

# Genetic improvement for resistance to *Fusarium* wilt in banana

## Mejoramiento genético para la resistencia a marchitez por *Fusarium* en banano

**Rómulo García-Velasco**, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario Tenancingo, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km 1.5, Tenancingo, Estado de México, CP 52400, México; **Nayanci Portal-González**, **Ramón Santos-Bermúdez**, Universidad Técnica “Luis Vargas Torres” de Esmeraldas, Campus Mútiles, San Mateo, Esmeraldas, CP 080150, Ecuador; **Armando Rodríguez-García**, **Barbarita Companioni-González\***, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro, No. 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, CP 25315, México. \*Autor para correspondencia: bcompanioni2007@gmail.com

**Recibido:** 06 de Agosto, 2020.

**Aceptado:** 13 de Diciembre, 2020.

García-Velasco R, Portal-González N, Santos-Bermúdez R, Rodríguez-García A and Companioni-González B. 2021. Genetic improvement for resistance to *Fusarium* wilt in banana. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 122-146.

**DOI:** <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2008-2>

Primera publicación en línea: 28 de Diciembre, 2020.

First publication on line: December 28, 2020.

**Resumen.** Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) representan uno de los productos más importantes para la seguridad alimentaria y la generación de ingresos. Sin embargo, la producción de estos cultivos se encuentra amenazada por el ataque de enfermedades como la marchitez por *Fusarium*. El control de esta enfermedad con el uso de agroquímicos resulta costoso y causa serios daños al medio ambiente. Por ello, se considera al mejoramiento genético de la resistencia como la única forma de control efectivo y sostenible para esta enfermedad. Se han desarrollado estrategias basadas en la

**Abstract.** Bananas and plantains (*Musa* spp.) represent one of the most important products for food security and income generation. However, the production of these crops is threatened by the attack of diseases such as Panama disease or *Fusarium* wilt. In recent years there is a general consensus that the only form of effective and sustainable control, both economic and for this disease, is genetic improvement for resistance. Several biotechnology based strategies have been developed for the genetic improvement of the crop in obtaining individuals resistant or tolerant to fusariosis. The present work was carried out with the objective of providing a review of scientific literature related to the use of biotechnological tools in genetic improvement for resistance to fusarial wilt in bananas, with emphasis on *in vitro*, *ex vitro* and field selection for pathogen resistance. The results presented in this review demonstrate the potential of biotechnology in the field of genetic improvement in crops. Which allow to accelerate the genetic improvement programs of resistance to this disease.

biotecnología para el mejoramiento genético del cultivo en la obtención de individuos resistentes o tolerantes a este patógeno. El presente trabajo se realizó con el objetivo de ofrecer una revisión de literatura científica relacionada con la utilización de técnicas biotecnológicas en apoyo al mejoramiento genético para la resistencia a marchitez por *Fusarium* en banano, con énfasis en la selección *in vitro*, *ex vitro* y en campo para la resistencia al patógeno. Los resultados presentados en esta revisión evidencian el potencial de la biotecnología y otras herramientas en el campo del mejoramiento genético en el cultivo. Los cuales permiten acelerar los programas de mejoramiento genético de la resistencia a esta enfermedad.

**Palabras clave:** biotecnología, enfermedad, *Musa* spp., selección temprana.

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) están entre los cultivos más importantes en los países del trópico y el subtropico. Constituyen una fuente importante de ingresos en casi 135 países productores (FAO, 2017). Lo anterior indica que los bananos y plátanos, representan uno de los productos más importantes para la seguridad alimentaria y la generación de ingresos. Sin embargo, la producción de estos cultivos se encuentra amenazada por el ataque de enfermedades como el Mal de Panamá o marchitez. Esta enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) representa una de las enfermedades más destructivas y de importancia económica en el género *Musa* (Ploetz, 2015). Durante los primeros 50 años del siglo XX esta enfermedad causó el reemplazo en las plantaciones del cultivar Gros Michel susceptible a la raza 1, por cultivares Cavendish con importantes transformaciones en la exportación de la industria bananera (Bubici *et al.*, 2019). La introducción de la raza tropical 4 de FOC

**Key words:** biotechnology, disease, *Musa* spp., early selection.

Bananas and plantains (*Musa* spp.) are among the most important crops in the countries of the tropics and subtropics. They are an important source of income in nearly 135 countries that produce this crop (FAO, 2017). This indicates that bananas and plantains are one of the most important products for food security and income. However, the production of these crops is under threat of diseases such as the Panama disease or wilting. This disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) is one of the most destructive and economically important in the *Musa* genus (Ploetz, 2015). During the first half of the 20th century, this disease led to the replacement of the Gros Michel cultivar, susceptible to race 1, with Cavendish cultivars, with important transformations in the exports of the banana industry (Bubici *et al.*, 2019). The introduction of tropical race 4 of FOC (RT4) in the plantations of Cavendish cultivars had a great economic and social impact on the banana industry in Latin America and the Caribbean (Ploetz, 2015). There is currently no sustainable chemical control for this disease. Therefore, in recent years there has been a general consensus over the fact that the only way of controlling this disease effectively and safely was via genetic breeding for resistance (Dita *et al.*, 2011). Strategies have been developed based on plant biotechnology for the genetic improvement of banana trees to obtain resistant plants, or tolerant to wilt by *Fusarium* (Saraswathi *et al.*, 2016). However, the search for new Cavendish cultivars, resistant or tolerant to this disease, is still a priority. On the other hand, most field studies lack long-term results that may contribute to evaluate the efficiency of the genes *in situ* (Ploetz *et al.*, 2015). In this sense, the development of methods for the early

(RT4) en las plantaciones de cultivares Cavendish representa un gran impacto económico y social en la industria bananera, en América Latina y el Caribe (Ploetz, 2015). En la actualidad no existe control químico sostenible para esta enfermedad. Por ello, en los últimos años existe un consenso general de que la única forma de control efectivo y segura para esta enfermedad lo constituye el mejoramiento genético para la resistencia (Dita *et al.*, 2011). Se han desarrollado estrategias basadas en la biotecnología vegetal para el mejoramiento genético del banano en la obtención de individuos resistentes o tolerantes a la marchitez por *Fusarium* (Saraswathi *et al.*, 2016). Pero, la búsqueda de nuevos cultivares Cavendish resistentes o tolerantes a la enfermedad continúa siendo una prioridad. Por otra parte, la mayoría de los estudios de campo carecen de resultados a largo plazo que contribuyan a evaluar la eficacia de los genes *in situ* (Ploetz *et al.*, 2015). En este sentido, el desarrollo de métodos para la selección temprana de individuos resistentes a las enfermedades, con el empleo de la biotecnología constituye un valioso utilitario para los programas de mejoramiento genético de los cultivos. Lo cual se ha convertido en las últimas décadas en un tema necesario y atractivo para los fitomejoradores (Saraswathi *et al.*, 2016). El presente trabajo se realizó con el objetivo de ofrecer una revisión de literatura científica relacionada con la utilización de técnicas biotecnológicas en apoyo al mejoramiento genético para la resistencia a la marchitez por *Fusarium* en banano, con énfasis en la selección *in vitro*, *ex vitro* y en campo para la resistencia al patógeno.

#### ***Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*: mecanismo de infección y síntomas de la enfermedad**

El género *Fusarium* constituye el más amplio e importante de la familia *Tuberculareacea*; y desde el punto de vista taxonómico es uno de los

selection of disease resistant individuals, along with the use of biotechnology, is a valuable asset for the genetic breeding programs of crops. In past decades, this has become a necessary and attractive topic for plant breeders (Saraswathi *et al.*, 2016). The present work was carried out in order to offer a revision of scientific literature related to the use of biotechnological techniques to support genetic breeding for resistance to wilting by *Fusarium* in banana trees, emphasizing selection *in vitro*, *ex vitro* and in the field for resistance to the pathogen.

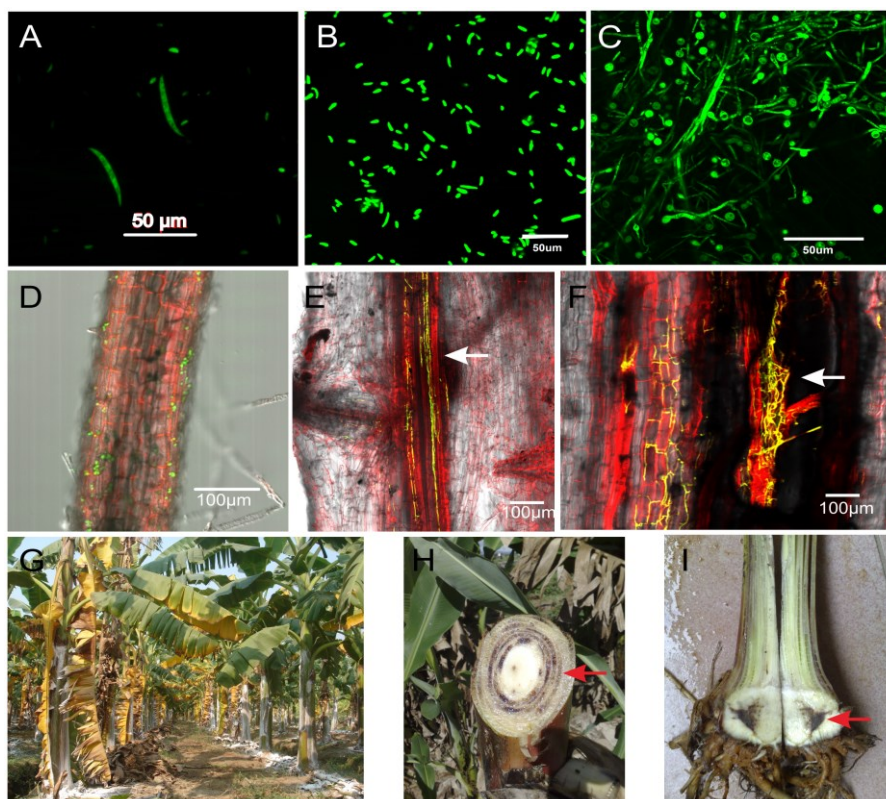
#### ***Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*: infection mechanism and symptoms of the disease**

