

In vitro inhibition of bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2

Inhibición *in vitro* de bacterias contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2

José Guadalupe Florencio-Anastasio^{1,2}, *Alejandro Alarcón¹, Clemente de Jesús García-Ávila², Ronald Ferrera-Cerrato¹, Andrés Quezada-Salinas², Juan José Almaraz-Suárez¹, Mario Espinosa-Mendoza², Daniela Alejandra Bocanegra-Flores², Lervin Hernández-Ramos². ¹Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, 56230 Texcoco, Estado de México, México. ²Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Carretera Federal México-Pachuca km 37.5, 55740 Tecámac, Estado de México, México.

*Corresponding author: aalarconcp@gmail.com

Received: July 04, 2022.

Accepted: December 27, 2022.

Florencio-Anastasio JG, Alarcón A, García-Ávila CJ, Ferrera-Cerrato R, Quezada-Salinas A, Almaraz-Suárez JJ, Espinosa-Mendoza M, Bocanegra-Flores DA and Hernández-Ramos L. 2023. *In vitro* inhibition of bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2. Mexican Journal of Phytopathology 41(1).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2207-2>

First DOI publication: December 29, 2022.

Primera publicación DOI: 29 de Diciembre, 2022.

Abstract. There are three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) that affect bananas and plantains, though the Cavendish group banana cultivars are resistant to Foc race 1 (FocR1) and Foc race 2 (FocR2). However, there are no effective control methods for the Tropical Race 4 (R4T). The foregoing makes it necessary to generate biological control strategies for FocR2 fungal

Resumen. Existen tres razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) que afectan a bananos y plátanos, los cultivares de banano grupo Cavendish son resistentes a Foc raza 1 (FocR1) y Foc raza 2 (FocR2). Sin embargo, no existen métodos de control efectivos para la Raza 4 Tropical (R4T). Lo anterior, hace necesario generar estrategias de control biológico utilizando a FocR2 como modelo fúngico que está presente en México, y que coadyuven ante la posible introducción de FocR4T al país. Se evaluó la inhibición *in vitro* de las cepas bacterianas *Bacillus subtilis* (BASU), *B. velezensis* (BAVE), *B. sonorensis* (BASO) contra tres aislamientos de FocR2 (MIC17188, MIC17191 y MIC17192) obtenidos de muestras vegetales colectadas en tres sitios de producción de plátano de Puebla, Michoacán y Oaxaca. A los 14 días, la cepa BASU tuvo en promedio, mayor inhibición (55.1%) con respecto a BAVE y BASO (45.8 y 21.7%, respectivamente) contra las tres cepas fúngicas antes mencionadas.

model that is present in Mexico, forecasting the potential introduction of FocR4T into our country. *In vitro* inhibition was evaluated of bacterial strains *Bacillus subtilis* (BASU), *B. velezensis* (BAVE), and *B. sonorensis* (BASO) against three isolates of FocR2 (MIC17188, MIC17191 and MIC17192), obtained from plant samples collected in three banana production sites in the states of Puebla, Michoacán and Oaxaca. At 14 days, the strain BASU had in average high inhibition (55.1%) in comparison to BAVE and BASO strains (45.8 and 21.7%, respectively) against the three fungal strains mentioned before. In addition, the *in vitro* inhibition of *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) and *Serratia* sp. (AC35) was also evaluated by considering three pre-inoculation timings; the strain BSP1.1 showed high inhibition (80.1%) when pre-inoculated individually seven days before the fungus and at seven days of confrontation.

Key words: *Fusarium* wilt, *Paenibacillus* sp., *Serratia* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus sonorensis*.

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (Foc), causal agent of *Fusarium* wilt or musaceae *Fusarium* wilt, was reported for the first time in Australia, in 1874, and later in 1890, it was reported in Panama and Costa Rica (America); therefore, it is assumed that this pathogen spread from these two countries to the rest of this continent (Ashby, 1913; Fish, 1970). There are three races of this pathogen that affect plantains and bananas: i) Race 1 (FocR1), affects *Musa textilis* (abacá), bananas from the Gros Michel clones (AAA), Maqueño (AAB), Silk (AAB), Pome (AAB), Pisang Awak (ABB) and IC2 (AAAA); ii) Race 2 (FocR2), affects bananas from Bluggoe clones (ABB) and other AAAA genome hybrids; and iii) Tropical Race 4 (FocR4T) is an aggressive

También se evaluó la inhibición *in vitro* de las bacterias *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) y *Serratia* sp. (AC35) en tres tiempos de pre-inoculación bacteriana. La cepa BSP1.1 presentó mayor inhibición (80.1%) cuando se pre-inoculó de manera individual, siete días antes del hongo y durante siete días de confrontación.

Palabras clave: Marchitez por *Fusarium*, *Paenibacillus* sp., *Serratia* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus sonorensis*.

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (Foc), agente causal de la marchitez por *Fusarium* o Fusario-sis de las musáceas, se reportó por primera vez en Australia, en 1874, y posteriormente, en 1890 se reportó en Panamá y Costa Rica (América); por lo que, se asume que este patógeno se dispersó desde estos dos países al resto de este continente (Ashby, 1913; Fish, 1970). Existen tres razas de este patógeno que afectan plátanos y bananos: i) Raza 1 (FocR1), afecta a *Musa textilis* (abacá), bananos de los clones Gros Michel (AAA), Maqueño (AAB), Silk (AAB), Pome (AAB), Pisang Awak (ABB) e IC2 (AAAA); ii) Raza 2 (FocR2), afecta bananos de clones Bluggoe (ABB) y otros híbridos del genoma AAAA; y iii) la Raza 4 Tropical (FocR4T), es un patógeno agresivo en los cultivares Cavendish (AAA), como Dwarf Cavendish, Grand Nain y Williams, así como en los demás cultivares susceptibles a FocR1 y FocR2 (Su *et al.*, 1986; Ploetz, 2005). En México, esta enfermedad se reportó por primera vez en 1932 (Ploetz, 2018); así mismo, Florencio-Anastasio *et al.* (2022) determinaron mediante un análisis filogenético que cuatro aislamientos de Foc obtenidos de muestras de los estados de Puebla y Michoacán se agruparon dentro del Clado VI de la clasificación propuesta por Fourie *et al.* (2009) y Karangwa *et al.* (2018). FocR1 ha pro-

pathogen in Cavendish cultivars (AAA), such as Dwarf Cavendish, Grand Nain and Williams, as well as in other cultivars susceptible to FocR1 and FocR2 (Su *et al.*, 1986; Ploetz, 2005). In Mexico this disease was reported for the first time in 1932 (Ploetz, 2018); Likewise, Florencio-Anastasio *et al.* (2022) determined through a phylogenetic analysis that four Foc isolates obtained from samples from the states of Puebla and Michoacan were grouped within Clade VI of the classification proposed by Fourie *et al.* (2009) and Karangwa *et al.* (2018). FocR1 has caused severe epidemics that impacted the banana industry in America, whose production was based on the Gros Michel variety, which caused the disappearance of most of the commercial plantations of this variety between 1950 and 1960, causing economic losses of up to \$2.3 billion dollars (Dita *et al.*, 2013). In the Ulua Valley (Honduras) 30,000 ha were lost from 1940 to 1960; while in Suriname and Quepos (Costa Rica) 4,000 and 6,000 ha were damaged in a period of eight and 12 years, respectively (Ploetz, 2000).

In Mexico, during the 1960s and early 1970s, close to 40,000 ha cultivated with the Gros Michel variety were destroyed; Only in 1994 there were around 4,000 ha of Manzano plantains, which were reduced to 1,260 ha, in 2004 (Orozco-Santos, 2013) and for the 2020 cycle, 1,690 ha had been established (SIAP, 2022). To counteract the economic losses caused by FocR1, the global solution consisted of replacing those plantations established with Gros Michel by cultivars of the Cavendish subgroup, which represent more than 99 % of export bananas (Dita *et al.*, 2018). On the other hand, FocR4T was first reported in Taiwan in 1989 (Ploetz, 2018), by 2022 its distribution includes Australia, Burma, China, Colombia, the Philippines, India, Indonesia, Mayotte Islands (France), Israel, Jordan, Laos, Lebanon, Malaysia, Mozambique, Oman, Pakistan, Peru, United

vocado severas epidemias que impactaron en la industria bananera en América, cuya producción fue basada en la variedad Gros Michel, lo que provocó la desaparición de la mayoría de las plantaciones comerciales de esta variedad en el período de entre 1950 a 1960, provocando pérdidas económicas de hasta \$2.3 mil millones de dólares (Dita *et al.*, 2013). En el Valle de Ulúa (Honduras) se perdieron 30,000 ha en el período de 1940 a 1960; mientras que en Surinam y Quepos (Costa Rica) se dañaron de 4,000 y 6,000 ha en un período de ocho y 12 años, respectivamente (Ploetz, 2000).

