

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca		 AGROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	
Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> (Foc R4T)		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
PROCESO: SANIDAD VEGETAL		SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA	
REQUISITO DE LA NORMA: 7.1			

## REPÚBLICA DEL ECUADOR

### MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, ACUACULTURA Y PESCA

#### AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO – AGROCALIDAD



**AGROCALIDAD**  
 AGENCIA ECUATORIANA  
 DE ASEGURAMIENTO  
 DE LA CALIDAD DEL AGRO

### Plan Nacional de Contingencia para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (Foc R4T)

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca		 AGROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE ASESORAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>		<b>SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 7.1</b>			

### Sección 1. Control, expedición, revisión y distribución del documento

Este documento y sus subsiguientes revisiones son expedidos y controlados por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCALIDAD. Se distribuye a todas las localidades dentro de la República de Ecuador, donde se ejecutan las actividades y procesos descritos en el mismo.

Este documento se encontrará disponible en la página web: [www.agrocalidad.gob.ec](http://www.agrocalidad.gob.ec) para su aplicabilidad en todo el territorio ecuatoriano.

Dadas las características de dinamismo de las acciones que contempla este Documento y todos aquellos aspectos que en determinado momento pueden ser objeto de reglamentación, se requiere una constante actualización mediante la sustitución de hojas. Las hojas que sean modificadas serán sustituidas por nuevas las cuales deberán llevar la fecha en la cual se efectuó la modificación y la disposición legal que la autoriza.

Cualquier modificación del presente documento requerirá de la aprobación del Director de Sanidad Vegetal de AGROCALIDAD.

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca		 ASESORÍA AGENCIA ECUATORIANA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA DE LA CADENA DEL ALIMENTO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
PROCESO: SANIDAD VEGETAL		SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA	
REQUISITO DE LA NORMA: 7.1			

Sección 2. Tabla de contenidos

Sección 1. Control, expedición, revisión y distribución del documento .....	2
Sección 2. Tabla de contenidos .....	3
Sección 3. Antecedentes.....	5
3.1. Objetivo .....	5
3.2. Glosario de términos .....	5
3.3. Abreviaturas.....	6
3.4. Base legal .....	7
3.6 Punto oficial de contacto, Organización Nacional de Protección Fitosanitaria de la República de Ecuador.....	8
Sección 4. Responsabilidades .....	8
Sección 5. Coordinación Interinstitucional .....	10
5.1. Vigilancia y Control.....	10
5.2. Reconocimiento y diagnóstico .....	10
5.3. Comunicación y divulgación.....	10
Sección 6. Información de la Plaga.....	10
Sección 7. Procedimientos de prevención .....	11
7.1. Perfiles de Peligro para el control de pasajeros .....	11
7.2. Medidas de control para medios de transporte.....	11
7.3. Certificación y registro de viveros, laboratorios y material de propagación de Musáceas nacionales y de importación.....	11
Sección 8. Métodos de detección e identificación de la plaga.....	12
8.1 Métodos de detección .....	12
8.1.1 Selección de especies y lugares de monitoreo y prospección .....	12
8.2. Protocolos de Identificación.....	13
Sección 9.- Medidas de Erradicación.....	13
Sección 10.- Plan de comunicación y capacitación.....	14
ANEXOS .....	15
Anexo 1.- Ficha Técnica <i>Fusarium oxysporum</i> F. sp. <i>cupense</i> raza 4 tropical (Mal de Panamá) .....	16

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca		 ASOCIACIÓN AGROPECUARIA ECUATORIANA DE ASESORAMIENTO DE LA CADENA DEL BANANO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
PROCESO: SANIDAD VEGETAL		SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA	
REQUISITO DE LA NORMA: 7.1			