The genus *Fusarium* is the broadest and most important in the *Tuberculareacea* family, and from a taxonomical standpoint, it is one of the most difficult to handle out of all the fungus groups. This fungus covers numerous species and diverse special forms (f. sp.) within each species. On the other hand, it presents great variability and its identification in different species is imprecise (Dean *et al.*, 2012). The perfect phase of *F. oxysporum* (FOX) is still unknown. However, the survival and proliferation of this species and its special forms depend on its asexual spores. FOC produces three types of asexual spores, including macroconidia, microconidia and chlamydo spores in its life cycle (Figure 1 A-C), which help it spread and survive. In addition, it shares a similar infection cycle with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (FOL), the causal agent of wilt in tomato (*Solanum lycopersicum*) (Guo *et al.*, 2014). Chlamydo spores have thick walls, formed inside the hypha or the macroconidia, and can survive in the absence of the host for several years in a latent state, or they can germinate and grow as saprophytes in the remains of non-host plants to produce new chlamydo spores (Nelson *et al.*, 1983). FOC conidia germinate and

más difíciles de todos los grupos de hongos. Este hongo comprende numerosas especies y diversas formas especiales (f. sp.) dentro de cada especie. Por otra parte, presenta una gran variabilidad y se hace imprecisa su identificación en las distintas especies (Dean *et al.*, 2012). La fase perfecta de *F. oxysporum* (FOX) no se conoce aún. Pero, la supervivencia y proliferación de esta especie y sus formas especiales existentes dependen de sus esporas asexuales. FOC produce tres tipos de esporas asexuales que incluyen macroconidios, microconidios y clamidosporas en su ciclo de vida (Figura 1 A-C), lo que le permite dispersarse y sobrevivir; además, comparte un ciclo de infección similar a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (FOL), agente causal de la enfermedad del marchitamiento del jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Guo *et al.*, 2014). Las clamidosporas son de paredes gruesas, formadas dentro de la hifa o del macroconidio y pueden sobrevivir en ausencia del hospedante por varios años en estado latente o consiguen germinar y crecer como saprófito en restos de plantas no hospedantes para producir nuevas clamidosporas (Nelson *et al.*, 1983). Los conidios de FOC germinan y forman hifas fúngicas bajo diversas condiciones nutricionales y ambientales; las hifas se desarrollan alrededor de las raíces y colonizan su superficie. Posteriormente, penetran la epidermis e invaden; y colonizan los vasos del xilema de la raíz (Figura 1 D-F). Después del proceso de infección en las raíces de las plantas de banano, el hongo crece hacia el rizoma y pseudotallo y causa la muerte del tejido o de toda la planta. Entre la infección inicial por el hongo y los síntomas externos transcurre un tiempo en que el limbo de las hojas se torna amarillo brillante, y se marchita o colapsa alrededor del pseudotallo (Figura 1 G). Mientras que los haces vasculares del pseudotallo y del rizoma de la planta enferma se tornan de color rojizo a marrón (Figura 1 H-I) (Guo *et al.*, 2014).

form fungal hyphae under diverse nutritional and environmental conditions; the hyphae develop around the roots and colonize their surface. They then penetrate the epidermis, invade and colonize the xylem vessels of the root (Figure 1 D-F). After the process of infection in the banana plant roots, the fungus grows towards the rhizome and the pseudostem and causes the death of the tissue or of the entire plant. Between the initial infection by the fungus and the external symptoms, there is a moment in which the limbo of the leaves turns a bright yellow and it wilts or collapses around the pseudostem (Figure 1 G), whereas the vascular bundles of the pseudostem and of the rhizoma of the diseased plant turn reddish or maroon (Figure 1 H-I) (Guo *et al.*, 2014).

The fungus may survive in the absence of the host for extended periods in a latent state or it may germinate and grow as a saprophyte in the remains of non-host plants to produce new chlamydo spores. Estas a su vez le permiten al patógeno adaptarse a condiciones extremas (Ploetz *et al.*, 2015). Consequently, the susceptible genotypes cannot be grown in an infected field for up to 30 years (Buddenhagen, 2009). However, the infection process may end and not progress when the plant is not susceptible or is not predisposed by environmental stress. Dong *et al.* (2012) found that the resistant host responds to a signal in the vessels infested with the formation of callose, vascular gels and tylose that immobilize the spores around the storage site. The development of these structures was examined in detail under an electron microscope and it was determined that the synthesis and release of the phenolic substances produced and lignified by these structures are the same which stop the invasion of the pathogen during the host-pathogen interaction.



**Figura 1.** Ciclo de infección de la marchitez vascular en banana causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. A) macroconidios; B) microconidios; C) clamidospora producida por el aislado FOC marcado con proteína fluorescentes verde; D) acoplamiento de la hifa de FOC a las raíces de banana; E) colonización de los haces vasculares de las raíces de banana, por la hifa de FOC (indicado por la flecha); F) una sección longitudinal de las raíces de banana muestra las hifas del hongo creciendo en los haces vasculares; G) las plantas de banana enfermas con los síntomas dominantes de hojas amarillentas; H-I) los haces vasculares del pseudotallo, y el rizoma de la planta de banana enfermas que se tornan de color rojizo a marrón (indicado por la flecha). Fuente: Guo *et al.* (2014).

**Figure 1.** Figure 1. Vascular wilt infection cycle in banana plants, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. A) macroconidia; B) microconidia; C) chlamydospore caused by the isolation FOC, marked with fluorescent green protein; D) connection of the FOC hypha to the roots of the banana plant; E) colonization of the vascular bundles of the roots of the banana plant via the hypha of the FOC (indicated with the arrow); F) longitudinal section of the roots of the banana plant showing the fungal hyphae growing in the vascular bundles; G) diseased banana plants with the predominant symptoms of yellow leaves; H-I) diseased vascular bundles of the pseudostems and the banana plant rhizomes turning reddish or maroon (indicated by the arrow). Source: *et al.* (2014).

El hongo puede sobrevivir en ausencia del hospedante por largos períodos de tiempo; en estado latente o pueden germinar o crecer como saprófito en restos de plantas no hospedantes para producir nuevas clamidosporas. Estas a su vez le permiten al patógeno adaptarse a condiciones extremas (Ploetz *et al.*, 2015). Como consecuencia, los genotipos

### Pathogenic complexity of FOC

The variability of FOC populations has been differentiated based on its pathogenicity, in which three races have been identified that affect *Musa* spp.: race 1, responsible of the epiphytotic disease in plantations of Manzano (AAB) and Gros

susceptibles no pueden cultivarse en un campo infectado por un período de hasta 30 años (Buddenhagen, 2009). Sin embargo, el proceso de infección puede terminar y no progresar cuando la planta no es susceptible o no está predispuesta por un estrés ambiental. Dong *et al.* (2012) encontraron que el hospedante resistente responde a una señal en los vasos infestados por la formación de calosa, geles vasculares y tilosas que inmovilizan las esporas alrededor del sitio de almacenamiento; el desarrollo de estas estructuras fue examinado en detalle por microscopía electrónica, finalmente determinaron que la síntesis y liberación de las sustancias fenólicas que producen y lignifican estas estructuras son las que detienen la invasión del patógeno durante la interacción hospedante-patógeno.

### Complejidad patogénica de FOC

La variabilidad de las poblaciones de FOC ha sido diferenciada en base a su patogenicidad donde se han identificado tres razas que afectan a *Musa* spp.: la raza 1 responsable de la epifitía en las plantaciones de los cultivares Manzano (AAB) y Gros Michel (AAA); la raza 2 patogénica al cultivar Bluggoe (ABB), y a algunos tetraploides (AAAA); y la raza 4 que ataca a los cultivares del subgrupo Cavendish (AAA) y a todos los susceptibles a las razas 1 y 2 (Ploetz, 2006). Esta última fue descubierta por primera vez en 1990 en Taiwán; y fue posteriormente dividida en las cepas tropical y subtropical (Ploetz, 2006). En la actualidad, la raza 4 de FOC se encuentra presente en veinte países de 135 productores de bananos (Martínez *et al.*, 2020). Sin embargo, la designación de razas de FOC era engorrosa y por ello se desarrollaron otros métodos que revelaron su diversidad genética. El análisis de compatibilidad vegetativa constituye una técnica rápida y confiable que la prueba de patogenicidad. Su utilización ha permitido determinar la diversidad de razas de FOC dentro de una región.

Michel (AAA) cultivars; race 2, pathogenic to the Bluggoe (ABB) cultivar and some tetraploids (AAAA); and race 4, which attacks the cultivars of the Cavendish subgroup (AAA) and all those susceptible to races 1 and 2 (Ploetz, 2006). The latter was discovered in 1990 in Taiwan, and later divided into the tropical and subtropical strains (Ploetz, 2006). Nowadays, race 4 of FOC is found in twenty out of 135 banana-producing countries (Martínez *et al.*, 2020). However, designating FOC races was cumbersome, and other methods were developed which revealed its genetic diversity. The vegetative compatibility analysis is a faster and more reliable technique than the pathogenicity test. Its use has helped determine the diversity of FOC races within a region. The analyses of vegetative compatibility groups (GCV) divided the FOC isolations into 24 GCVs (GCV0120 to GCV0126 and GCV0128 to GCV01224) (Ploetz, 2006). Later deoxyribonucleic acid (DNA) markers revealed the polyphyletic origin of FOC, since some GCV are taxonomically closer to other special forms of FOX than to other FOC GCVs (Fourie *et al.*, 2009). Additionally, the strains belonging to diverse GCVs infest particular banana cultivars and were therefore grouped in the same race. This suggests that the pathogenicity to a specific cultivar has evolved convergently or is a result of the horizontal transfer of genes between the members of the FOX complex (Ploetz, 2006). In general, FOC lineages show a notable dichotomy referred to as types or clades (Groenewald *et al.*, 2006). High resolution genotyping by sequencing analysis using DArTseq generates readings of short sequences after reducing the complexity of a genome by digestion with restriction enzymes. In this sense, markers of entire genomes using DArTseq divided the 24 FOC strains (which represent all the GCVs known to date) into two groups (Cruz *et al.*, 2013). On the other hand, the analysis of the genome revealed that the genomic structures of the

Los análisis de los grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) dividieron los aislados de FOC en 24 GCV (GCV0120 a GCV0126, y GCV0128 a GCV01224) (Ploetz, 2006). Después, marcadores de ácido desoxirribonucleico (ADN) revelaron el origen polifilético de FOC ya que algunos GCV están taxonómicamente más cerca de otras formas especiales de FOX que a otros GCVs de FOC (Fourie *et al.*, 2009). Además, las cepas pertenecientes a diversos GCVs infestan cultivares particulares de banano y, por lo tanto, se agruparon en la misma raza. Lo que sugiere que la patogenicidad hacia un cultivar específico ha evolucionado convergentemente o ha resultado de la transferencia horizontal de genes entre los miembros del complejo de FOX (Ploetz, 2006). En general, los linajes de FOC muestran una notable dicotomía referida como tipos o clados (Groenewald *et al.*, 2006). La genotipificación de alta resolución por análisis de secuenciación usando DArTseq genera lecturas de secuencias cortas después de reducir la complejidad de un genoma por digestión con enzimas de restricción. En este sentido, marcadores de genomas enteros por DArTseq dividieron las 24 cepas de FOC (que representan todos los GCV hasta ahora conocidos) en dos grupos (Cruz *et al.*, 2013). Por otro lado, el análisis del genoma reveló que las estructuras genómicas de los aislados de la raza 1 y la raza 4 eran altamente sinténicas (que ocurren en el mismo cromosoma) con las de FOL cepa Fol4287. Guo *et al.* (2014) lograron la identificación de genes ortólogos SIX primariamente descritos para el genoma de aislados de FOL mediante el análisis del genoma de aislados de la raza 1 y la RT4 de FOC. En este aspecto, se han diseñado varios protocolos para la detección molecular de aislados de FOC, los cuales han sido revisados de forma exhaustiva por Lin y Lin (2016) y Ying y Yi (2016). De este modo FOC se compone de tres razas, ocho linajes y 24 GCVs. La mayor parte del daño es causado por la RT4 de FOC que se encontraba sólo en Asia. Sin

isolations of races 1 and 4 were highly synthetic (occurring in the same chromosome) with those of FOL strain Fol4287. Guo *et al.* (2014) managed to identify SIX orthologous genes, primarily described for the genome of FOL isolations via the analysis of the genomes of isolations from race 1 and the RT4 of FOC. In this regard, many protocols have been designed to detect FOC isolation molecules, which have been thoroughly revised by Lin and Lin (2016) and Ying and Yi (2016). Thus, FOC is composed of three races, eight lineages and 24 GCVs. Most of the damage is caused by the RT4 in FOC, found only in Asia. However, García-Bastidas *et al.* (2019) reported the first case of FOC-related RT4 outside of Southeast Asia in the Colombian Guajira region, classified as *Fusarium odoratissimum* (Figure 2). This represents a high risk for all the other countries in the Americas. Therefore, strategies must be developed to fight this disease and minimize the hazards of the effects caused by the entry of this new race of the pathogen into exporting Latin American and Caribbean countries.