En México, durante la década de 1960 y principios de 1970, cerca de 40,000 ha cultivadas con la variedad Gros Michel fueron arrasadas; tan solo en 1994 había alrededor de 4,000 ha de plátano Manzano, las cuales se redujeron a 1,260 ha, en 2004 (Orozco-Santos, 2013) y para el ciclo 2020 se tenían establecidas 1,690 ha (SIAP, 2022). Para contrarrestar las pérdidas económicas provocadas por FocR1, la solución a nivel mundial consistió en reemplazar aquellas plantaciones establecidas con Gros Michel por cultivares del subgrupo Cavendish, que representan más del 99 % del banano de exportación (Dita *et al.*, 2018). Por otra parte, se reportó por primera vez a FocR4T en Taiwán en 1989 (Ploetz, 2018), para 2022 su distribución comprende Australia, Birmania, China, Colombia, Filipinas, India, Indonesia, Islas Mayotte (Francia), Israel, Jordania, Laos, Líbano, Malasia, Mozambique, Omán, Pakistán, Perú, Reino Unido, Tailandia, Taiwán, Turquía y Vietnam (Ploetz *et al.*, 2018; Promusa, 2018; DOA, 2019; ICA, 2019; Aguayo *et al.*, 2021; García-Bastidas *et al.*, 2020; Özarslan dan y Akgül, 2020; SENASA, 2021).

La presencia de este patógeno en dos países de América (Colombia y Perú), incrementa el riesgo de su introducción a México (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022). Aun cuando los bananos del grupo Cavendish son resistentes a las razas 1 y 2 (Su *et al.*,

Kingdom, Thailand, Taiwan, Turkey, and Vietnam (Ploetz *et al.*, 2018; Promusa, 2018; DOA, 2019; ICA, 2019; Aguayo *et al.*, 2021; García-Bastidas *et al.*, 2020; Özarslandan and Akgül, 2020; SENASA, 2021).

The presence of this pathogen in two countries of America (Colombia and Peru) increases the risk of its introduction to Mexico (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022). Although Cavendish group bananas are resistant to races 1 and 2 (Su *et al.*, 1986), there are no resistant banana or plantain cultivars or chemicals effective against FocR4T (Cook, 2005). Likewise, some biological control schemes based on the use of antagonistic bacteria and fungi against Foc breeds have been proposed (Bubici *et al.*, 2019); for example, the bacterium *Burkholderia cenocepacia* 869T2 presented 44.4% inhibition *in vitro*, and reduced the incidence of FocR4T in Cavendish bananas by 86.1% in the field (Ho *et al.*, 2015). *Pseudomonas fluorescens* and *P. fluorescens* WCS417 also reduced (83.4 and 87.4%, respectively) the severity of FocR4T in Cavendish bananas in greenhouse. The use of biofertilizers based on pig manure in combination with *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 reduced the incidence of FocR4T in greenhouse Cavendish bananas by 75% (Shen *et al.*, 2015), while the same bacterium decreased the incidence of FocR4T by 68.5% in the field (Xue *et al.*, 2015). On the other hand, *B. amyloliquefaciens* W19 reduced the incidence of Foc by 42.8 and 44.4% in two Cavendish banana fields (Wang *et al.*, 2016); In addition, *B. subtilis* N11 reduced the incidence of FocR4T by 82.1%, while the combination of *Paenibacillus polymyxa* SQR21 + *Trichoderma harzianum* T37 reduced the incidence of FocR4T by 64.3% in Cavendish banana (Zhang *et al.*, 2011). The bacterium *Paenibacillus* sp. BSP.1.1, *Serratia* sp. AC35, *Pseudomonas tolaasii* P61, *Bacillus pumilus* BFIEST 4C, *B. pumilus* R44, *B. pumilus* A1, and *Serratia liquefaciens* CPA C53 inhibited mycelial growth *in vitro* of five Foc Race

1986), no existen cultivares de banano o plátano resistentes o productos químicos efectivos contra FocR4T (Cook, 2005). Así mismo, se han propuesto algunos esquemas de control biológico basados en el uso de bacterias y hongos antagonistas contra las razas de Foc (Bubici *et al.*, 2019); por ejemplo, la bacteria *Burkholderia cenocepacia* 869T2 presentó 44.4% de inhibición *in vitro*, y redujo en 86.1% la incidencia de FocR4T en banano Cavendish en campo (Ho *et al.*, 2015). También *Pseudomonas fluorescens* y *P. fluorescens* WCS417 redujeron (83.4 y 87.4%, respectivamente) la severidad de FocR4T en banano Cavendish en invernadero. El uso de biofertilizantes basados en abono de cerdo en combinación con *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 redujo 75% la incidencia de FocR4T en banano Cavendish en invernadero (Shen *et al.*, 2015), mientras que la misma bacteria disminuyó 68.5 % la incidencia de FocR4T en campo (Xue *et al.*, 2015). Por otra parte, *B. amyloliquefaciens* W19 redujo 42.8 y 44.4% la incidencia de Foc en dos campos de banano Cavendish (Wang *et al.*, 2016); además, *B. subtilis* N11 redujo 82.1% la incidencia de FocR4T, mientras que la combinación de *Paenibacillus polymyxa* SQR21 + *Trichoderma harzianum* T37 redujo 64.3% la incidencia de FocR4T, en banana Cavendish (Zhang *et al.*, 2011). Las bacterias *Paenibacillus* sp. BSP.1.1, *Serratia* sp. AC35, *Pseudomonas tolaasii* P61, *Bacillus pumilus* BFIEST 4C, *B. pumilus* R44, *B. pumilus* A1, y *Serratia liquefaciens* CPA C53 inhibieron el crecimiento micelial *in vitro* de cinco aislamientos de Foc Raza “1 o 2” en 46.6, 26.6, 12.0, 11.9, 10.1, 9.7 y 4.9%, respectivamente (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022). Por lo anterior, la presente investigación evaluó el efecto *in vitro* de cinco bacterias antagonistas sobre el desarrollo micelial de FocR2, como hongo fitopatógeno modelo, dada su presencia en el país, para valorar su aplicación potencial en futuros esquemas de manejo fitosanitario, ante una eventual introducción de FocR4T a nuestro país.

“1 or 2” isolates at 46.6, 26.6, 12.0, 11.9, 10.1, 9.7 and 4.9%, respectively (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022).

Therefore, the present investigation evaluated the *in vitro* effect of five antagonistic bacteria on the mycelial development of FocR2, as a model phytopathogenic fungus, given its presence in the country, to assess its potential application in future phytosanitary management schemes, in the event of a possible introduction of FocR4T to our country.

Phylogenetic analysis. To determine the race to which the isolates evaluated in the present study belong (Table 1), the same methodology reported by Florencio-Anastasio *et al.* (2022), phylogenetic analysis of the IGS (Intergenic spacers) region of the rDNA amplified with the primers PNFo and PN22 (Edel *et al.*, 1995) was performed.

FocR2 isolates. The fungi isolates were donated by Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Which were isolated from banana plantations in Hueytamalco, Puebla (MIC17188; MIC17189; MIC17190), Tacámbaro, Michoacán (MIC17191) and Villa de Tututepec de Melchor Ocampo, Oaxaca (MIC17192), from samples of individual plants

Análisis filogenético. Con la finalidad de determinar la raza a la cual pertenecen los aislamientos evaluados en el presente estudio (Cuadro 1), se siguió la misma metodología reportada por Florencio-Anastasio *et al.* (2022), se realizó el análisis filogenético de la región IGS (Intergenic spacers) del rDNA amplificada con los iniciadores PNFo y PN22 (Edel *et al.*, 1995).

Aislamientos FocR2. Los aislamientos del hongo fueron donados por el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Los cuales fueron aislados de plantaciones bananeras de Hueytamalco, Puebla (MIC17188; MIC17189; MIC17190), Tacámbaro, Michoacán (MIC17191) y Villa de Tututepec de Melchor Ocampo, Oaxaca (MIC17192), a partir de muestras de plantas individuales colectadas por el Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (PVEF) para la vigilancia y detección oportuna de FocR4T. Las muestras colectadas consistieron en fragmentos de 5 x 1.5 cm de haces vasculares de plantas plátano con síntomas de amarillamiento.

