



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

“Estimación del Riesgo de Tres Fincas Bananeras en la Provincia de Los Ríos para Mal de Panamá (Focrt4) para la Elaboración de un Plan de Respuesta de Erradicación.”

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

(PROYECTO DE GRADUACIÓN)

Previa la obtención del Título de:

INGENIERO AGRÍCOLA Y BIOLÓGICO

Presentada por:

VÍCTOR ALFREDO ZÚÑIGA BURGOS

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO 2015

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme vivir.

A mis padres, Teresa y Luis, que sin los valores que ellos me han enseñado, no estaría donde estoy ahora.

A mi hermana, Ibelia, que sin su apoyo, no sé dónde estaría.

A mis maestros, PhD. Santos, MSc. Sofía López, PhD. Ma. Isabel Jiménez y a Msc. Juan Aycart, que sin sus conocimientos, no estaría en ningún lado.

A mis buenos y “malos” amigos, que gracias a sus insistencias y distracciones, respectivamente, termine este proyecto a tiempo.

A mis enemigos, por hacerme más fuerte.

DEDICATORIA

A mi familia, a quienes les debo todo.

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Ing. Jorge Duque R.
DECANO DE FIMCP
PRESIDENTE

Dr. Efrén Santos O., Ph.D.
DIRECTOR DEL TFG

Dra. María Isabel Jimenez F., Ph. D,
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido desarrollado en el presente Trabajo Final de Graduación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Víctor Alfredo Zúñiga Burgos

RESUMEN

Ecuador es el principal exportador de banano en el mundo y es un producto de importancia económica para el país. Las variedades utilizadas en el cultivo son clones del subgrupo Cavendish, escogida por su resistencia al hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (Foc). Foc es un hongo que ataca a los cultivos pertenecientes al género *Musa* causando marchitez y muerte de la planta. En el año 1993, en el sudeste asiático, se reportó una nueva raza de este hongo que puede atacar al subgrupo Cavendish, llamado Raza Tropical 4 (RT4). El hongo se ha esparcido por el sudeste, este de Asia y norte de Australia causando pérdidas catastróficas de hasta el 80% de la producción en Malasia y Filipinas. En años recientes se ha reportado la enfermedad en Jordania (2006) y Mozambique (2013), dando una alerta al Ecuador y países de América productoras de banano, de la virulencia y del riesgo de la llegada del patógeno.

Este estudio tuvo como objetivo estimar y clasificar el riesgo que presentan tres fincas bananeras del país ante la llegada del patógeno; además de realizar los cimientos para un programa nacional de prevención y cuarentena del hongo.

El proyecto tuvo como primer propósito estudiar la ruta más probable que tome el patógeno desde las regiones donde se reporta el hongo hasta el Ecuador, información necesaria para poder establecer un plan de prevención nacional. Como segunda fase del estudio, se estudiaron los diversos factores que actúan como vectores de la enfermedad dentro de las fincas junto con análisis de expertos de epidemiología botánica, comparándolas y jerarquizándolas de acuerdo a su importancia y nivel de riesgo. Como tercera fase del proyecto se realizó un diagnóstico molecular de la enfermedad en las fincas para llegar a contrastar y confirmar la virulencia de las diferentes razas del patógeno en cuestión.

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo clasificar los diversos niveles de riesgo según las características de cada finca y realizar una medición abstracta del riesgo que presentan. Finalmente, se obtuvieron los datos necesarios para realizar los cimientos de un plan de contingencia que incluya la contención, cuarentena y erradicación del hongo en el futuro.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ABREVIATURAS	vii
SIMBOLOGÍA	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE PLANOS	v
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	3
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 Banano.....	3
1.1.1 Descripción	3
1.1.2 Importancia económica.....	5
1.1.3 Principales Plagas y Enfermedades	6
1.2 Marchitez por fusarium.....	7
1.2.1 Historia.....	7
1.2.2 Biología.....	10
1.2.3 Sintomatología.....	13
1.2.4 Impacto económico.....	16
1.3 Epidemiología	17
1.3.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense	17
1.3.2 Epidemiología aplicada al paisaje.....	18
CAPÍTULO 2.....	20
2. EPIDEMIOLOGÍA Y RIESGO	20
2.1. Conceptos.....	20

2.1.1. Epidemiología	21
2.1.2. Riesgo.....	21
2.2. Movimiento humano y epidemiología.....	31
2.3. Diagnóstico confirmatorio molecular	32
2.4. Medidas cuarentenarias.....	34
2.5. Medidas de Erradicación.....	35
CAPÍTULO 3.....	37
3. METODOLOGÍA	37
3.1. Estadísticas Nacionales e Internacionales aplicadas al seguimiento del hongo.....	37
3.2. Determinación de factores críticos	39
3.2.1. Análisis de factores de riesgo del <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense Raza Tropical 4.....	39
3.2.2. Reuniones de Expertos.....	40
3.2.3. Listado y jerarquización de factores	41
3.3. Levantamiento de base de datos de finca.....	41
3.3.1. Diseño.....	41
3.3.2. Ejecución	42
3.4. Análisis del Panorama de las fincas.....	44
3.5. Análisis Estadístico	44
3.6. Diagnóstico Molecular.....	44
3.6.1. PCR para Raza 1.....	47
3.6.2. PCR para Raza Tropical 4.....	47
CAPÍTULO 4.....	48
4. Resultados	48

CAPÍTULO 5.....	64
5. Discusión y Conclusiones	64

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

Msnm	Metros sobre el nivel del mar
PIB	Producto Interno Bruto
Foc	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubensis</i>
FocRT4	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubensis</i> Raza Tropical 4
Ltd	Limited.
SN	Sigatoka Negra
PCR	Reaccion en Cadena de Polimerasa
ADN	Acido Desoxirribonucleico
FAO	Organización para las naciones unidas para la alimentación y agricultura

SIMBOLOGÍA

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
Cm	Centímetros
Min	Minutos
M	Metros
NO ₃	Nitrato
Ha	Hectarea

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Síntomas Externos De Marchitez Por <i>Fusarium</i>	15
Figura 1.2	<i>Fusarium</i> En Banano	16
Figura 4.1	Total De Entradas De Personas En Las Entradas Descritas ...	55
Figura 4.2	Gel De Agarosa Al 1% Para Determinar Presencia De Bandas De Adn	60
Figura 4.3	Gel De Agarosa Al 1,5% Para Detección Del Gel De Actina Banano	61
Figura 4.4	Gel De Agarosa Al 1,5% Para Detección De De Foc Raza 1/Raza 2 (Abajo, Tamaño Esperado Del Amplicón: 242 Bp), Focrt4 (Arriba, 463 Bp) Y Género <i>Fusarium</i> (Arriba, 650 Bp).....	62
Figura 5.1	Estado De Conocimiento De Sn Por Parte De Las Personas Que Entra A La Finca.	73
Figura 5.2	Número De Personas Que Entran Por Medio De Transporte ..	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Posición Taxonómica De <i>Fusarium Oxysporum</i>	11
Tabla 2	Razas Patogénicas De <i>Fusarium Oxysporum F. Sp. Cubense</i>	13
Tabla 3	Matriz De Riesgo Utilizado En Este Proyecto De Graduación	23
Tabla 4	Resumen De Las Diferentes Interpretaciones De Probabilidad Discutidas	29
Tabla 5	Resumen De Diagnósticos Moleculares Desarrollados Para Focrt4	34
Tabla 6	Descripción De Muestras Tomadas Para El Diagnóstico Molecular	46
Tabla 7	Riesgo En Países En Peligro Importante	48
Tabla 8	Riesgo En Países En Peligro Intolerable	50
Tabla 9	Riesgo Presentados Por Región	50
Tabla 10	Resumen Del Panorama Que Presenta Cada Finca	54
Tabla 11	Persona Que Han Estado En El Extranjero En Los Últimos 6 Meses Y Qué País Visitaron.....	56
Tabla 12	Cuerpos De Agua Visitados En La Última Semana Por El Personal Entrante A Las Fincas.....	57
Tabla 13	Medio De Transporte Por El Cual El Personal Entrante Llegó A Las Fincas	57
Tabla 14	Conocimiento Por Parte Del Personal De Enfermedades De Importancia Económica Del Banano.....	58
Tabla 15	Respuesta Por Parte Del Personal Del Contacto Que Estuvieron Junto Con Enfermedades De Importancia Económica Del Banano.....	59
Tabla 16	Porcentaje De Personas Que Mencionaron Estar En Contacto Con Enfermedades De Banano Sobre A Los Que Mencionaron Conocerlas.....	59
Tabla 17	Riesgo Hipotético En Caso De Infección De Focrt4 En Zonas De Mayor Influencia.....	65
Tabla 18	Cinco Principales Corredores De La Migración De Sur A Norte, Según El Banco Mundial, 2010.....	67

ÍNDICE DE PLANOS

Plano 1 Ubicación De Las Fincas Estudiadas	43
Plano 2 Fincas María José Y Banaloli	69
Plano 3 Finca Elba.....	71

INTRODUCCIÓN

Mal de Panamá, o marchitez por fusarium, es una enfermedad que ataca a las plantas de banano, traslocando el paso de nutrientes en el pseudotallo; esto causa marchitez de la planta y muerte de la misma.

Esta enfermedad tuvo una alta importancia económica a mediados del siglo XX, a tal punto que causó una reingeniería total de la industria bananera mundial para poder adaptarse a esta enfermedad. Esta reingeniería implicó el cambio de variedad de banano de exportación a una que sea resistente a la misma.

A finales del siglo XX, en el sudeste asiático, apareció una nueva raza del patógeno causante de la marchitez por fusarium que puede atacar a las variedades de banano de exportación. Este se mantuvo en el sudeste asiático, hasta el 2013, donde se presentó en el sur de África y medio Oriente. Esto alarma a la comunidad científica e industrial del banano, ya que implicaría una grave amenaza para la producción bananera mundial.

En este proyecto, se realiza un análisis y estimación del riesgo, desde el punto de vista subjetivo, que presentan tres fincas bananeras de la provincia de Los Ríos de contraer esta nueva raza fisiológica.

CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Banano

1.1.1 Descripción

Los Plátanos y Bananos son frutos producido por diferentes plantas herbáceas gigantes de la especie *musa spp.* Esta fruta es variable en forma, color y sabor según su variedad y origen genético; suelen ser distinguidas por su forma de consumo entre plátanos (cocción) y bananas (fruta fresca). La fruta crece perennemente en racimos colgando de la cima de la planta (1).

El centro de origen del banano se localiza en el sudeste asiático, en ambientes tropicales y subtropicales. La mayoría de los cultivares están adaptados hasta los 600 msnm, a pesar de que algunas variedades pueden desarrollarse hasta los 2300 msnm. La temperatura óptima de floración es alrededor de los 27°C; más allá de los 37°C la planta sufre daños tanto al nivel foliar como en el

fruto. El banano cuando es expuesto a temperaturas menores a los 16°C, su ritmo de crecimiento es muy lento haciendo que su emisión foliar sea de 1 hoja por mes, muy distante a 1 hoja por semana que es lo normal. Carece de un tallo verdadero y en su lugar está estructurada por vainas foliares de hasta 30 cm de diámetro que conforman un pseudotallo. Su altura es variable y determinada por la variedad del cultivo. Las hojas del banano son lisas, oblongas, con el ápice trunco y la base redonda, verdes por el haz y normalmente glaucas por el envés, con los márgenes lisos y las nervaduras pinnadas. Dispuestas en espiral, se despliegan hasta alcanzar 3 m de largo y 60 cm de ancho; el pecíolo tiene hasta 60 cm (2).

Las variedades triploides, como el 'Gros Michel' y los clones Cavendish, son partenocarpías, es decir, no producen semilla. Las variedades de este fruto de mayor extensión en plantaciones bananeras de exportación son los clones del subgrupo Cavendish. Los plátanos, son más importante en el consumo local en países en desarrollo, debido a que son un cultivo prioritario en la seguridad alimentaria de los mismos (2).

1.1.2 Importancia económica

El banano, en todas sus formas y variedades, es el 4to cultivo de mayor consumo a nivel mundial, detrás del arroz, trigo y maíz (3). Dentro de las dietas locales de países en desarrollo, constituye como un fruto básico e indispensable debido a su alto contenido nutricional (2).

En el 2012, se cultivaron alrededor de 5 millones de hectáreas a nivel mundial, dando una producción cercana a los 101 millones de toneladas. India es el mayor productor bananero del mundo, produciendo el 24% de banano en el mundo, y usado casi en su totalidad, para consumo interno (4).

En el 2012, Ecuador fue el país de mayor exportación bananera del mundo, cubriendo el 26.6% del mercado importador de banano (4).

El banano de exportación en Ecuador constituye el 26% del PIB agrícola (5), esto se traduce en una producción cercana a los 4.7 billones de dólares en los últimos 10 años (6). Se calcula que cerca de 220000 de familias dependen directa e indirectamente de este cultivo en el Ecuador (7).

1.1.3 Principales Plagas y Enfermedades

En Ecuador, el banano es afectado por varias plagas y enfermedades; la enfermedad de mayor importancia económica actual en el Ecuador que afecta al banano, es la SN, producida por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Este es un hongo biotrófico que se reproduce por medio de ascosporas y conidióforos. Afecta al cultivo a nivel foliar, creando, inicialmente, estrías de color marrón oscuro, hasta que progresivamente inducen necrosis en la hoja, impidiéndole el proceso fotosintético de la planta; generando bajo rendimiento y maduración temprana de la fruta. Esta enfermedad, si no se controla, puede generar hasta el 61% de merma de producción (8). El control de SN es, casi en su totalidad, químico; y puede tomar hasta el 27% del costo de producción de banano (9).

Sin embargo, la enfermedad más catastrófica es el mal de Panamá, también llamado Marchitez por fusarium o fusariosis. Esta plaga, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubensis (Foc), ataca al pseudotallo internamente, trasladando el transporte de nutrientes y agua en la planta, finalmente causando la muerte de la misma. Se reproduce por medio de ascosporas y clamidiosporas; no se conoce alguna fase sexual de la misma. El

hongo está sujeto al suelo y no existen pruebas definitivas de que pueda ser transportado por el viento (10). Esta plaga fue la más importante a mediados del siglo XX, al punto que forzó el cambio de variedad cultivable para la exportación bananera y causó una reingeniería total de la industria (2).

1.2 Marchitez por fusarium

1.2.1 Historia

Los primeros registros de la sintomatología de la enfermedad se dieron a mediados del siglo XIX, en el sudeste asiático; pero siempre se lo relacionaban con otros problemas como baja fertilización o razones climáticas. Sin embargo, la enfermedad se dispersó por todos los países bananeros de toda Asia, imposibilitando la producción de banano de exportación, que en esta época era el banano de variedad Gros Michel (11).

Esto forzó, para finales del siglo XIX, a que los inversionistas muevan sus plantaciones a regiones vírgenes de la enfermedad, como Latinoamérica. Sin embargo, junto con las plantaciones, llegó la enfermedad, y esta se esparció por toda América (1). Para mediados del siglo XX, la enfermedad se hizo incontenible; y la

variedad Gros Michel, incultivable para producciones a gran escala alrededor del mundo (2).

