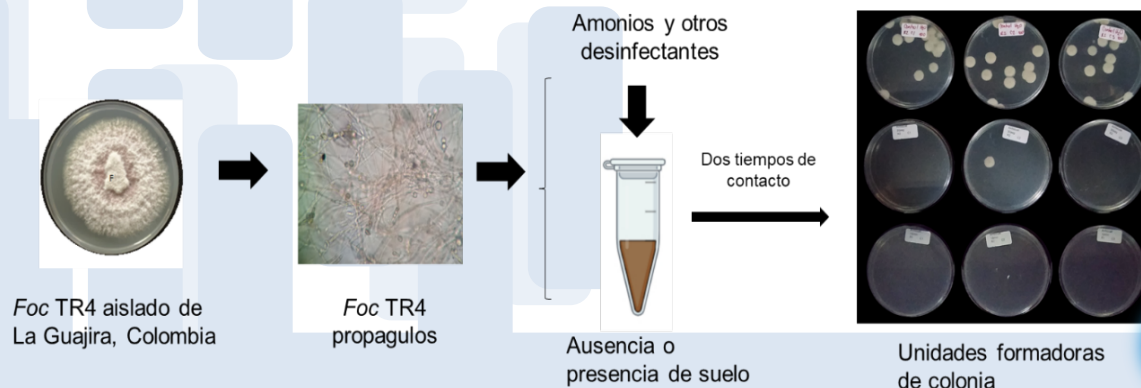




Producto 5. Fortalecimiento de capacidades para la prevención y el manejo de la marchitez por *Fusarium* de las Musáceas en América Latina y el Caribe - ATN/RF-18761-RG.

Producto 5. Nota Técnica 3

Evaluación de desinfectantes basados en amonios cuaternarios disponibles en el mercado colombiano frente a *Fusarium oxysporium* f. sp. *cubense* - Foc R4T

Luisa Fernanda Izquierdo García, Sandra Lorena Carmona, Mónica Betancourt y Mauricio Soto-Suárez.

2025



Códigos JEL: Q16

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

El presente documento ha sido preparado por Luisa Fernanda Izquierdo García, Sandra Lorena Carmona, Mónica Betancourt y Mauricio Soto Suárez.

Copyright © 2025 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org

Diciembre, 2024.



Tabla de Contenidos

Resumen.....	1
Abstract	1
Introducción	2
Materiales y métodos.....	3
Evaluación de desinfectantes contra Foc R4T en ausencia de suelo	3
Evaluación de desinfectantes frente a diferentes estructuras reproductivas de Foc R4T en presencia de suelo.....	4
Resultados	5
Evaluación de desinfectantes contra Foc R4T en ausencia de suelo.	5
Evaluación de desinfectantes contra diferentes estructuras reproductivas de Foc R4T en presencia de suelo.....	5
Conclusiones y recomendaciones.....	7
Bibliografía.....	7



Resumen

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (Foc R4T) es el agente causal de la marchitez del banano y es considerado el patógeno más importante en las musáceas. En el continente americano, Foc R4T fue reportado por primera vez en Colombia en el año 2019 y posteriormente se reportó en Perú (2021) y Venezuela (2023). La primera estrategia para prevenir esta enfermedad es la exclusión del patógeno. Sin embargo, una vez presente, la contención y manejo en áreas enfermas y la exclusión de áreas libres pasan a ser las prioridades para minimizar los impactos desfavorables en los cultivos de musáceas. Una de las principales herramientas para generar exclusión del patógeno es la implementación de medidas de bioseguridad, como el uso de pediluvios, rodiluvios y lavado de herramientas, contenedores, etc. y desinfección con compuestos basados en amonio cuaternario (CAM). A pesar de que el uso de los CAM es reconocido por su control sobre diferentes especies de *Fusarium*, este tipo de productos en general no requieren registro sanitario frente a un blanco biológico y, por esta razón, en muchas ocasiones no cumplen con los estándares mínimos para el uso en los esquemas de bioseguridad para Foc R4T. Por esta razón, una vez se reportó la enfermedad en Colombia rápidamente se iniciaron las pruebas para verificar si los CAM disponibles comercialmente en el país cumplían con los requisitos para su uso en esquemas de bioseguridad. Se optimizaron métodos para la evaluación *in vitro* del efecto de desinfectantes sobre macro, microconidas y clamidosporas de *Foc* R4T; se evaluaron 10 productos basados en amonios cuaternarios de diferentes categorías, casas comerciales y generaciones. Se observó que todos los productos tienen efecto desinfectante. Sin embargo, en presencia de suelo, se reduce la eficacia de éstos. Por lo tanto, todas las recomendaciones de bioseguridad para la prevención de la enfermedad deben centrarse en la premisa de “entrar limpio y salir limpio”. Los protocolos y resultados obtenidos en Colombia serán la base para el desarrollo colaborativo con los países ejecutores del proyecto.

