer la distinción en síntomas externos, por esto es importante revisar los síntomas internos, pues no

---

*Complementación entre campo y laboratorio, análisis integrado de los síntomas no casarse con la primera impresión*

---

siempre en moko se van a observar las hojas jóvenes con síntomas, o el exudado bacteriano y agujetas (puntos negros) característico de esta enfermedad, pero si se pueden diferenciar porque Moko afecta frutos y se observan síntomas en los hijuelos, mientras que en *Foc* no pues lo hijuelos se ven aparentemente sanos, pero se debe tener en cuenta que una planta puede estar afectada por los dos patógenos, por ellos es importante hacer una análisis integrado.

En el caso de *Erwinia* causante de la pudrición blanda se observa necrosis por enzimas pectinolíticas y la planta cae mientras que en *Foc* la planta se mantiene erecta aún con síntomas avanzados, en *Erwinia* se observa tejido de apariencia acuosa con olor fétido, pero este último no se presenta siempre, se presentan síntomas de amarillamiento con similares a los causado por *Foc* pero este es más homogéneo. Aunque no está presente en la región también existe la marchitez causada por *Xanthomonas* la cual afecta frutos y se evidencian exudados bacterianos de coloración amarilla en el tejido. Adicionalmente el insecto conocido como gusano tornillo puede causar un síntoma muy similar a *Foc* pero se observa un tejido más seco e internamente se observan galerías. Es importante analizar el contexto dado que factores físicos o ambientales pueden causar síntomas similares.



---

## Procedimientos oficiales para la toma, manejo y envío de muestras para el diagnóstico de Foc R4T– ICA

---

Cristian Vargas, Instituto Colombiano Agropecuario – ICA, Colombia

En Colombia los cultivos de musáceas tienen presencia en todos los departamentos, siendo uno de los cinco cultivos de gran importancia agrícola y en la seguridad alimentaria del país. La producción nacional oscila alrededor de 6.716.255 ton en un área aproximada de 527.579 ha sembradas estimando que el sector bananero genera 168.781 empleos entre directos e indirectos y el sector platanero alrededor de 286.000 empleos visualizados en 57.000 familias dedicadas a la producción. Al igual que otros cultivos, los riegos fitosanitarios que enfrentan las musáceas en Colombia no se excluyen, es así como el Instituto Colombiano Agropecuario – ICA cumpliendo su función en el diseño y ejecución de estrategias para prevenir, controlar y reducir los riesgos sanitarios, biológicos y químicos para especies vegetales, ha venido implementando diferentes mecanismos tras publicarse oficialmente la primera detección de marchitez por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Raza 4 Tropical – Foc R4T en un predio ubicado en el departamento de la Guajira, en el año 2019. Sin embargo, desde el año 2010 formó parte del listado de plagas cuarentenarias con un estatus de ausente. La implementación de protocolos de mitigación y contención necesarios para prevenir la diseminación de este patógeno por el país ha requerido por parte del ICA asegurar la fase de vigilancia, diagnóstico y confirmación, por medio de tres ejes: i. Monitoreo, ii. Muestreo y preparación de la muestra y iii. Diagnóstico en laboratorio.

El monitoreo es el punto inicial enfocado hacia el compromiso y acompañamiento al productor, donde inicialmente se realiza la visita al predio con el objetivo de caracterizar y reconocer diferentes aspectos ambientales, de manejo agronómico, accesibilidad, entre otros; la inspección del predio requiere un diseño preliminar para identificar características específicas en la distribución del cultivo, para evitar sesgos. En cuanto a muestreo y preparación de las muestras es indispensable conservar los protocolos de seguridad evitando convertirse en vector del patógeno, una vez seleccionada la planta a muestrear, se realiza registro fotográfico, seguido a esto se procede a seleccionar el área de corte en el pseudotallo entre los 50 a 60 cm desde la base,

---

*El ICA como estrategia de vigilancia de Foc R4T en Colombia planteó un plan de muestreo nacional, consiste en un muestreo masivo en todos los departamentos para argumentar la ausencia del patógeno en otras áreas nacionales de producción donde no se ha reportado alertas.*

---

ubicando un papel en el suelo para colocar el material extraído de la planta evitando la contaminación planta–suelo. La incisión se realiza en forma de cuadrado en un área de 5 x 8 cm haciendo un corte profundo que alcance el mayor número de capas posibles, la tercer capa se corta en trozos más pequeños envolviendo en toallas de papel verificando el retiro de la mayor parte de humedad, luego se rotula la muestra y se procede a cubrir la herida

realizada a la planta con capas del pseudotallo y adhiriéndolas con cinta transparente, todas las muestras colectadas deben ubicarse en neveras, las cuales deben ir selladas en su totalidad y solo se anexan los formatos de información, para la identificación y procesamiento en laboratorio. Todos los contenedores con las muestras deben ser manejados con precaución, asegurando que las muestras solo sean manipuladas por personal capacitado. Así mismo, debe conservarse las condiciones de preservación mínimas hasta el análisis en laboratorio. Como tercer momento, una vez son recibidas las muestras en laboratorio son procesadas bajo los protocolos definidos y condiciones de bioseguridad que esta previamente establecidos en los laboratorios de patógenos cuarentenarios.