En el año 1876, identificaron a la enfermedad por primera vez en Australia, y finalmente lo relacionaron con la presencia de un patógeno no identificado. Sin embargo, no es hasta el año 1910, que identificaron al hongo causante de la enfermedad, lo denominaron *Fusarium cubensis*; sin embargo no fue siquiera después de varios años que se definió la taxonomía del hongo *Fusarium oxysporum* por medio de *formae specialis* donde se definió al *Fusarium oxysporum* que afecte al género musa, como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensis* (Foc) (12).

Se intentaron varias técnicas para controlar al hongo, siendo la más efectiva el barbecho inundado; sin embargo, debido a su alto costo no era viable la producción del fruto (13). Esta situación incontenible forzó a la industria bananera a buscar un cultivar resistente a esta enfermedad. Se han probado varios clones, como el filipino, pero sin ningún éxito.

Finalmente se optó por utilizar las variedades del subgrupo Cavendish, provenientes de Vietnam las cuales eran resistentes a

la enfermedad, con largo tiempo de maduración y buenas características organolépticas (1).

A pesar de las buenas características del Cavendish, éste era más delicado de manipular que el fruto Gros Michel, que se lo transportaba en racimos hacia el resto del mundo. La industria bananera tuvo que tomar una reingeniería total para adaptarse a esta nueva variedad. Los contenedores con refrigeración empezaron a utilizarse, y la caja de banano con plásticos protectores, que hoy en día se conoce, fue desarrollada por Dole Fresh Fruit International, Ltd (14).

Para la década de los 90s hasta la actualidad, Cavendish sigue siendo, la variedad preponderante en todo el mundo. Sin embargo, en los 70s, en Taiwán, se detectó la misma sintomatología de la enfermedad en un clon Cavendish y se confirmó que existe una raza fisiológica con capacidad de generar la enfermedad. En 1989, se detectó mediante la técnica de Compatibilidad Vegetativa (GCV) que se trataba de una, nueva raza fisiológica y se lo categorizo como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensis* Raza Tropical 4 (FocRT4) (15).

Para el año 2000, esta raza se ha esparcido por todo el sudeste asiático y la zona de Northern Territories de Australia y para finales de esa década, se mantuvo en esas regiones. Sin embargo en el 2013, se detectaron 2 nuevos casos de marchitez por fusarium causado por FocRT4 fuera del sudeste asiático: en Mozambique (16) y en Jordania (17). En Mozambique, la plantación de 300 Ha que cayó infectada, perdió 50 Ha en un solo año debido a esta raza de Foc. En el 2014 se ha confirmado su presencia informalmente en Pakistán (10) (18).

Estos tres últimos casos dan un alerta a la comunidad científica y a la industria bananera mundial debido al potencial destructivo de esta enfermedad. El banano latinoamericano entraría en serio peligro si dicha raza llegase a tierras americanas.

1.2.2 Biología

Foc es un hongo sujeto al suelo donde se reproduce por medio de conidias y clamidosporas; no se conoce fase sexual alguna de este hongo. En ausencia de algún huésped, Foc puede mantenerse en el suelo por más de 30 años por medio de las clamidosporas, o puede mantenerse asintómicamente en las malezas.

La infección en banano empieza como una respuesta a la exudación de las raíces primarias y secundarias de la planta; el rizoma por lo general no es atacado directamente. Las esporas de Foc, después de la germinación, generan una hifa que se adhiere a la epidermis; ésta la penetra y su micelio avanza intracelularmente a través del córtex hasta llegar e infectar el xilema, produciendo toxinas y conidias que colonizan vasos cercanos (10).

Taxonomía

La posición taxonómica del hongo es la siguiente:

TABLA 1
POSICIÓN TAXONÓMICA DE *FUSARIUM OXYSPORUM*

Rango Taxonómico	Taxón
Dominio:	Eukaryota
Reino:	Fungi
División:	Ascomycota
Clase:	Ascomycete
Subclase:	Sordariomycetidae
Orden:	Hypocreales

Fuente: Cohen, Alisha E. *Bananas: Nutrition, Diseases and Trade Issues*.

New York : NOVA, 2011.

Fusarium oxysporum es un complejo de diversas especies fúngicas, sin diferencias morfológicas (20). Este complejo se diferencian entre *formae specialis* dependiendo de su antagonismo hacia la especie de su huésped (12). Por ejemplo, el hongo *Fusarium oxysporum* que muestra antagonismo ante la papa (*solanum tuberosum*) se lo llama *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas*; existen alrededor de 60 *formae specialis* de *fusarium oxysporum*. Foc solo puede infectar a las plantas de banano. Por lo general la sintomatología que presenta esta especie es marchitamiento y/o necrosis de la planta.

Foc ha sido clasificado por medio de GCVs, donde se analizaban mutaciones del hongo y se analizaba su compatibilidad entre ellos, cada grupo es identificado por códigos (21). De estos estudios, 4 razas patogénicas han sido descritas ahora. La lista de razas fisiológicas patogénicas es presentada en la siguiente tabla:

TABLA 2
RAZAS PATOGENICAS DE *FUSARIUM OXYSPORUM F. SP.*
CUBENSE

CULTIVARES	RAZA 1	RAZA 2	RAZA SUBTROPICAL 4	RAZA TROPICAL 4
Gros Michel (genotipo AAA)	+	-	+	+
Manzano (AAB)	+	-	+	+
Pome (AAB)	+	-	+	+
Pisang awak (ABB)	+	-	+	+
Bluggoe (ABB)	-	+		+
Cavendish (AAA)	-	-	+(En subtrópicos)	+

Fuente: Technical Manual: Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama Disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* Tropical Race 4 (Perez-Vicente, Dita, Martinez-de la Parte, 2014)

La combinación de letras indica el origen del cariotipo del cultivar, A: *Musa acuminata*, B: *Musa balbisiana*.

1.2.3 Sintomatología

La enfermedad no presenta síntomas en los primeros estados de infección de la planta; solo presenta sintomatología cuando este ha avanzado en la planta.

La planta muestra sintomatología externa, que se presenta a nivel foliar, e interna que se muestra solo en el interior del pseudtallo (22)

Síntomas Externos

La enfermedad puede presentar dos tipos de sintomatología externa: El síndrome de hoja amarilla o síndrome de hoja verde (23).

Síndrome de hoja amarilla: La sintomatología externa más común en fusariosis; las hojas más viejas de la planta presentan coloración amarillenta en los bordes, muy parecido a los síntomas de deficiencia de potasio. Esta decoloración avanza progresivamente hacia las hojas más jóvenes mientras se quiebran por los peciolo y colapsan.

Síndrome de hoja verde: Las hojas se quiebran por el peciolo y colapsan sin ningún cambio de color por parte del follaje.

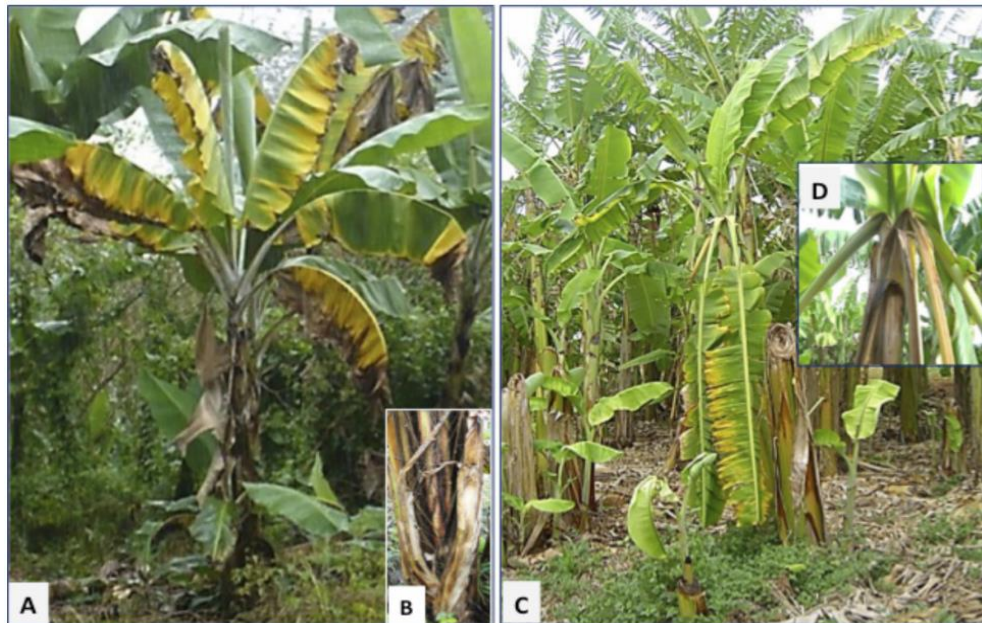


FIGURA 1.1 SÍNTOMAS EXTERNOS DE MARCHITEZ POR FUSARIUM

A. Planta mostrando un amarillamiento general y necrosis de las hojas ('Síndrome de la hoja amarilla') en estado avanzado de la enfermedad. B. Pseudotallo partiéndose. C. Planta afectada por la marchitez por Fusarium con hojas verdes ('Síndrome de la hoja verde'). D. Detalles de la hoja cayendo por el colapso de los peciolo.

Síntomas Internos

La sintomatología interna empieza por una descolorización del sistema vascular, empezando por las raíces, después el cormo, el rizoma y finalmente al pseudotallo.

Estas se vuelven amarillentas hasta progresivamente tomar una tonalidad rojiza, café o negra en la parte externa del pseudotallo.

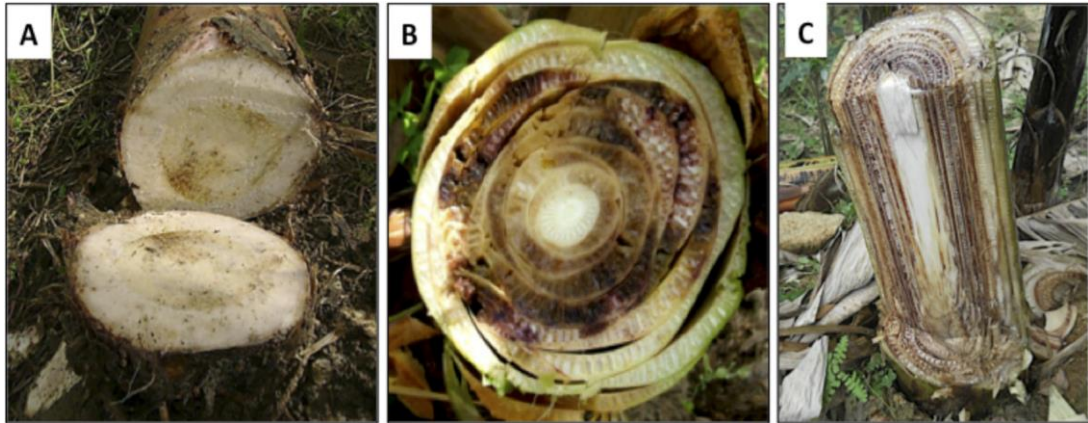


FIGURA 1.2 FUSARIUM EN BANANO

A. Corte transversal en el cormo (rizoma) mostrando necrosis de los tejidos. B. Corte transversal del pseudotallo mostrando necrosis avanzada del tejido vascular. C. Corte longitudinal del pseudotallo mostrando necrosis a lo largo de los haces vasculares. (Fotos: M. A. Dita y L. Pérez-Vicente).

1.2.4 Impacto económico

A pesar de que el efecto económico de FocRT4 no está bien documentada, existen registros del impacto que tuvo la Raza 1 del patógeno a mediados del siglo XX. Entre 1940 y 1960, 30000 Has se perdieron en Honduras y en una década completa, se llegaron a tener registros de 4000 Has perdidas en Surinam y 6000 Has perdidas en Costa Rica (24). Se estima que las pérdidas causadas por esta enfermedad, durante la primera mitad del siglo XX, ronda los USD 2.3 mil millones (25).

1.3 Epidemiología

1.3.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense

La capacidad del Foc de esparcirse es limitada por sí sola, se ha registrado que su movimiento por sí sola no alcanza más de 8m por año (22). Sin embargo, el potencial epidemiológico del Foc reside en las clamidosporas. Éstas son esporas con una estructura más resistente a las conidias; haciéndola persistente en cualquier suelo por más de 30 años.

Estas clamidosporas son fácilmente esparcibles por cualquier factor externo como movimiento humano y cuerpos de agua (26). Existe cierta evidencia que es probable que el patógeno también sea transportado por el viento, sin embargo esos datos están todavía en estudio y aun no son concluyentes (13).

Es conocido que dentro de 1 gramo de suelo infectado, adherido a la suela de los zapatos, se encuentran alrededor de 142 clamidosporas de FocRT4 (13). También se especula que la maquinaria es responsable de la esparción de inóculo dentro de las fincas (27).

1.3.2 Epidemiología aplicada al paisaje

Foc, por sí solo no puede esparcirse a grandes distancias. El hongo para poder diseminarse depende mucho de factores externos. Si se analiza cada finca desde el punto de vista del paisaje, se puede conocer la ruta más probable por la que el hongo puede ingresar hacia la finca.

De acuerdo a la literatura, las enfermedades botánicas son más comunes cerca de ciertas estructuras como caminos, donde el movimiento humano es más intenso y el suelo infectado puede ser transportado y esparcido por personas o maquinaria motorizada (28).

Los cuerpos de agua, como los ríos, son también las rutas de infección más críticas en la epidemiología botánica. En un caso hipotético, las clamidosporas que pueden estar alojadas en una plantación río arriba, puede ser transportada río abajo, hacia el resto de plantaciones que estén a un lado del río, o que tomen agua del mismo para la irrigación de su cultivo (27).

Las densidades de siembra, también son factores importantes de esparcimiento de patógenos. Las poblaciones altas de huéspedes para un patógeno son un ambiente ideal para la dispersión del

mismo. Los monocultivos, especialmente los que son uniformes genéticamente como el banano, son los más propensos y favorables para la dispersión de un patógeno (27).

CAPÍTULO 2

2. EPIDEMIOLOGÍA Y RIESGO

2.1. Conceptos

Una evaluación, o estimación del riesgo se lo puede realizar de distintas maneras, según el caso que se esté analizando mediante la determinación de la probabilidad del evento que se quiera evitar junto con las consecuencias, todo esto bajo un proceso de determinación de factores que influyan en el riesgo (29). El término riesgo está incluso bajo debate en cuanto a su definición y extensión de la palabra, según su aplicación y en qué campo se la utilice (30).

En epidemiología, la palabra riesgo es muy inexacta en cuanto a su significado. Filho y Colaboradores en su publicación: "Riesgo: Concepto Básico de la Epidemiología" tratan de formalizar el concepto de riesgo desde un punto de vista semántico, hermenéutico y etimológico, dirigido a la salud pública. En este estudio, se evaluará el riesgo fitosanitario de introducción de una enfermedad cuarentenaria.