Palabras claves: desinfectantes, amonio cuaternario, *Foc* R4T.

Abstract

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (k TR4) is the causal agent of banana wilt and is considered the most important pathogen in Musaceae family. In America, Foc TR4 was first reported in Colombia in 2019 and subsequently in Peru (2021) and Venezuela (2023). The primary strategy to prevent this disease is the exclusion of the pathogen. However, when pathogen is already present, containment and management of affected areas and exclusion from disease-free areas is a priority to minimize adverse impacts on crops. One of the main tools for pathogen exclusion is the implementation of biosecurity measures, such as the use of footbaths, wheel baths, washing tolos and containers, etc., and disinfection with quaternary ammonium compounds (QACs). Although the use of QACs is recognized for their control over different *Fusarium* species, these products generally do not require sanitary registration against a biological target, and for this reason, the products used often do not have standards for use in biosecurity schemes for Foc TR4. For this reason, once the disease was reported in Colombia, tests were quickly initiated to verify if the QACs commercially available in the country accomplish all the quality and efficacy requirements for use in biosecurity schemes. Methods were optimized for the *in vitro* evaluation of the effect of disinfectants on macroconidia, microconidia, and chlamydospores of *Foc* TR4; 10 products based on QACs from different categories, commercial companies and generations were evaluated. It was observed that all products have a disinfectant effect; however, in the presence of soil, their efficacy is reduced. Therefore, all biosecurity recommendations for disease prevention should focus on the premise of “come clean and go clean”. The protocols and results obtained in Colombia will be important for collaborative development with the project-executing countries.

Key words: disinfectants, quaternary ammonium.



Introducción

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* Foc R4T es el causante de la marchitez del banano, ataca una amplia gama de variedades de banano, incluidos los clones Cavendish, que son la fuente del 99 % de las exportaciones de banano. En 2019 se reportó Foc R4T en Colombia (García-Bastidas et al., 2020), y más recientemente (2021) en Perú (Acuña et al., 2021) y Venezuela (Mejías-Herrera et al., 2023). Hasta el momento no existe ningún producto agrícola capaz de controlar Foc R4T (Dita et al., 2018). Siendo un patógeno que puede dispersarse fácilmente a través de suelo contaminado, cualquier medio que pueda transportar suelo contaminado puede diseminar Foc R4T, entre ellos plántulas, herramientas, zapatos, vehículos y agua. Por lo tanto, se deben implementar en las fincas protocolos de bioseguridad para reducir la propagación del patógeno, como la desinfección de herramientas, superficies de trabajo, vehículos y equipos utilizados en las plantaciones de banano (Nguyen et al., 2019).

En general, los desinfectantes más recomendados para uso agrícola son aquellos de amplio espectro, dentro de los que se encuentran el yodo agrícola, los compuestos a base de cloro, el glutaraldehído y los compuestos basados en amonio cuaternario (CAM). Estos últimos han sido probados por su alta eficacia contra microorganismos y específicamente se han reportado para prevenir la dispersión de Foc R4T. En la actualidad, los CAM se han clasificado de primera a quinta generación de acuerdo con la complejidad, conformación y combinación de las moléculas, potenciando su actividad antifúngica (Wessels & Ingmer, 2013). Las moléculas de los amonios cuaternarios poseen una carga positiva que se une a las paredes y membranas celulares de los hongos, desestabilizándolos y ocasionando la ruptura y daño general en la célula (Feng et al., 2020).