Cepas bacterianas evaluadas. Para el bioensayo 1, se utilizaron las cepas bacterianas *Bacillus sub-*

Table 1. Origin of the isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2, deposited in the collection of Laboratorio de Micología, del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-Senasica) (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022).

Cuadro 1. Origen de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2, depositadas en la colección del Laboratorio de Micología, del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-Senasica) (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022).

Aislamientos	Municipio / Estado	Latitud	Longitud	No. de accesión
CNRF-MIC17188	Hueytamalco, Puebla	20.00857	-97.24197	MN702818
CNRF-MIC17189	Hueytamalco, Puebla	20.00882	-97.2419	MN702819
CNRF-MIC17190	Hueytamalco, Puebla	20.00928	-97.24209	MN702820
CNRF-MIC17191	Tacámbaro, Michoacán	19.21827	-101.45857	MN702821
CNRF-MIC17192	Villa de Tututepec de Melchor Ocampo, Oaxaca	16.04554	-97.70423	

collected by the National Program Phytosanitary Epidemiological Surveillance (PVEF) for surveillance and timely detection of FocR4T. The collected samples consisted of 5 x 1.5 cm fragments of vascular bundles from banana plants with yellowing symptoms.

Evaluated bacterial strains. For bioassay 1, the bacterial strains *Bacillus subtilis* (BASU), *B. sonorensis* (BASO), *B. velezensis* (BAVE) were used, which were provided by Laboratorio de bacterias, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del SENASICA (Table 2) to evaluate its effect on the mycelial growth of three FocR2 isolates (MIC17188, MIC17191 and MIC17192) (Table 1). On the other hand, in bioassay 2, the bacterial strains *Paenibacillus* sp. BSP 1.1 and *Serratia* sp. AC 35, which were provided by Laboratorio de Microbiología, Postgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, to determine their influence on the mycelial growth of the FocR2 strain CNRF-MIC17188 (accession number MN702818).

Bioassay 1. *In vitro* inhibition of bacteria against three isolates of FocR2. For this bioassay, the antagonistic effect of the bacterial strains: BASU, BASO, BAZE (Table 1) on the mycelial growth of the isolates MIC17188, MIC17191 and MIC17192 (Table 2) was evaluated using the technique

tilis (BASU), *B. sonorensis* (BASO), *B. velezensis* (BAVE), las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de bacterias, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del SENASICA (Cuadro 2) para evaluar su efecto en el crecimiento micelial de tres aislamientos de FocR2 (MIC17188, MIC17191 y MIC17192) (Cuadro 1). Por otra parte, en el bioensayo 2, se utilizaron las cepas bacterianas *Paenibacillus* sp. BSP 1.1 y *Serratia* sp. AC 35, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología, Postgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, para determinar su influencia en el crecimiento micelial de la cepa FocR2 CNRF-MIC17188 (número de acceso MN702818).

Bioensayo 1. Inhibición *in vitro* de bacterias contra tres aislamientos de FocR2. Para este bioensayo se evaluó el efecto antagonista de las cepas bacterianas: BASU, BASO, BAZE (Cuadro 1), sobre el crecimiento micelial de los aislamientos MIC17188, MIC17191 y MIC17192 (Cuadro 2) utilizando la técnica propuesta por (Pineda-Mendoza *et al.*, 2019). Las bacterias se reactivaron en agar nutritivo (Merck®) Se establecieron cuatro tratamientos (tres bacterias más el testigo) con cuatro repeticiones cada uno. En los extremos de las cajas de Petri con medio PDA (Potato Dextrose Agar, Merck®), se colocó una asada (línea de 5 cm) de las cepas bacterianas de siete días de crecimiento.

Table 2. Origin of the antagonistic bacteria evaluated against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2.

Cuadro 2. Origen de las bacterias antagonistas evaluadas contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2.

Bacteria	Clave asignada	Origen de las bacterias
<i>Bacillus subtilis</i>	BASU	SENASICA
<i>Bacillus sonorensis</i>	BASO	SENASICA
<i>Bacillus velezensis</i>	BAVE	SENASICA
<i>Paenibacillus</i> sp.	BSP 1.1	COLPOS
<i>Serratia</i> sp.	AC 35	COLPOS

proposed by (Pineda-Mendoza *et al.*, 2019). The bacteria were reactivated in nutrient agar (Merck®). Four treatments were established (three bacteria plus the control) with four repetitions each. At the ends of the Petri dishes with PDA medium (Potato Dextrose Agar, Merck®), a streak (5 cm line) of the seven-day-old bacterial strains was placed. The Petri dishes were incubated in the dark at 28 ± 2 °C for 24 h; Subsequently, 7 mm diameter agar disks of each FocR2 isolate were placed, which were removed from the margins of the seven-day-old fungal cultures and placed on the opposite side of each Petri dish, 5 cm from each other. distance from bacterial growth. The control consisted of only placing fungal growth disks in PDA culture medium. The dishes were incubated again in dark at 28 ± 2 °C; at 3, 7, 10 and 14 days after sowing, the radius of mycelial growth of each fungal isolate was measured, four measurements of fungal growth were taken with a vernier, to calculate the percentage of inhibition by utilizing the reported formula was used by Landa *et al.* (1997):

$$\text{Percentage of inhibition} = \frac{R - r}{R} \times 100$$

Where, r is the growth radius of the fungus in the presence of the bacteria and R is the growth radius of the fungus without the bacteria (control).

Bioassay 2. *In vitro* inhibition of *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) and *Serratia* sp. against the FocR2 isolate MIC17188 at three pre-inoculation times. In this bioassay, the inhibitory effect *in vitro* of the bacterial strains *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) and *Serratia* sp. (AC 35) together and separately (Table 1) against the FocR2 isolate MIC17188 (Table 2) was evaluated, in previous studies, this isolate presented a higher *in vitro* growth rate (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022), three different

Las cajas fueron incubadas en oscuridad a 28 ± 2 °C por 24 h; posteriormente, se colocaron discos de agar de 7 mm de diámetro de cada aislamiento de FocR2, los cuales fueron removidos de los márgenes de los cultivos fúngicos de siete días de crecimiento, y se colocaron en el lado opuesto de cada caja, a 5 cm de distancia del crecimiento bacteriano. El testigo consistió en solo colocar discos del crecimiento fúngico en medio de cultivo PDA. Las cajas se incubaron nuevamente en oscuridad a 28 ± 2 °C; a los 3, 7, 10 y 14 días después de la siembra, se midió el radio de crecimiento micelial de cada aislamiento fúngico, se tomaron cuatro mediciones del crecimiento fúngico con un vernier, para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la formula reportada por Landa *et al.* (1997):

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{R - r}{R} \times 100$$

Dónde, r es el radio de crecimiento del hongo en presencia de la bacteria y R es el radio de crecimiento del hongo sin la bacteria (testigo).

Bioensayo 2. Inhibición *in vitro* de *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) y *Serratia* sp. contra el aislamiento MIC17188 de FocR2 en tres tiempos de pre-inoculación. En este bioensayo se evaluó el efecto inhibitorio *in vitro* de las cepas bacterianas *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) y *Serratia* sp. (AC 35) juntas y separadas (Cuadro 1) contra el aislamiento MIC17188 de FocR2 (Cuadro 2), en estudios previos, dicho aislamiento presentó mayor ritmo de crecimiento *in vitro* (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022), se evaluaron tres diferentes tiempos de pre-inoculación a 2, 4 y 7 días de pre-inoculación (DPI) en el medio de cultivo (pre-inoculación se refiere a la siembra de las bacterias en la caja de Petri previo a la siembra de los aislamientos del hongo, con la finalidad de que las bacterias produzcan y secreten

pre-inoculation times at 2, 4 and 7 days of pre-inoculation (DPI) in the culture medium (pre-inoculation means to the seeding of the bacteria in the Petri dish prior to seeding the isolates of the fungus, in order to allow the bacteria to produce and secrete antifungal metabolites). The same inoculation procedure described in Bioassay 1 was used. A 7 mm disk of the fungus was placed in the center of the Petri dish and 5-cm streak of the bacterial strains were placed at opposite ends, in such a way that the bacterial growth was initially separated 3 cm from the fungus and 6 cm from each other. Four replicates were established for each treatment, including the control which consisted of a 7 mm disk of the fungus, and the Petri dishes were incubated again in the dark at 28 ± 2 °C. The radius of mycelial growth of the isolation of the fungus was measured at 2, 4, 6 and 7 days.