2.1.1. Epidemiología

La epidemiología botánica estudia las enfermedades en las poblaciones de plantas; esto abarca distintas disciplinas científicas como la biología, estadística, agronomía y ecología (31). Los epidemiólogos botánicos se esfuerzan en estudiar y entender las causas y efectos que las enfermedades tengan en cultivos o poblaciones botánicas y entregar posibles estrategias para la mitigación de los patógenos (31).

Para que exista una enfermedad, el fenómeno debe abarcar tres aspectos: El patógeno, el huésped susceptible y el ambiente adecuado para que la enfermedad prolifere (31). Si los tres aspectos anteriormente mencionados se mantienen en el tiempo, entonces una epidemia ocurrirá (32).

2.1.2. Riesgo

Este proyecto tiene como objetivo determinar el panorama del riesgo que presentan 3 fincas bananeras de Los Ríos, además de realizar los cimientos para la elaboración de un plan de respuesta de prevención y erradicación.

Sin embargo, el término riesgo puede tomar varios significados, muchas veces ambiguos (30). Filho y colaboradores concluyen que: “El riesgo en epidemiología equivale a efecto, probabilidad de ocurrencia de una patología en una población determinada, expresado a través del indicador paradigmático de incidencia”¹ siempre y cuando se cumplan con estos tres elementos en la estimación del riesgo:

- Ocurrencia de casos de óbito-enfermedad salud (numerador).
- Base de referencia poblacional (denominador).
- Base de referencia temporal (período).

Otros autores definen el término riesgo como:

- a) La probabilidad de ocurrencia de un evento (mórbido o fatal)
- b) Un término no técnico que incluye diversas medidas de probabilidad en cuanto a consecuencias desfavorables.²

Un análisis de riesgo se puede efectuar mediante el uso de una matriz de riesgo que ilustre la combinación de estos factores:

¹ *Riesgo: concepto básico de la epidemiología.* Filho, Naomar de Almeida, Castiel, Luis David and Ayre, Luis Ricardo. 2009, Salud Colectiva, pp. 323-344.

² Last, J. M. *A dictionary of epidemiology.* New York : Oxford University Press, 1989.

probabilidad y consecuencias, a distintos niveles de severidad u ocurrencia.

Matriz de Riesgo

En un proyecto de análisis de riesgo es muy utilizada una matriz de riesgo, debido a la facilidad de visualización de los posibles casos de ocurrencia. Existen varias matrices de riesgo estandarizadas según la organización (33; 34). Sin embargo, muchas de las veces, las matrices de riesgo son generadas por la misma organización que realiza el estudio de riesgo. En este estudio, se adaptó la matriz a la problemática de la enfermedad estudiada.

TABLA 3
MATRIZ DE RIESGO UTILIZADO EN ESTE PROYECTO DE GRADUACIÓN

		Consecuencias		
		Ligeramente Dañino	Dañino	Extremadamente Dañino
Probabilidad	Baja	Riesgo Trivial 1	Riesgo Tolerable 2	Riesgo Moderado 3
	Media	Riesgo Tolerable 2	Riesgo Moderado 3	Riesgo Importante 4
	Alta	Riesgo Moderado 3	Riesgo Importante 4	Riesgo Intolerable 5

Fuente: propia

Por ejemplo, si tomamos otro escenario de riesgo de enfermedades para banano, como la SN, este tendría mayores factores a considerar dentro de su estudio de riesgo. El comportamiento de la SN, depende del clima y de la estación del año. Si realizamos un análisis de riesgo durante el invierno, la probabilidad de quema de las bananeras por SN es alta y sus consecuencias dependerían del control fitosanitario del mismo. Si el control de SN es eficiente, las consecuencias serían ligeramente dañinas, y por ende, el riesgo estaría en nivel 3: moderado. Si al contrario, el control es ineficiente o nulo, las consecuencias serían graves (extremadamente dañino), pudiéndose someter a cuarentena la finca; así, con altas probabilidades y graves consecuencias, el riesgo estaría en nivel 5: Riesgo Intolerable.

Durante el verano sin lluvia y con temperaturas frescas, las probabilidades son bajas y las consecuencias dependerán de como es el estado de la enfermedad a finales del invierno, esto variando el riesgo de trivial (Riesgo nivel 1) a un riesgo moderado (Riesgo nivel 3).

Retomando el mal de Panamá, antes del primer reporte de fusariosis en Cavendish, la probabilidad de ocurrencia de la

enfermedad era baja, al igual que las consecuencias debido a la resistencia de la variedad; el riesgo era trivial o casi inexistente. Después del reporte de fusariosis en Cavendish y de la identificación de FocRT4, las probabilidades, en Ecuador, seguían siendo bajas debido a que la enfermedad se encontraba confinada en el sudeste asiático, pero paralelamente, las consecuencias cambiarían drásticamente. Haciendo que el riesgo se mueva de trivial, hacia moderado o intolerable.

Es importante notar que las interpretaciones de las consecuencias son relativas entre las ópticas con las que se la analice, por ejemplo, en África las consecuencias de esta enfermedad afectaría la seguridad alimentaria del continente, mientras que en América, afectaría la producción de fruta fresca de exportación, además de las variedades de banano y plátano consumidas localmente. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos históricos de la enfermedad durante el siglo XX (Sección 1.2.1.) y de la importancia económica y sociales de la misma (Sección 1.2.4.) se concluye que los efectos de esta enfermedad están dentro del rango de extremadamente dañino, esto debido a que no hay ningún reporte de control efectivo a nivel comercial.

Dentro del concepto de riesgo, la palabra probabilidad está comprometida intrínsecamente. Existen varias interpretaciones de la palabra probabilidad, desde el punto de vista matemático, estadístico y filosófico (35).

Interpretaciones de Probabilidad

Existen varias definiciones de lo que implica la probabilidad; por ahora se mencionará cuatro de las más importantes y relevantes en la filosofía y ciencia.

La Place dio la primera interpretación de probabilidad, ampliamente usada en la teoría de juegos (36):

“La teoría de la probabilidad consiste en la reducción de todos los acontecimientos de la misma clase a un cierto número de casos igualmente posibles, es decir, a como la que puede ser igualmente indeciso sobre en lo que respecta a su existencia, y en la determinación del número de casos favorable al evento cuya probabilidad se solicita. La relación de este número para que de todos los casos posibles es la medida de esta probabilidad, que es por lo tanto simplemente una fracción cuyo numerador es el

número de casos favorables y cuyo denominador es el número de todos los casos posibles”³.

Esta interpretación es conocida como interpretación clásica o también como Ley de Laplace de probabilidades. Es ideal para describir probabilidades totalmente al azar, como el resultado del lanzamiento de un dado (36).

Otra definición altamente utilizada, especialmente en epidemiología, es la interpretación frecuentista de la probabilidad (30). La probabilidad frecuentista infinita se puede definir de la siguiente manera:

Ecuación A. Definición de Probabilidad Frecuentista

$$p = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{N_y}{N}$$

Donde p es la probabilidad, N el número posible de experimentos y N_y donde el evento estudiado ocurrió (35). Sin embargo este tiene sus limitaciones en estudios de riesgo de casos particulares, como

³ **Laplace, Pierre-Simon.** *A Philosophical Essay on Probabilities (1951 Edition)*. New York : Dover Publications Inc., 1814

es el caso del tema en estudio en este proyecto de graduación, ya que:

“Las probabilidades definidas en esta manera solo admite casos donde los eventos son altamente recurrentes o tienen un largo historial registrado, dejando atrás un número de casos extremos infrecuentes” (35).

Otra interpretación utilizada, aunque debatible, es la interpretación de propensión, donde la probabilidad se toma desde un punto de vista de propensión física, o disposición, o tendencia de cierto tipo de situación física que dan a resultados de cierto tipo (36). Este tipo de interpretación es muy parecida a la interpretación frecuentista, sin embargo este tipo de concepto abre la puerta a estudios de casos particulares y únicos a diferencia de la probabilidad por medio de la frecuencia. Sin embargo, esta definición se encuentra en disputa debido a su naturaleza metafísica e incalculable (36).

La interpretación subjetiva o lógica de la probabilidad, es muy utilizada en el campo de la predicción meteorológica (35). Este implica que la probabilidad es un número que indique ‘grados de certeza’ por parte de la persona que entregue esta probabilidad; de esta manera, esta interpretación puede dar varios resultados de

una probabilidad dependiendo del momento y de la persona que calcule la probabilidad en base a sus conocimientos científicos (36). La interpretación subjetiva depende de conocimientos científicos y experiencias pasadas por parte de quien emita la probabilidad y por lo tanto la calidad de la misma depende de la calidad del pensador. La ventaja de esta interpretación es que permite el cálculo de la probabilidad de eventos que no han tenido registros pasados (35), como es el caso de este estudio.

TABLA 4
RESUMEN DE LAS DIFERENTES INTERPRETACIONES DE
PROBABILIDAD DISCUTIDAS

	Clásica	Frecuentista	Propensión	Subjetiva
Hipótesis Principal	Principio de indiferencia	Frecuencia de Ocurrencia	Grado de conexión causal	Grados de creencia
Base Conceptual	Simetría Hipotética	Datos pasados y referencias de clase	Estado presente del sistema	Conocimiento e Intuición
Acercamiento Conceptual	Conjetural	Empírico	Metafísico	Subjetivo
Posible Caso Único	Si	No	Si	Si
Preciso	Si	No	Si	No
Problemas	Ambigüedad en principio de indiferencia	Problema de referencia de clase	Concepto Disputado	Opiniones no comprobadas

Fuente: "Diversity in interpretations of probability: implications for weather forecasting", Elía, Ramón; Laprise, René (2005).

En este proyecto de graduación, se calculará el riesgo de una manera subjetiva, tomando en cuenta el método de dispersión del patógeno de finca en finca según lo indique la literatura.

Factores de Riesgo

En epidemiología humana, factor de riesgo se define como cualquier situación o circunstancia que aumente las probabilidades de que una persona contraiga una enfermedad (30). En este estudio tomaremos esta definición desde el punto de vista botánico.

Enfermedad Cuarentenaria

En medicina, cuarentena se define como el acto de separar y restringir el movimiento de personas; un 'estado de aislamiento forzado' (37). Una enfermedad cuarentenaria, o plaga cuarentenaria se define como:

“Plaga de importancia económica potencial para el área en peligro aun cuando la plaga no esté presente o, si está presente, no está extendida y se encuentra bajo control oficial”⁴ (38)

En el presente estudio se tomará a FocTR4 como una plaga cuarentenaria debido a su importancia económica potencial.

⁴ **FAO.** Principios de cuarentena fitosanitaria en relacion con el comercio internacional. *Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias* . Roma : FAO, 1995.

2.2. Movimiento humano y epidemiología

La principal vía de transmisión de FocRT4 son plantas infectadas vivas o muertas, partes de plantas y/o suelo infectado, movilizado por personas, maquinaria y/o animales.

Sin embargo, una vez que la enfermedad se establece dentro de una plantación, los medios de infección, incluyen también, el movimiento de fluidos como el agua dentro de la plantación, junto con el transporte de suelo dentro de la misma (26). Se especuló que insectos pueden actuar como vectores de diseminación del hongo, tales como el picudo *Cosmopolites sordidus* (39). Esta posibilidad fue confirmada molecularmente por Meldrum et. al (2013) por medio de una reacción en cadena de polimerasa (PCR) donde se encontró la presencia de FocRT4 en el exoesqueleto del insecto en plantaciones de Australia.

El factor humano es ampliamente aceptado en la comunidad científica como elemento clave en la dispersión de la enfermedad en el pasado, principalmente por el movimiento de material vegetal infectado de plantaciones devastadas por la enfermedad hacia nuevas áreas de producción; esto debido a que la enfermedad

puede permanecer asintomática en los hijos de las plantas (21). Stover (1962) especuló que la diseminación de clones susceptibles a nuevas áreas es casi paralela al esparcimiento de la enfermedad.

Se ha registrado que los caminos son grandes focos de dispersión de inóculo de enfermedades, relacionándolo con el movimiento humano que existe dentro de ellos (40; 28).

A nivel de fincas, el factor humano es muy importante en el riesgo de una finca de contraer cualquier enfermedad fitosanitaria. Es muy aceptada la teoría de que a través de la historia, la dispersión de enfermedades, tanto botánicas como animales, son en gran parte a causa del movimiento humano alrededor del mundo (41).

2.3. Diagnóstico confirmatorio molecular

Uno de los grandes problemas al enfrentar el marchitamiento por fusarium causado por cualquier raza de Foc, es que éste no presenta ningún síntoma externo hasta que la enfermedad esté avanzada en la planta (2); dificultando el diagnóstico precoz del mismo (21).

Históricamente, una de las técnicas de diagnóstico utilizadas es el estudio de grupos de compatibilidad vegetativa (GCV), este procedimiento consiste en la generación de mutantes auxótrofos de aislamientos del hongo que no usan NO_3 (42); este proceso de aislamiento, inóculo y espera de incubación del hongo, puede tomar meses de estudio (26).

Las técnicas basadas en la polimerización de la cadena de ADN (PCR) se las utiliza para poder diagnosticar la presencia de FocRT4 de una manera precoz, eficaz y, principalmente, la planta no necesita presentar síntomas de la enfermedad (43). Ya que este procedimiento necesita de una muestra de ADN del hongo, y no varios aislamientos del mismo, lo hace más fácil y accesible de ejecutar. Esta técnica ha sido revolucionaria en la biología molecular (44) y en la detección de fito-patógenos (26).

Existen varios primers y tipo de PCR utilizados para la detección molecular del FocRT4 todos descritos en la siguiente tabla:

TABLA 5
RESUMEN DE DIAGNÓSTICOS MOLECULARES
DESARROLLADOS PARA FOCRT4

Tipo de Diagnóstico molecular	Primer forward	Primer reverse	Publicación	Secuencia abierta para el público
PCR no específico para FocRT4	5'- CAGGGGATGTATGA GGAGGACT-3'	5'- GTGACAGCGTCGTC TAGTTCC-3'	(45)	Si
PCR específico para FocRT4	5'- CACGTTTAAGGTGC CATGAGAG-3'	5'- GCCAGGACTGCCTC GTGA-3'	(43)	Si
PCR en tiempo real	qFocR4T-f	qFocR4T-r1	(46)	NO
Loop-Mediated isothermal amplification PCR	-	-	(13)	NO
PCR Dúplex en tiempo real para Foc1 y Foc4*	Foc1-0422F1 5'AGGTGAGAAATCT GTTGAGTCTCGAT3' Foc4-0422F2 5'GGCTTCCAGACCG ACAAGATAT3'	Foc1-0422R1 5'AACTCCTTCACCA GCCCTTTCG3' Foc4-0422R2 5'TGCTTGGCCTTGA TTCTGACT3'	(47)	Si

Fuente: propia

*Probing primers: Foc1-0422P1 5'Cy5- AGCATGGCAGGTCGT-bhq3 3'; Foc4-0422P2 5'FAM-AAATCGAACAGTTTGCG-BHQ1 3'

2.4. Medidas cuarentenarias

En general, no existe ningún método efectivo de control de la enfermedad (2; 26; 13). La única manera de contener, mas no

controlar, la enfermedad es por medio de la cuarentena (48) y el aislamiento de la planta afectada.