### Controlling wilt by *Fusarium* in banana

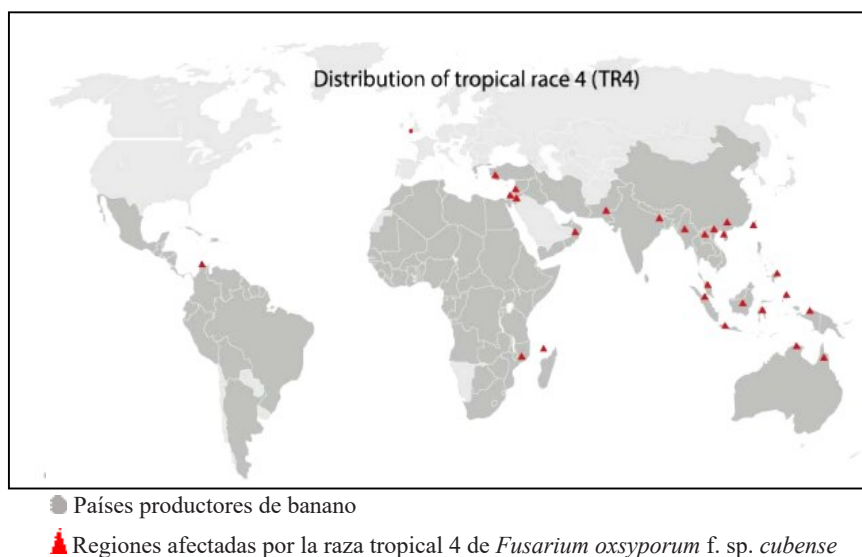
The perennial production of the banana crop and the polycyclic nature of wilt by *Fusarium* hinder the development of efficient management strategies. In spite of this, using the available knowledge and technologies, it is now easier to implement quarantine policies and therefore avoid pathogens from spreading. In relation to this, in Mexico, the SADER (Secretariat of Agriculture and Rural Development) via the SENASICA (National Agrifood Health, Safety and Quality Service) are taking important measures to prevent the entry and spreading of the RT4 of FOC into the country. These measures include phytosanitary surveillance actions for the timely detection of RT4, training technicians and farmers in order to raise awareness regarding

embargo, García-Bastidas *et al.* (2019) informaron el primer reporte de la RT4 de FOC asociado con la enfermedad fuera del sudeste asiático, en la zona de la Guajira colombiana clasificado como *Fusarium odoratissimum* (Figura 2). Lo cual representa un alto riesgo para el resto de los países del continente americano. Por lo que se requiere el desarrollo de estrategias para el combate de esta enfermedad; y reducir los riesgos de las afectaciones que puede causar la entrada de esta nueva raza del patógeno en el resto de los países exportadores de América Latina y el Caribe.

### Control de la marchitez por *Fusarium* en banano

La producción perenne del cultivo de banano y la naturaleza policíclica de la enfermedad marchitez por *Fusarium* impiden el desarrollo de estrategias de manejo eficientes. A pesar de ello, con el conocimiento y las tecnologías disponibles, hoy es más fácil y efectivo implementar políticas cuarentenarias e impedir así la diseminación de patógenos.

the risk of moving vegetative material, and finally, exploring and monitoring the banana-producing regions (Manzo *et al.*, 2014). Other measures for management also included are planting annually in phases, the use of tissue culture plants, crop rotation, having an adequate drainage system in the plantation, the incorporation of organic matter and applying biocontrol agents via *Trichoderma harzianum*. However, these control methods only allow for planting these cultivars for short periods, since the fungus destroys the plantations soon after (Fu *et al.*, 2017). Due to this, the only efficient control method has been considered to be planting disease-resistant hosts (Dita *et al.*, 2011). In this sense, since the appearance of wilt by *Fusarium* in different banana-producing countries, a wide genetic breeding program has been developed for the resistance to the three races of FOC, using conventional and biotechnological techniques, with a recent emphasis on the RT4 of FOC.



**Figura 2.** Distribución de la raza tropical 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en banano. Mapa producido por Biodiversidad Internacional para ProMusa (imagen cortesía: ProMusa.com).

**Figure 2.** Distribution of tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana plants. Map produced by International Biodiversity for ProMusa (image courtesy of ProMusa.com).



En relación con ello, en México la SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural) a través de SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) realizan un conjunto de medidas importantes para prevenir la entrada y diseminación de la RT4 de FOC en el país. Dentro de estas medidas encontramos acciones de vigilancia epidemiológica fitosanitaria para la detección oportuna de la RT4; la capacitación de técnicos y productores, con el interés de lograr conciencia en los productores del riesgo de trasladar material vegetativo; y por último, la exploración y monitoreo de las regiones bananeras (Manzo *et al.*, 2014). Otras de las medidas de manejo utilizadas tenemos las siembras anuales escalonadas; la utilización de plantas de cultivo de tejidos; la rotación de cultivo; contar en el terreno de siembra con un buen sistema de drenaje; la incorporación de materia orgánica; y la aplicación del biocontrol mediante *Trichoderma harzianum*. No obstante, estos métodos de control sólo permiten sembrar estos cultivares por períodos cortos, dado a que el hongo vuelve a devastar las plantaciones (Fu *et al.*, 2017). Por ello, se ha considerado que el único método eficaz de control es sembrar o plantar hospedantes resistentes a la enfermedad (Dita *et al.*, 2011). En este sentido, desde la aparición de la marchitez por *Fusarium* en los diferentes países productores de banano, se desarrolla un amplio programa de mejoramiento genético para la resistencia a las tres razas de FOC, mediante técnicas convencionales y biotecnológicas con énfasis en los últimos años en la RT4 de FOC.

### **Técnicas biotecnológicas en apoyo al mejoramiento genético de *Musa* spp. para la resistencia a FOC**

Las mayores posibilidades que brindan las técnicas biotecnológicas están dadas en la mejora de

### **Biotechnological techniques to support the genetic breeding of *Musa* spp. for the resistance to FOC**

The greatest possibilities provided by biotechnological techniques are found in the improvement of the resistance to pathogens, which offer several advantages over conventional methods, due to the possibility of selecting individuals from large populations of plants in a short timeframe. This increases the possibility of finding the desired traits. On the other hand, they help control inoculants and the environmental conditions that may interfere with the results obtained. In turn, they help access plants that are free of diseases and offer the efficiency of the genetic breeding programs for crops (Ortiz and Swennen, 2014). For these reasons, the results of the breeding of banana and plantain plants have been introduced faster than with the conventional genetic breeding methods (Li *et al.*, 2015); micropropagation has played an important role, and particularly, it has improved the management of healthy germplasm on a global scale. Somaclonal variation, *in vitro* mutagenesis, genetic transformation and early selection in the *Musa* genus have been used successfully in several genetic breeding programs.

### **Utilization of the somaclonal variation**

Somaclonal variation, which comprises genetic or epigenetic changes induced during the callus phase of the plant cells grown *in vitro* has been used for genetic breeding in several agronomic traits. Molina *et al.* (2011) determined the response to susceptibility or resistance to the RT4 in FOC in two somaclonal variants of Cavendish (AAA) from Taiwan, two commercial cultivars of the Cavendish subgroup, three local cultivars, and an improved hybrid from Honduras, in a field previously

la resistencia a patógenos. Las cuales ofrecen varias ventajas sobre los métodos convencionales por la posibilidad de seleccionar individuos a partir de grandes poblaciones de plantas en un espacio reducido de tiempo. Lo cual aumenta de esta forma la posibilidad de encontrar los caracteres deseados. Por otra parte, permiten un control de la concentración de inóculo, y de las condiciones ambientales que pudieran interferir en los resultados obtenidos. A su vez, permiten el acceso a las plantas libres de la enfermedad; y por último mejoran la eficiencia de los programas de mejoramiento genético de los cultivos (Ortiz y Swennen, 2014). Por estas razones, los resultados de la mejora de bananos y plátanos mediante la biotecnología vegetal se han introducido con mayor rapidez en comparación con los métodos del mejoramiento genético convencional (Li *et al.*, 2015); en donde la micropropagación ha jugado un papel importante, en particular ha mejorado el manejo del germoplasma sano a escala mundial. La variación somaclonal, la mutagénesis *in vitro*, la transformación genética y la selección temprana en el género *Musa* se han empleado con éxito en varios programas de mejoramiento genético.

#### Utilización de la variación somaclonal

La variación somaclonal que comprende los cambios genéticos o epigenéticos inducidos durante la fase de callo de las células vegetales cultivadas *in vitro* ha sido usada para el mejoramiento genético de varios caracteres agronómicos. Molina *et al.* (2011) determinaron la respuesta a la susceptibilidad o resistencia a la RT4 de FOC en dos variantes somaclonales de Cavendish (AAA) de Taiwán, dos cultivares comerciales del subgrupo Cavendish, tres cultivares locales, y un híbrido mejorado de Honduras, en un campo previamente infestado con el patógeno en Filipinas. En dicha investigación observaron los mayores valores de incidencia de la

infested with the pathogen from the Philippines. The investigation observed the highest values of incidence of the disease (100%) in two commercial Cavendish cultivars (Gran Enano and Williams), as well as in the local cultivar 'Lakatan'. However, no plants infected with the FOC RT4 were found in the somaclonal variants from Taiwan ('GCTCV119' and 'Formosana'). In other studies, Molina *et al.* (2016) compared four selections of somaclonal variations ('GCTCV-105', 'GCTCV-119', 'GCTCV-218' and 'GCTCV-219') of Cavendish (AAA) from Taiwan and three important local cultivars from the Philippines: 'Latundan' (AAB, subgroup Seda), 'Lakatan' (AAA, subgroup Lakatan) and 'Saba' (ABB, subgroup Saba) with the commercial Cavendish Gran Enano (AAA, subgroup Cavendish) in a soil severely infested with FOC RT4 in southern Philippines. Results displayed susceptibility with an incidence of the disease of 64 and 76% respectively in the commercial cultivars of Gran Enano and 'Lakatan' in the first cycle of evaluation of resistance, and 79 and 92% respectively in the second cycle. However, 'GCTCV' somaclonal variants expressed an incidence of the disease of 0 to 6% in the first cycle and 0 to 8% in the second cycle of the tests to evaluate the symptoms of the disease. The cultivar 'Saba' displayed an incidence of the disease of 0% in both the first and second cycles of evaluation of resistance to the fungus. These results confirmed the stability in the resistance to FOC RT4 in the 'GCTCV' somaclonal variants. On the other hand, they show that the selection of somaclonal variants are a feasible tool in genetic breeding for the search for resistance to FOC in banana plants.