Anexo 2.- PLAN NACIONAL DE ACCIÓN PARA CONTROLAR Y ERRADICAR POSIBLES FOCOS DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> raza 4 tropical.....	24
Anexo 3.- Denuncia Fitosanitaria .....	32
Anexo 4.- Protocolos para la producción libre de plátano y otras musáceas proveniente de predios libres de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> raza 4 tropical.....	33
Anexo 5.- Lista de Hospederos <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> R4T.....	36
Anexo 6.- Plan de comunicación para la prevención del mal de panamá ( <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> R4T) en ECUADOR.....	37
Anexo 7.- Temas de capacitación para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> R4T.....	41
Anexo 8.- Manual de procedimientos técnicos para el registro y certificación de centros de producción, viveros y productores de material vegetal de propagación de banano y otras musáceas	43
Anexo 9.- Instructivo específico de toma y envío de muestras de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ubense</i> raza 4 tropical para el laboratorio de biología molecular vegetal.....	44
Anexo 10.- Diagnóstico PCR convencional para la detección de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ubense</i> raza 4 tropical.....	45
Anexo 11.- Resolución 048 que establece las medidas y los requisitos fitosanitarios generales y específicos para la importación de plantas in vitro de musáceas ( <i>Musa</i> spp.) obtenido por biotecnología moderna .....	46

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca		 AGROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE REGULARIZACIÓN DE LA CADENA DEL AGRO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>		<b>SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 7.1</b>			

### Sección 3. Antecedentes

En América Latina y el Caribe, aunque no es el centro de origen de los plátanos y bananos, se produce un 28% de la producción mundial. En relación al banano, aproximadamente 20 millones de toneladas son de consumo local (64% de la producción) y siete países de la región están entre los diez primeros países exportadores de banano. Así mismo, el 99% de los plátanos exportados se producen en América Latina (FAOSTAT, 2009).

En la economía ecuatoriana la producción y comercialización de banano juega un papel importante ya que representa el segundo rubro en importancia después del petróleo. En el Ecuador existen aproximadamente 163.960 ha. (Catastro bananero 2013); la mayor producción de banano en el país se concentra en las provincias de Guayas, Los Ríos y El Oro, mientras que la mayor producción de plátano se localiza en El Carmen provincia de Manabí.

En el 2012, el sector bananero ecuatoriano exportó USD 2.078.239,38 millones de dólares por concepto de divisas y 5.196.065,09 de toneladas ubicando al banano como el primer producto de exportación del sector privado del país y uno de los principales contribuyentes al fisco. Entre los productos no tradicionales, las exportaciones ecuatorianas de banano, representan el 45.34% del valor FOB exportado y el 87.14% de las toneladas exportadas. (PROECUADOR, 2013)

La plaga más destructiva de musáceas es *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* que provocó la desaparición de miles de hectáreas de la variedad Gros Michel en la década de los 60 con un impacto económico (solo estimado para las compañías exportadoras) de US \$2,300 millones; donde la única solución fue cambiar el cultivo a la variedad Cavendish.

La aparición en el sudeste asiático a principios de los 90 de la raza 4 tropical (R4T), la cual afecta a las variedades del subgrupo Cavendish y a otras variedades como son plátanos (AAB), bananos de cocción tipo Bluggoe (ABB), Gros Michel (AAA), Prata (AAB) y Manzano (AAB), constituye una seria amenaza para la producción de musáceas en el Ecuador.

Con estos antecedentes, AGROCALIDAD, a través de la Dirección de Sanidad Vegetal, establece el Plan Nacional de Contingencia para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (Foc R4T).

#### 3.1. Objetivo

Proporcionar las bases técnicas y los procedimientos para la implementación de acciones fitosanitarias que permitan prevenir, detectar, controlar y erradicar en forma apropiada posibles brotes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc R4T) en el Ecuador.

#### 3.2. Glosario de términos

Para el presente Plan de Contingencia se utilizarán los términos establecidos en la NIMF No. 5: “Glosario de Términos Fitosanitarios”, de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF), Resolución 027 de la Comunidad Andina (CAN) y los siguientes términos:

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca		 ASESORÍA AGENCIA ECUATORIANA DE ASESORÍA TECNOLÓGICA DE LA CADENA DEL ALIMENTO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
PROCESO: SANIDAD VEGETAL		SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA	
REQUISITO DE LA NORMA: 7.1			