La mayoría de Las organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria (ONPFs) recomiendan el uso de amonio cuaternario para la prevención del ingreso de Foc R4T a las plantaciones de banano, a través de su uso en pediluvios, rodiluvios, puestos de control, puestos de lavado en puertos, etc. Sin embargo, muchos de estos productos no cuentan con registro fitosanitario otorgado por las ONPFs porque no están formulados para un blanco biológico específico; esto limita su uso en plantaciones certificadas de banano y, además, genera incertidumbre en el uso para la prevención y manejo de la enfermedad.

Por esta razón, como parte del proyecto “Prevención y manejo de la marchitez por *Fusarium* de las Musáceas - ATN/RF-18761-RG” se planteó como objetivo: *Evaluar el uso moléculas desinfectantes frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* - Foc R1 y Foc R4T.* Se usó Foc R1 en los países en los cuales no se ha reportado la enfermedad y Foc R4T en Colombia. Los resultados permiten contar con una metodología estandarizada para la evaluación de diferentes moléculas desinfectantes y determinar la eficacia de diferentes CAMs para ejercer desinfección sobre Foc R4T en presencia y ausencia de suelo.

Materiales y métodos

Evaluación de desinfectantes contra Foc R4T en ausencia de suelo

Se prepararon soluciones de trabajo de 10 desinfectantes comerciales basados en amonio cuaternario para asegurar una concentración final de 1.200 ppm en cada producto. Esta concentración es efectiva en la desinfección de *Foc R4T* de acuerdo con los resultados reportados por Nguyen et al., (2019, **Tabla 1**). Los desinfectantes fueron puestos en contacto con estructuras activas (macro y microconidias) de *Foc R4T* en dos tiempos diferentes: < 1 minuto (entre 30 a 60 segundos de contacto) y 15 minutos de contacto.

Tabla 1. Desinfectantes evaluados y sus características químicas (ingredientes activos y generación de amonios cuaternarios). Fuente: elaboración propia.

Desinfectante	Ingrediente activo	Generación Amonio cuaternario
1. QAC1- 1 st	Cloruro de Benzalconio	1 ^a
2. QAC2-1 st	Cloruro de Benzalconio	1 ^a
3. QAC3-1 st	Cloruro de Benzalconio	1 ^a
4. QAC4-1 st	Cloruro de Benzalconio	1 ^a
5. QAC5-4 th	Cloruro de dimetil amonio	4 ^a
6. Qac6-4 th	Cloruro de Didecildimetilamonio	4 ^a
7. QAC7-4 th	Cloruro de Benzalconio + Cloruro de Didecildimetilamonio	4 ^a
8. QAC8-5 th	Cloruro Di(octil/decil) + dimetil amonio + Cloruro de Benzalconio	5 ^a
9. QAC9-5 th	Amonio Cuaternario	5 ^a
10. QAC10-5 th	Amonio Cuaternario	5 ^a

Una concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} (con. mL^{-1}) de macro y microconidias de *Foc R4T* se mezclaron con el respectivo desinfectante en los tiempos mencionados anteriormente, y luego fueron llevados a concentraciones de inactividad diluyéndolos con agua hasta 120 ppm, posteriormente sembrados en cajas de Petri con medio de cultivo PDA. Después de siete días, se hicieron las evaluaciones de inhibición de macro y microconidias de cada uno de los desinfectantes. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, donde cada tratamiento correspondió a los productos desinfectantes, incluyendo un control positivo sin aplicación de desinfectante, con tres réplicas técnicas de cada tratamiento y tres cajas de Petri como unidad experimental.



Evaluación de desinfectantes frente a diferentes estructuras reproductivas de Foc R4T en presencia de suelo

Para la evaluación de estructuras reproductivas tipo macro y microconidas, se pesaron 100 mg de suelo previamente tamizado, con un contenido de materia orgánica de 10,56% en tubos de 2 mL; estos fueron esterilizados con tres ciclos en autoclave (120 °C – 20 PSI de presión, 20 min). Posteriormente cada tubo fue inoculado con 200 µL de una suspensión de Foc R4T a una concentración de 5×10^5 con.mL⁻¹ (es decir, cada tubo se inoculó con aproximadamente 100.000 conidias) y se incubaron a 27 °C durante 24 horas.