#### Utilization of induced *in vitro* mutagenesis

Mutagenic techniques that induce inheritable changes in the genetic composition of a cell by altering its deoxyribonucleic acid (DNA) have

enfermedad (100%) en los dos cultivares comerciales Cavendish (Gran Enano y Williams) y en el cultivar local ‘Lakatan’. Sin embargo, no encontraron plantas infectadas a la RT4 de FOC en las variantes somaclonales de Taiwán (‘GCTCV119’ y ‘Formosana’). En otros estudios Molina *et al.* (2016) compararon cuatro selecciones de variantes somaclonales (‘GCTCV-105’, ‘GCTCV-119’, ‘GCTCV-218’ y ‘GCTCV-219’) de Cavendish (AAA) de Taiwán; y tres cultivares locales importantes de Filipinas: ‘Latundan’ (AAB, subgrupo de Seda), ‘Lakatan’ (AAA, subgrupo Lakatan) y ‘Saba’ (ABB, subgrupo Saba) con el Cavendish comercial Gran Enano (AAA, subgrupo Cavendish) en un suelo severamente infestado con la RT4 de FOC en el sur de Filipinas. Los resultados mostraron susceptibilidad con una incidencia de la enfermedad de 64 y 76% respectivamente en los cultivares comerciales de Gran Enano y ‘Lakatan’ en el primer ciclo de evaluación de la resistencia; y de 79 y 92% respectivamente, en el segundo ciclo. Sin embargo, las variantes somaclonales ‘GCTCV’ manifestaron una incidencia de la enfermedad de 0 a 6% en el primer ciclo; y de 0 a 8% en el segundo ciclo de las pruebas de evaluación de los síntomas de la enfermedad. El cultivar ‘Saba’ mostró una incidencia de la enfermedad del 0% tanto en el primero como en el segundo ciclo de evaluación de la resistencia al hongo. Estos resultados confirmaron la estabilidad de la resistencia a la RT4 de FOC en las variantes somaclonales ‘GCTCV’. Por otra parte, muestran que la selección de variantes somaclonales constituye una herramienta factible en el mejoramiento genético para la búsqueda de resistencia a FOC en banano.

#### Utilización de la mutagénesis *in vitro* inducida

Las técnicas mutagénicas que inducen cambios heredables en la constitución genética de una célula

been used as a very efficient tool in the genetic breeding of plants. In this sense, Chen *et al.* (2013) used *in vitro* mutagenesis, induced by ethyl methanesulfonate to evaluate the obtaining of lines of Brazilian banana (*Musa* spp., AAA) resistant to FOC RT4. The plants regenerated from the five Brazilian banana lines resistant to the RT4 of the pathogen then underwent an *in vitro* selection method, in which they displayed a reduction in the incidence of the disease in relation to plants used as a control. Meanwhile, Saraswathi *et al.* (2016) obtained banana mutants from the cultivar Rasthali (Silk, AAB), resistant to race 1 of FOC, vegetative compatibility group (GCV) [0124/5]. These results show that it is possible to adopt different biotechnological techniques for the genetic breeding of banana and obtain resistance to FOC.

#### Utilization of genetic transformation

The genetic transformation methods used to introduce into the cells the exogenous DNA to be expressed in the plant is another biotechnological technique for the development of resistance to fungi in economically important crops such as banana. Several genes have been used to fight this pathogen. In this sense, Paul *et al.* (2011) tested genes *Bcl-xl*, *Ced-9* and *Bcl-2 3' UTR* in the banana cultivar ‘Lady Finger’ (AA). The results showed the overexpression of gene *Bcl-2 3' UTR* in the lines that displayed resistance to FOC. On the other hand, they noticed apoptosis to be characteristic in host plants against necrotrophic pathogens, in which the pathogen caused the death of tissue and increased its growth potential faster. In another study, Ghag *et al.* (2012) inserted petunia (*Petunia hybrida*) genes that codify defensins *PhDef1* and *PhDef2* in banana plants, using embryogenic suspensions as explants and *Agrobacterium tumefaciens* as a transformation system, and found high levels of

mediante la alteración de su ácido desoxirribonucleico (ADN) han sido utilizadas como una herramienta muy eficiente en el mejoramiento genético de plantas. En este sentido, Chen *et al.* (2013) emplearon la mutagénesis *in vitro* inducida por el metanosulfonato de etilo para evaluar la obtención de líneas de banano brasileño (*Musa* spp., AAA) resistentes a la RT4 de FOC. Las plantas regeneradas a partir de las cinco líneas de banano brasileño resistentes a la RT4 del patógeno fueron sometidas a un método de selección *in vitro* posterior; donde mostraron una reducción en la incidencia de la enfermedad con relación a las plantas utilizadas como control. Mientras que Saraswathi *et al.* (2016) obtuvieron mutantes de banano del cultivar Rasthali (Silk, AAB) resistentes a la raza 1 de FOC, grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) [0124/5]. Estos resultados evidencian que es posible adoptar diferentes técnicas biotecnológicas para el mejoramiento genético del banano y obtener resistencia a FOC.

### Utilización de la transformación genética

Los métodos de transformación genética que se utilizan para introducir al interior de las células vegetales, el ADN exógeno que se quiere expresar en la planta constituye otra estrategia biotecnológica para el desarrollo de la resistencia a hongos en cultivos económicamente importantes como el banano. Varios genes han sido utilizados para combatir este patógeno. En este sentido Paul *et al.* (2011) ensayaron los genes *Bcl-xl*, *Ced-9* y *Bcl-2 3' UTR* en el cultivar de banano 'Lady Finger' (AA). Los resultados demostraron la sobreexpresión del gen *Bcl-2 3' UTR* en las líneas que manifestaron resistencia a FOC. Por otra parte, observaron como característico la apoptosis en plantas hospederas contra patógenos necrotróficos, donde el patógeno provocó la muerte del tejido e incrementó su potencial

constitutive expressions of these defensins in elite banana plants in the cultivar Rasthali (*Musa* AAB), which, in turn, displayed resistance to the infection with race 1 of FOC, in both *in vitro* and *in vivo* studies.

On the other hand, Mahdavi *et al.* (2012) showed the expression of genes of thaumatin in rice (*Oriza sativa*) in transgenic banana plants resistant to FOC TR4. Later, genes obtained from onions (*Allium cepa*) which are codifying for an antimicrobial protein (Ace-AMP1) were introduced and expressed in transgenic bananas (Mohandas *et al.*, 2013). Likewise, Ghag *et al.* (2014) developed a procedure for transformation in bananas mediated by *Agrobacterium* for the expression of *siRNAs* aimed at vital FOC genes. After eight months of evaluations, they obtained five transgenic lines with levels of resistance to FOC. In turn, Zhuang *et al.* (2016) demonstrated the antagonistic effect of multifunctional protein B4 from the virus *Banana bunchy top virus* (BBTV) against *F. oxysporum* in bananas. This offers new insights for the breeding of transgenic resistance to *Fusarium*, taking the virus-fungus interaction into consideration. Likewise, Dale *et al.* (2017) obtained two transgenic Cavendish lines, the first of which was transformed using gene *RGA2*, isolated from a diploid banana plant resistant to FOC RT4. The second line was transformed, using gene *Ced9* from nematodes. After three years of field tests, they displayed resistance to FOC RT4.

As these examples show, genetic transformation has been, in recent years, the biotechnological technique with the highest expectation for genetic breeding in the crop. However, most studies show no long-term field results to help evaluate the efficiency of the genes *in situ* (Ploetz, 2015). Hence the comprehension of the host-pathogen interaction in terms of defense, and the paths related to virulence mechanisms help identify the

de crecimiento más rápido. En otro estudio, Ghag *et al.* (2012) insertaron genes de petunia (*Petunia hybrida*) que codifican las defensinas *PhDef1* y *PhDef2* en plantas de banano usando como explantes suspensiones celulares embriogénicas; y como sistema de transformación el empleo de *Agrobacterium tumefaciens*, se encontraron altos niveles de expresión constitutiva de estas defensinas en plantas élites de banano en el cultivar Rasthali (*Musa AAB*); que a su vez mostraron resistencia contra la infección de la raza 1 de FOC en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por otro lado, Mahdavi *et al.* (2012) demostraron la expresión de genes de taumatina de arroz (*Oriza sativa*) en plantas transgénicas de banano con resistencia a la TR4 de FOC. Posteriormente, genes obtenidos de cebolla (*Allium cepa*) codificantes para una proteína antimicrobiana (Ace-AMP1) fueron introducidos y expresados en bananos transgénicos (Mohandas *et al.*, 2013). Por otra parte, Ghag *et al.* (2014) desarrollaron un procedimiento de transformación en banano mediada por *Agrobacterium* para la expresión de *siRNAs* dirigidos contra genes vitales de FOC. Después de ocho meses de evaluación obtuvieron cinco líneas transgénicas con niveles de resistencia a FOC. Mientras que Zhuang *et al.* (2016) demostraron el efecto antagónico de la proteína multifuncional B4 del virus *Banana bunchy top virus* (BBTV) contra *F. oxysporum* en banano. Lo cual ofrece nuevos conocimientos para el mejoramiento de la resistencia transgénica a *Fusarium* teniendo en cuenta la interacción virus-hongo. Por otro lado, Dale *et al.* (2017) obtuvieron dos líneas de Cavendish transgénico: la primera línea fue transformada con el gen *RG2* aislado de un banano diploide resistente a la RT4 de FOC; y la segunda fue transformada con el gen *Ced9* derivado de nemátodos. Después de tres años de pruebas en campo demostraron resistencia a la RT4 de FOC.

critical steps to develop resistant cultivars using genetic approaches.

### Early resistance selection

The early selection of the resistance in plants to different special forms (f. sp.) of *F. oxysporum* has been an essential goal in conventional and biotechnological genetic breeding. This type of selection has increased due to the advances on studies on plant processes, on the biology of pathogens and on the understanding of the plant-pathogen interaction. The use of fungus culture filtrates (FCH) and toxins, and even dual cultures are promising for this process. The first and most crucial step when evaluating a new banana clone is selecting the resistance to the difference races of wilt by FOC (Buddenhagen, 2009). Therefore, the development of efficient methods to help select susceptible and resistant to this pathogen is a priority in the genetic breeding of this crop. To date, different groups of researchers have developed two selection systems for the resistance of banana plants to FOC: 1) selection *ex vitro* and *in vivo* by planting banana propagules in pots, or in the field with the inoculant of the natural or artificial fungus; 2) selection *in vitro*, using propagules or FCH and toxins as selection agents. Below are some of the experiences of the selection of the resistance of banana plants to FOC with the use of the selection systems mentioned.

### *Ex vitro* and *in vivo* evaluations of the resistance to the RT4 of FOC in banana propagules

The *ex vitro* and *in vivo* selections to evaluate the resistance to diseases have been the main selection methods for many years. They consist of the natural infection with spores from the fungus and are currently still being used. Below are the

Como se puede apreciar, en los últimos años la transformación genética constituye la técnica biotecnológica de mayor expectativa para el mejoramiento genético en el cultivo. Sin embargo, los resultados de campo a largo plazo que contribuyan a evaluar la eficacia de los genes *in situ* no están presentes en la mayoría de los estudios (Ploetz, 2015). Por ello, la comprensión de la interacción hospedero-patógeno en términos de defensa; y las rutas relacionadas con los mecanismos de virulencia permite identificar pasos críticos para desarrollar cultivares resistentes empleando enfoques genéticos.