Las medidas cuarentenarias consisten en, básicamente, crear un cerco epidemiológico alrededor de la planta enferma en un radio de 7,5m y 15m de distancia, tomando en cuenta con sólo una entrada al cerco, dicha entrada debe tener un pediluvio.

Estos procedimientos ya fueron establecidos a nivel gubernamental, (49) el cual realizó un plan de contingencia donde muestra los procedimientos oficiales para el Ecuador en caso de un brote de FocRT4 en el territorio.

2.5. Medidas de Erradicación

No existe método de erradicación de la enfermedad sin que la planta no sea sacrificada. Existen métodos como la quema controlada del suelo, o el barbecho inundado, que merman las esporas por una mayor cantidad de tiempo (2).

Guo Gang & colaboradores, resumen las medidas de control biológico posibles para el Foc, donde analizan el uso de microbios antagonistas para la contención (mas no erradicación) del

patógeno. En este se concluye que varios factores son los que determinan el poder del control biológico además del uso de organismos endófitos (50).

Agrocalidad, en su plan de contingencia, menciona como método la inyección de glifosato a la planta, para que esta perezca, al igual que todos sus rebrotes. Una vez que éstas estén secas y muertas, se procede a incinerar o fumigar (49).

Cabe recalcar que todo método de erradicación, hasta el momento, sacrifica la unidad de producción, sin garantizar la supresión del patógeno en el área.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1. Estadísticas Nacionales e Internacionales aplicadas al seguimiento del hongo

Para determinar la ruta transcontinental más probable de ingreso del patógeno al Ecuador, se necesita de la ayuda de las estadísticas nacionales de ingreso y egreso de personas al Ecuador por cualquier tipo de ruta de entrada (51); además de la lista de países con el patógeno reportado (Sección 1.2.1.1.).

La lista completa de países reconocidos por la ONU será dividida según el geo esquema de la misma organización (52); además, serán categorizadas según el nivel de peligro que presente cada nación estudiada. Este peligro se lo dividirá en 3 categorías, según el status del FocRT4 reportado en el país.

- Países con peligro intolerable (categoría 1): Países con reportes de diagnóstico positivo de FocRT4
- Países con peligro importante (categoría 2): Países fronterizos con países con el patógeno reportado (categoría 1).
- Países con peligro tolerable (categoría 3): Países que no tienen frontera con los territorios reportados con FocRT4 (categoría 1).

Una vez completado esto, se mostrará el riesgo que presenta el Ecuador ante todos los países, regiones y categorías de peligro de la siguiente forma:

Ecuación B. Fórmula para determinar el riesgo subjetivo de contracción de FocTR4

$$\text{Riesgo} = \frac{\text{Total ingreso de personas por país/region/peligro (FocRT4)}}{\text{Total ingreso de personas al Ecuador}}$$

Se ordenarán los países según su riesgo de mayor a menor, donde la parte superior de esta tabla indicará los países con mayor influencia de riesgo en el Ecuador. Los datos serán presentados en fracciones y para poder comparar entre riesgos calculados, se estandarizarán las fracciones bajo un mismo denominador.

3.2. Determinación de factores críticos

El riesgo con probabilidad subjetiva (lógica) será analizado en base a la literatura científica y opiniones de personal experto calificado. Este es un proceso donde se analizan los factores de riesgo (Sección 2.1.2.2.) que implica la infección de FocRT4 hacia una finca.

3.2.1. Análisis de factores de riesgo del *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense* Raza Tropical 4.

Tomando en cuenta la epidemiología del patógeno, junto con el estudio de casos pasados de infección del hongo, se analizará su relación con el paisaje y el terreno de las fincas estudiadas, comparándola con la literatura mencionada en el capítulo 2.

Los factores de riesgo consideradas en este proyecto de graduación son:

- Número de personas que entran y salen de las fincas
- Tamaño de la finca
- Cuerpos de agua con los que la finca y las personas dentro de ellas interactúan.
- Tipo de transporte en el que las personas entran a las plantaciones

- Cuántas personas han estado en países extranjeros en los últimos 6 meses y que países visitaron
- Estado de conocimiento de enfermedades de importancia económica del banano de las personas.

3.2.2. Reuniones de Expertos

Debido a que este análisis de riesgo se realizó en fincas pertenecientes a Logística Bananera S.A. (Subsidiaria de Dole Fresh Fruit International, Ltd). Los resultados y la metodología fueron cercanamente asesorados por los líderes científicos del género *Musa* de esta empresa. Los científicos envueltos en la asesoría de este proyecto son:

- Msc. Juan José Aycart – Gerente Técnico, R&D de Logban S.A. (Ecuador)
- Miguel Eduardo Muñoz PhD – Gerente Investigaciones de Standard Fruit Company Costa Rica (Costa Rica)
- Marco Castro PhD. – Científico Líder de Standard Fruit de Honduras, S.A. (Honduras).

3.2.3. Listado y jerarquización de factores

Durante la estimación subjetiva del riesgo en las fincas, se necesitó jerarquizar por importancia a cada factor de riesgo mencionado en la sección 3.2.1.

Se llegó a esta jerarquización de importancia gracias a la opinión durante las reuniones con los expertos mencionados en la sección 3.2.2.

3.3. Levantamiento de base de datos de finca

Se levantó información de distinta naturaleza. Utilizando información geográfica para reconocer el paisaje y panorama de las fincas. Se realizó una encuesta para poder conocer mejor el movimiento humano en la finca.

3.3.1. Diseño

El levantamiento de información de movimiento humano dentro de las fincas consistió en el diseño de una encuesta a las entradas de las fincas.

La encuesta buscó establecer el movimiento humano de la finca estudiada, determinando simultáneamente factores de riesgo paralelos al movimiento humano. Estos factores fueron:

- Movimiento fuera del País previo a la entrada a la finca
- Contacto previo entrada con algún cuerpo de agua e identificación del mismo en caso de ser positivo.
- Medio de transporte relacionado al movimiento humano
- Conocimiento general del FocRT4 y otras enfermedades del banano por parte de las personas que entran a la finca

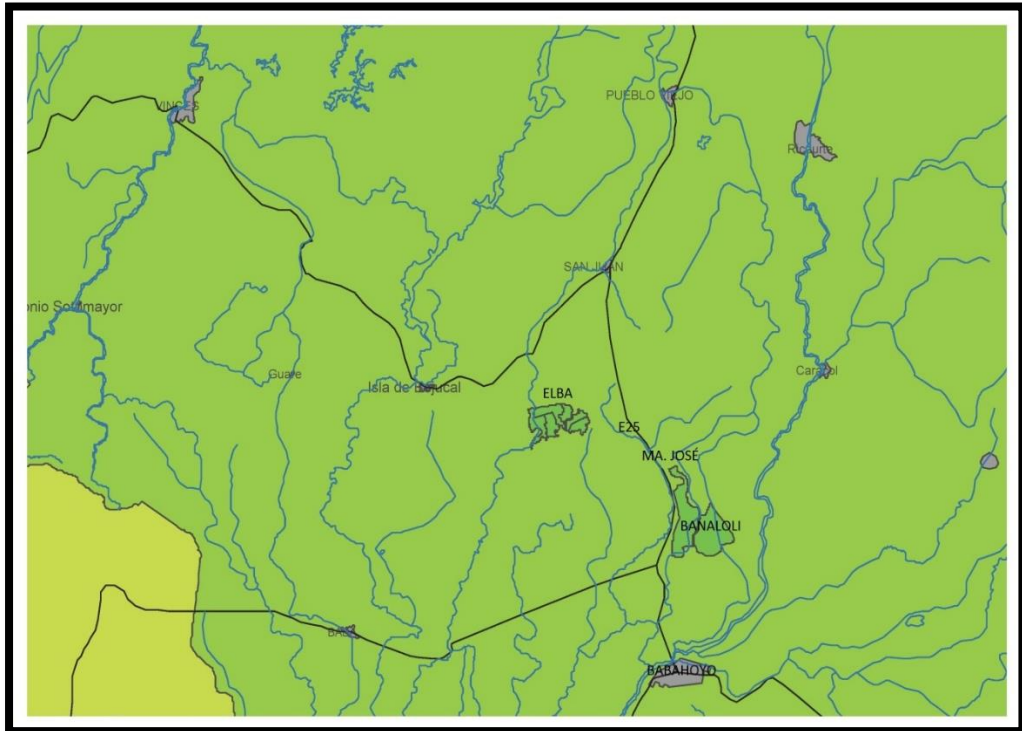
El formato utilizado para esta encuesta está en el apéndice A.

3.3.2. Ejecución

Las fincas a estudiarse son 3 fincas en la zona de Pimocha, en la provincia de Los Ríos:

- María José
- Elba
- Banaloli

Se puede apreciar la ubicación de las fincas en el siguiente plano:



PLANO 1 UBICACIÓN DE LAS FINCAS ESTUDIADAS

Cada finca presenta distintos tipos de entradas y de terrenos, además de flujo de personas. Este se realizó entre las 5:30 am y 11 am (ahí se concentra el mayor flujo de personas en las fincas) del día miércoles 11 de septiembre del 2014 en las entradas de María José – Banaloli, y otra el 17 de septiembre del 2014 en Elba.

Se decidió separar la encuesta a 1 semana debido a limitaciones operacionales de realizarlo en un solo día.

3.4. Análisis del Panorama de las fincas

Se determinó cuáles son los otros factores de riesgos dentro de las fincas, se estudiarán poblados, caminos, cuerpos de agua ubicados dentro de la misma.

Se utilizó como herramienta mapas hidrográficos y de estructuras presentes en las plantaciones, además de los debidos recorridos dentro de las fincas para reconocer el panorama del mismo.

3.5. Análisis Estadístico

El estudio de los datos recolectados se lo realizó a nivel descriptivo, debido a que éste es un estudio subjetivo del riesgo, y así poder dar una justificación a los 'grados de certeza' (Sección 2.1.2.2) de que ocurra un evento de FocRT4.

3.6. Diagnóstico Molecular

Se monitoreo las áreas con riesgo de Foc Raza 1 en fincas pequeñas

Se siguió la metodología propuesta por Dita et al. 2013 en el manual técnico presentado por la FAO.

Se realizó un muestreo de plantas de variedades susceptibles a la raza 1 de Foc. Se localizó una plantación de 1 hectárea de banano

variedad 'Seda' ('Gros Michel') en el cantón La Maná, en la provincia de Cotopaxi, Ecuador. Se muestreó una planta asintomática y otra con los síntomas de la enfermedad (indicios de marchitez).

Dos muestras más se tomaron de plantas del subgrupo Cavendish (variedad 'Williams') en las fincas estudiadas en el riesgo: Banaloli y María José. El muestreo de las plantas fue completamente al azar.

Una última muestra se tomó de un pseudotallo de banano sembrado en un cono urbano de una ciudad de alto movimiento humano. Se tomó una muestra de banano sembrado al frente del Centro de Clasificación Regional de Correos del Ecuador, en la zona de Sauces 7, en la ciudad de Guayaquil, provincia del Guayas, Ecuador.

El periodo para la toma de muestras fue durante los días 9 y 11 de marzo del 2015. Las muestras se las resume en la siguiente tabla:

TABLA 6
DESCRIPCIÓN DE MUESTRAS TOMADAS PARA EL
DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Muestra	Lugar de Recolección	Síntomas	Variedad
1	La Maná	No	'Gros Michel'
2	La Maná	Marchitez	'Gros Michel'
3	Banaloli, Pimocha	No	'Williams'
4	Maria José, Pimocha	No	'Williams'
5	Sauces 7, Guayaquil	No	'Williams'

Fuente: propia

El método de extracción de ADN es un protocolo perteneciente intelectualmente al laboratorio de biología molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) donde se puede obtener ADN de alta calidad para un alto rango de material vegetal y fungoso (53), éste se encuentra adjunto en el apéndice B.

Además de los diagnósticos moleculares realizados para la enfermedad, se realizaron tres PCR más:

- Actina banano: para comprobar la extracción legítima de banano y amplificación por PCR.
- Bandas de ADN para determinar su calidad de extracción según el método de Santos et al. 2008.

- Primers amplificadores de ADN del género *Fusarium*, usados en Dita et al. 2010 y desarrollados por O'Donell et al. 1998 con el fin de determinar presencia de *Fusarium* spp.

Las condiciones para todas las reacciones de PCR fueron las siguientes:

- 1) 95° 2 min
- 2) 95° 30 seg
- 3) 60° 30 seg
- 4) 72° 45 seg
- 5) 72° 5 min
- 6) 4° Hold
- 7) 37 ciclos

3.6.1. PCR para Raza 1

Para diagnóstico de Raza 1, se tomó los primers publicados por Dita et al. 2010, mostrados en la sección 2.3.

3.6.2. PCR para Raza Tropical 4

Para diagnóstico de Raza Tropical 4, se realizó un PCR dúplex junto con el PCR con primers amplificadores de *Fusarium* (EF-1 y EF-2), esto tomando los primers publicados por Dita et al. 2010

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

Resultados de Estadísticas de movimiento de personas en Ecuador

a) Categorizadas por Peligro.

Los países en peligro importante (peligro 2) son más numerosos que los países en peligro intolerable (peligro 1), donde la mayoría de ellos, Ecuador tiene un movimiento de gente cercano a 0 en comparación de otras naciones.

TABLA 7

RIESGO EN PAÍSES EN PELIGRO IMPORTANTE

País Categoría 2	Salidas	Entradas	Riesgo Salidas	Riesgo Entradas
ISRAEL	882	4088	1/1000	3/1000
INDIA	282	3399	≈0	2/1000
NUEVA ZELANDIA	65	1757	≈0	1/1000
SUDAFRICA	137	738	≈0	1/1000
SINGAPUR	71	526	≈0	≈0
VIETNAM	21	262	≈0	≈0
HONG KONG	212	255	≈0	≈0
ARABIA SAUDITA	108	118	≈0	≈0
MYANMAR	0	84	0	≈0
ZIMBABWE	1	39	≈0	≈0

CHIPRE	2	37	≈0	≈0
YEMEN	0	33	0	≈0
EMIRATOS A. UNIDOS	282	31	≈0	≈0
IRAK	85	28	≈0	≈0
AFGANISTAN	8	25	≈0	≈0
IRAN	1	18	≈0	≈0
ZAMBIA	2	17	≈0	≈0
SIRIA	1	16	≈0	≈0
MADAGASCAR	1	16	≈0	≈0
CAMBOYA	0	13	0	≈0
TAYIKISTAN	0	8	0	≈0
TANZANIA	1	6	≈0	≈0
BRUNEI	3	4	≈0	≈0
MALAWI	0	3	0	≈0
PAPUA NUEVA GUINEA	4	2	≈0	≈0
LAOS	0	0	0	0
BUTAN	0	0	0	0
SUAZILANDIA	0	0	0	0
TOTAL	2169	11523	2/1000	8/1000

Fuente: propia

Sin embargo, a pesar de que los países con el hongo reportado son menos, estos concentran mayor cantidad de movimiento humano que los países con riesgo 2. Es importante señalar que no todas las regiones de China Popular tienen reportes de la presencia de FocRT4, pero debido a que la base de datos no muestra tal nivel de información, el estudio se limita a trabajar con los datos de la cantidad total de personas por el país; esto también aplica para Australia

TABLA 8
RIESGO EN PAÍSES EN PELIGRO INTOLERABLE

Pais Categoría 1	Salidas	Entradas	Riesgo Salidas	Riesgo Entradas
CHINA POPULAR (PEKIN)	2586	14735	2/1000	11/1000
AUSTRALIA	708	12039	1/1000	9/1000
FILIPINAS	50	2812	≈0	2/1000
TAIWAN-CHINA	103	815	≈0	1/1000
INDONESIA	61	447	≈0	≈0
LIBANO	40	303	≈0	≈0
MALASIA	69	242	≈0	≈0
TAILANDIA	87	224	≈0	≈0
PAKISTAN	32	140	≈0	≈0
JORDANIA	15	82	≈0	≈0
MOZAMBIQUE	7	76	≈0	≈0
OMAN	44	14	≈0	≈0
TOTAL	3802	31929	3/1000	23/1000

Fuente: propia

b) Categorizadas por Región.