Pasadas 24 horas de contacto Foc R4T-suelo, se adicionó a cada tubo 800 µL de cada desinfectante evaluado para obtener una concentración final de 1.200 ppm en presencia del patógeno y suelo. Se evaluaron tiempos de exposición de <1 y 15 minutos. Inmediatamente después de los tiempos de contacto, se realizó una dilución del desinfectante a 120 ppm con el fin de detener la reacción. Luego, se sembró 1 mL en medio PDA suplementado con tritón y cloranfenicol, se llevó a incubación durante cinco días a 25 °C y se estimó el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC.mL⁻¹). Se utilizó el mismo diseño experimental indicado en los ensayos en ausencia de suelo.

Para la producción de clamidosporas se siguió el protocolo suministrado por la Corporación Bananera Nacional de Costa Rica (CORBANA) empleando un medio de cultivo a base de suelo y raíces de banano o plátano. Para ello, se tomaron raíces de plátano y banano sanas, posteriormente se licuaron a máxima velocidad durante un minuto, el líquido obtenido fue filtrado por muselina (0,5 mm) para eliminar el exceso de humedad, el material fue colocado en bandejas de aluminio y se secó a 50 °C durante 24 horas. Posteriormente, las raíces secas fueron licuadas con el fin de disminuir el tamaño de partícula, se mezcló en un Erlenmeyer de 500 mL con suelo orgánico en una relación 3:1 de raíz: suelo (v/v) y se esterilizó en dos ciclos de autoclave a 121 °C y 15 PSI de presión durante 15 minutos.

La inoculación con Foc R4T se realizó a partir de una fermentación líquida del hongo de siete días de edad en medio de cultivo de caldo de papa (PDB: potato-dextrose-broth), adicionando 10 mL de inóculo en 100 mL de medio de cultivo, luego, fueron llevados a incubación a 27°C bajo oscuridad, y a partir del día 21 se realizaron observaciones bajo el microscopio con el fin de observar la formación de clamidosporas.

Después de los 21 días de incubación, y con el fin de liberar las clamidosporas puras y separarlas de otras estructuras formadas por el microorganismo, se siguió el protocolo descrito por Nguyen et al. (2019). Se tomó el micelio junto con medio de cultivo y se adicionó agua destilada estéril con una jeringa sobre una muselina estéril para eliminar los microconidios. Luego, el micelio fue llevado a agitación, a temperatura ambiente, durante una hora a 500 rpm, con el fin de romper los agregados de micelio y liberar las clamidosporas formadas. Posteriormente, el micelio fue



filtrado por muselina, el líquido obtenido se centrifugó durante 30 minutos a 7.000 g, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en sacarosa al 50% y centrifugado a 7.000 g durante 2 minutos para eliminar el suelo. Después, el sobrenadante que contenía aún microconidios y clamidosporas fue centrifugado nuevamente durante 30 minutos a 7.000 g para eliminar los microconidios restantes. El sobrenadante obtenido, que contenía las clamidosporas puras, fue centrifugado nuevamente durante una hora, el pellet obtenido fue resuspendido en agua destilada estéril, este último procedimiento fue repetido dos veces con el fin de eliminar los residuos de sacarosa. Finalmente, las clamidosporas fueron conservadas a 4°C hasta su uso.

Posteriormente la solución obtenida de clamidosporas se evaluó usando la misma metodología descrita para las macro y microconidias.

Resultados

Evaluación de desinfectantes contra Foc R4T en ausencia de suelo.

El protocolo usado fue eficaz para la producción de propágulos de *Foc R4T* y la posterior evaluación de la eficacia de los desinfectantes contra las clamidosporas.

Todos los amonios cuaternarios (1.200 ppm) presentaron 100% de eficacia contra macro, microconidias y clamidosporas en ausencia de suelo (**Figura 1**).

Evaluación de desinfectantes contra diferentes estructuras reproductivas de Foc R4T en presencia de suelo.

Todos los amonios cuaternarios redujeron la germinación de esporas de *Foc R4T* tanto a <1 min y 15 min de exposición, con valores de inhibición entre 80 y 100% (**Figura 2**). Seis amonios cuaternarios (QAC2_1st, QAC3_1st, QAC7_4th, QAC8_5th, QAC9_5th, and QAC10_5th) alcanzaron más de 95% de actividad fungicida contra micro y macroconidias de *Foc R4T* a 15 min de exposición. Otros tres desinfectantes (QAC1_1st, QAC4_1st, and QAC6_4th) redujeron su eficacia a 70-91%, permitiendo escapes significativos de propágulos de *Foc R4T*.