### Selección temprana de resistencia

La selección temprana de la resistencia en plantas frente a diferentes formas especiales (f. sp.) de *F. oxysporum* ha sido un objetivo primordial en el mejoramiento genético convencional y biotecnológico. La misma se ha incrementado por el avance en los estudios tanto de los procesos de la planta, y la biología de los patógenos como del entendimiento de la interacción planta-patógeno. El empleo de filtrados del cultivo de hongos (FCH) y toxinas e incluso cultivos duales para este proceso son prometedores. El primero y más crucial de todos los pasos al evaluar un nuevo clon de banano es la selección de la resistencia a las diferentes razas de marchitez por FOC (Buddenhagen, 2009). Por lo tanto, constituye una prioridad el desarrollo de métodos eficientes que permitan seleccionar cultivares susceptibles y resistentes a este patógeno, en el mejoramiento genético en el cultivo. Hasta el momento, diferentes grupos de investigadores han desarrollado dos sistemas de selección para la resistencia del banano a FOC: 1) selección *ex vitro* e *in vivo* mediante plantación de propágulos de banano en macetas, y en campo con inóculo del hongo natural o artificial; 2) selección *in vitro* utilizando como

results of the evaluation for resistance to FOC RT4 of banana cultivars, plantains and Cavendish somaclonal variants with those selection systems, provided by the Taiwan Banana Research Institute (Huang *et al.*, 2005).

Dita *et al.* (2011) obtained a quick and reliable bioassay for the evaluation of resistance to FOC RT4 under greenhouse conditions. They used a double pot system, following Mohamed *et al.* (2000). The roots of seedlings from the *in vitro* culture of the cultivar Gran Enano (grupo AAA) were cut at a length of approximately 40 cm. They then carried out the inoculation process individually with three isolations of the RT4 of the fungus (NRRL36114, FOC-115 and BPS3.4) of the GCV [01213] and one isolation of race 1, CNPMFO8-R1. The inoculation was carried out by submerging the root for 30 minutes in a suspension of  $10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of the fungus. The inoculated seedlings were planted in 8 L pots containing sterile river sand as a substrate and supplemented with 20 g of maize grains pre-colonized with FOC. The evaluation of the resistance was carried out between days 7 and 40 after the inoculation of the seedlings by evaluating the internal symptoms and the decoloring of the rhizome. The results showed that the bioassay described under controlled greenhouse conditions was reliable to obtain a response of resistance on the reaction of the host to FOC. In addition, the bioassay presented a useful tool to carry out accurate studies in the plant-pathogen interaction. In this sense, Li *et al.* (2015) studied the resistance to FOC RT4 in eight genotypes of wild banana plants (*Musa acuminata* subsp. *burmannica*, *M. balbisiana*, *M. basjoo*, *M. itinerans*, *M. nagensium*, *M. ruiliensis*, *M. velutina* and *M. yunnanensis*) under greenhouse and field conditions. For the greenhouse tests, the banana seedlings from the *in vitro* culture were inoculated by punching holes at the bottom of the pseudostem,

agente de selección propágulos o FCH y toxinas. A continuación, se recogen algunas experiencias de la selección de la resistencia del banano a FOC con el uso de los sistemas de selección mencionados.

### Evaluación *ex vitro* e *in vivo* de la resistencia a la RT4 de FOC en propágulos de banano

La selección *ex vitro* e *in vivo* para evaluar la resistencia a enfermedades constituyen los principales métodos de selección desde hace muchos años. Consisten en la infección natural con esporas provenientes del hongo y en la actualidad continúan siendo utilizados. Seguidamente, se muestran resultados en la evaluación para resistencia a la RT4 de FOC de cultivares de bananos, plátanos y variantes somaclonales de Cavendish mediante estos sistemas de selección proporcionados por el Instituto de Investigaciones del Plátano de Taiwán (Cuadro 1) (Huang *et al.*, 2005).

Dita *et al.* (2011) obtuvieron un bioensayo rápido y confiable para la evaluación de la resistencia a la RT4 de FOC en condiciones de invernadero.

along with a suspension of  $5 \times 10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  of the fungus. After this process, the resistance was selected every day for 65 days by evaluating the expression of internal and external symptoms of the disease in the seedlings. For external symptoms, it was carried out using a grading scale with four categories: 0 = no symptoms; 1 = initial yellowing, mainly on the lower leaves; 2 = yellowing of all the lower leaves with a certain decoloring of the youngest leaves; 3 = all leaves with intense yellowing or dead plant. Meanwhile, the internal symptoms were evaluated using a scale based on the decoloring of the rhizome: 0 = no symptoms, 1 = 1 - 20%, 2 = 21 - 40% and 3 = > 40% of decolored rhizomes. The field selection test was carried out on an experimental field naturally infested with FOC RT4. The evaluation of the expression of external symptoms of the disease was carried out every two weeks for 12 months after planting and internal symptoms were evaluated at the end of the experiment (12 months) according to the scale. The results showed that there are different sources of resistance to FOC RT4, which is an important

**Cuadro 1. Resultados en la evaluación para resistencia a la RT4 de FOC de cultivares de bananos, plátanos y variantes somaclonales de Cavendish.**  
**Table 1. Results in the evaluation for resistance to RT4 of FOC in banana, plantains and somaclonal variants of Cavendish cultivars.**

Cultivar	Lugar	Respuesta a RT4 de FOC	Referencia
'FHIA 01'	FAO, Malasia	Resistente	Huang <i>et al.</i> (2005)
'FHIA 02'	International <i>Musa</i> Testing Programme, Phase III (IMTP III) China	Resistente	Huang <i>et al.</i> (2005)
'FHIA 03'	Journal of Tropical Crops China	Resistente	Zisi <i>et al.</i> (2009)
'FHIA 17'	Papua New Guinea	Resistente	Molina <i>et al.</i> (2011)
'FHIA 18'	Journal of Tropical Crops China	Altamente Resistente	Zisi <i>et al.</i> (2009)
'FHIA 21'	International <i>Musa</i> Testing Programme, Phase III (IMTP III), China	Resistente	Molina <i>et al.</i> (2011) Huang <i>et al.</i> (2005)
'FHIA 23'	FHIA: Bananas Database	Susceptible	Houbin <i>et al.</i> (2004)
'FHIA 25'	Journal of Tropical Crops China	Altamente Resistente	Zisi <i>et al.</i> (2009)
'FORMOSANA'	Papua New Guinea	Resistente	Molina <i>et al.</i> (2011)
	Taiwan	Resistente	Hwang y Ko (2007)

Para ello utilizaron un sistema de doble maceta según Mohamed *et al.* (2000). Las plántulas provenientes del cultivo *in vitro* del cultivar Gran Enano (grupo AAA) les realizaron cortes a las raíces a una longitud aproximadamente de 40 cm. Después, realizaron el proceso de inoculación de forma individual con tres aislados de la RT4 del hongo (NRRL36114, FOC-115 y BPS3.4) del GCV [01213]; y un aislado de la raza 1, CNPMFO8-R1. La inoculación se realizó mediante la inmersión de la raíz durante 30 minutos en una suspensión de  $10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  del hongo. Las plántulas inoculadas fueron sembradas en macetas de 8 L que contenían como sustrato arena de río estéril; y suplementada con 20 g de granos de maíz pre-colonizados con FOC. La evaluación de la resistencia se realizó a los siete hasta los 40 días después de la inoculación de las plántulas, mediante la evaluación de los síntomas internos y la decoloración del rizoma. Los resultados mostraron que el bioensayo descrito en condiciones controladas de invernadero fue confiable para obtener una respuesta de resistencia en la reacción del huésped a FOC. Además, el bioensayo mostró una herramienta útil para realizar estudios precisos en la interacción planta-patógeno. En este mismo sentido, Li *et al.* (2015) estudiaron la resistencia a la RT4 de FOC en ocho genotipos silvestres de banano (*Musa acuminata* subsp. *burmannica*, *M. balbisiana*, *M. basjoo*, *M. itinerans*, *M. nagen-sium*, *M. ruiliensis*, *M. velutina* y *M. yunnanensis*) en condiciones de invernadero y en campo. Para las pruebas en invernadero procedieron a la inoculación de las plántulas de banano provenientes del cultivo *in vitro* mediante la punción de orificios en la base del pseudotallo; con una suspensión de  $5 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  del hongo. Después de este proceso, realizaron la selección de la resistencia cada dos días hasta los 65 días mediante la evaluación de la expresión de los síntomas internos y externos de la enfermedad en las plántulas. Para los síntomas

genetic resource for banana genetic breeding programs that intend to obtain cultivars resistant to wilt by FOC RT4. However, studies related to the resistance to FOC RT4 continue, as indicated with examples in Table 1.

### ***In vitro* selection using propagules or filtrates of the fungal culture and toxins**

Wu *et al.* (2010) developed an *in vitro* bioassay methodology for the early detection of resistance or susceptibility to FOC RT4 in six cultivars of *Musa* (Brazil Xiangjiao subgroup AAA, Guangfen Num.1 subgroup ABB, Formosana subgroup AAA, Nongke No.1 subgroup AAA, GCTCV-119 subgroup AAA and Dongguan Dajiao subgroup AAA). The rooted *in vitro* banana seedlings were inoculated in their culture medium via a suspension of  $10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of FOC. After 24 days of inoculation, the selection of the resistance to the pathogen was carried out on the banana seedlings using a scale of 0 to 6 degrees of severity, suggested by the same authors. The results showed that the two susceptible cultivars (Brazil Xiangjiao and Guangfen No.1) presented the highest degrees of severity of the disease in comparison with the four resistant cultivars tested (Formosana, Nongke No.1, GCTCV-119 and Dongguan Dajiao). This shows that the promising resistant clones obtained with traditional genetic breeding techniques can be directly analyzed using the *in vitro* bioassay described. This method is more time-efficient, since it requires no acclimatization stage for the plants. Meanwhile, Saraswathi *et al.* (2016) carried out the selection of mutants of banana plants of the Rasthali cultivar (Silk, AAB) with resistance to race 1 of the FOC GCV [0124/5] by *in vitro* selection, using FCH and the toxin (fusaric acid) as selection agents. The individual buds of the banana mutants obtained after the third or fourth subculture were



externos, fue mediante una escala de calificación de cuatro clases: 0 = sin síntomas; 1 = amarillamiento inicial, principalmente en las hojas inferiores; 2 = amarillamiento de todas las hojas inferiores con cierta decoloración de las hojas más jóvenes; 3 = todas las hojas con intenso amarilleamiento o planta muerta. Mientras que los síntomas internos fueron evaluados por medio de una escala basada en la decoloración del rizoma: 0 = sin síntomas, 1 = 1 - 20%, 2 = 21 - 40% y 3 = > 40% de rizoma descolorido. La prueba de selección en campo se realizó en una parcela experimental infestada de forma natural con la RT4 de FOC. La evaluación de expresión de los síntomas externos de la enfermedad se realizó cada dos semanas hasta los 12 meses después de la siembra; y, los síntomas internos se evaluaron al final del experimento (12 meses) de acuerdo a la escala. Los resultados mostraron que existen diferentes fuentes de resistencia a la RT4 de FOC, lo cual constituyen un importante recurso genético para los programas de mejoramiento genético del banano con el interés de obtener cultivares resistentes al marchitamiento para la RT4 de FOC. Sin embargo, se continúan los estudios relacionados a la resistencia a RT4 de FOC como se indican solo algunos.