<b>Denuncia</b>	Documento en que se da noticia a la autoridad competente de la comisión de un delito o de una falta. (RAE)
<b>Erradicación</b>	Aplicación de <b>medidas fitosanitarias</b> para eliminar una <b>plaga</b> de un <b>área</b> [FAO, 1990; revisado FAO, 1995; anteriormente <b>erradicar</b> ]
<b>Incidencia</b>	Número de plantas o partes de la planta afectada.
<b>Infestación</b>	Presencia de una plaga viva en un <b>producto básico</b> , la cual constituye una <b>plaga</b> de la <b>planta o producto vegetal</b> de interés. La <b>infestación</b> también incluye infección [CEMF, 1997; revisado CEMF, 1999]
<b>Inspección</b>	Examen visual <b>oficial</b> de <b>plantas, productos vegetales</b> u otros <b>artículos reglamentados</b> para determinar si hay <b>plagas</b> y/o determinar el cumplimiento con las <b>reglamentaciones fitosanitarias</b> [FAO, 1990; revisado FAO, 1995; anteriormente <b>inspeccionar</b> ]
<b>Medida Fitosanitaria</b>	Cualquier legislación, reglamento o procedimiento oficial que tenga el propósito de prevenir la introducción y/o dispersión de plagas cuarentenarias o de limitar las repercusiones económicas de las plagas no cuarentenarias reglamentadas [FAO, 1995; revisado CIPF, 1997; CIMF, 2002; aclaración, 2005]
<b>Peligro Fitosanitario</b>	Potencialidad de cualquier especie, raza o biotipo vegetal, animal o agente, de resultar dañino para las plantas o productos vegetales.
<b>Prospecciones</b>	Procedimiento oficial conducido por un período definido de tiempo para determinar las características de la población de una plaga o para determinar qué especies ocurren en un área.
<b>Riesgo Fitosanitario</b>	Probabilidad de introducción y dispersión de un plaga y magnitud de las posibles repercusiones económicas asociadas a ellas
<b>Severidad</b>	Cantidad de tejido afectado
<b>Sitio de Monitoreo</b>	Lugar correspondiente a una superficie representativa de un cultivo o un lugar de acopio, selección o almacenamiento de productos agrícolas, donde se realiza la inspección.
<b>Vigilancia Fitosanitaria</b>	Un proceso <b>oficial</b> mediante el cual se recoge y registra información sobre la <b>presencia</b> o ausencia de una <b>plaga</b> utilizando <b>encuestas, monitoreo</b> u otros procedimientos [CEMF, 1996]

### 3.3. Abreviaturas

CAN	Comunidad Andina
CIPF	Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
Foc R4T	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>
NIMF	Norma Internacional de Medidas Fitosanitarias
OMC	Organización Mundial de Comercio
ONPF	Organización Nacional de Protección Fitosanitaria
RI	Reporte de Inspección

 <b>Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca</b>		 <b>ASECUALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASESORAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>		<b>SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 7.1</b>			

### 3.4. Base legal

- a) Ley de Sanidad Vegetal publicada en el Registro Oficial Suplemento N° 315 de 16 de abril de 2004 y el Reglamento a la Ley de Sanidad Vegetal publicada en el Registro Oficial Suplemento 1 de 20 de marzo de 2003.
- b) Decreto Ejecutivo 1449 publicado en el Registro Oficial N° 479 de 2 de diciembre de 2008.
- c) Decisión 515 de la Comisión de la Comunidad Andina: Sistema Andino de Sanidad Agropecuaria
- d) Resolución 1475 de la Comunidad Andina del 31 de marzo de 2006: Adopción de Categorías de Riesgo Fitosanitario para el comercio intra-subregional y con terceros países de plantas, productos vegetales y otros artículos reglamentados
- e) Ley de Sanidad Vegetal y su Reglamento, Codificación 8, Registro Oficial Suplemento 315 de 16 de Abril del 2004, República de Ecuador.
- f) Resolución No. 24 del 5 de junio del 2008, en la cual se aprueba el Sistema de Vigilancia Fitosanitaria como procedimiento técnico para mantener actualizada la información fitosanitaria nacional, a través de la detección oportuna de la ocurrencia o ausencia de plagas.
- g) Resolución No. 154 del 23 de septiembre de 2010, en la cual se aprueba el Manual Operacional de Vigilancia Fitosanitaria, para realizar actividades de recolección y registro de información fitosanitaria sobre la presencia o ausencia de plagas.
- h) Resolución No. 042 del 11 de mayo de 2011, que establece de manera obligatoria el control y manejo de plantaciones abandonadas.
- i) Resolución No. 043 del 4 de junio de 2013, que establece expedir el Manual de Fincas y/o sitios que representan riesgo fitosanitario.
- j) Resolución 048 del 17 de mayo del 2011 que establece las medidas y los requisitos generales y específicos para la importación de plantas in vitro de musáceas (*Musa* spp. Obtenido por biotecnología moderna (cultivo de meristemas)
- k) Resolución 036 que establece el Manual de Procedimientos Técnicos para el Registro y Certificación de Centros de Producción, Viveros y Productores de Material Vegetal de propagación de banano y otras musáceas
- l) Resolución 138 del 27 de mayo de 2013 que establece los manuales y protocolos de procedimientos para el rubro banano