## Métodos para el diagnóstico de *Foc R4T* usados por el ICA en Colombia – ICA

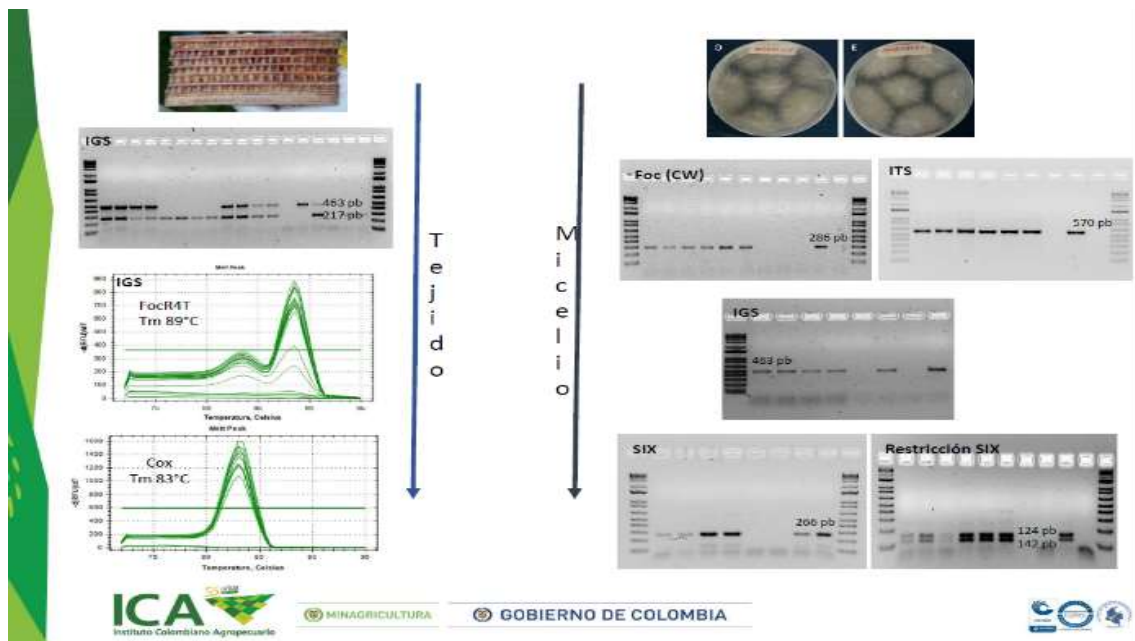
Mariluz Ayala. Analista Laboratorio Cuarentena Vegetal, Subgerencia de Análisis y Diagnóstico - Instituto Colombiano Agropecuario – ICA, Colombia. Correo: [mariluz.ayala@ica.gov.co](mailto:mariluz.ayala@ica.gov.co)

El Instituto Colombiano Agropecuario – ICA desde su red de laboratorios de diagnóstico sanitario ha realizado la implementación de un proceso para la detección de *Foc R4T* considerando puntos estratégicos debido a la presencia del patógeno en el país. Entre 2016 y 2017 se inició el proceso de definición de un método para la detección de *Foc R4T*, mediante la estandarización y el trabajo en conjunto con instituciones de investigación y el gremio productor, realizando capacitaciones y entrenamientos para la implementación del método analítico. Para el desarrollo de este método, inicialmente el instituto estableció las líneas de análisis teniendo en cuenta muestras sospechosas por sintomatología en Cavendish, el abordaje se realizó en dos líneas principales que se trabajaron simultáneamente a partir de ADN obtenido de tejido vegetal para generar una alerta temprana, así como también a partir de aislamientos fúngicos para la confirmación y en el caso de presentar un caso sospechoso se confirmaría mediante técnicas moleculares como PCR cuantitativa.

En 2019 se realizó la confirmación de muestras sospechosas procedentes del departamento de La Guajira, mediante la implementación del protocolo previamente establecido y la validación de los resultados preliminares obtenidos en los laboratorios ICA, de esta manera se realizó el primer reporte del patógeno en el país. Posterior a este primer reporte, se trabajó en conjunto con una institución internacional, quien

*Todos los procesos se desarrollan dentro del marco del sistema ISO/IEC 17025 que considera aspectos del proceso analítico con el fin de asegurar la calidad para la toma de decisiones por parte del instituto Colombiano Agropecuario - ICA.*

realizó análisis adicionales para la confirmación con el fin de establecer las decisiones bajo el panorama de la presencia de una plaga cuarentenaria presente en el territorio nacional, teniendo en cuenta esta





---

situación se analizaron aspectos determinantes como los procesos de diagnóstico, ampliación de la capacidad y bioseguridad.