### **Selección *in vitro* con uso de propágulos o filtrados del cultivo del hongo y toxinas**

Wu *et al.* (2010) desarrollaron una metodología de bioensayo *in vitro* para la temprana detección de la resistencia o susceptibilidad a la RT4 de FOC en seis cultivares de *Musa* (Brazil Xiangjiao subgrupo AAA, Guangfen No.1 subgrupo ABB, Formosana subgrupo AAA, Nongke No.1 subgrupo AAA, GCTCV-119 subgrupo AAA y Dongguan Dajiao subgrupo AAA). Las plántulas enraizadas *in vitro* de banano fueron inoculadas en su medio de cultivo mediante una suspensión de  $10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$

transferridas al medio de cultivo de multiplicación y suplementadas con diferentes concentraciones de la toxina (ácido fusárico comercial) (Sigma Aldrich, U.S.A.) (0.0125; 0.025; 0.0375; 0.05 and 0.0625 mM) and with concentrations of 3, 4, 5, 6, 7 and 8% of the FCH; in addition, they added growth regulator. After three weeks, they observed a survival rate of 50% for the explants in the concentration of 0.050 mM of the toxin and 7% with the filtrate of the fungal culture. In higher concentrations, they observed a rapid reduction in the growth of the banana mutant buds. After three months, the selected mutants were transferred in order to carry out the tests in pots under conditions controlled by the inoculation into the substrate with a suspension of spores of  $12 \times 10^9$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of the fungus. After six months of the process of evaluation of the resistance, three putative mutants were obtained with resistance to FOC race 1, which were massively multiplied *in vitro* to continue other studies on the interaction.

It is worth pointing out that in order to establish resistance selection systems, determining a correct concentration of the filtrate of the pathogen culture or toxin is necessary for the expression of the differential phytotoxic activity between varieties. This increases the possibilities of obtaining stable lines for disease-resistant plants (Švábová and Lebeda, 2005). As indicated, even when *in vitro* selections are carried out, allegedly resistant plants must undergo field studies. The disease caused by FOC has relatively long incubation periods under these conditions. In other words, many months can go by between the infection of the roots and the yellowing and collapse of the limbo of the leaves (external symptoms). Therefore, a large number of plants must be followed up for a prolonged time.

The above statements indicate the need to develop alternative, quick and non-destructive methods for the selection of resistance of banana

de FOC. Después de 24 días de la inoculación se realizó la selección de la resistencia al patógeno sobre las plántulas de banano mediante una escala de 0 a 6 grados de severidad, propuesta por los mismos autores. Los resultados mostraron que los dos cultivares susceptibles (Brazil Xiangjiao y Guangfen No.1) presentaron los mayores grados de severidad de la enfermedad, en comparación con los cuatro cultivares resistentes probados (Formosana, Nongke No.1, GCTCV-119 y Dongguan Dajiao). Lo cual evidencia que los prometedores clones resistentes obtenidos mediante técnicas de mejoramiento genético tradicionales pueden ser analizados de forma directa mediante el bioensayo *in vitro* descrito; este método eficientiza los tiempos dado a que no necesita una etapa de aclimatización para las plántulas. Mientras, Saraswathi *et al.* (2016) realizaron la selección de los mutantes de banano del cultivar Rasthali (Silk, AAB) con resistencia a la raza 1 del GCV [0124/5] de FOC mediante la selección *in vitro*. Para ello, utilizaron como agentes de selección el FCH y la toxina (ácido fusárico). Los brotes individuales de los mutantes de banano obtenidos después del tercer o cuarto subcultivo fueron transferidos al medio de cultivo de multiplicación, suplementado con diferentes concentraciones de la toxina (ácido fusárico comercial) (Sigma Aldrich, EE. UU.) (0.0125; 0.025; 0.0375; 0.05 y 0.0625 mM); y a las concentraciones de 3, 4, 5, 6, 7 y 8% del FCH. Además, añadieron el regulador de crecimiento. Después de tres semanas observaron el 50% de supervivencia de los explantes en la concentración de 0.050 mM de la toxina y 7% con el filtrado del cultivo del hongo. En concentraciones superiores observaron una rápida disminución en el crecimiento de los brotes de los mutantes de banano. A los tres meses siguientes, los mutantes seleccionados fueron transferidos para realizar las pruebas en macetas, en condiciones controladas mediante la inoculación al sustrato con una suspensión

to FOC in the resistance selection test under field conditions. In this sense, Companioni *et al.* (2003) developed a procedure for the foliar differentiation of resistance and susceptibility of banana cultivars to FOC race 1, GCV [01210] by means of leaves-boring bioassay (bioassay on banana detached leaves) in and the application of FCH. The evaluation bioassay consisted in collecting middle-aged banana cultivar leaves in the field: Gros Michel (group AAA, susceptible) and FHIA-01 (group AAAB, resistant), on which FCH was applied. The application was made on three different positions of the adaxial side of the leaf limbo: distal, middle and proximal. After 48 hours, the phytotoxic activity of the fungal culture filtrates was evaluated with the symptomatological expression of necrosis formed around the point of application of FCH, expressed as the area of the elliptic lesion (mm<sup>2</sup>) (Figure 3). Forty-eight hours after the FCH was applied on banana leaves, the greatest statistical differences between cultivars were observed.

Other studies (Companiononi *et al.*, 2005; 2012) included evaluations of other indicators, such as biochemical components (Figure 4). The discriminant analysis for the differentiation of resistance and susceptibility of banana cultivars, used in the genetic breeding program, is a novel aspect in this investigation.

This estimation was carried out using a data matrix that included the effect of the FCH (area of the lesion and levels of phenols, both free and linked to the cell walls, aldehydes except malondialdehyde, and proteins) on the leaves of 18 cultivars. After the discriminant analysis, two functions were obtained; one for resistant cultivars and the other for susceptible ones. Each plant of the matrix was evaluated according to discriminant functions and classified as resistant or susceptible for 94.4% of all cases (68 plants out of 72). The

de esporas de  $12 \times 10^9$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  del hongo. Posterior a los seis meses del proceso de evaluación de la resistencia obtuvieron tres mutantes putativos resistentes a la raza 1 de FOC. Los cuales fueron multiplicados *in vitro* de forma masiva para continuar otros estudios en la interacción.

Es importante señalar que, para el establecimiento de sistemas de selección de la resistencia es necesaria la determinación de una concentración correcta del filtrado del cultivo patógeno o toxina, para la expresión de la actividad fitotóxica diferencial entre variedades. Lo cual incrementa las posibilidades de obtener líneas estables de plantas con resistencia a las enfermedades (Švábová y Lebeda, 2005). Como se puede mostrar, aunque se realicen selecciones *in vitro* las plantas supuestamente resistentes deben someterse a estudios en campo. La enfermedad causada por FOC tiene períodos relativamente largos de incubación bajo estas condiciones. En otras palabras, desde la infección de las raíces hasta el amarillamiento y colapso del limbo de las hojas (síntomas externos) pueden transcurrir varios meses. Por lo tanto, se debe realizar un seguimiento a un gran número de plantas durante un prolongado tiempo.

Los planteamientos anteriores indican la necesidad del desarrollo de métodos alternativos, rápidos y no destructivos para la selección de la resistencia del banano a FOC en las pruebas de selección de resistencia en condiciones de campo. En este aspecto, Companioni et al. (2003) desarrollaron un procedimiento para la diferenciación foliar de la resistencia y susceptibilidad de cultivares de banano a la raza 1 de FOC, GCV [01210] mediante el bioensayo de punteadura en hojas (bioensayo en hojas de banano desprendidas); y la aplicación de FCH. El bioensayo de evaluación consistió en la colecta en campo de hojas de mediana edad de dos cultivares de banano: Gros Michel (grupo AAA, susceptible) y FHIA-01 (grupo AAAB, resistente); a los

described method is a useful tool to increase the efficiency of the selection under *ex vitro* and *in vivo* conditions, regardless of environmental conditions or the favorable season for the development of the disease. It also helps evaluate an important number of samples in the laboratory and to speed up the genetic breeding programs for this disease. For this reason, García *et al.* (2020) proved that the method to differentiate the susceptibility or resistance to *Fusarium* described earlier can be carried out quickly and in a non-destructive way with the use of treated FCH on the leaves for different populations of the pathogens. This could be applicable to the genetic breeding programs for musaceae, both conventional and biotechnological. On the other hand, they lay the foundations for future projects related to the identification of the specificity of alleged avirulence genes of the causal agent. In this regard, Portal *et al.* (2018) studied the toxic components of FCH of race 1 of FOC GCV [01210] using the bioassay described by Companioni *et al.* (2003) and they isolated the extracellular microbial metabolites implied in the response of the plant. In the latter, they obtained a culture filtrate of the specific host and they characterized the phytotoxic compounds such as fusaric acid, bovericin and fumonisin B1. These results are the basis for the direct isolation of avirulence genes of the pathogen and genes for the resistance in banana plants via advanced genetics for use in genetic breeding programs for the crop.

The results presented in this revision show the potential of plant biotechnology and other tools in the field of genetic breeding for the crop, in which biotechnological techniques constitute feasible tools in the search for resistance to FOC. In this regard, genetic transformation is the biotechnological technique with the highest expectations in recent years. However, most field studies lack long-term results that contribute to the evaluation of

que se les aplicó el FCH. La aplicación se realizó en tres posiciones diferentes en el lado adaxial del limbo de la hoja: distal, media y proximal. Transcurridas 48 horas se evaluó la actividad fitotóxica de los filtrados del cultivo del hongo, a través de la expresión sintomatológica de necrosis formada alrededor del punto de aplicación del FCH, expresada como área de la lesión elíptica ( $\text{mm}^2$ ) (Figura 3). A las 48 horas de la aplicación del FCH en las hojas de banano se observaron las mayores diferencias estadísticas entre los cultivares.

En otros estudios (Companioni *et al.*, 2005; 2012) incluyeron evaluaciones de otros indicadores, tales como componentes bioquímicos (Figura 4). El análisis de la discriminante para la diferenciación de la resistencia y susceptibilidad de cultivares de banano, utilizado en el programa de mejoramiento genético constituye un aspecto novedoso en esta investigación. Tal estimación se realizó a partir de una matriz de datos que incluyó el efecto del FCH (área de la lesión y niveles de fenoles libres y ligados a las paredes celulares, aldehídos, excepto malondialdehído, y proteínas) en hojas de dieciocho cultivares. Tras el análisis discriminante, se obtuvieron dos funciones, una para los cultivares resistentes, y otra para los susceptibles. Se evaluó cada planta de la matriz, según las funciones discriminantes; y estas se clasificaron en resistentes o susceptibles al 94.4% de los casos (68 de 72 plantas). El método descrito constituye una herramienta útil para incrementar la eficiencia de la selección en condiciones *ex vitro* e *in vivo*, sin tener en cuenta las condiciones ambientales, y la época del año favorable para el desarrollo de la enfermedad. También permite evaluar un número importante de muestras en condiciones de laboratorio, y acelerar los programas de mejoramiento genético a esta enfermedad. Lo cual evidencia el potencial de la biotecnología en el campo del mejoramiento genético en el cultivo. Por tal motivo, García *et al.*

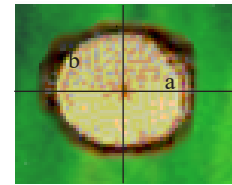
$$A = \pi/4 ab$$

A – área de la elipse ( $\text{mm}^2$ ).

a – semi-eje mayor (mm).

b – semi-eje menor (mm).

$$\pi - 3.14$$



**Figura 3.** Expresión sintomatológica de necrosis formada alrededor del punto de aplicación del filtrado del cultivo del hongo, expresada como área de la lesión elíptica ( $\text{mm}^2$ ).