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca		 AGROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>		<b>SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 7.1</b>			

- m) Resolución 033 del 06 de marzo de 2014, que establece la Guía para el control de pasajeros internacionales y sus equipajes.
- n) Decisión 767 de la CAN Modificaciones a la Decisión 436 (Norma Andina para el Registro y Control de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola)
- o) Instructivo INT/BM/ 24. Instructivo específico de toma y envío de muestras de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical para el laboratorio de Biología Molecular-Vegetal
- p) Procedimiento PEE/BM/02. Diagnostico PCR convencional para la detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical

### 3.6 Punto oficial de contacto, Organización Nacional de Protección Fitosanitaria de la República de Ecuador

El punto oficial de contacto en la República de Ecuador es la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCALIDAD. Todas las comunicaciones en relación con este Plan de Contingencia debe ser dirigido a:

Director Ejecutivo de AGROCALIDAD

Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro - AGROCALIDAD  
 República de Ecuador

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-316 y Amazonas, Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 9no. Piso.

Teléfono: 593 2 2 543 319

Fax: 593 2 2 543 319

e-mail: [direccion@agrocalidad.gob.ec](mailto:direccion@agrocalidad.gob.ec); [relaciones.internacionales@agrocalidad.gob.ec](mailto:relaciones.internacionales@agrocalidad.gob.ec)

### Sección 4. Responsabilidades

#### AGROCALIDAD

- DIRECCIÓN EJECUTIVA  
 Designar un portavoz responsable para la comunicación interna y externa, así como para las notificaciones oficiales
- DIRECCIÓN JURIDICA  
 Asesorar en la implementación de las normativas necesarias para ejecutar el presente plan
- DIRECCIÓN SANIDAD VEGETAL  
 Establecer comunicación con otras organizaciones públicas o privadas concernidas.
- VIGILANCIA FITOSANITARIA  
 Prospección de cultivos  
 Detección de los brotes  
 Determinación de la localización exacta de la plaga
- CUARENTENA VEGETAL  
 Supervisar la ejecución de las actividades asignadas al punto de control interno.  
 Analizar las bases de datos generadas por el punto de control interno para evaluar la efectividad del control.

 <b>Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca</b>		 <b>ASOCIACIÓN NACIONAL DE PRODUCTORES DE BANANO Y PLÁTANO</b>	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>		<b>SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 7.1</b>			

Inspección fitosanitaria de en los puntos de control interno. Controles en el movimiento de materiales de riesgo

- ACCESO A MERCADOS INTERNACIONALES  
Controles e Inspección de plantas empacadoras de banano y plátano
- CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO  
Controles e Inspección de viveros
- PROGRAMAS ESPECÍFICOS  
Aplicación de las medidas de erradicación
- DIRECCIÓN SERVICIOS DE LABORATORIOS  
Identificación oficial de la plaga
- COMUNICACIÓN SOCIAL  
Comunicar sobre las medidas de prevención y acción de la plaga  
Coordinar con el MAGAP la designación del vocero oficial, quien será la persona autorizada para informar sobre la situación de Foc R4T