Experimental design and statistical analysis. For each trial, a completely randomized experimental design was established and they were performed separately, to avoid possible cross effects due to volatile compounds produced by antagonistic bacteria. The inhibition data were analyzed with the statistical package SAS for Windows (SAS Institute Inc, 2002), performing an analysis of variance and Tukey's mean comparison test ($\alpha \leq 0.05$).

Phylogenetic analysis. BLAST analysis of the consensus sequences of the isolates MIC17188, MIC17189, MIC17190 (Hueytamalco, Puebla) and MIC17191 (Tacámbaro, Michoacán) confirmed the identity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2 with 100 % cover and grouped with the race within Clade VI proposed by Fourie *et al.* (2009) and Karangwa *et al.* (2018) (Figure 1).

Bioassay 1. *In vitro* inhibition of bacteria against three isolates of Foc R2. The BASU bacterial

metabolites antifúngicos). Se utilizó el mismo procedimiento de inoculación descrito en el Bioensayo 1. Se colocó un disco de 7 mm del hongo en el centro de la caja de Petri y se colocaron asadas de 5 cm de las cepas bacterianas en extremos opuestos, de tal manera que el crecimiento bacteriano quedó separado inicialmente a 3 cm del hongo y a 6 cm entre sí. Se establecieron cuatro repeticiones por cada tratamiento, incluyendo el testigo el cual consistió de disco de 7 mm del hongo, y las cajas de Petri se incubaron nuevamente en oscuridad a 28 ± 2 °C. Se midió el radio de crecimiento micelial del aislamiento del hongo a los 2, 4, 6 y 7 días.

Diseño experimental y análisis estadístico. Para cada ensayo se estableció un diseño experimental completamente al azar y se realizaron por separado, para evitar posibles efectos cruzados por compuestos volátiles producidos por bacterias antagonistas. Los datos de inhibición se analizaron con el paquete estadístico SAS para Windows (SAS Institute Inc, 2002), realizando un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

Análisis filogenético. El análisis BLAST de las secuencias consenso de los aislamientos MIC17188, MIC17189, MIC17190 (Hueytamalco, Puebla) y MIC17191 (Tacámbaro, Michoacán) permitió confirmar la identidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2 con 100 % de cobertura y agrupadas con la raza dentro del Clado VI propuesto por Fourie *et al.* (2009) y Karangwa *et al.* (2018) (Figura 1).

Bioensayo 1. Inhibición *in vitro* de bacterias contra tres aislamientos de Foc R2. La cepa bacteriana BASU fue la que provocó la inhibición mayor del desarrollo micelial de los tres aislamientos de FocR2, con un 55.1% en promedio, a los 14 días de la confrontación. Por su parte, las cepas BAVE y

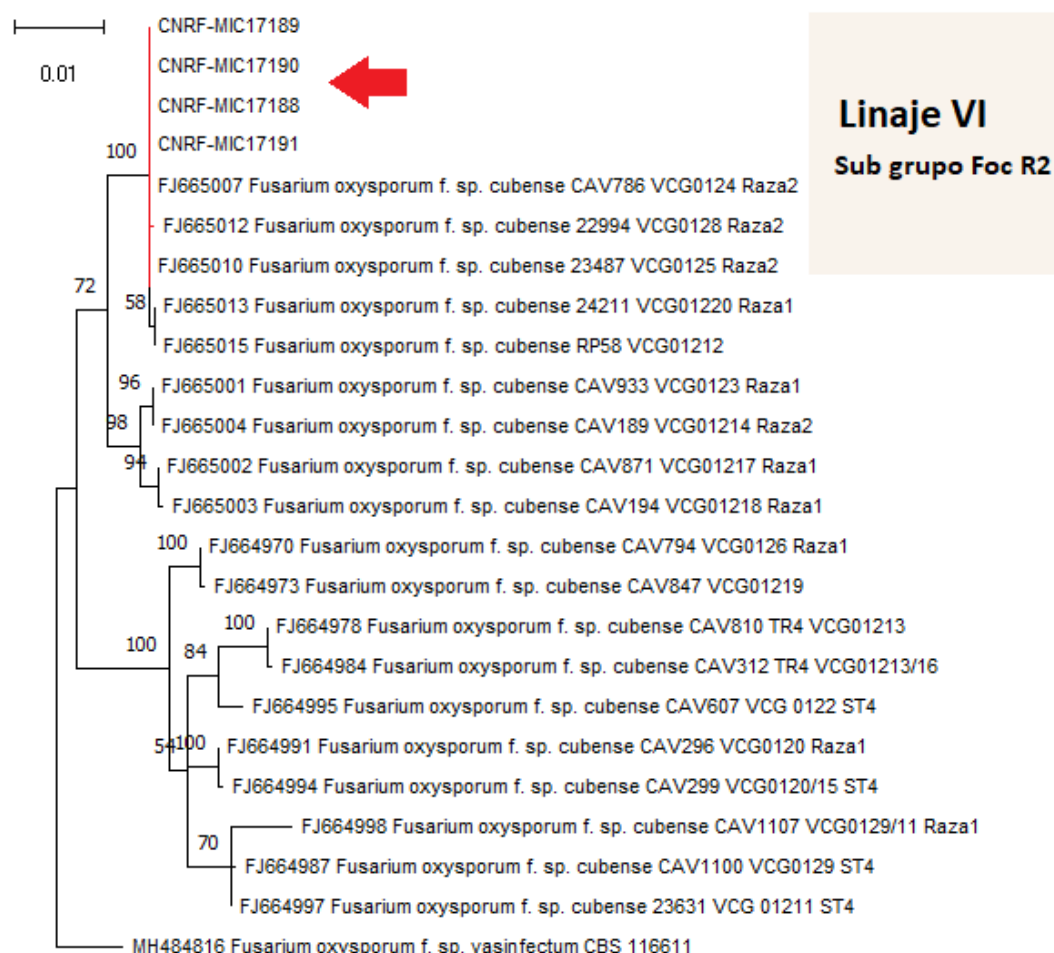


Figure 1. Phylogenetic analysis of four isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (MIC17188, MIC17189, MIC17190, MIC17191) from Puebla and Michoacan, Mexico.

Figura 1. Análisis filogenético de cuatro aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (MIC17188, MIC17189, MIC17190, MIC17191) de Puebla y Michoacán, México.

strain was the one that caused the greatest inhibition of mycelial development of the three FocR2 isolates, with an average of 55.1%, 14 days after the confrontation. On the other hand, the BAVE and BASO strains showed an average inhibition percentage of 45.8 and 21.7%, respectively (Table 3; Figures 2 and 3).

Bioassay 2. *In vitro* inhibition of *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) and *Serratia* sp. against the FocR2

BASO mostraron un porcentaje de inhibición promedio de 45.8 y 21.7%, respectivamente (Cuadro 3; Figuras 2 y 3).

Bioensayo 2. Inhibición *in vitro* de *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) y *Serratia* sp. contra el aislamiento MIC17188 de FocR2 en tres tiempos de pre-inoculación. A los 7 días de evaluación, la cepa bacteriana *Paenibacillus* sp. BSP 1.1, por sí sola tuvo el mayor efecto inhibitorio en el crecimiento

Table 3. Comparative fungal inhibitions (average of the three strain isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2) obtained from fungal confrontations with three bacteria, 14 days after evaluation.

Cuadro 3. Inhibiciones fúngicas comparativas (promedio de los tres aislamientos cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2) obtenidas de confrontaciones fúngicas con tres bacterias, a los 14 días de evaluación.

Bioensayo 1	Inhibición fúngica ^z (%)
<i>Bacillus subtilis</i> (BASU)	55.1 a
<i>Bacillus velezensis</i> (BAVE)	45.8 b
<i>Bacillus sonorensis</i> (BASO)	21.7 c

^zValues estimated from the control fungal growth data for the corresponding bioassay. Identical letters are not significantly different (Tukey, $\alpha \leq 0.05$), n=4. / ^zValores estimados a partir de los datos de crecimiento fúngico del testigo para el bioensayo correspondiente. Las letras idénticas no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0.05$), n=4.

isolate MIC17188 at three pre-inoculation times. After 7 days of evaluation, the bacterial strain *Paenibacillus* sp. BSP 1.1, by itself, had the greatest inhibitory effect on the mycelial growth of the MIC17188 isolate at 4 and 7 DPI of 75.9 and 80.1%, respectively, followed by the combination of *Paenibacillus* sp. BSP 1.1 + *Serratia* sp. AC35 whose inhibition was 52.7 and 75.5%, respectively; While the bacterial strain *Serratia* sp. AC35 presented inhibition values of 46.8 and 52.3% on the same pre-inoculation dates (Table 4; Figure 4).