Similar a lo obtenido con micro y macroconidias, el QAC5_1st alcanzó 100% de efecto fungicida contra clamidosporas en presencia de suelo en ambos tiempos de exposición (**Figura 2**). QAC3_1st y QAC8_5th fueron eficaces en 98 y 100%; y 94 y 97% contra clamidosporas a <1 min y 15 min respectivamente. Los demás desinfectantes alcanzaron niveles de eficacia entre 82 y 97%.

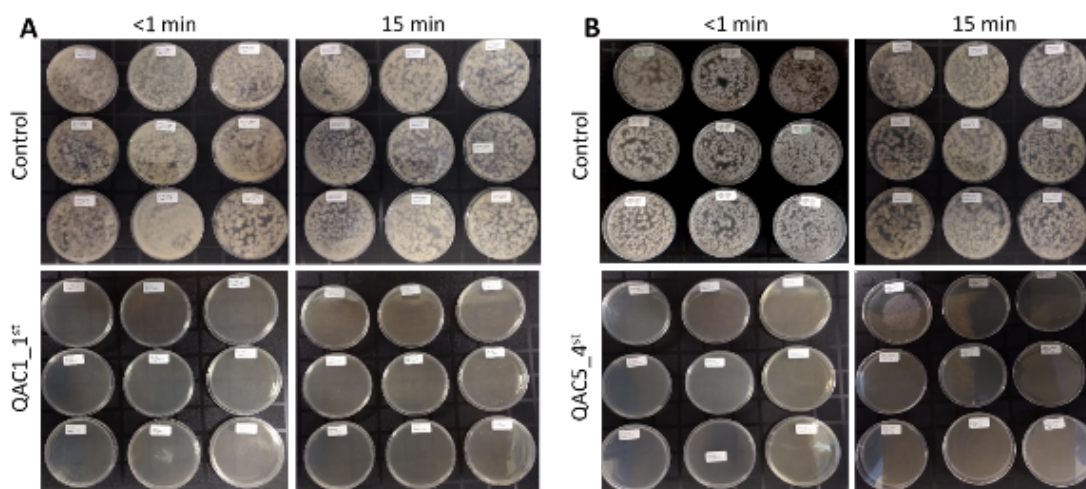


Figura 1. Eficacia de amonios cuaternarios contra *Foc* R4T en ausencia de suelo en dos tiempos de exposición: A) macro y micro conidias con (abajo-QAC1_1st) y sin (arriba-control) tratamiento desinfectante; B) clamidosporas de *Foc* R4T con (abajo- QAC5_4th) y sin (arriba-control) tratamiento desinfectante. Fuente: Elaboración propia. Imagen representativa mostrando únicamente dos amonios cuaternarios (QAC1_1st y QAC5_4th) de los 10 amonios cuaternarios evaluados. Fotografías por L. Izquierdo y L. Carmona.