**OTROS ACTORES**

- INIAP, CIBE, DOLE,  
Realizar investigación para el manejo y control de Foc R4T  
Detección de brotes  
Identificación oficial de la plaga
- MINISTERIOS DE AGRICULTURA, GANADERÍA ACUACULTURA Y PESCA  
Prospección de cultivos  
Detección de los brotes  
Determinación de la localización exacta de la plaga  
Apoyo en las campañas de capacitación y erradicación  
Coordinar con el departamento de Comunicación Social de AGROCALIDAD la designación del vocero oficial, quien será la persona autorizada para informar sobre la situación de Foc R4T  
Apoyar con un programa de compensación o cambio de cultivo a los productores donde se han realizado labores de erradicación.
- GOBIERNOS MUNICIPALES, GOBIERNOS PROVINCIALES  
Detección de brotes  
Apoyo en las campañas de capacitación y erradicación
- SENA  
Apoyo en los controles fitosanitarios para prevenir el ingreso de la plaga
- MINISTERIO COMERCIO EXTERIOR (Oficinas Comerciales)  
Informar a ecuatorianos y extranjeros en países de riesgo sobre medidas de precaución previo a ingresar a Ecuador
- MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES Y MOVILIDAD HUMANA (Embajadas, Consulados)  
Informar a ecuatorianos en países de riesgo y extranjeros sobre medidas de precaución previo a ingresar a Ecuador
- MINISTERIO DEL INTERIOR (Subsecretaría de Migración)  
Informar sobre el ingreso de turistas o ecuatorianos que viajan a países de riesgo. Determinar turistas y ecuatorianos que tienen conexiones en países de riesgo para mayor control de las autoridades nacionales
- SECOM  
Autorizan y validan la difusión de sabatinas, cadenas nacionales y temas prioritarios de comunicación

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca		 AGROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE ASESORAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AJO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
PROCESO: SANIDAD VEGETAL		SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA	
REQUISITO DE LA NORMA: 7.1			

- AEROLINEAS  
Informar sobre el riesgo de introducción de Foc R4T a la región
- PRODUCTORES, EXPORTADORES Y PUBLICO EN GENERAL  
Cumplir con las disposiciones del presente manual

### Sección 5. Coordinación Interinstitucional

La incursión de Foc R4T es de interés nacional por lo que se establecerán las relaciones de cooperación y coordinación en áreas que se consideren claves. Algunas de las áreas consideradas son:

**5.1. Vigilancia y Control.** Las actividades de vigilancia son fundamentales para la pronta detección de brotes de Foc R4T, es necesario establecer acuerdos de cooperación con los potenciales afectados (productores, importadores, exportadores) a fin de que brinden información oportuna y apoyen las diferentes campañas que las Instituciones ejecuten. Otros cooperantes para la vigilancia y control son: Gobiernos Municipales, Gobiernos provinciales, Programa de Apoyo a pequeños productores de banano, Universidades, Centros de Investigación y otras instituciones.

**5.2. Reconocimiento y diagnóstico.** La cooperación de especialistas nacionales e internacionales puede ser necesaria desde las primeras fases de la emergencia para un diagnóstico preliminar confiable (por ejemplo AGROCALIDAD, Centros de Investigación, INIAP, CIBE, Universidad de Wageningen, entre otras). De igual manera, la cooperación técnica, cuando es requerida, puede coadyuvar en la implementación de la confirmación del diagnóstico. Las instituciones de investigación deben cooperar en el estudio del patógeno, para determinar con más precisión los patotipos aislados. Por otro lado, la investigación será importante para desarrollar nuevas técnicas o mejorar las actuales en la identificación de la plaga.

**5.3. Comunicación y divulgación.** Las acciones de comunicación y divulgación son más eficientes si se realizan de manera coordinada y aprovechando el máximo las capacidades regionales para dicho fin. Los medios de comunicación y divulgación se deben realizar a través de alianzas estratégicas entre organizaciones públicas y privadas de las diferentes regiones interesadas.

### Sección 6. Información de la Plaga

El mal de Panamá causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, es una de las plagas más importantes de las musáceas. Se han descrito razas con capacidad de atacar clones particulares. Foc R4T es una plaga especialmente de musáceas (Stover, 1962). Sin embargo, parece tener la capacidad de permanecer en determinadas malezas (Hennessy *et al.* 2005) y posiblemente en otras plantas relacionadas con las musáceas tales como *Heliconia* spp. [Esto último es aún motivo de discusión (Pérez Vicente 2004; Fourie *et al.* 2009)].