**Figure 3.** Symptomatologic expression of necrosis formed around the point of application of the fungal culture filtrate, expressed as the area of the elliptical lesion ( $\text{mm}^2$ ).

genes *in situ*. Therefore, understanding the host-pathogen interaction in terms of defense and the paths related to the virulence mechanisms help identify critical steps towards the development of resistant cultivars using genetic approaches. However, the selection systems for resistance to this disease under field conditions are laborious, destructive and time-consuming. For these reasons, the development of efficient methods for the early selection of resistance to FOC are a useful tool for accurately studying the plant-pathogen interaction and increasing the efficiency of genetic breeding for the crop.

## Perspectives

Scientific studies reported globally, related to the host-pathogen interaction of the binome *Musa* spp. and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, indicate that the current and future tendency is the search for materials resistant to the pathogen via diverse biotechnology techniques, such as somaclonal variation, induced *in vitro* mutagenesis and genetic transformation itself, which are supported by methodologies for the early detection

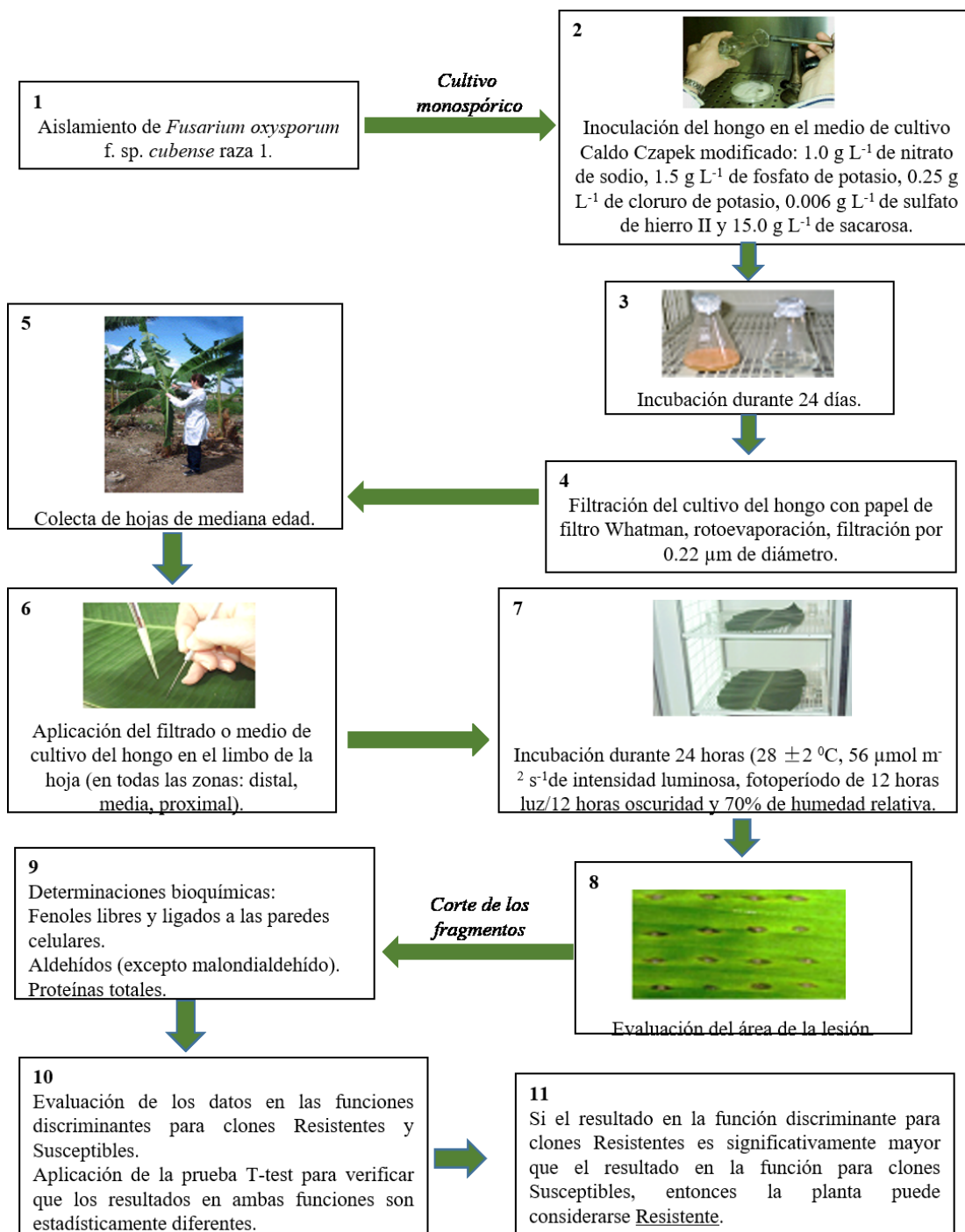


Figura 4. Método para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 en banano según Companioni *et al.* (2012).

Figure 4. Method to differentiate the resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 in banana plants at a foliar level, according to Companioni *et al.* (2012).

(2020) demostraron que el método para la diferenciación de la susceptibilidad o resistencia a marchitez por *Fusarium* descrito con anterioridad puede realizarse de forma rápida, y no destructiva con el uso del FCH tratados en las hojas para diferentes poblaciones del patógeno. Lo cual podría ser aplicable para los programas de mejoramiento genético de musáceas tanto convencional como biotecnológicas. Por otro lado, propician las bases para futuros proyectos relacionados con la identificación de los metabolitos fitotóxicos, y de la especificidad de presuntos genes de avirulencia del agente causal. En este aspecto, Portal *et al.* (2018) estudiaron mediante el bioensayo descrito por Companioni *et al.* (2003) los componentes tóxicos de los FCH de la raza 1 de FOC GCV [01210]; y aislaron los metabolitos microbianos extracelulares implicados en la respuesta de la planta. Donde obtuvieron un filtrado de cultivo del hospedero específico, y caracterizaron los compuestos fitotóxicos como ácido fusárico, bovericina y fumonisina B1. Estos resultados constituyen la base para el aislamiento directo de genes de avirulencia del patógeno, y genes de resistencia en banano mediante la genética avanzada para su uso en programas de mejoramiento genético en el cultivo.

Los resultados presentados en esta revisión evidencian el potencial de la biotecnología vegetal y otras herramientas en el campo del mejoramiento genético en el cultivo. Donde las técnicas biotecnológicas constituyen herramientas factibles en la búsqueda de la resistencia a FOC. En este sentido, la transformación genética representa la técnica biotecnológica de mayor expectativa en los últimos años. Sin embargo, la mayoría de los estudios de campo carecen de resultados a largo plazo que contribuyan a evaluar la eficacia de los genes *in situ*. Por ello, la comprensión de la interacción hospedero-patógeno en términos de defensa; y las rutas relacionadas con los mecanismos de virulencia

of resistance, with partially successful results thus far. Diverse work groups have been formed to face this phytopathological problem; those in Southeast Asia are particularly important, since it is where FOC RT4 was first detected, in 1990. In June of 2019, plants with FOC symptoms were observed in Colombia, only 19 years later. This was a warning for OIRSA member countries, including Mexico, and by July 25, 2019, the SADER-SENASICA (2019) claimed to be ready to prevent the entry of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* RT4 into the country, and reinforced security and prevention measures to mitigate the risk of its entry. It also made a priority out of training technicians and farmers, in which epidemiological surveillance was crucial. Regarding scientific research to face the problem that draws near, little progress has been made in Mexico. It is therefore crucial for research-focused institutions to address this problem.

## CONCLUSIONS

The results presented in this revision show the potential of plant biotechnology and other tools in the field of genetic breeding in the crop. They help speed up the genetic breeding programs for resistance to this disease. The genetic transformation is the biotechnological technique that has provided the greatest expectations in recent years. However, most field studies lack long-term results that help evaluate the efficiency of the genes *in situ*. Due to this, the development of efficient methods for the early selection of resistance to FOC is a useful tool to carry out accurate studies in the plant-pathogen interaction and to increase the efficiency of the genetic breeding programs for resistance to FOC in the crop.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

permite identificar pasos críticos para desarrollar cultivares resistentes empleando enfoques genéticos. Pero, los sistemas de selección para la resistencia a esta enfermedad en condiciones de campo resultan trabajosos, destructivos y consumen mucho tiempo. Por estas razones, el desarrollo de métodos eficientes para la selección temprana de la resistencia a FOC constituye una herramienta útil para realizar estudios precisos en la interacción planta-patógeno; y aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento genético en el cultivo.

### Perspectivas

Estudios científicos reportados en todo el mundo relacionados a la interacción hospedante-patógeno del binomio *Musa* spp. y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* indican que la tendencia en el presente y futuro es la búsqueda de materiales resistentes al patógeno mediante el uso de las diversas técnicas de la biotecnología como lo son la variación somaclonal, mutagenesis *in vitro* inducida y la transformación genética mismas que son apoyadas con metodologías para la detección temprana de la resistencia; con resultados parcialmente exitosos hasta ahora. Grupos diversos de trabajo se han formado para afrontar este problema fitopatológico, destacan los del continente asiático donde se detectó por primera vez e FOC RT4 en 1990. En junio de 2019 se observaron plantas con síntomas de FOC en Colombia, tan solo 19 años después. Esto alertó a los países miembros del OIRSA del cual México forma parte; para el 25 de julio de 2019, a través de la SA-DER-SENASICA (2019) señaló estar preparado para prevenir la entrada al país del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* RT4. Reforzar las medidas de vigilancia y prevención sanitarias para mitigar el riesgo de entrada; así como la capacitación de técnicos y productores son prioridad, donde el programa de vigilancia epidemiológica forma parte

fundamental. En relación a investigación científica para enfrentar este problema que se avecina poco se ha avanzado en México. Por lo que, es una necesidad inminente que instituciones enfocadas a la investigación aborden este problema.

### CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta revisión muestran el potencial de la biotecnología vegetal y otras herramientas en el campo del mejoramiento genético en el cultivo. Los cuales permiten acelerar los programas de mejoramiento genético de la resistencia a esta enfermedad. La transformación genética representa la técnica biotecnológica de mayor expectativa en los últimos años. Sin embargo, la mayoría de los estudios de campo carecen de resultados a largo plazo que contribuyan a evaluar la eficacia de los genes *in situ*. Por ello, el desarrollo de métodos eficientes para la selección temprana de la resistencia a FOC constituye una herramienta útil para realizar estudios precisos en la interacción planta-patógeno; y aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento genético para la resistencia a FOC en el cultivo.