TABLA 9
RIESGO PRESENTADOS POR REGIÓN

(Los países con asterisco contienen países en Categoría 1)

Región	Salidas	Entradas	Riesgo Salidas	Riesgo Entradas
Sudamérica	404259	719551	350/1000	527/1000
Norteamérica	401874	279073	348/1000	204/1000
Europa del Sur	122480	83382	106/1000	61/1000
Europa Occidental	20877	81900	18/1000	60/1000
América Central	114283	50524	99/1000	37/1000
Caribe	25406	43056	22/1000	32/1000
Europa del Norte	4043	36526	3/1000	27/1000
Asia Oriental*	3237	21706	3/1000	16/1000

Sudeste de Asia*	1213	16666	1/1000	12/1000
Desconocido	53734	10127	47/1000	7/1000
Europa Oriental	689	6847	1/1000	5/1000
Asia Occidental*	1888	5695	2/1000	4/1000
Asia del Sur*	332	3806	≈0	3/1000
Oceanía*	142	1876	≈0	1/1000
África Occidental	61	1825	≈0	1/1000
África Austral	275	1746	≈0	1/1000
Norte de África	579	720	1/1000	1/1000
África Central	62	432	≈0	≈0
África Oriental*	74	290	≈0	≈0
Asia Central	33	185	≈0	≈0
TOTAL	1155541	1365933	1000/1000	1000/1000

Fuente: propia

Es importante señalar que el 88.9% del riesgo se concentra en países con riesgo tolerable (categoría 3), lo cuales son las 5 primeras regiones presentes en la tabla X.

Resultados de la Jerarquización de Factores de Riesgo

Después de análisis exhaustivo junto con gente experta perteneciente a la industria bananera y peritos en los cultivos del género Musa además de sus enfermedades, se determinó el orden jerárquico, de mayor a menor, en importancia de los factores de riesgo como el siguiente:

c) Número de personas que hayan visitado el extranjero:

Este es descrito como el factor de riesgo más importante antes de un inóculo inicial de FocRT4 en las fincas. El caso más probable es

que gente envuelta en la industria bananera (ingenieros, tecnólogos, técnicos agrícolas, etc.) se transporte entre fincas del extranjero hacia las fincas estudiadas, donde fácilmente se puede transportar patógeno.

d) Número de personas que entran y salen de las fincas

Es vital conocer el número de personas que entran en la finca para poder conocer cuál es la cantidad de personas a manejar para evitar la entrada de la enfermedad, además de su propagación.

e) Estado de conocimiento de enfermedades de banano por parte del personal.

Durante las reuniones, se llegó a un consenso para evitar en gran medida la introducción de FocRT4, la gente involucrada en las plantaciones debe estar educada y concientizada a cerca de lo que significa esta enfermedad y las consecuencias que tendría, no sólo para la finca, sino para la industria bananera como se la conoce.

f) Tamaño de Finca

El tamaño de finca se toma como indicador del poder económico que la misma tiene. Este influye bastante en la capacidad de cada finca en poder afrontar obras complementarias para la evasión del

patógeno y además de que la probabilidad de que la finca reporte la enfermedad se hace menor si ve comprometido su pequeño capital.

g) Cuerpos de agua que influyan en la finca

Si la finca es atravesada por un cuerpo de agua, éste contiene riesgo de que las esporas viajen por el mismo, y por ende siendo depositadas en fincas que también estén influenciadas por el cuerpo de agua.

h) Medios de transporte utilizados dentro y hacia la finca

Esto determinará que tipo de infraestructura implementar para la cuarentena del patógeno y en qué medida y prontitud establecerla.

i) Cuerpos de agua que son frecuentados por el personal de finca

Esto podría ser tomado como fuentes futuros de inóculo. Probable, pero de menor importancia si se considera como se disemina la enfermedad.

Resultados de Estadísticas de movimiento de personas en las Fincas.

Las fincas donde se hicieron las encuestas mostraron tres escenarios distintos en cuanto a su panorama se trata, esto se resume en la siguiente tabla:

TABLA 10
RESUMEN DEL PANORAMA QUE PRESENTA CADA FINCA

Nombre Finca:		María José	Elba	Banaloli
Ha:		363	309	288
Fuentes de Agua	Esteros Internos	Estero Cadena	Estero Nigüito	Estero Cadena
	Desembocan	Río Catarama	Río Pueblo Viejo	Río Catarama
	Muro contención inundaciones	Si	No	Si
	Toma de agua para riego	Río Catarama	Río Pueblo Viejo	Río Catarama
Movimiento Humano	Entradas a la finca	2	1	Compartidas con María José
	Entradas compartidas	Si, Banaloli	Si, La Julia	Si, María José
Infraestructura	Pediluvios	No	No	No
	Fosa para lavar carros	No	No	No
	Cerca perimetral	Parcial	No	No
	Carretero principal para acceso	E25	E25	E25
	Colinda directamente con fincas de banano	Si	Si	Si
Programa de concientización	Entrenamiento en diagnóstico de campo	No	No	No
	Simulación de cuarentena	No	Si	No
	Entrenamiento a nivel de mandos medios	No	No	No

Fuente: propia

Los resultados del total de personal de entrada se muestran en el
Figura 4.1:

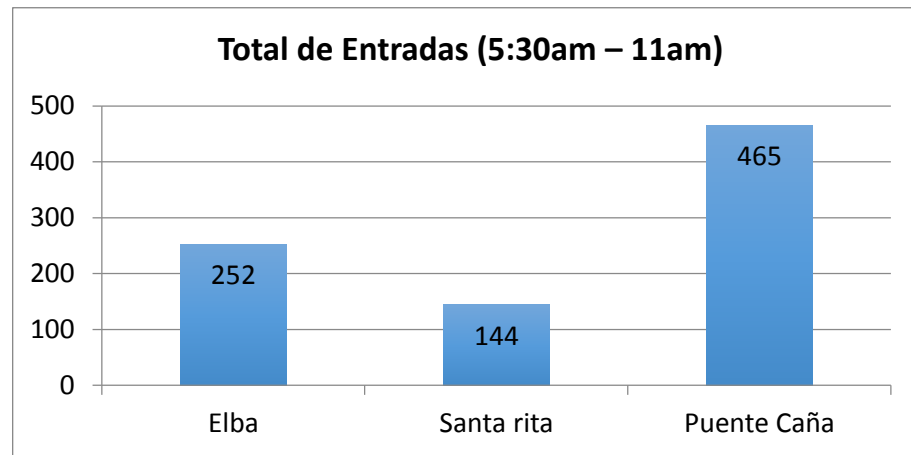


FIGURA 4.1 TOTAL DE ENTRADAS DE PERSONAS EN LAS ENTRADAS DESCRITAS

Fuente: propia

a) Casos de personas que han estado en el extranjero

De las 861 personas entrevistadas, 5 personas mencionaron haber estado en el extranjero. Dos mencionaron haber visitado Perú; el resto mencionó a Honduras, Italia y México, lo cual coincide con las estadísticas nacionales de movimiento de personas, en cuanto a que Perú, perteneciente a la región sudamericana, es el país con mayor influencia en las fincas.

Lo mismo se puede decir de Honduras y México, ambos pertenecientes a Centroamérica. Esta región está dentro de las 5 regiones del mundo de mayor movimiento humano con Ecuador.

Cabe señalar, que las personas que visitaron Centro y Sudamérica, todos eran ingenieros agrícolas que laboraban para Dole fresh fruit company, Ltd. Sin embargo, el caso particular de la persona que visitó Italia, no era ninguna persona estudiada en ciencias agrícolas.

TABLA 11
PERSONA QUE HAN ESTADO EN EL EXTRANJERO EN LOS
ÚLTIMOS 6 MESES Y QUÉ PAÍS VISITARON

	Entrada			Total
	Elba	Puente Caña	Santa Rita	
No	251	461	144	856
Si	1	4	-	5
• Honduras	-	1	-	1
• Italia	1	-	-	1
• México	-	1	-	1
• Perú	-	2	-	2
Total	252	465	144	861
Proporciones	1/200	2/200	0	1/200

Fuente: propia

**b) Riesgo de inóculo acuático: cuerpos de agua de mayor
afluencia.**

En cuanto al resultado de los cuerpos de agua visitados por el personal que ingreso a las fincas, estos mostraron en su mayoría, fincas que son cercanos a las fincas.

TABLA 12
CUERPOS DE AGUA VISITADOS EN LA ÚLTIMA SEMANA POR EL
PERSONAL ENTRANTE A LAS FINCAS

	Entrada			
	Elba	Puente Caña	Santa Rita	TOTAL
No	241	431	137	809
Si	11	34	7	52
• Babahoyo	1	6		7
• Caracol		6		6
• Catarama	1	3		4
• Montalvo	3	5		8
• Pimocha		3		3
• Salitre		2		2
• (No Recuerda / No sabe)	6	9	7	22
TOTAL	252	465	144	861

Fuente: propia

TABLA 13
MEDIO DE TRANSPORTE POR EL CUAL EL PERSONAL ENTRANTE
LLEGÓ A LAS FINCAS

	Entrada			
	Elba	Puente Caña	Santa Rita	TOTAL
Automotor	13	22	4	39
Bus	92	246	73	411
Camión	26	4	7	37
Moto	105	136	55	296
Otro	16	57	5	78
TOTAL	252	465	144	861

Fuente: propia

c) Medio de transporte del personal.

Los resultados indican que la gran mayoría entra por medio de buses, en segundo lugar el medio por el cual llegan es por medio de motocicletas. En la categoría otros incluyen bicicletas o a pie.

d) Nivel de Conocimiento de enfermedades importantes del banano.

La mayoría de las personas mencionaron que conocían SN; sin embargo, en cuanto a enfermedades de importancia económica cuarentenarias, muy pocos la conocían. Este conocimiento y alerta de enfermedades se le limitaba a Ingenieros agrícolas que visitaban la finca.

TABLA 14
CONOCIMIENTO POR PARTE DEL PERSONAL DE ENFERMEDADES
DE IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL BANANO

		Entrada			
		Elba	Puente Caña	Santa Rita	TOTAL
¿Conoce usted...	Mal de Panamá?	3	4	0	7
	Moko?	3	4	0	7
	Sigatoka Negra?	144	294	121	559
TOTAL		252	465	144	861

Fuente: propia

Se preguntó, además si han estado en contacto con algunas de las enfermedades mencionadas anteriormente. Esto con el fin de conocer la calidad de conocimiento que tienen de la enfermedad.

TABLA 15
RESPUESTA POR PARTE DEL PERSONAL DEL CONTACTO QUE ESTUVIERON JUNTO CON ENFERMEDADES DE IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL BANANO

		Entrada			
		Elba	Puente Caña	Santa Rita	TOTAL
¿Ha estado en contacto con...	Mal de Panamá?	0	0	0	0
	Moko?	0	0	0	0
	Sigatoka Negra?	97	259	75	431
TOTAL		252	465	144	861

Fuente: propia

TABLA 16
PORCENTAJE DE PERSONAS QUE MENCIONARON ESTAR EN CONTACTO CON ENFERMEDADES DE BANANO SOBRE A LOS QUE MENCIONARON CONOCERLAS

	Entrada			
	Elba	Puente Caña	Santa Rita	TOTAL
Mal de Panamá	0%	0%	-	0%
Moko	0%	0%	-	0%
Sigatoka Negra	67.4%	88.1%	62.0%	77.1%

Fuente: propia

En total, de las personas que mencionaron conocer a la SN, el 77.1% mencionó que en efecto ellos han estado en contacto con la enfermedad.

Resultados del Diagnóstico molecular

La extracción de ADN a partir de muestras de pseudotallo de banano fue desarrollada de acuerdo al protocolo adaptado por Santos (2008). Bandas de ADN de alto peso molecular se obtuvieron en las diferentes muestras procesadas (Figura 4.2).

e) Resultados de Bandas de ADN

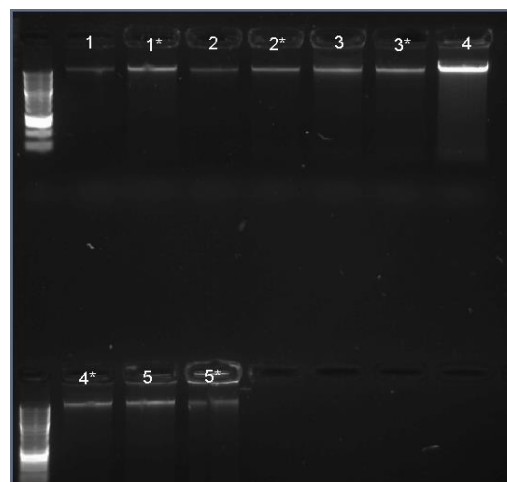


FIGURA 4.2 GEL DE AGAROSA AL 1% PARA DETERMINAR PRESENCIA DE BANDAS DE ADN

Fuente: Propia

Los números indican la muestra analizada (pseudotallo de planta de banano), mientras que el asterisco indica que es una réplica de la misma.

f) Resultados de PCR para actina banano.

Los resultados indican que si existe ADN de banano en la extracción de ADN realizado. Esto debido a que la banda se movilizó moderadamente durante la electroforesis en la mayoría de las muestras estudiadas, a excepción de la muestra réplica 2 (Fig. 4.3).