El hongo presenta características saprófitas (Wardlaw 1972) y puede sobrevivir en el suelo hasta por 30 años mediante estructuras de resistencia (clamidosporas) (Stover, 1962). La germinación de las clamidosporas es inducida por la acción de exudados radicales de plantas susceptibles, e infectan la superficie y la corteza de las raicillas secundarias y terciarias, de donde después el micelio alcanza los vasos del xilema produciendo microconidios. Mediante la degradación de paredes y vasos cribosos, los conidios se mueven a través de la corriente ascendente de savia y colonizan nuevos vasos hasta

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca		 AGROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE REGULATORIO DE LA CALIDAD DEL AJO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>		<b>SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 7.1</b>			

colonizar la mayor parte del sistema vascular de la planta y eventualmente causar su muerte. Cuando la planta muere, el hongo coloniza el tejido parenquimatoso adyacente a los vasos y produce esporas. A partir de la muerte de los tejidos de la planta también se induce la formación de clamidosporas (esporas de paredes gruesas que pueden sobrevivir en condiciones desfavorables). Tanto las esporas como las clamidosporas pueden dispersarse por diversos medios (agua, viento, suelo contaminado, tejido infectado vivo o muerto), con la diferencia de que las últimas tienen mayor capacidad de sobrevivencia. (OIRSA 2013). Ver Anexo 1

En los últimos diez años *Fusarium oxysporum* raza 4 tropical, se ha reportado en zonas productoras del Sudeste de Asia, Taiwán, China, Indonesia, Malasia, Australia y Filipinas, actualmente la FAO reporta la plaga en África y el Medio Oriente, Jordania y Mozambique afectando a la mayoría de musáceas comestibles, por lo que su pronta dispersión es una amenaza potencial para el sector bananero de América Latina y El Caribe.

## **Sección 7. Procedimientos de prevención**

### **7.1. Perfiles de Peligro para el control de pasajeros**

Basados en que el mayor riesgo de introducción de plagas se produce por la movilidad humana, es necesario que se apliquen mayores controles a los pasajeros provenientes de países que reporten la presencia de Foc R4T, por lo que el control de pasajeros, será en base a los perfiles de peligro establecidos por AGROCALIDAD.

### **7.2. Medidas de control para medios de transporte**

En la actualidad el comercio internacional de plantas, productos vegetales y otros artículos reglamentados se realiza en el marco del Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (AMSF) de la Organización Mundial de Comercio (OMC) y del Nuevo Texto de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF), de cuyos acuerdos Ecuador es parte contratante, por lo que es necesario que se emitan disposiciones para el control de lugares de almacenamiento, empaquetado, medios de transporte, contenedores, suelo y todo otro organismo, objeto o material capaz de albergar o diseminar plagas de plantas, en particular cuando medie el transporte internacional, por lo que AGROCALIDAD establecerá la normativa que deberán aplicar las embarcaciones, aeronaves y medios de transporte terrestre para su ingreso al país.

### **7.3. Certificación y registro de viveros, laboratorios y material de propagación de Musáceas nacionales y de importación**

Las actividades de producción y comercialización de partes vegetativas, plántulas y plantas de banano y musáceas dentro del territorio ecuatoriano, se aplica a todas las personas naturales o jurídicas a través de la Dirección de Sanidad Vegetal y procesos desconcentrados de AGROCALIDAD, con la implementación del "Manual de procedimientos técnicos para el registro y certificación de centros de producción, viveros y productores de material vegetal de propagación de banano y otras musáceas", establecido mediante Resolución Técnica N°138 (Anexo 8) y la Resolución 048 que establece las medidas y los requisitos fitosanitarios generales y específicos para la importación de plantas in vitro de musáceas (*Musa* spp.) obtenido por biotecnología moderna (Anexo 11)

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca		 AGROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE ASESORAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
PROCESO: SANIDAD VEGETAL		SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA	
REQUISITO DE LA NORMA: 7.1			

## Sección 8. Métodos de detección e identificación de la plaga

Las actividades relacionadas a aspectos fitosanitarios se regulan a través de la Ley de Sanidad Vegetal (Registro oficial N° 315 del abril 16 de 2004), cuyo organismo ejecutor oficial es la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la calidad del Agro-AGROCALIDAD. En las áreas de producción AGROCALIDAD, por medio del personal técnico agrícola de las coordinaciones provinciales realiza actividades de vigilancia fitosanitaria a través de prospecciones de plagas puntuales en las épocas de cultivo esto se ejecuta mediante la Resolución N° 24 del Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria-SESA (Actualmente AGROCALIDAD) de fecha 5 de junio del 2008.

### 8.1 Métodos de detección

El sistema de vigilancia fitosanitaria que mantiene AGROCALIDAD a nivel nacional, contempla dos estrategias de acción para la detección temprana de plagas: vigilancia activa y vigilancia pasiva. La vigilancia activa se orienta a la captura y registro de información de FOC R4T obtenidas a través de prospecciones, monitoreos, verificación de denuncias, etc., que se realizan en el campo.