The *in vitro* inhibition capacity of the BASU, BAVE and BASO bacterial strains considered in this work had not been previously determined against any pathogen; these strains inhibited the mycelial growth of three FocR2 strains, by 40.87% in average, being BASU (55.1%) and BAVE (45.8%) the most effective, while BASO showed the least effectiveness (21.7%). There are reports indicating that several bacterial strains of *B. subtilis* exert *in vitro* inhibition towards *F. oxysporum* and at the same time reduce the incidence of FocR1 when inoculated into vitroplants of banana variety red banana (AAA) under greenhouse conditions

micelial del aislamiento MIC17188 a los 4 y 7 DPI de 75.9 y 80.1%, respectivamente, seguido de la combinación de *Paenibacillus* sp. BSP 1.1 + *Serratia* sp. AC35 cuya inhibición fue de 52.7 y 75.5%, respectivamente; Mientras que la cepa bacteriana *Serratia* sp. AC35 presentó valores de inhibición del 46.8 y 52.3% en las mismas fechas de pre-inoculación (Cuadro 4; Figura 4).

La capacidad de inhibición *in vitro* de las cepas bacterianas BASU, BAVE y BASO consideradas en este trabajo, no se había determinado previamente contra ningún patógeno; estas cepas inhibieron el crecimiento micelial de tres cepas de FocR2, en 40.87% en promedio, siendo las más efectivas BASU (55.1%) y BAVE (45.8%), en tanto que BASO mostró la menor efectividad (21.7%). Existen reportes donde indican que varias cepas bacterianas de *B. subtilis* ejercen inhibición *in vitro* hacia *F. oxysporum* y a la vez reducen la incidencia de FocR1 cuando se inoculan en vitroplantas de banana variedad Red banana (AAA) en condiciones de invernadero ya sea solas o en combinación con *Pseudomonas fluorescens* Pfl (Rubio-Tinajero *et al.*, 2021; Kavino y Manoranjitham, 2018). De

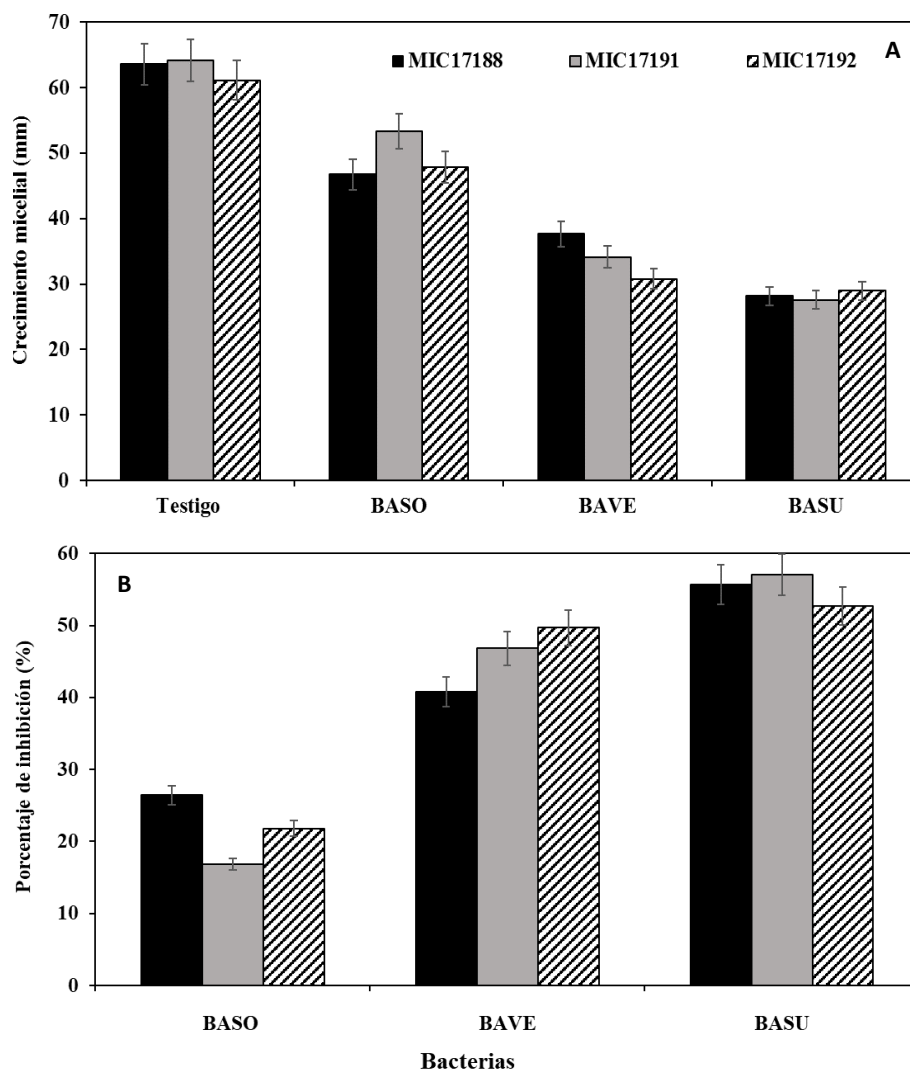


Figure 2. *In vitro* inhibition of *Bacillus subtilis* (BASU), *B. sonorensis* (BASO), and *B. velezensis* (BAVE) against the isolates MIC17188, MIC17191, and MIC17192 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2, after 14 days of evaluation. A) Mycelial growth, and B) Percentage of inhibition. Means±Standard error. n=4.

Figura 2. Inhibición *in vitro* de *Bacillus subtilis* (BASU), *B. sonorensis* (BASO), y *B. velezensis* (BAVE) contra los aislamientos MIC17188, MIC17191 y MIC17192 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2, a los 14 días de evaluación. A) Crecimiento micelial, y B) Porcentaje de inhibición. Medias±Error estándar. n=4.

either alone or in combination with *Pseudomonas fluorescens* Pfl (Rubio-Tinajero *et al.*, 2021; Kavino and Manoranjitham, 2018). Similarly, the effectiveness of *B. subtilis* has been evaluated in *in vivo* trials, based on its ability to reduce the incidence of *F. oxysporum* in *Dioscorea villosa* tubers (Khan *et al.*, 2017). Some species of *B.*

igual forma, la efectividad de *B. subtilis* se ha evaluado en ensayos *in vivo*, con base en su capacidad de reducir la incidencia de *F. oxysporum* en tubérculos de *Dioscorea villosa* (Khan *et al.*, 2017). En particular algunas especies de *B. velezensis* han mostrado cierta efectividad en la reducción de la incidencia de *F. oxysporum* en plántulas de banano,