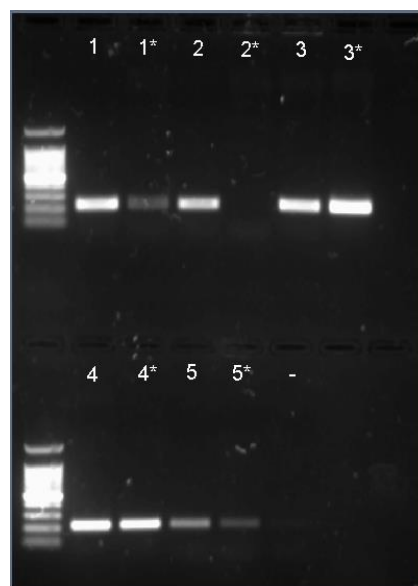


FIGURA 4.3 GEL DE AGAROSA AL 1,5% PARA DETECCIÓN DEL GEL DE ACTINA BANANO

Fuente: Propia

Los números indican la muestra analizada, mientras que el asterisco indica que es una réplica de la misma.

g) Resultados para detección de *Fusarium* spp.

Se realizó la PCR dúplex con el fin de identificar al mismo tiempo si es *Fusarium*. No existió amplificación utilizando los primers específicos para *Fusarium* lo que indica que las muestras analizadas no poseen *Fusarium* spp. Las bandas que se observan son los dímeros que se forman de los primers que se utilizaron.

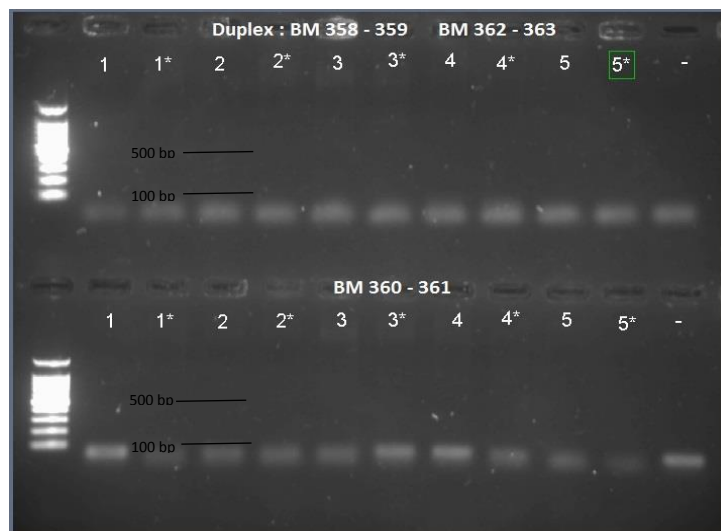


FIGURA 4.4 GEL DE AGAROSA AL 1,5% PARA DETECCIÓN DE DE FOC RAZA 1/RAZA 2 (ABAJO, TAMAÑO ESPERADO DEL AMPLICIÓN: 242 BP), FOCRT4 (ARRIBA, 463 BP) Y GÉNERO *FUSARIUM* (ARRIBA, 650 BP).

Fuente: Propia

Los números indican la muestra analizada, mientras que el asterisco indica que es una réplica de la misma.

CAPÍTULO 5

5. Discusión y Conclusiones

Estadísticas Nacionales de Movimiento Humano Dirigidos a FocRT4

La Tabla 8 indica que, para el riesgo 1 (Peligro intolerable), 23 personas de cada 1000 que entran al Ecuador provienen de regiones con reportes de presencia de FocRT4 en sus plantaciones de banano.

En la Tabla 7, que indica Riesgo 2 (Peligro importante), señala que 8 de cada 1000 personas provienen de países con frontera a países infectados con FocRT4. Sumados estos dos valores, tendríamos un riesgo de 31/1000, es decir, 31 de cada 1000 personas que entran al Ecuador, tienen probabilidad de transportar el patógeno al país. Esto se traduce a un 3.1% de la población entrante al Ecuador.

A pesar de que es un número reducido a comparación de otros países con mayor influencia de países infectados, no se puede menospreciar

dicho valor. El potencial catastrófico de esta enfermedad reside en su capacidad de diseminación; después de todo como Stover mencionó: la propagación de esta enfermedad fue paralela al movimiento humano de zonas infectadas a zonas libres de la misma (22). Es suficiente con que un gramo de suelo infectado se deposite en suelo sano para que la enfermedad se propague, Kema mencionó que en un gramo de suelo infectado se pueden encontrar hasta 132 clamidosporas de FocRT4 (13).

En la tabla 9, se puede observar que las regiones de mayor influencia en Ecuador, son Sudamérica (527/1000), Norteamérica (204/1000) y Europa del Sur (61/1000) con una notable mención de Centroamérica (37/1000). El fin de esta tabla es de estudiar hipotéticos casos de infección de FocRT4 en las regiones de mayor influencia para el Ecuador. Este análisis se lo ve resuelto en la siguiente tabla:

TABLA 17
RIESGO HIPOTÉTICO EN CASO DE INFECCIÓN DE FOCRT4 EN
ZONAS DE MAYOR INFLUENCIA

Región	Riesgo Hipotético en caso de infección	Aumento de riesgo relativo
Sudamérica	558/1000	18
Norteamérica	235/1000	8
Sur de Europa	92/1000	3
Centro América	68/1000	2
Riesgo Actual	31/1000	N/A

Fuente: Estudio para la determinación del peligro de introducción del marchitamiento por Fusarium del banano, análisis del componente migratorio para Ecuador. (54)

Si la región sudamericana es infectada con FocRT4, especialmente si se trata de un país fronterizo como Colombia o Perú, el riesgo escala a 558 de cada 1000, esto se traduce a un 56% de la población que entra al Ecuador, con un aumento de 18 veces el riesgo que presentamos ahora.

Existe una especial mención de las regiones de Europa del sur y de Centroamérica, que a pesar de que no comparten tanto movimiento humano con Ecuador como Norteamérica y otros países de Sudamérica, estas regiones fueron mencionadas durante el estudio de riesgo a nivel de fincas (Tabla 11).

Norteamérica, debería ser tomada como una de las rutas más peligrosas en las que el patógeno entre. Si el patógeno cae en esa región, el riesgo actual aumentaría 8 veces más. Según la Organización mundial para las Migraciones en el 2013 menciona que la 3^{era} y 4^{ta} ruta más importante de migración legal de Sur a Norte, a nivel mundial es de China y Filipinas (Países Categoría 1) hacia Estados Unidos de Norteamérica respectivamente, es decir del sudeste asiático hacia Norteamérica, esto sin contar que India (País Categoría 2) también está 5^{ta} en esta lista. Juntos estos 3 países suman el 4.7% de todo el movimiento humano de sur a norte en el mundo.

TABLA 18
CINCO PRINCIPALES CORREDORES DE LA MIGRACIÓN DE SUR A
NORTE, SEGÚN EL BANCO MUNDIAL, 2010

S-N	Origen	Destino	Número de migrantes	% del total de migrantes S-N
1	México	Estados Unidos de América	12.189.158	12,8
2	Turquia	Alemania	2.819.326	3,0
3	China	Estados Unidos de América	1.956.523	2,1
4	Filipinas	Estados Unidos de América	1.850.067	1,9
5	India	Estados Unidos de América	1.556.641	0,7

Fuente: Informe sobre las migraciones en el mundo 2013, OIM, Ginebra, 2013.

Es importante notar, que Norteamérica no tiene plantaciones de banano a gran escala debido a que su clima no es el adecuado para el cultivo. Esto hace a esta región aún más peligrosa, debido a que la enfermedad puede estar presente en la región sin tener avistamiento alguno de síntomas de la enfermedad, y por ende sin ningún reporte del mismo (54).

Como se ha observado en el pasado, el traspaso de material vegetal es una de las vías más rápidas en la que la enfermedad se transmite. Sería prudente evitar el importe de este material de regiones del mundo donde se encuentre esta enfermedad, como Asia Occidental.

Un caso de Fusariosis causado por FocRT4 es remoto en Ecuador, sin embargo, con que dicho caso remoto y único se dé, las consecuencias

de la misma serán catastróficas como se lo demuestra el pasado (Sección 1.2.1, 1.2.4).

Estadísticas de Movimiento Humano dentro de las fincas estudiadas.

Estas estadísticas serán analizadas desde un punto de vista descriptivo, según al consenso de jerarquización de los factores de riesgo a la que se llegó:

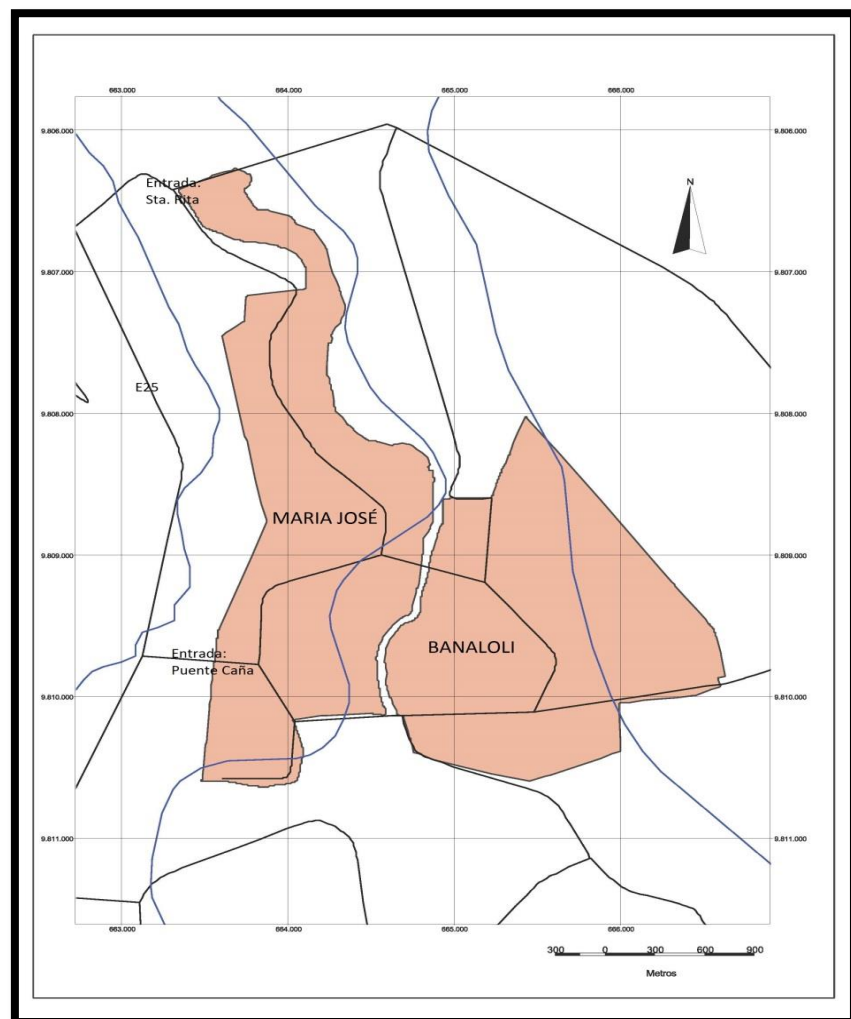
a) Número de personas que hayan visitado el extranjero:

Tomando en cuenta la tabla 11, mostrada en el capítulo 4, se resume que 1 de cada 200 personas que visita las fincas estudiadas, han estado en el extranjero en los últimos 6 meses. Es importante notar que dichas personas que mencionaron haber visitado el exterior, eran individuos peritos en las ciencias agrícolas y pertenecientes a la empresa Logban S.A. a excepción del sujeto que mencionó haber visitado Italia en los últimos 6 meses.

Esto da cierto indicio, de que la responsabilidad de mantener la inocuidad de la finca, en fin de cuentas recae sobre los expertos que manejan dichas fincas, ya que ellos son los que son más propensos a transportar patógenos del exterior directamente hacia la finca.

b) Número de personas que entran y salen de las fincas

Cabe recalcar que la finca Banaloli es un caso único, que a pesar de que es una finca distinta de María José, con personal y manejo agrícola distinto, ésta compartía la misma entrada que María José (Puente Caña y Santa Rita)

**PLANO 2 FINCAS MARÍA JOSÉ Y BANALOLI**

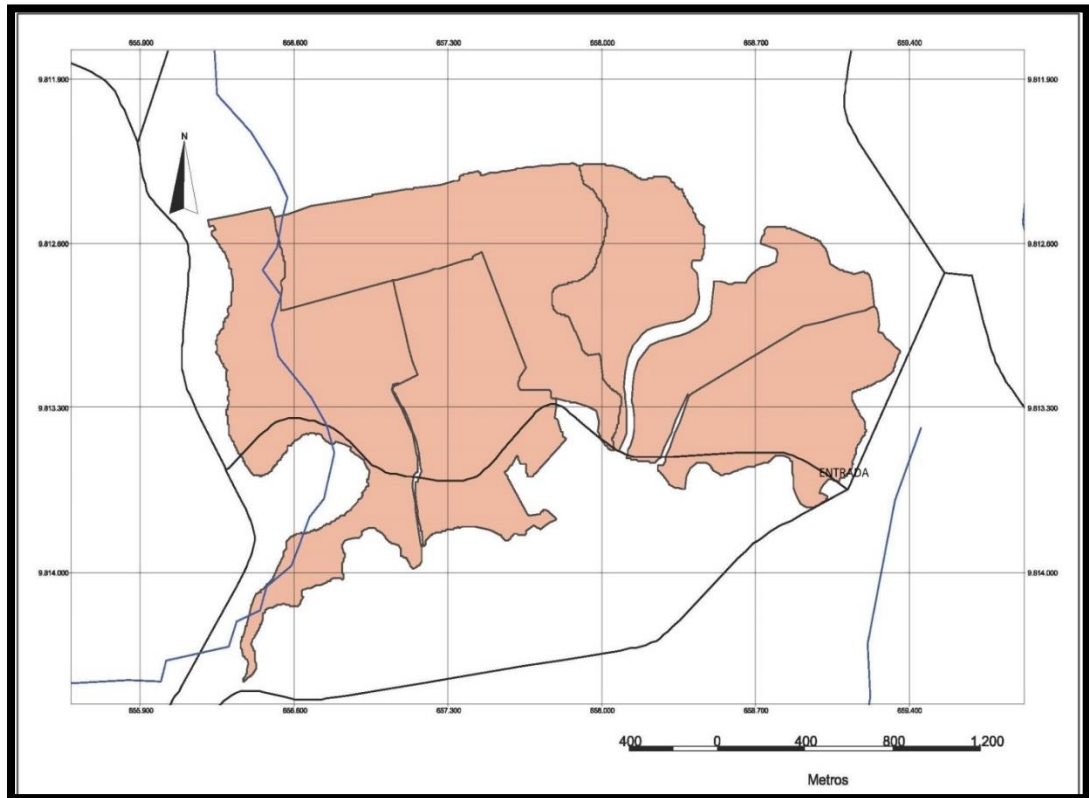
Fuente: Propia

Juntos Puente Caña y Santa Rita recibieron, en los días evaluados, 609 personas. Donde el 76.3% de ellos entraron por Puente Caña. Esto da cierta idea de lo grande que son estas fincas y de la mayor importancia que conlleva Puente Caña en la ejecución de un plan de prevención

Esto dice mucho del tipo de infraestructura que se deba utilizar para la prevención de la enfermedad, por ejemplo: Puente Caña necesitará más amonio cuaternario que Elba o Sta. Rita si se desea mantener la inocuidad en las entradas de las mismas.