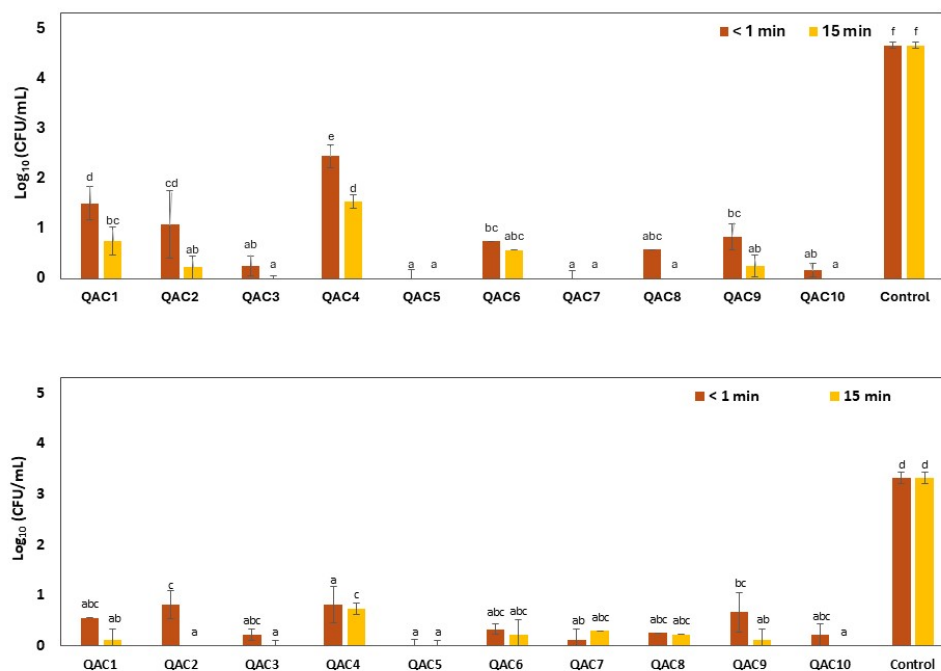


Figura 2. Eficacia de amonios cuaternarios contra *Foc* R4T en presencia de suelo. Panel superior: Macro y microconidias. Panel inferior: Clamidosporas. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos según Kruskal-Wallis, con una significancia de 95%. Fuente: Elaboración propia.



Conclusiones y recomendaciones

Este trabajo representa evidencia científica para recomendar desinfectantes comerciales disponibles localmente en el mercado en Colombia que pueden contribuir en la limitación de la dispersión de *Foc* R4T. Sin embargo, para la mayoría de los productos no fue posible lograr la efectividad del 100% en presencia de suelo a una concentración de 1.200 ppm. Por esto, es crucial complementar el uso de los desinfectantes con un proceso adicional en campo en los esquemas de seguridad, que incluya la remoción completa del suelo presente en los equipos, herramientas, botas y demás elementos a desinfectar.

Los resultados permitieron evidenciar que los productos a base de amonio cuaternario pueden tener diferente comportamiento. Por lo tanto, es necesario que los países aún no afectados por *Foc* R4T evalúen los productos que tienen disponibles en el mercado, frente al patógeno *Foc* R1 por ejemplo, como fase previa para prepararse ante una posible incursión del patógeno.

Bibliografía

- Acuña, R., Rouard, M., Leiva, A. M., Marques, C., Olortegui, A., Ureta, C., Cabrero Pintado, R. M., Rojas, J. C., López Álvarez, D., Cenci, A., Cuéllar, W. J., & Dita, M. (2021). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 causing Fusarium wilt in Cavendish bananas in Peru. *Plant disease*, 106(8). <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1951-PDN>
- Dita, M.; Barquero, M.; Heck, D.; Mizubuti, E.S.G.; Staver, C.P. (2018). Fusarium wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Front. Plant Sci.*, 871, 1–21.
- Feng, X. Z., Xiao, Z., Zhang, L., Liao, S., Chen, S., Luo, H., He, L., Fan, G., & Wang, Z. (2020). Antifungal activity of β -pinene-based hydronopyl quaternary ammonium salts against phytopathogenic fungi. *Natural Product Communications*, 15(8), 1934578X20948365.
- García-Bastidas, F., Quintero-Vargas, C., Ayala-Vasquez, M., Seidl, M., Schermer, T., Santos-Paiva, M., Noguera, A., Aguilera-Galvez, C., Wittenberg, A., Hofstede, R., Sorensen, A., & Kema, G. H. J. (2019). First report of Fusarium wilt Tropical Race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *Plant Disease*. doi:10.1094/pdis-09-19-1922-pdn
- Mejías Herrera, R., Hernández, Y., Magdama, F., Mostert, D., Bothma, S., Paredes Salgado, E. M., Terán, D., González, E., Angulo, R., Angel, L., Rodríguez, Y., Ortega, R., Viljoen, A., & Marys, E. E. (2023). First report of Fusarium wilt of Cavendish bananas caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 in Venezuela. *Plant disease*, 107(10), 3297.
- Nguyen, T. V., Tran-Nguyen, L. T. T., Wright, C. L., Trevorrow, P., & Grice, K. (2019). Evaluation of the efficacy of commercial disinfectants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 1 and Tropical Race 4 propagules. *Plant Disease*, 103, 721–728.
- Wessels, S., & Ingmer, H. (2013). Modes of action of three disinfectant active substances: a review. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 67(3), 456-467.

Instituciones participantes

EJECUTORES



ASOCIADOS



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org