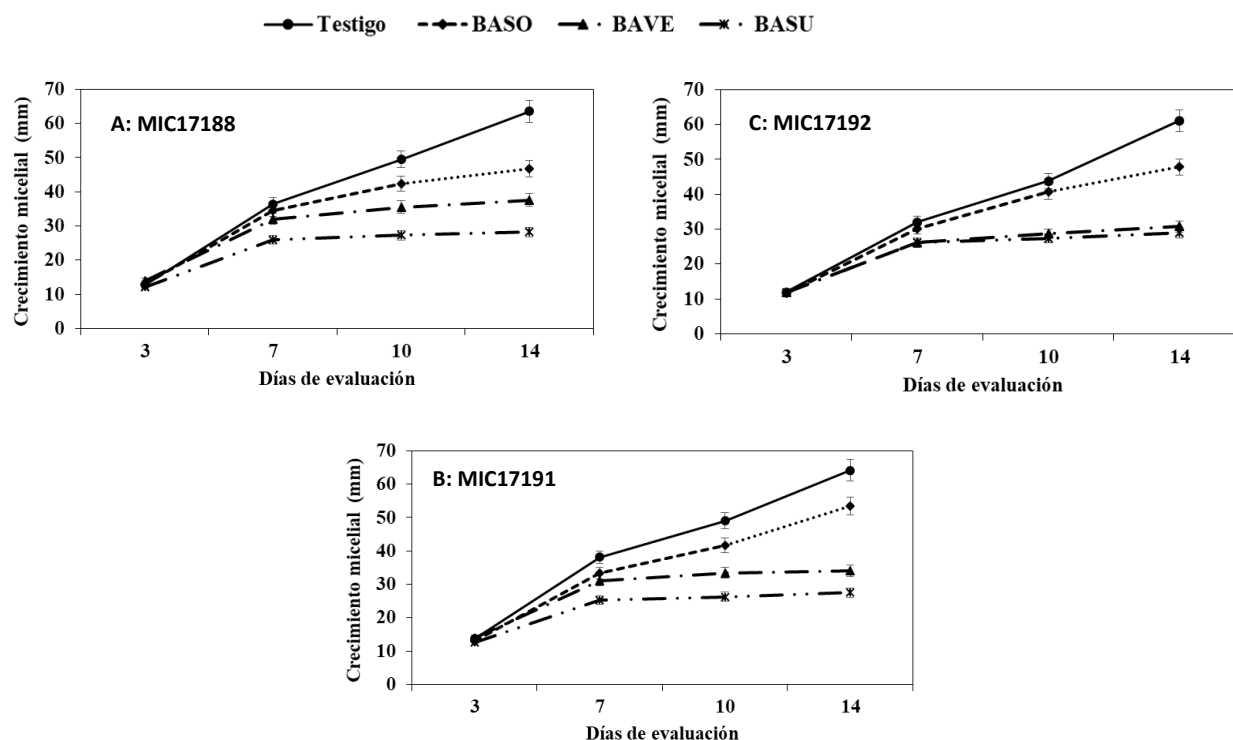


Figure 3. *In vitro* mycelial growth of the isolates MIC17188, MIC17191 and MIC17192, of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2 in the presence of *Bacillus subtilis* (BASU), *B. sonorensis* (BASO) and *B. velezensis* (BAVE) bacteria, at 3, 7, 10 and 14 days of evaluation. Means $\pm$ Standard error. n=4.

Figura 3. Crecimiento micelial *in vitro* de los aislamientos MIC17188, MIC17191 y MIC17192, de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2 en presencia de las bacterias *Bacillus subtilis* (BASU), *B. sonorensis* (BASO) y *B. velezensis* (BAVE), a los 3, 7, 10 y 14 días de evaluación. Medias $\pm$ Error estándar. n=4.

Table 4. Inhibitory effect of *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1), *Serratia* sp. (AC 35) and its combination, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2 (MIC17188), with seven days of bacterial pre-inoculation and seven days of confrontation.

Cuadro 4. Efecto inhibitorio de *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1), *Serratia* sp. (AC 35) y su combinación, contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2 (MIC17188), con siete días de pre-inoculación bacteriana y siete días de confrontación.

Tratamiento	Inhibición fúngica (%)*
BSP 1.1	80.15 a
BSP 1.1 + AC 35	75.51 b
AC 35	52.31 c

*Estimated value from the fungal growth of the control of the corresponding bioassay. Identical letters in the column are not significantly different (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). n=3. / *Valor estimado a partir del crecimiento fúngico del testigo del bioensayo correspondiente. Letras idénticas en la columna no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). n=3.

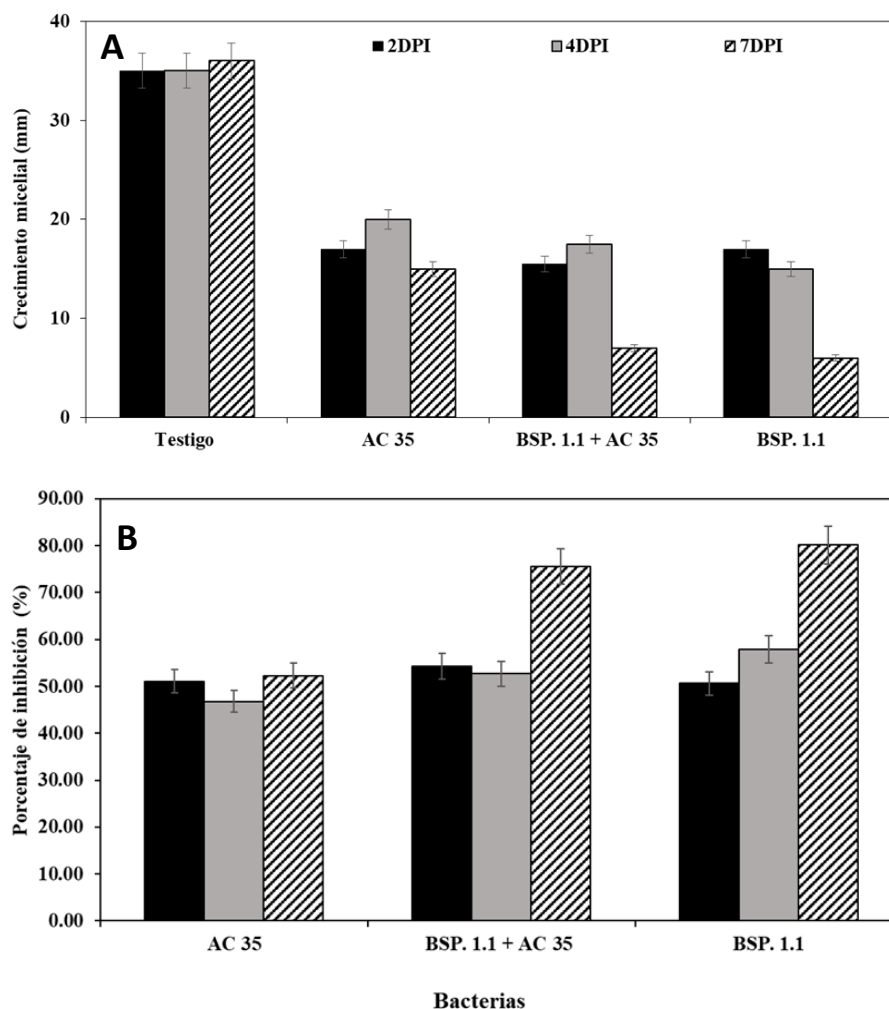


Figure 4. *In vitro* inhibition of the bacteria *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) and *Serratia* sp. (AC35) against the isolate MIC17188 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* at three times of bacterial inoculation (two, four and seven days). A) Mycelial growth, and B) Percentage of inhibition. After seven days of evaluation. Means + Standard error. n=3.

Figura 4. Inhibición *in vitro* de las bacterias *Paenibacillus* sp. (BSP 1.1) y *Serratia* sp. (AC35) contra el aislamiento MIC17188 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* a tres tiempos de inoculación bacteriana (dos, cuatro y siete días). A) Crecimiento micelial, y B) Porcentaje de inhibición. A los siete días de evaluación. Medias $\pm$ Error estándar. n=3.

velezensis have shown some effectiveness in reducing the incidence of *F. oxysporum* in banana seedlings, under greenhouse conditions (Cao *et al.*, 2018), and especially the incidence of FocR4T in plants of Cavendish banana var. Brazil (Huang *et al.*, 2019). This agrees with that report from Segura-Mena *et al.* (2021) who mention that the

en condiciones de invernadero (Cao *et al.*, 2018), y de manera especial la incidencia de FocR4T en plantas de banana Cavendish var. Brazil (Huang *et al.*, 2019). Lo anterior concuerda con lo reportado por Segura-Mena *et al.* (2021) quienes mencionan que la utilización de bacterias benéficas/antagonistas son parte de prácticas de manejo del suelo para

use of beneficial/antagonistic bacteria are part of soil management practices to reduce the incidence and severity of diseases caused by *Fusarium*.

The results obtained suggest that *B. subtilis* and *B. sonorensis* could potentially be evaluated in greenhouse and later in the field, to be considered in the future as part of a management program against FocR2 and against FocR4T, before an eventual introduction of it; either through bacterization practices of plantain vitroplants before their establishment in the field or in the preparation of biofertilizer formulations that could be applied once the crop is established in the field, as has already been reported by Kavino and Manoranjitham (2018) and Huang *et al.* (2019).