El flujo de trabajo con muestras sospechosas se detalla desde la recepción de las muestras, el posterior aislamiento a partir de material vegetal sintomático, extracción de ADN a partir de material vegetal sintomático, asintomático o aislamientos fúngicos para la detección empleando los diferentes marcadores moleculares previamente reportados y la confirmación mediante técnicas moleculares más sensibles como la amplificación por qPCR para asegurar la veracidad de los resultados. Un aspecto importante de resaltar ha sido el trabajo interinstitucional, el cual ha permitido fortalecer el proceso de diagnóstico y los procesos de vigilancia mediante la implementación de nuevas metodologías como LAMP, la cual tiene un gran potencial para el diagnóstico de *Foc R4T in-situ* y una alta sensibilidad y especificidad, además de la evaluación de muestras complejas como suelo y agua.

La ampliación de las capacidades diagnósticas ha permitido un aumento en el número de laboratorios habilitados para el diagnóstico fitosanitario y la implementación de un programa piloto de un laboratorio móvil. Respecto al componente de bioseguridad, se destacan aspectos importantes a tener en cuenta durante el proceso de toma de muestras sintomáticas y custodia de las mismas, la contención del patógeno en los laboratorios autorizados para el análisis fitosanitario, todos estos aspectos de bioseguridad en sus diferentes fases se constituyen como una parte fundamental del proceso analítico.

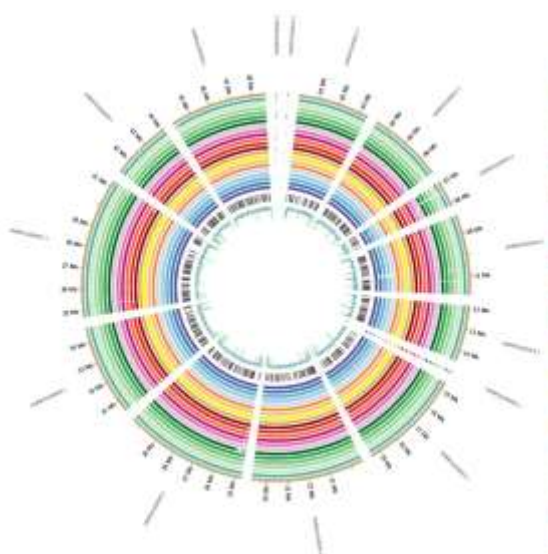
---

## Métodos bioinformáticos para el análisis de marcadores moleculares de detección y comparación de genomas de *Foc*

---

Mauricio Soto-Suárez. Investigador PhD Asociado, Agrosavia – Colombia. Correo: [msoto@agrosavia.co](mailto:msoto@agrosavia.co)

Las técnicas de secuenciación de tercera generación, como la tecnología Oxford Nanopore (ONT), son metodologías de fácil manejo, adquisición y uso en diferentes condiciones, ya sean de laboratorio o campo. Una vez caracterizado un microorganismo, el procesamiento de la información es clave para la entrega de resultados y la toma de decisiones. Adicional a su portabilidad, ONT posee ventajas frente a otras técnicas de secuenciación como Illumina que secuencian muchos fragmentos cortos, como es la capacidad de secuenciar fragmentos muy largos con los cuales es posible realizar ensamblajes de genomas completos tanto para genómica comparativa como ensamblajes *de novo*. Aunque con ONT, la calidad de las lecturas no es tan alta, este parámetro se compensa y corrige con la longitud y cantidad de estas. La versatilidad de la tecnología permite además hacer análisis metagenómicos, de transcriptomas y reconstrucciones filogenéticas.



La tecnología ONT usa la lectura de la interrupción de una corriente eléctrica continua, la cual es codificada en un archivo con la extensión Fast5; pero que después es convertida a nucleótidos en archivo FASTA en formato fastqpass. Mientras se realiza la secuenciación se puede verificar en tiempo real usando el software en línea Kaiju, para validar que los resultados que se están generando, efectivamente corresponden al organismo blanco. Este programa busca en bases de datos en línea y alinea las secuencias entregadas en formato FASTA, arrojando los nombres de los organismos con mayor porcentaje de homología con una aproximación de género y en ocasiones especie.

Al finalizar la secuenciación, se debe hacer un análisis de cobertura y tamaño del genoma para realizar las comparaciones con genomas de referencia. Uno de los primeros análisis que se hacen es con software Alfred que permite hacer un conteo de las lecturas y el tamaño de los fragmentos y analizar la calidad de las lecturas obtenidas. Por su parte, Qualimap arroja datos de tamaño de genoma, número de lecturas contenido GC, cobertura, estadísticas cromosomales.