Santa Rita es un caso distinto, ya que es una entrada que va directamente hacia María José, pero puede interconectarse con Banaloli al final de la ruta. En este espacio solo recibió 144 el día de la evaluación (que fue el mismo día que se evaluó Puente Caña)

Elba, una finca que tiene sólo una entrada, recibió 252 personas el día de la evaluación, considerablemente menor a las entradas en Puente Caña. Sin embargo cabe señalar, que para poder ingresar a esta finca, se debe cruzar un camino que atraviesa otra finca bananera (Finca “La Julia”) este es una relación entre fincas similar al de Banaloli con María José.



PLANO 3 FINCA ELBA

Fuente: Propia

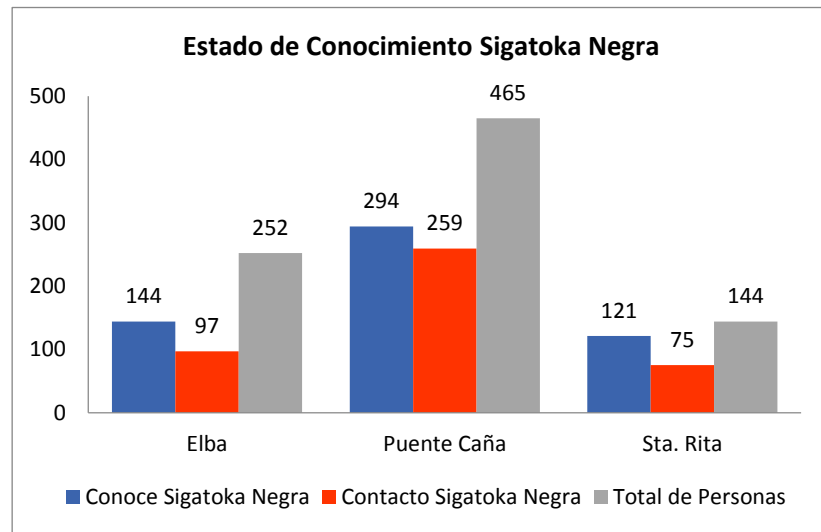
En conclusión, las fincas que tienen una entrada directa hacia la finca, tienen mayor poder de control sobre las personas que entran, que aquellas que comparten una entrada con otra finca vecina. El número de personas que entran a la finca determina la cantidad de recursos que necesita cada entrada para el control de posible inóculo de la enfermedad; es decir, un mayor flujo de personas necesitará de infraestructura más grande para el control de la misma.

c) Estado de conocimiento de enfermedades de banano por parte del personal.

De las 861 personas encuestadas en las tres entradas de las fincas, 7 mencionaron conocer Mal de Panamá y Moko, ambas enfermedades cuarentenarias del banano, y ninguna de ellas mencionó estar en contacto con las enfermedades. Es necesario acotar que las personas que mencionaron conocer estas enfermedades, son personal conocedor de la industria del banano y de sus enfermedades que labora en las instalaciones.

Sin embargo, al cuestionar a las personas a cerca de SN, un mayor número de personas mencionaron conocer esta enfermedad, y un número menor al que dicen conocer la enfermedad, clama haber estado en contacto con ella; este patrón se repite en las tres entradas.

Los datos se encuentran resumidos en la figura a continuación.



En azul, personas que mencionan conocer SN; en rojo, personas que mencionaron estar en contacto con SN; En gris, el total de personas que entraron a las fincas.

FIGURA 5.1 ESTADO DE CONOCIMIENTO DE SN POR PARTE DE LAS PERSONAS QUE ENTRA A LA FINCA.

Fuente: propia

Esto da a conocer que una porción importante de las personas que entran a las fincas no tienen claro lo que es una enfermedad de banano, esto debido a que no todas las personas que mencionan conocer SN claman estar en contacto con ella, a pesar de que el hongo se esparce por medio del viento y aire.

Esto da a una alerta acerca de lo importante que es educar a las personas envueltas en cualquiera de las líneas de producción que implica el banano, especialmente de las que se encuentran dentro

de las fincas. El concientizar al personal acerca de FocTR4, es, tal vez, el paso más importante a tomar en un plan de prevención contra la enfermedad; ya que si se tiene a una población avisada y conocedora de lo que significa estar enfermedad, esta estará más dispuesta a ayudar en la prevención del Mal de Panamá.

d) Tamaño de Finca

Las características de las fincas se ven en la tabla 10. Donde el número de hectáreas entre las 3 fincas rodean, en promedio, las 320. Esto da entender que el nivel de producción de las fincas es similar entre ellas, al igual que su poder económico. Es necesario acatar que estas fincas son de propiedad de Logban S. A., una empresa que puede llevar a cabo un plan de prevención de FocTR4 y asumir todos sus costos.

Sin embargo, si se toma en cuenta la producción de fincas pequeñas a comparación de las del presente estudio, éstas no tendrían las mismas condiciones para sobrellevar los costos del plan de prevención. A esto se suma el hecho que difícilmente reportarán un caso de FocRT4, ya que esto podría implicar el cierre cuarentenario de las fincas, y por consiguiente, una mayor dificultad para vender su producto.

El tamaño de las fincas es, tal vez, un indicador de las fincas más vulnerables a la enfermedad; donde las que tengan el menor poder económico, serán las primeras en colapsar a la enfermedad y, a su vez, actuarán como foco de inóculo de la enfermedad si éstas deciden no reportar la enfermedad.

e) Cuerpos de agua que influyan en la finca

Es conocido que los cuerpos de agua pueden también transportar esporas de FocRT4, por ende deben ser tomados en cuenta como posible fuente de inóculo.

Las fincas estudiadas toman agua de esteros que cruzan a las fincas. Estos esteros, por lo general, suelen tener suficiente agua en la época después del invierno, pero en época seca, este acostumbra a ser llenado con agua de ríos más grandes, como el Catarama.

Si tomamos en cuenta que el personal que visita las fincas suelen bañarse, en su mayoría, en ríos grandes como lo es el Babahoyo o Catarama, se puede concluir que las fincas suelen tomar agua de ríos con inóculo potencial de FocRT4.

f) Medios de transporte utilizados dentro y hacia la finca

Los datos son resumidos en la figura 8:

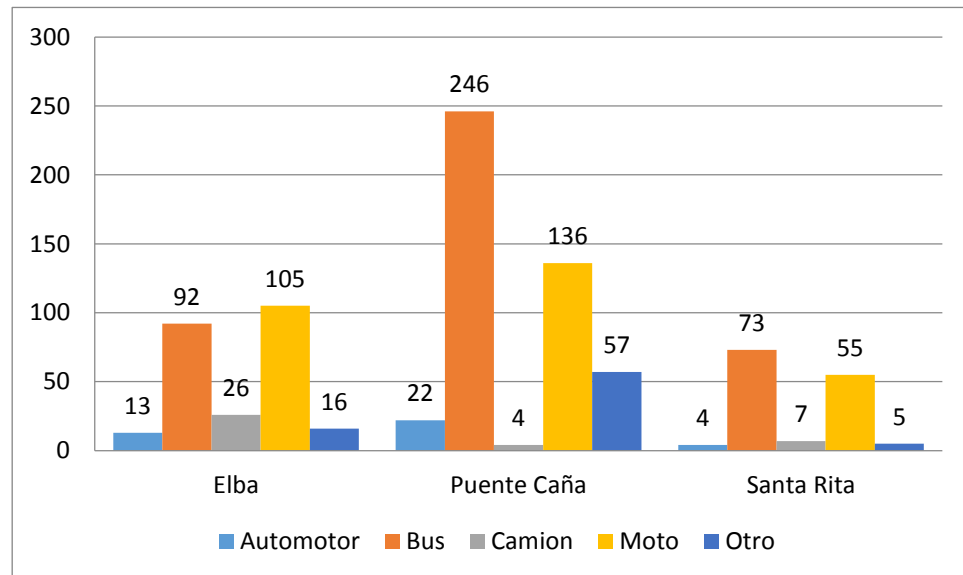


FIGURA 5.2 NÚMERO DE PERSONAS QUE ENTRAN POR MEDIO DE TRANSPORTE

En azul, autos; en rojo, buses; en verde, camiones de carga; en morado, moto; en celeste, otros (incluye: bicicletas, triciclos, a pie). Fuente: propia

Aquí se muestran los distintos escenarios que enfrenta cada finca al momento de controlar el personal al ingreso de la misma. Los buses y las motocicletas son los medios de transporte predilectos para ingresar a las fincas.

Es decir que el tipo de infraestructura que debe predominar en las entradas son pediluvios y lavaderos de buses. Los camiones de

carga pesada y automóviles son mucho menos frecuentes que el resto de medios de transporte.

Es necesario señalar, que en el momento de ingreso de los buses a las fincas, las personas que van dentro no suelen bajarse hasta llegar a sus puntos de trabajo, que por lo general son las empacadoras que quedan en el centro de la finca, esto muestra un desafío en el momento de controlar el posible patógeno que se encuentre en las fincas.

g) Cuerpos de agua que son frecuentados por el personal de finca

Los cuerpos de agua que son frecuentados por el personal, da cierta idea de hacia dónde se puede movilizar un posible inóculo de FocRT4 y/o donde más probablemente aparezca primero.

Este último dato es clave para conocer hacia donde se esparciría el inóculo en caso de que se presente. Si tomamos en cuenta las corrientes de los ríos, el inóculo será transportado hacia el suroeste del Ecuador, desembocando finalmente en el Río Guayas. Esto significa que toda plantación bananera que tome agua del Río

Babahoyo, muy probablemente esparcirá las esporas de FocRT4 en su plantación.

Resultados de Diagnóstico Molecular de FocRT4

La extracción de ADN fue exitosa, en donde se confirmó mediante PCR la presencia de ADN de banano. Sin embargo, al realizar la detección utilizando primers específicos para *Fusarium* spp., Foc Raza 1, Foc Raza 2 y FocRT4, no se detectó amplificación alguna, sugiriendo que las muestras analizadas no poseen *Fusarium*. Sin embargo, es necesario realizar pruebas con bananos infectadas con *Fusarium*, ya que las muestras recolectadas en este estudio, no se confirmó si los síntomas observados de marchitez, fueron ocasionados por *Fusarium*, y probablemente sean por un estrés abiótico como sequía o salinidad.

Plan de Prevención y Erradicación

Con los datos recolectados podemos establecer un plan de Prevención y Erradicación en la finca. Este debe tomar en cuenta 3 fases que se muestran a continuación:

Fase 1: Concientización, educación y preparación.

Solo 7 de las 861 personas encuestadas a las entradas de la finca mostraron conocer de la enfermedad, y de lo que la misma implica. Si la gente conoce como se disemina esta enfermedad, y se le educa en cómo prevenirlo, el riesgo de contraer esta enfermedad disminuye.

La importancia de la enfermedad debe ser recalcada al personal, para que el proceso de inocuidad sea tomado en serio y por lo tanto, sea llevado a cabo responsablemente por parte de todos.

Agrocalidad desarrolló un manual de bioseguridad para banano, en el cual menciona la importancia del manejo del personal a nivel educativo. Señalización y letreros acerca de las zonas de cuarentenas y de la importancia de la enfermedad deben estar ubicados en cada entrada de la finca (56).

Esta fase también incluye una etapa de preparación, donde se deben llevar a cabo simulacros de cuarentena según el reglamento oficial de Agrocalidad. El personal debe estar listo y entrenado para cuando ocurra un avistamiento de la enfermedad, ya que entre más

rápido se llegue a actuar y con menos errores dentro del proceso, menor es el riesgo de esparcimiento.

Este procedimiento debe ser seguido por toda finca, independientemente de su tamaño o paisaje.

Fase 2: Instalación de Infraestructura.

Agrocalidad en su plan de contingencia, menciona que también debe haber un manejo de los vehículos además del personal. Pediluvios deben ser ubicados en las entradas de las fincas y en sus empacadoras también, especialmente en los sitios que dan directo a los caminos de la finca. Si es posible, el personal debe caminar con botas de caucho que se mantengan en la finca, en un cuarto exclusivo de cambio de botas a las entradas de la fincas.

Debe haber estaciones de lavados de automóviles donde se lave suelo y semillas de malezas. Las estaciones deben estar alejadas de las plantaciones y ubicados de tal manera que los vehículos estén obligados a pasar por él, su drenaje no debe desembocar hacia ríos o hacia la plantación.

Si es posible, a los visitantes se los debe transportar con un vehículo propio de la finca. Los visitantes deben parquarse en una zona exclusiva para visitantes, donde ahí deben pasar por pediluvios y puedan cambiarse de calzado antes de ingresar a las fincas, esto es especialmente necesario si estos visitantes ingresaron a otras fincas.

Las estaciones de lavado deben acomodarse a las necesidades de cada entrada. Elba y Puente Caña deben tener una estación de lavado lo suficientemente grande para desinfectar al menos 2 buses a la vez, mientras que en Santa Rita basta con uno, esto debido a que el número de entradas de personas y vehículos es más pequeño que el de las otras dos fincas.

Elba y Puente Caña deben tener infraestructura adecuada para la desinfección de motocicletas, capaces de ser usadas constantemente y duraderas, ya que estas serán las que más utilizadas.

En las estaciones de bombeo de agua, de todas las fincas, debe adaptarse un sistema de desinfección del agua, esto para minimizar el riesgo de inóculo acuático que pueda traer. Elba

puede no tener la necesidad de ésto ya que toma agua de un río no muy concurrido por la gente, sin embargo, río arriba existen muchas plantaciones bananeras que pueden generar inóculo.

Las cercas alrededor de los linderos de las fincas son muy importantes si se quiere evitar que otras personas o animales ingresen a la finca sin antes haber sido desinfectados, las cercas deben de estar presentes, en especial Finca Elba que colinda con otra finca (Finca “La Julia”).

Fase 3: Erradicación

Esta fase es exclusiva en caso de aparezca un caso de Fusariosis en las fincas.

Agrocalidad, ya tiene un plan de cuarentena oficial para un posible caso de FocTR4 en el país. Este incluye el cercado e inmovilización de material a 15 m a la redonda de la planta afectada. Ubicación, con pediluvios, de una sola entrada a la zona de cuarentena, y erradicación de la planta enferma y de los hijos de la planta con inyecciones de glifosato. Esto se debe repetir hasta que la planta esté totalmente muerta. Una vez muerta la planta, se procede a la quema del área delimitada.

Esta fase debe ser seguida por toda finca que se encuentre en territorio ecuatoriano en caso de que encuentre un caso de FocTR4.

Recomendaciones

Se recomienda:

- Tener en cuenta, para futuro análisis de riesgo, cuales son las personas con educación en ciencias agrícolas que entran a las fincas y tomar especial atención a su presencia en las fincas.
- Tomar una muestra de Foc Raza 1 como control positivo de la enfermedad en el momento de realizar un diagnóstico molecular.