Regarding the inhibition of mycelial growth of FocR2 MIC17188, a previous study showed that the bacterial strains *Paenibacillus* sp. BSP1.1 and *Serratia* sp. AC35 exerted an inhibition of 45 and 27% when pre-inoculated one day before the fungal confrontation (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022); in the present work, this inhibition increased to 80.1 and 52.3%, respectively, when the bacteria were pre-inoculated *in vitro*, seven days before the confrontation, which suggests that the longer the bacteria have to establish themselves in the culture medium, the greater the inhibitory effect. This gives consistency to what was suggested by Caballero-Hernández (2011) when recommending the protection of banana plants with antagonistic bacteria applied seven days before the inoculation of the pathogen.

Furthermore, the strain *Paenibacillus* sp. BSP1.1 has also been effective in inhibiting the mycelial growth of *Rhizoctonia* sp. (Pineda-Mendoza *et al.*, 2019), this bacterial strain is attractive for its biotechnological use as part of an integrated management program for the biocontrol of Foc, due to the high percentage of inhibition against five isolates of Foc Race “1 or 2” (Florencio-Anastasio

reducir la incidencia y severidad de enfermedades causadas por *Fusarium*.

Los resultados obtenidos sugieren que *B. subtilis* y *B. sonorensis* podrían ser potencialmente evaluadas en invernadero y posteriormente en campo, para en un futuro también ser consideradas como parte de un programa de manejo contra FocR2 y contra FocR4T, ante una eventual introducción de este último; ya sea mediante prácticas de bacterización de vitroplantas de plátano antes de su establecimiento en campo o en la elaboración de formulaciones de biofertilizantes que se podrían aplicar una vez que el cultivo está establecido en campo, como ya ha sido reportado por Kavino y Manoranjitham (2018) y Huang *et al.* (2019).

Respecto a la inhibición del crecimiento micelial de FocR2 MIC17188, un estudio previo, demostró que las cepas bacterianas *Paenibacillus* sp. BSP1.1 y *Serratia* sp. AC35 ejercieron una inhibición de 45 y 27% cuando se preinocularon un día antes de la confrontación fúngica (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022); en el presente trabajo, esta inhibición se incrementó hasta 80.1 y 52.3%, respectivamente, cuando las bacterias se preinocularon *in vitro*, siete días antes de la confrontación, lo que sugiere que entre más tiempo tengan las bacterias para establecerse en el medio de cultivo, mayor será el efecto inhibitorio. Lo anterior, da consistencia a lo sugerido por Caballero-Hernández (2011) al recomendar la protección de plantas de banano con bacterias antagonistas aplicadas siete días antes de la inoculación del patógeno.

Además, la cepa *Paenibacillus* sp. BSP1.1 también ha sido eficaz para inhibir el crecimiento micelial de *Rhizoctonia* sp. (Pineda-Mendoza *et al.*, 2019), esta cepa bacteriana es atractiva para su utilización biotecnológica como parte de un programa de manejo integrado para el biocontrol de Foc, debido a alto porcentaje de inhibición contra cinco aislamientos de Foc Raza “1 o 2” (Florencio-

et al. 2022). In addition, this bacterium produces auxins and indoles, and solubilizes phosphates, which is why it is considered a good promoter of plant growth and improves seed germination and the growth of *Capsicum annum* plants (Angulo-Castro *et al.*, 2018; Pineda-Mendoza, 2015; Pineda-Mendoza *et al.*, 2019). Therefore, *Paenibacillus* sp. BSP1.1 can potentially be used in biological control programs as a “bacterization practice” one week before its establishment in the field to induce greater protection in plantain and banana vitroplants.

CONCLUSIONS

The bacterial strain *Paenibacillus* sp. BSP 1.1, by itself, had the greatest inhibitory effect on the mycelial growth of the FocR2 isolate MIC17188 when pre-inoculated at seven days.

The inhibitory effect of the combined inoculation of the bacterial strains *Paenibacillus* sp. BSP 1.1 and *Serratia* sp. AC35 was lower compared to the single inoculation of the *Paenibacillus* sp. BSP 1.1.

ACKNOWLEDGMENTS

To Subdirección de Diagnóstico Fitosanitario, Coordinación de Análisis de Riesgo de Plagas y Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) for allowing the use of its facilities for this research.

LITERATURA CITADA

Aguayo J, Cerf-Wendling I, Folscher AB, Fourier-Jeandel C, Ioos R, Mathews MC, Mostert D, Renault C, Wilson V and Viljoen A. 2021. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4) causing Banana Wilt in the Island of Mayotte. Plant Disease 105(1):219. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32755365/>.
Angulo-Castro A, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Almaraz-Suárez JJ, Delgadillo-Martínez J, Jiménez-Fernández

Anastasio *et al.* 2022). Además, esta bacteria produce auxinas e indoles, y solubiliza fosfatos, por lo que se considera un buen promotor del crecimiento vegetal y mejora la germinación de semillas y el crecimiento de plantas de *Capsicum annum* (Angulo-Castro *et al.*, 2018; Pineda-Mendoza, 2015; Pineda-Mendoza *et al.*, 2019). Por lo tanto, *Paenibacillus* sp. BSP1.1 potencialmente puede utilizarse en programas de control biológico como “práctica de bacterización” una semana antes de su establecimiento en campo para inducir mayor protección a vitroplantas de plátano y banano

CONCLUSIONES

La cepa bacteriana *Paenibacillus* sp. BSP 1.1, por si sola tuvo el mayor efecto inhibitorio en el crecimiento micelial del aislamiento MIC17188 de FocR2 cuando se pre-inoculó a los siete días.

El efecto inhibitorio de la inoculación combinada de las cepas bacterianas *Paenibacillus* sp. BSP 1.1 y *Serratia* sp. AC35 fue menor en comparación con la sola inoculación de la cepa *Paenibacillus* sp. BSP 1.1.

Agradecimientos

A la Subdirección de Diagnóstico Fitosanitario, Coordinación de Análisis de Riesgo de Plagas y Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) por facilitar el uso de sus instalaciones para esta investigación.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

M y García-Barradas O. 2018. Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plántulas de 2 variedades de *Capsicum annum* L. inoculadas con rizobacterias u hongos micorrícicos arbusculares. Revista Argentina de Microbiología 50(2):178-188. <https://doi.org/10.1016/j>