En Agrosavia se secuenciaron mediante esta técnica, varios genomas de *Foc* R4T, que se ensamblaron *de novo* con Flye 2.8.2, las lecturas se filtraron con BlobTools 2 y se pulieron con Racon v1.4.3. Finalmente, las secuencias consenso se crearon con medaka 1.2.1., luego de lo cual se lograron aproximadamente 17 Gb de datos de lectura larga para todos los aislamientos secuenciados con una longitud promedio de N50 de entre 7323 pb y 28804 pb

Para comprender la relación genética de los aislamientos colombianos de *Foc* TR4 con los de otras ubicaciones geográficas, se identificaron SNPs en todo el genoma. Los datos de secuencia se adquirieron

---

como archivos fastQ de las bases de datos Sequence Read Archive (SRA) y CNCBNGDC. La calidad de los datos de secuenciación se evaluó mediante FASTQC y las lecturas de baja calidad o que contenían secuencias adaptadoras se recortaron con Trim Galore o Canu. Se usaron los programas Burrows Wheeler Aligner (BWA) y Minimap2 para alinear con una secuencia de referencia y se evaluaron los alineamientos con Qualimap; se identificaron los SNPs mediante VCFtools y Nanocaller, los cuelos se filtraron con Perl para conservar SNP de alta calidad con frecuencias superiores al 90 %. Se identificaron variantes genómicas (haplotipos) y se escribieron en archivos en formatos FastA y Nexus. La red de unión mediana se generó en PopART.

## Lecciones aprendidas

A partir del taller, pero también del trabajo de articulación entre los líderes del proyecto y responsables del diagnóstico en cada país se determinó la línea base del diagnóstico en los países ejecutores y asociados al proyecto, que se presentan en la **Tabla 1** y que permitieron identificar las acciones de mejora y trabajo para cada país. Ninguno de los países contaba con 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. 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, en las ONPFs podría ser que se tengan optimizadas técnicas de PCR y PCR cuantitativa.

**Tabla 1.** Métodos usados por las Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria (ONPF).

PAÍS	Métodos oficiales de diagnóstico Foc R4T											
	Microbiología	PCR Convencional			qPCR			ddPCR	LAMP	PCR + RFLP	Sequencing	
	Material	FocTR4 (Dita et al., 2011)	W2987 (Li et al., 2013)	Six 1 (Carvalhais et al., 2019)	RT_13.16 (Matthews et al., 2020)	FWBTR4 (Aguayo et al., 2017)	Clear detection kit	ddRT_13.16	DArTseq (Ordoñez et al., 2019)	Six 1 (Carvalhais, 2019)		
Perú	<input checked="" type="checkbox"/> Vegetal <input type="checkbox"/> Suelo	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio
Paraguay	<input type="checkbox"/> Vegetal <input type="checkbox"/> Suelo	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>
República Dominicana	<input checked="" type="checkbox"/> Vegetal <input type="checkbox"/> Suelo	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/>
Ecuador	<input checked="" type="checkbox"/> Vegetal <input type="checkbox"/> Suelo	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>
Nicaragua	<input checked="" type="checkbox"/> Vegetal <input type="checkbox"/> Suelo	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>
Costa Rica	<input type="checkbox"/> Vegetal <input type="checkbox"/> Suelo	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>
Bolivia	<input checked="" type="checkbox"/> Vegetal <input type="checkbox"/> Suelo	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>
Panamá	<input checked="" type="checkbox"/> Vegetal <input type="checkbox"/> Suelo	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/>
Venezuela	<input checked="" type="checkbox"/> Vegetal <input type="checkbox"/> Suelo	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>
ICA	<input checked="" type="checkbox"/> Vegetal <input type="checkbox"/> Suelo	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/>
AGROSAVIA	<input checked="" type="checkbox"/> Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> Suelo	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/> ADN Vegetal <input checked="" type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ADN Vegetal <input type="checkbox"/> ADN micelio	<input checked="" type="checkbox"/>

*Países ejecutores del proyecto*

Los métodos se dividen en Microbiología, PCR convencional, qPCR, ddPCR, LAMPy secuenciación. En este caso, cada País proporcionó información sobre los métodos que tienen actualmente disponibles y aquellos para los que necesitan realizar ajustes en la metodología. Es importante notar que la información corresponde a estado actual en ONPFs y no en Centros de Investigación.

La mayoría de los INIAs manifiestan conocer los métodos pero no haberlos aplicado nunca, ni tampoco tienen los insumos y/o equipos para desarrollar los protocolos.

Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



[www.fontagro.org](http://www.fontagro.org)

Correo electrónico: [fontagro@fontagro.org](mailto:fontagro@fontagro.org)