APÉNDICES

APÉNDICE B

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN

EXTRACCIÓN DE ADN MÉTODO CTAB

EXTRACCIÓN ADN CTAB				
Reactivos	Concentraciones iniciales	Concentraciones finales	Volumen (1ml)	Volumen (10ml)
CTAB	7%	2.8%	400µl	4ml
NaCl	5M	1.3M	267µl	2.670µl
EDTA (Ph8.0)	0.5M	20mM	40µl	400µl
Tris – HCL (pH 8.0)	1M	10mM	100µl	1ml
PVP (40.000)	---	1%	10mg	100mg
β-mercapto ethanol	---	0.2%	2µl	20µl
ddH ₂ O	---	Completar 1ml	191µl	1910µl

- 1.- Preparar 1ml por muestra a extraer de la solución descrita anteriormente (manteniendo las concentraciones y descripciones iniciales).
- 2.- En 120mg de tejido macerado adicionar 800µl del buffer de extracción a cada muestra, mezclar en vortex.
- 3.- Adicionar proteinasa K (20 µg/ µl) y colocar a baño María (65° C) durante 1 hora, invirtiendo los tubos cada 10 minutos.
- 4.- Retirar los tubos del baño María y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 5.- Adicionar 700µl de cloroformo-isoamil (24:1), agitar por inversión los tubos hasta que este turbio.
- 6.- Centrifugar durante 10 minutos a 14,000rpm / 4° C, retirar el sobrenadante y colocarlo en tubo nuevo de 2ml.
- 7.- Adicionar 55µl de CTAB 7% mezclar ligeramente por 5 minutos y repetir el paso 5 y 6.
- 8.- Retirar el sobrenadante colocarlo en un tubo nuevo de 2ml y adicionar 700µl de isopropanol frio mezclar invirtiendo el tubo por 5 minutos, colocar las muestras en -20° C durante 30 minutos (puede quedarse toda la noche a 4° C).
- 9.- Centrifugar por 10 minutos a 14,000 rpm/4° C, remover el sobrenadante y lavar 2 veces el pellet con 200µl de etanol al 70% y volver a centrifugar a las mismas condiciones pasadas. Secar a temperatura ambiente de 15-20 minutos.
- 10.- Resuspender el ADN en 100µl de agua con RNase a concentración final de 40µg/ml y colocar en baño María para disolver el pellet de 10 a 15 minutos.
- 11.- Adicionar NaCl (5M) en proporción 1:10 (NaCl : ADN) y 2/3 del volumen de isopropanol frio volver a precipitar.
- 12.- Incubar a 4° C toda la noche o a -20° C por 3 horas.
- 13.- Repetir el paso 9 y resuspender en agua.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) 1. **Stover, R. H. and Simmonds, N. W.** *Bananas*. Harlow, UK : Longman Scientific and Technical, 1987.
- 2) 2. **Jones, David.** *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. New York : CABI Publishing, 2000.
- 3) 3. **Arias, Pedro, et al., et al.** *LA ECONOMÍA MUNDIAL DEL BANANO 1985-2002*. Roma : FAO, 2004.
- 4) 4. **FAO.** FAOSTAT. *FAOSTAT*. [Online] 10 23, 2014. [Cited: 01 20, 2015.] <http://faostat3.fao.org/search/BANANA/E>.
- 5) 5. **ProEcuador.** *Análisis del Sector Bananero, 2013*. Guayaquil : ProEcuador, 2013.
- 6) 6. **BCE.** *Análisis de Coyuntura*. Guayaquil : Banco Central del Ecuador, 2014.
- 7) 7. **BASIC.** *Analysis of German banana value chains and impacts on small farmers & workers*. s.l. : Bureau d'Analyse Societale pour une Information Citoyenne, 2014.
- 8) 8. *Susceptibility of banana cultivars to fungus leaf diseases in Fiji.* **Firman, I. D.** 1972, *Tropical Agriculture (Trinidad)*, pp. 189-196.
- 9) 9. *Produccion de Platano en Presencia de la Sigatoka Negra.* **Stover, R. H.** 1987, *Union de Paises Exportadores de Banano*, Informe mensual 82., pp. 50-56.

- 10) 10. **Dita, Miguel Angel, Echegoyén, Plutarco Elías and Perez-Vicente, Luis Fernando.** *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.* San Salvador : OIRSA, 2013.
- 11) 11. **James, Andrew C., et al., et al.** Fungal Diseases of Banana. [book auth.] Alisha E. Cohen. *Bananas: Nutrition, Diseases and Trade Issues.* New York : NOVA, 2011.
- 12) 12. *The species concept of fusarium.* **Snyder, W. C. and Hansen, H. N.** 1940, American Journal of Botany, pp. 64-67.
- 13) 13. *Taller Regional para la Elabroacion de una Estrategia Continental contra el riesgo de Ingreso del Mal de Panama Raza 4 Tropical.* **Kema, Gert.** Guayaquil : Agrocalidad, 2014. Advancing Fusarium Oxysporum f. sp. cubense research.
- 14) 14. **Aycart, Juan Jose.** *Comunicacion personal.* [interv.] Victor Alfredo Zuñiga. 09 01, 2014.
- 15) 15. *Estado de la incidencia en Asia del marchitamiento por Raza4 tropical de Fusarium en el cultivo del banano.* **Molina, A. B.** San Salvador : OIRSA, 2009. Reunion de Grupos de Interes sobre los Riesgos de la Raza 4 tropical de Fusarium, BBTv y otras Plagas de Musáceas. p. 71.
- 16) 16. **IITA.** New banana disease to Africa found in Mozambique. *iita.org.* [Online] November 01, 2014. <http://www.iita.org/2013-press->

releases/-/asset_publisher/CxA7/content/new-banana-disease-to-africa-found-in-mozambique#.VPdLCHzF9y0.

- 17) 17. *First Report of Fusarium oxysporum f. sp. cubense Tropical Race 4 associated with Panama Disease of banana outside Southeast Asia.* **García-Bastidas, F., et al., et al.** 2013, Plant Disease.
- 18) 18. **Fresh Plaza.** Panama disease detected in Pakistan, Lebanon. *Fresh Plaza.* [Online] 1 4, 2015. <http://www.freshplaza.com/article/137640/Panama-disease-detected-in-Pakistan%2c-Lebanon>.
- 19) 19. **Cohen, Alisha E.** *Bananas: Nutrition, Diseases and Trade Issues.* New York : NOVA, 2011.
- 20) 20. *A DNA sequence-based phylogenetic structure for the Fusarium oxysporum species complex.* **O'Donell, K. and Cigelnik, E.** 1999, *Phytoparasitica* 27, p. 69.
- 21) 21. **Ploetz, R. C. and Pegg, K. G.** *Fusarium Wilt.* [book auth.] D. R. Jones. *Diseases of Banana, Abacá and Enset.* New York : CABI Publishing, 2000, p. 143.
- 22) 22. **Stover, R. H.** *Fusarial Wilt (Panama disease) of bananas and other Musa species.* Kew, Surrey, UK : Commonwealth Mycological Institute, 1962.
- 23) 23. *Fusarium wilt (Panama disease) of bananas: An updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent.* **Perez-**

- Vicente, Luis.** Oaxaca : ACORBAT, 2004. XV Reunion Internacional de ACORBAT. pp. 1-14.
- 24) 24. **Ploetz, R. C.** Panama Disease: An old nemesis rears its ugly head Part 1. The beginnings of the banana export trades. *APSNET.org*. [Online] August 2005. <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Documents/2005/PanamaDisease1.pdf>.
- 25) 25. —. Panama Disease: An Old Nemesis Rears Its Ugly Head. Part 2. The Cavendish Era and Beyond. *Apsnet.org*. [Online] October 2005. <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Documents/2005/PanamaDisease2.pdf>.
- 26) 26. **Perez-Vicente, Luis, Dita, Miguel A. and Martinez-de la Parte, Einar.** *Technical Manual: Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana caused by Fusarium oxysporum f. sp. cubense Tropical Race 4 (TR4)*. Roma : FAO, 2014.
- 27) 27. *Landscape epidemiology of Plant Diseases*. **Plantegenest, Manuel, Le May, Christopher and Fabre, Frederic.** 2007, Journal of The Royal Society, pp. 963-972.
- 28) 28. *Large-scale spatial dynamics of a specialist plant pathogen in a fragmented landscape*. **Laine, Anna-Lissa and Hanski, Ilkka.** 2006, Journal of Ecology, pp. 217-226.

- 29) 29. **Chapman, Chris and Ward, Stephen.** *Project Risk Management: Processes, Techniques and Insights*. s.l. : Wiley, 2003.
- 30) 30. *Riesgo: concepto básico de la epidemiología.* **Filho, Naomar de Almeida, Castiel, Luis David and Ayre, Luis Ricardo.** 2009, Salud Colectiva, pp. 323-344.
- 31) 31. **Agrios, George.** *Plant Pathology*. s.l. : Academic Press, 2005.
- 32) 32. *High-Temperature, Adult-Plant Resistance to Wheat Stripe Rust and Effects on Yield Components.* **Shultz, T.R and Line, R.F.** 1992, Agronomy Journal (American Society of Agronomy), pp. 170-175.
- 33) 33. **B.V., CGE Risk Management Solutions.** Risk Matrices. *CGE Risk Management Solutions B.V.* [Online] 01 20, 2015. <http://www.cgerisk.com/knowledge-base/risk-assessment/risk-matrices>.
- 34) 34. **International Organization for Standardization.** *Space Systems Risk Management*. s.l. : International Organization for Standardization, 2003.
- 35) 35. *Diversity in Interpretations of Probability: Implications for Weather Forecasting.* **De Elia, Ramon and Laprise, René.** 2005, MONTHLY WEATHER REVIEW, pp. 1129-1143.
- 36) 36. **Hajek, Alan.** Interpretations of Probability. *The Stanford Encyclopedia of Philosophy (Winter 2012 Edition)*. [Online] 12 19, 2011. [Cited: 09 25, 2014.]

<http://plato.stanford.edu/archives/win2012/entries/probability-interpret/>.

- 37) 37. **CDC**. Centers for Disease Control and Prevention. *cdc.gov*. [Online] July 10, 2014. [Cited: November 01, 2014.] <http://www.cdc.gov/quarantine/>.
- 38) 38. **FAO**. Principios de cuarentena fitosanitaria en relacion con el comercio internacional. *Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias* . Roma : FAO, 1995.
- 39) 39. *Biology and integrated pest management for the banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae)*. **Gold, E. J., Pena, J. E. and Karamura, E. B.** 2001, Integrated Pest Management Review, pp. 79-155.
- 40) 40. *Spread of an invasive pathogen over a variable landscape: a nonnative root rot on Port Oxford cedar*. **Jules, E. S., et al., et al.** 2002, Ecology, pp. 3167-3181.
- 41) 41. *Travel and the Emergence of Diseases*. **Wilson, Mary E.** 1995, Emerg Infect Diseases, pp. 39-46.
- 42) 42. **Perez-Vicente, Luis, Batlle, Alicia and Dita, Miguel A.** Protocol for determination of vegetative compatibility groups (VCGs): Technique of Puhalla (1985) and Correll et. al. (1987) based on the generation of auxotrophic mutants that do not use NO₃ (NIT mutants). [book auth.] Luis Perez-Vicente, Miguel A. Dita and Einar

Martinez-de la Parte. *Technical Manual: Prevention and diagnostic of Fusarium wilt (Panama disease) of banana caused by Fusarium oxysporum f. sp. cubense Tropical Race 4 (TR4)*. Rome : FAO, 2014, pp. 40-51.

- 43) 43. *A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen.* **Dita, M. A., et al., et al.** 2010, Plant Pathology, pp. 348-357.
- 44) 44. *Primer-directed enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* **Saiki, R. K., et al., et al.** 1985, Science, pp. 1230-1350.
- 45) 45. *Development of a molecular marker for specific detection of Fusarium oxysporum f. sp. subense race 4.* **Lin, Y. H., et al., et al.** 2008, Eur J Plant Pathol.
- 46) 46. *Diagnostico mediante qPCR de las razas 1, 2 y 4 Tropical de Fusarium oxysporum f. sp. cubense, Agente Causal del Mal de Panama de las Musaceas.* **Perez-Vicente, Luis, Martinez-de la Parte, Einar and Borrás-Hidalgo, Orlando.** Colombia : CORPOICA, 2013. II Congres Latinoamericano y del Caribe de Platanos y Bananos.
- 47) 47. *Development of a single-tube duplex real-time fluorescence method for the rapid quantitative detection of Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 1 (FOC1) and race 4 (FOC4) using TaqMan*

- probes. **Yang, Lei-Liang, et al., et al.** 2015, Crop Protection, pp. 27-35.
- 48) 48. **Dita, Miguel Angel, Echegoyén, Plutarco Elías and Perez-Vicente, Luis Fernando.** *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.* San Salvador : OIRSA, 2013.
- 49) 49. **Agrocalidad.** *Plan Nacional de Contingencia para Fusarium oxysporum f. sp. cubense (Foc RT4).* Quito : Agrocalidad, 2013.
- 50) 50. *Biocontrol of Fusarium wilt of banan: Key influence factos and strategies.* **Gang, Guo, et al., et al.** 2013, African Journal of Microbiology Research, pp. 4835-4843.
- 51) 51. **OPTUR.** Estadísticas Turismo Ecuador Entradas Salidas Ecuador. *OPTUR.* [Online] 09 10, 2014. <http://www.optur.org/estadisticas-turismo.html>.
- 52) 52. **ONU.** United Nations Statistics Division - Standard country and area codes Classifications. *United Nations Statistics Division.* [Online] 09 10, 2014. <http://millenniumindicators.un.org/unsd/methods/m49/m49regin.htm>.
- 53) 53. *Aislamiento de ADN Genómico (Para cualquier tejido de plantas y hongos filamentosos).* **Santos, Efren.** 2008.
- 54) 54. *Estudio para la determinación del peligro de introducción del marchitamiento por Fusarium del banano, análisis del componente*

- migratorio para Ecuador. Aycart, Juan and Zuñiga, Victor. 2015, Agrocalidad.*
- 55) 55. **Organización mundial para las Migraciones.** *Informe sobre las migraciones en el mundo 2013.* Ginebra : Organización mundial para las Migraciones, 2013.
- 56) 56. **Plant Health Australia.** *Farm Biosecurity Manual for the Banana Industry, Version 1.0.* Queensland : Plant Health Australia, 2009.
- 57) 57. *Are banana weevil borers a vector in spreading Fusarium oxysporum f. sp. cubensis tropical race 4 in banana plantations?* **Meldrum, R. A., et al., et al.** 2013, Australasian Plant Pathology, pp. 543-549.
- 58) 58. **Last, J. M.** *A dictionary of epidemiology.* New York : Oxford University Press, 1989.
- 59) 59. **Laplace, Pierre-Simon.** *A Philosophical Essay on Probabilities (1951 Edition).* New York : Dover Publications Inc., 1814.
- 60) 60. *Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies.* **O'Donnell, K, et al., et al.** 1998, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, pp. 2044-2049.
- 61) 61. *Quarantine pests of Banana, an Australian perspective.* **Drenth, A.** Guayaquil : Agrocalidad, 2014. Taller Regional para la

elaboración de una estrategia continental contra el riesgo de Ingreso del Mal de Panamá Raza 4 Tropical.