La vigilancia pasiva corresponde a actividades de recopilación de información fitosanitaria desde otras fuentes de información externas a AGROCALIDAD, constituidas por diversas instancias del sector privado y estatal como tesis, artículos científicos, etc.

#### 8.1.1 Selección de especies y lugares de monitoreo y prospección

Dentro de las prospecciones de cultivos en cada provincia se identificarán áreas de riesgo y potenciales áreas de peligro de introducción (entrada y establecimiento) de FOC R4T.

Para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* R4T se prospectará y monitoreara en las zonas bananeras y plataneras del Ecuador.

El monitoreo se realizará en:

- Áreas en el entorno de los puntos de control y couriers.
- Áreas con cultivos establecidos a partir de material de propagación vegetal importado y tránsito
- Áreas relacionadas con lugares de acopio, consumo, almacenamiento, procesamiento o selección de productos agrícolas importados
- Áreas relacionadas con Estaciones Experimentales agrícolas
- Áreas de riesgo correspondientes a vías o rutas internacionales

La vigilancia activa se realizará en base a la Tabla 1.

**Tabla 1.-** Selección del sitio de detección

Superficie Lote	Superficie sitio detección
Menor de 1 ha	Total
1 a 5 ha	1 ha

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca		 AGROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE REGULARIZACIÓN DE LA CALIDAD DEL AJO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
PROCESO: SANIDAD VEGETAL		SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA	
REQUISITO DE LA NORMA: 7.1			

Mayor de 5-12 ha	2 ha
Mayor de 12 -30 ha	4 ha
Mayor de 30 ha	4 ha

Una vez seleccionado el sitio de monitoreo, se procede a recorrer el lote siguiendo un diseño de acuerdo a la forma de producción de la especie de cultivo.

En los lotes de musaceas se realiza el recorrido de dos diagonales en el sitio de detección definido de acuerdo a la figura 1.



Fig. 1. Forma de realizar el monitoreo

## 8.2. Protocolos de Identificación

El instructivo específico de toma y envío de muestras de Foc R4T *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical del laboratorio de Biología Molecular-Vegetal de AGROCALIDAD (BM), expone los lineamientos para la toma de muestras, preparación y envío de muestras de musáceas al BM. El ensayo que se realiza en el laboratorio servirá para la confirmación de la presencia o ausencia de Foc R4T. Ver Anexo 9

## Sección 9.- Medidas de Erradicación.

Independientemente de la vía de introducción de Foc R4T a Ecuador, es muy probable que transcurra un largo período entre la introducción y la detección, debido al período de incubación largo de esta plaga.

Por esta razón, el éxito de la implementación del Plan (Anexo 2) está determinado por la aparición de focos de la plaga; el Plan de Acción se activará inmediatamente a la primera sospecha de presencia de la plaga

Para la erradicación de un brote de Foc R4T, AGROCALIDAD actuará de manera inmediata con la destrucción de las plantas que presenten síntomas. Una vez confirmada la presencia de la plaga, se procede a:

1. Delimitar el área afectada
2. Establecer el área bajo cuarentena

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca		 ASROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE REGISTRO Y CONTROL DE LA CALIDAD DEL AGRO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
PROCESO: SANIDAD VEGETAL		SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA	
REQUISITO DE LA NORMA: 7.1			

3. Eliminación del brote
4. Establecimiento de zonas de seguridad

#### Sección 10.- Plan de comunicación y capacitación

La comunicación efectiva a la población es un factor clave para el éxito de un plan de prevención, control y erradicación por lo que este plan es dirigido al público general. (Anexo 6)

AGROCALIDAD promoverá la realización de cursos de difusión y capacitación entre los sectores y actores de toda la cadena agraria productiva de musáceas en FOC R4T para garantizar una actuación estandarizada y armonizada en la ejecución de las diferentes actividades contempladas en el Plan de contingencia. (Anexo 7)

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca		 ASOCIACIÓN AGENCIAS ECUATORIANAS DE ASESORAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AJO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
PROCESO: SANIDAD VEGETAL		SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA	
REQUISITO DE LA NORMA: 7.1			