- ram.2017.03.011.
- Ashby SF. 1913. Banana disease in Jamaica. Bulletin of the Department of Agriculture Jamaica 2(6): 95-128. <https://naldc-legacy.nal.usda.gov/naldc/download.xhtml?id=12088&content=PDF>.
- Bubici G, Kaushal M, Prigigallo MI, Cabanás CGL and Mercado-Blanco J. 2019. Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in Microbiology* 10:616. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00616/full>.
- Caballero-Hernández AJ. 2011. Uso de hongos endofíticos de *Trichoderma* spp. para el biocontrol del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) raza tropical 1 en vitropalantas del cultivar Gros Michel (AAA). Tesis Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Escuela de Posgrado. 90 p. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/5623>.
- Cao Y, Pi H, Chandransu P, Li Y, Wang Y, Zhou H, Xiong H, Helmann JD and Cai Y. 2018. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports* 8:4360. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>.
- Cook DC, Taylor AS, Meldrum RA and Drenth A. 2015. Potential economic impact of panama disease (tropical race 4) on the Australian banana industry. *Journal of Plant Disease Protection* 122(5/6):229-237. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03356557>.
- Dita RMA, Echegoyén RPE y Pérez VLF. 2013. Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en un país de la región del OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). San Salvador, El Salvador. 155p. [https://www.researchgate.net/profile/Plutarco-Echegoyen/publication/256547836\\_Plan\\_de\\_contingencia\\_ante\\_un\\_brote\\_de\\_la\\_raza\\_4\\_tropical\\_de\\_Fusarium\\_oxysporum\\_f\\_sp\\_cubense\\_en\\_un\\_pais\\_de\\_la\\_region\\_del\\_OIRSA/links/02e7e5236098aa1954000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Plutarco-Echegoyen/publication/256547836_Plan_de_contingencia_ante_un_brote_de_la_raza_4_tropical_de_Fusarium_oxysporum_f_sp_cubense_en_un_pais_de_la_region_del_OIRSA/links/02e7e5236098aa1954000000.pdf)
- Dita M, Barquero M, Heck D, Mizubuti ES and Staver CP. 2018. *Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable management. *Frontiers in Plant Science* 9(1468). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6202804/>.
- DOA. 2019. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 in Thailand. Department of Agriculture (DOA) of Thailand. Pest Reports from Thailand. International Plant Protection Convention. <https://www.ippc.int/en/countries/thailand/pestreports/2019/11/detection-of-fusarium-oxysporum-f-sp-cubense-tropical-race-4-in-thailand/>.
- Edel V, Steinberg C, Avelange I, Laguerre G, Alabouvette C. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85:579-585. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1995Articles/Phyto85n05\\_579.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1995Articles/Phyto85n05_579.PDF).
- Florencio-Anastasio JG, García-Ávila CJ, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R, Quezada-Salinas A, Almaraz-Suárez JJ, Moreno-Velázquez M and Hernández-Ramos L. 2022. Effectiveness of antagonistic bacteria, commercial fungicides, and fourth generation quaternary ammonium salts, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race “1 or 2”. *European Journal of Plant Pathology* 163:719-731. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02510-0>.
- Fish S. 1970. The history of plant pathology in Australia. *The Annual Review of Phytopathology* 8:13-36. <https://appsnet.org/History/THE%20HISTORY%20OF%20PLANT%20PATHOLOGY%20IN%20AUSTRALIA.pdf>.
- Fourie G, Steenkamp ET, Gordon TR and Viljoen A. 2009. Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* vegetative compatibility groups. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (14): 4770-4781. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2708428/>.
- García-Bastidas FA, Quintero-Vargas JC, Ayala-Vásquez M, Schermer T, Seidl MF, Santos-Paiva M, Noguera AM, Aguilera-Gálvez C, Wittenberg A, Hofstede R, Sorensen A and Kema HJ. 2020. First report of *Fusarium* Wilt Tropical Race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *Plant Disease* 104(3): 994. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN>.
- Ho YN, Chiang HM, Chao CP, Su CC, Hsu HF, Guo CT, Hsieh JL and Huang CC. 2015. *In planta* biocontrol of soilborne *Fusarium* wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. *Plant Soil* 387: 295-306. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11104-014-2297-0.pdf>.
- Huang J, Pang Y, Zhang F, Huang Q, Zhang M, Tang S, Fu H and Li P. 2019. Suppression of *Fusarium* wilt of banana by combining acid soil ameliorant with biofertilizer made from *Bacillus velezensis* H-6. *European Journal of Plant Pathology* 154: 585-596. <https://link.springer.com/article/10.1007/s2F510658-019-01683-5>.
- ICA. 2019. Resolución No. 00011912. Por medio de la cual se declara el estado de emergencia fitosanitaria en el territorio nacional por la presencia de la enfermedad conocida como marchitez de las musáceas por Foc R4T. Instituto Colombiano Agropecuario. 22 p. <https://www.ica.gov.co/getattachment/499e9fe5-1c2c-482a-87a9-62ae25f02f53/2019R11912.aspx>.
- Karangwa P, Monster D, Ndayinzamasso P, Dubois T, Niere B, Felde AZ, Shouten A, Blomme G, Beed F and Viljoen A. 2018. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in East and Central Africa. *Plant Disease* 102: 552-560. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-17-0282-RE>.
- Kavino M and Manoranjitham SK. 2018. *In vitro* bacterization of banana (*Musa* spp.) with native endophytic and rhizospheric bacterial isolates: Novel ways to combat *Fusarium* wilt. *European Journal of Plant Pathology*

- 151: 371-387. <https://en.xmol.com/paper/article/1335489338024620155>.
- Khan N, Maymon M and Hirsch AM. 2017. Combating *Fusarium* infection using *Bacillus*-based antimicrobials. *Microorganism* 5:75. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040075>.
- Landa B, Hervás A, Bettiol W and Jiménez-Díaz R. 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica* 25:305-318. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/12764/1/1997AP039BettiolAntagonistic3360.PDF>.
- Orozco-Santos M. 2013. Historia y situación actual del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31: S35. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/suplemento.pdf>.
- Özarslandan M and Akgül DS. 2020. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4 causing *Fusarium* wilt disease of banana in Turkey. *Plant Disease* 104(3):974. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1881-PDN>.
- Pineda-Mendoza DY. 2015. Potencial de tres cepas de rizobacterias como antagonistas de *Rhizoctonia solani* en chile serrano (*Capsicum annuum* L.). Tesis de maestría en Edafología. Colegio de Posgraduados, Área de Microbiología. Montecillo, Estado de México. México. 60 p.
- Pineda-Mendoza DY, Almaraz JJ, Lara-Hernández ME, Arteaga-Garibay R y Silva-Rojas HV. 2019. Cepas de bacterias aisladas de esporomas de hongos ectomicorrízicos promueven el crecimiento vegetal. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria* 115(1): 4-17. <https://doi.org/10.12706/itea.2018.027>.
- Ploetz RC. 2000. Panama disease: A classic and destructive disease of banana. *Plant Health Progress*. <https://doi.org/10.1094/PHP-2000-1204-01-HM>.
- Ploetz RC. 2005. Panama Disease: An old nemesis rears its ugly head part 2: The Cavendish era and beyond. Online. APSnet Features. <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Documents/2005/PanamaDisease2.pdf>
- Ploetz R. 2018. *Fusarium* wilt. pp. 207-228. In: Jones, D.R. (Ed.). *Diseases of Banana*, Abacá, and Enset. CABI publishing. <https://books.google.com.mx/books?id=HeWCDwAAQBAJ&pg=PA210&lpg=PA210&dq=Panama+disease+belice+1913&source=bl&ots=zZ9heNd4FZ&sig=ACfU3U0Ja8JJnKiPwMYIAItIszG364kP7w&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjixuiVwLrAhVEQ6wKHbRZACMQ6AEwDXoECAGQAQ#v=onepage&q&f=true>.
- Promusa. 2018. TR4 present in the UK (United Kingdom). A global programme for *Musa* improvement (Promusa). <https://www.promusa.org/blogpost580-TR4-present-in-the-UK>.
- Rubio-Tinajero S, Osorio-Hernández E, Estrada-Drouaillet B, Silva-Espinosa JHT, Rodríguez-Mejía MDL and Nava-Juárez RA. 2021. *In vitro* antagonist biocontrol of *Fusarium oxysporum* and *Dickeya chrysanthemi*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39(3): 515-528. <https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3932021/RMF2104-1.pdf>.
- Segura-Mena RA, Stoorvogel JJ, García-Bastidas F, Salacinas-Niez M, Kema GHJ and Sandoval JA. 2021. Evaluating the potential of soil management to reduce the effect of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana (*Musa* AAA). *European Journal of Plant Pathology* 160:441-455. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02255-2>.
- SENASA. 2021. Primer Reporte sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical, W.C. Snyder & H.N. Hansen 1940. Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA). [https://assets.ippc.int/static/media/files/pestreport/2021/04/30/Reporte\\_Foc\\_R4T\\_PERU\\_IPPC\\_29\\_abril\\_2021.pdf](https://assets.ippc.int/static/media/files/pestreport/2021/04/30/Reporte_Foc_R4T_PERU_IPPC_29_abril_2021.pdf).
- Shen Z, Ruan Y, Wang B, Zhong S, Su L, Li R and Shen Q. 2015. Effect of biofertilizer for suppressing *Fusarium* wilt disease of banana as well as enhancing microbial and chemical properties of soil under greenhouse trial. *Applied Soil Ecology* 93:111-119. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139315001158>.
- SIAP. 2022. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Su HJ, Hwang SC and Ko WH. 1986. *Fusarium* wilt of Cavendish bananas in Taiwan. *Plant Disease* 70(9): 814-818. [http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Do-cuments/1986Articles/PlantDisease70n09\\_814.PDF](http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Do-cuments/1986Articles/PlantDisease70n09_814.PDF).
- Wang BB, Shen ZZ, Zhang FG, Raza W, Yuan J, Huang R, Ruan YZ, Li R and Shen QR. 2016. *Bacillus amyloliquefaciens* strain W19 can promote growth and yield and suppress *Fusarium* wilt in banana under greenhouse and field conditions. *Pedosphere* 26(5): 733-744. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1002016015600832>.
- Xue C, Penton R, Shen Z, Zhang R, Huang Q, Li R, Ruan Y and Shen Q. 2015. Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Scientific Reports* 5:11124. <https://www.nature.com/articles/srep11124.pdf>.
- Zhang N, Wu K, He X, Li SQ, Zhang Z H, Shen B, Yang XM, Zhang RF, Huang QW and Shen QR. 2011. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. *Plant Soil* 344:87-97. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-011-0729-7>.