### LITERATURA CITADA

- Bubici G, Kaushal M, Prigigallo MI, Gómez C and Mercado J. 2019. Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in Microbiological* 10: 616. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00616>
- Buddenhagen IW. 2009. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of 'tropical race 4' to better manage banana production. *Acta Horticulturae* 828(828): 193-204. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.828.19>
- Chen YF, Chen W, Huang X, Hu X, Zhao JT, Gong Q, Li XJ and Huang XL. 2013. *Fusarium* wilt-resistant lines of Brazil banana (*Musa* spp., AAA) obtained by EMS-induced mutation in a micro-cross-section cultural system. *Plant Pathology* 62(1): 112-119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02620.x>

- Companiononi B, Arzola M, Rodríguez Y, Mosqueda M, Pérez MC, Borrás O, Lorenzo JC and Santos R. 2003. Use of *in vitro* culture-derived *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 filtrates for rapid and non-destructive differentiation of field-grown banana resistant from susceptible clones. *Euphytica* 130: 341-347. <https://doi.org/10.1023/A:1023027604627>
- Companiononi B, Lorenzo JC y Santos R. 2012. Nuevo método para la diferenciación al Mal de Panamá en banano. Editorial Académica Española. <http://www.eae-publishing.com>
- Companiononi B, Mora N, Díaz L, Pérez A, Arzola M, Espinosa P, Hernández M, Ventura J, Pérez MC, Santos R and Lorenzo JC. 2005. Identification of discriminant factors alter treatment of resistant and susceptible banana leaves with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* culture filtrates. *Plant Breeding* 124: 79–85. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2004.00997.x>
- Cruz VM, Kilian A and Dierig DA. 2013. Development of DArT marker platforms and genetic diversity assessment of the U.S. collection of the new oilseed crop lesquerella and related species. *PLoS One* 8: 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064062>
- Dale JL, James A, Paul JY, Khanna H, Smith M, Peraza-Echeverria S, Garcia-Bastidas F, Kema G, Waterhouse P, Mengersen K and Harding R. 2017. Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nature Communications (United Kingdom)* 8 (1):1496. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01670-6>
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond K, Di Prieto A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J and Foster G. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13(4): 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dita MA, Waalwijk C, Paiva LV, Souza MT and Kema GHJ. 2011. A greenhouse bioassay for the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* x 'Grand Naine' (*Musa*, AAA, Cavendish subgroup) interaction. *Acta Horticulturae* 897: 377-380. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.897.51>
- Dong X, Ling N, Wang M, Shen Q and Guo S. 2012. Fusaric acid is a crucial factor in the disturbance of leaf water imbalance in *Fusarium*-infected banana plants. *Plant Physiology Biochemistry* 60: 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.08.004>
- FAO. 2017. Global programme on banana *Fusarium* wilt disease: Protecting banana production from the disease with focus on tropical race 4 (TR4). FAO, Rome, ITA. <http://www.fao.org/3/a-i7921e.pdf>
- Fourie G, Steenkamp ET, Gordon TR and Viljoen A. 2009. Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* vegetative compatibility groups. *Applied Environmental Microbiology* 75: 4770-4781. <https://doi.org/10.1128/AEM.00370-09>
- Fu L, Penton CR, Ruan Y, Shen Z, Xue C, Li R and Shen Q. 2017. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana *Fusarium* wilt disease. *Soil Biology and Biochemistry* 104: 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.10.008>
- García-Velasco R, Portal-González N, Santos-Bermúdez R, Yanes-Paz E, Lorenzo-Feijoo JC. y Companiononi-González B. 2020. Método rápido aplicado en la evaluación previa de la resistencia del banano al *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38(2): 389-397. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2004-1>
- García-Bastidas F, Quintero J, Ayala M, Schermer T, Seidl M, Santos M, Noguera AM, Aguilera C, Wittenberg A, Sørensen A, Hofstede R and Kema GHJ. 2019. First report of *Fusarium* wilt tropical race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *Disease notes*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN>
- Ghag SB, Shekhawat UK and Ganapathi TR. 2012. Petunia floral defensins with unique prodomains as novel candidates for development of *Fusarium* wilt resistance in transgenic banana plants. *PLoS One* 7: 39557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039557>
- Ghag SB, Shekhawat UK and Ganapathi TR. 2014. Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal* 12: 541–553. <https://doi.org/10.1111/pbi.12158>
- Groenewald S, van der Berg N, Marasas WFO and Viljoen A. 2006. Biological, physiological and pathogenic variation in a genetically homogenous population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Australasian Plant Pathology* 35: 401-409. <https://link.springer.com/article/10.1071/AP06041>
- Guo L, Han L, Yang L, Zeng H, Fan D, Zhu Y, Feng Y, Wang G, Peng C, Jiang X, Zhou D, Ni P, Liang C, Liu L, Wang J, Mao C, Fang X, Peng M and Huang J. 2014. Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing banana vascular wilt disease. *PLoS ONE* 9(4): e95543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095543>
- Houbin C, Chunxiang X, Qirui F, Guibing H, Jianguo L, Zehuai W and Molina AB Jr. 2004. Screening of banana clones for resistance to fusarium wilt in China. In: Molina AB, Xu LB, Roa VN, Van den Bergh I. and Borromeo KH (eds.). *Advancing banana and plantain R&D in Asia and the Pacific*, Vol.13. Proceedings of the 3rd BAPNET Steering Committee meeting held in Guangzhou, China, 23-26 November, 2004. 165-174 p.
- Howang SC and Ko WH. 2007. Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Disease* 88(6): 580-588. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.6.580>
- Huang BZ, Xu LB and Molina AB. 2005. Preliminary evaluation of IMTP-III varieties and local cultivars against *Fusarium* wilt disease in southern China. In: Molina AB, Xu LB, Roa VN, Van den Bergh I. and Borromeo KH (eds.). *Advancing banana and plantain R&D in Asia and the Pacific*, Vol.13. Proceedings of the 3rd BAPNET Steering Committee meeting held in Guangzhou, China, 23-26 November, 2004. 187-192 p.
- Li WM, Dita M, Wub W, Hua GB, Xie JH and Geb XJ. 2015. Resistance sources to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in banana wild relatives. *Plant Pathology* 64: 1061-1067. <https://doi.org/10.1111/ppa.12340>
- Lin YH and Lin YL. 2016. Recent developments in the molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Nature and Science* 2(10): e239. Disponible en línea: <http://www.jnsoci.org/files/article/2016/e239.pdf>



- Mahdavi F, Sariah M and Maziah M. 2012. Expression of rice thaumatin-like protein gene in transgenic banana plants enhances resistance to *Fusarium* wilt. *Applied Biochemistry Biotechnology* 166 (4): 1008-1019. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9489-3>
- Manzo G, Orozco M, Martínez L, Garrido E y Canto B. 2014. Enfermedades de importancia cuarentenaria y económica del cultivo de banano (*Musa* sp.) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32(2): 89-107. [https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3222014/AR/32-2\\_02.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3222014/AR/32-2_02.pdf)
- Martínez GE, Rey JC, Pargas RE y Manzanilla EE. 2020. Marchitez por *Fusarium* raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano. *Agronomía Mesoamericana* 31(1): 259-276. <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37925>
- Mohamed AA, Mak C, Liew KW and Ho YW. 2000. Early evaluation of banana plants at nursery stage for *Fusarium* wilt tolerance. In: Molina AB, Masdek NK and Liew KW (eds.). *Banana Fusarium wilt management: towards sustainable cultivation*, proc. int. workshop on the Banana *Fusarium* wilt disease, Genting Highlands Resort, Malaysia, 18-20 October 1999. 174-185 p.
- Mohandas S, Sowmya HD, Saxena AK, Meenakshia S, Thilaka RR and Mohmood Riaz. 2013. Transgenic banana cv. 'Rasthali' (AAB, Silk gp) harbouring Ace-AMP1 gene imparts enhanced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. *Scientia Horticulturae* 164: 392-399. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.018>
- Molina AB, Sinohin VG, Fabregar E, Ramillete EB, Loayan MM and Chao CP. 2016. Field resistance of Cavendish somaclonal variants and local banana cultivars to tropical race 4 of *Fusarium* wilt in the Philippines. *Acta Horticulturae* 1114: 227-230. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1114.31>
- Molina AB, Fabregar EG, Ramillete EG, Sinohin VO and Viljoen A. 2011. Field resistance of selected banana cultivars against tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Philippines. *Phytopathology* 101: S122-S122. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16107.23844>
- Molina AB, Fabregar EG, Soquita RO and Sinohin VGO. 2011. Comparison of host reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 and agronomic performance of somaclonal variant 'GCTCV-119' (AAA, Cavendish) and 'Grand Naine' (AAA, Cavendish) in commercial farms in the Philippines. *Acta Horticulturae* 897(897): 399-402. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.897.55
- Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press. University Park of London.
- Ortiz R and Swennen R. 2014. From crossbreeding to biotechnology-facilitated improvement of banana and plantain. *Biotechnology Advances* 32(1): 158-169. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.010>
- Paul JY, Becker DK, Dickman MB, Harding RM, Khanna HK and Dale JL. 2011. Apoptosis-related genes confer resistance to *Fusarium* wilt in transgenic 'Lady Finger' bananas. *Plant Biotechnology Journal* 9(9): 1141-1148. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00639.x>
- Ploetz RC. 2015. *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology* 105: 1512-1521. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>
- Ploetz RC. 2006. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 96(6): 653-656. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0653>
- Portal N, Soler A, Alphonsine PAM, Borrás-Hidalgo O, Portielles R, Peña-Rodríguez LM, Yanes E, Herrera L, Solano J, Ribadeneira C, Walton JD and Santos R. 2018. Nonespecific toxins as components of a host-specific culture filtrate from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. *Plant Pathology* 67(2): 467-476. <https://doi.org/10.1111/ppa.12736>
- SADER-SENASICA. 2019. Acuerda SENASICA y productores de plátano acciones conjuntas para prevenir entrada de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/articulos/acuerda-senasica-y-productores-de-platano-acciones-conjuntas-para-prevenir-entrada-de-fusarium-oxysporum-f-sp-cubense-raza-4-tropical-210454?idiom=es>.
- Saraswathi M, Kannan G, Uma S, Thangavelu R and Backiyarani S. 2016. Improvement of banana cv. Rasthali (Silk, AAB) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (VCG 0124/5) through induced mutagenesis: Determination of LD50 specific to mutagen, explants, toxins and *in vitro* and *in vivo* screening for *Fusarium* wilt resistance. *Indian Journal of Experimental Biology* 54: 345-353. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27319054/>
- Švábová L and Lebeda A. 2005. *In vitro* selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. *Journal of Phytopathology* 153(1): 52-64. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00928.x>
- Wu YL, Yi GJ and Peng XX. 2010. Rapid screening of *Musa* species for resistance to *Fusarium* wilt in an *in vitro* bioassay. *European Journal of Plant Pathology* 128(3): 409-415. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9669-y>
- Ying L and Yi L. 2016. Recent developments in the molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Nature and Science* 2(10): e239. <https://www.jnsoci.org/content/239>
- Zhuang J, Coates CJ, Mao Q, Wu Z, and Xie L. 2016. The antagonistic effect of Banana bunchy top virus multifunctional protein B4 against *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* (5): 669-679. <https://doi.org/10.1111/mpp.12319>
- Zisi X, Xin Z, Yeyuan C, Shirong L, Shouxing W. 2009. Assessment of banana germplasm for resistance to fusarium wilt. *Chinese Journal of Tropical Crops* 3: 362-364. [http://caod.oriprobe.com/articles/15644270/Assessment\\_of\\_Banana\\_Germplasm\\_for\\_Resistance\\_to\\_Fusarium\\_Wilt.htm](http://caod.oriprobe.com/articles/15644270/Assessment_of_Banana_Germplasm_for_Resistance_to_Fusarium_Wilt.htm)