# ANEXOS

 Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca		 ASESORÍA AGENCIA ECUATORIANA DE REGULACIÓN DE LA CADENA DEL BANANO	
<b>Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> (Foc R4T)</b>		Edición No: 0	
		Fecha de Aprobación: 02-10-2013	
PROCESO: SANIDAD VEGETAL		SUBPROCESO: VIGILANCIA FITOSANITARIA	
REQUISITO DE LA NORMA: 7.1			

Anexo 1.- Ficha Técnica *Fusarium oxysporum* F. sp. *cupense* raza 4 tropical (Mal de Panamá)

## FICHA TÉCNICA

### *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical Mal de Panamá (Panama disease of banana)

#### 1. PLAGA

El Mal de Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cupense* raza 4 tropical, es una de las enfermedades más nocivas que atacan a las musáceas (Batlle y Pérez, 2009). Se desarrolla favorablemente en las regiones tropicales (Moore *et al.*, 1995) y más del 80% de los bananos y plátanos producidos en el mundo son susceptibles a esta raza (OIRSA, 2009)<sup>1</sup>.

##### 1.1. Ubicación taxonómica

Phylum: Ascomycota  
 Clase: Sordariomycetes  
 Orden: Hypocreales  
 Familia: Nectriaceae  
 Género: *Fusarium*  
 Especie: *F. oxysporum* f.sp. *cupense* raza tropical 4  
 (CABI, 2014)<sup>2</sup>.

##### 1.2. Descripción morfológica

*Fusarium oxysporum* f.sp. *cupense* o Foc R4T, produce macroconidios en esporodoquios sobre conidióforos ramificados, en la superficie de las plantas infectadas o en un medio de cultivo artificial. Los microconidios presentan formas ovaladas y se originan sobre microconidióforos o monofialides cortos en el micelio aéreo (Sabadell, 2003)<sup>1</sup>.

Las clamidosporas poseen paredes gruesas, y su producción es abundante sobre los tejidos infectados en estados avanzados de la enfermedad. Se forman solas o en grupos, pueden estar intercaladas o en la parte terminal de las hifas (Sabadell, 2003)<sup>1</sup>.

#### 2. BIOLOGÍA

##### 2.1. Ciclo biológico

*Fusarium oxysporum* f.sp. *cupense* R4T puede permanecer en residuos de plátano infectados, en forma de clamidosporas, las cuales germinan estimuladas por secreciones radicales de plantas hospederas y no hospederas o por el contacto con tejido sano de un cultivar susceptible. Después de 6 a 8 horas produce micelio y conidios y nuevas clamidosporas después de 2 a 3 días (Stover, 1968)<sup>1</sup>.

El hongo penetra a la planta a través de las raíces terciarias, no por las raíces principales, a menos que haya exposición del cilindro central. A continuación, pasa al sistema vascular del rizoma y pseudotallo e

invade los vasos del xilema; el hongo produce conidios, los cuales son llevados a lo largo de los haces vasculares donde inician nuevas zonas de infección, ocasionando su obstrucción y como consecuencia se reduce el movimiento del agua y nutrientes.

En estados más avanzados de la enfermedad el hongo crece fuera del sistema vascular, en el parénquima adyacente, produciendo grandes cantidades de conidios y clamidiosporas; estas últimas retornan al suelo cuando la planta muere y permanecen en dormancia eventualmente por varios años. El ciclo se repite cuando las clamidiosporas germinan e infectan nuevamente la planta (Davis, 2005; Moore *et al.*, 1995)<sup>1</sup>.

## 2.2. Epidemiología

La temperatura óptima para el desarrollo de *Foc* R4T es de 25-28 °C, el crecimiento se inhibe cuando la temperatura es cercana a 33 °C y no es favorable por debajo de 17 °C (Cook y Baker, 1983). Es capaz de crecer y esporular sobre un amplio rango de valores de pH (óptimo a pH 7.5-8.5); creciendo mejor en condiciones de oscuridad continua (Nelson *et al.*, 1981)<sup>1</sup>.

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* R4T, puede sobrevivir en residuos vegetales y formar clamidiosporas que permanecen latentes en el suelo, en residuos vegetales o en raíces de hospederos alternantes, hasta por 30 años (Moore *et al.*, 1995; Arroyo *et al.*, 1993). Adicionalmente, la enfermedad aumenta cuando después de un periodo de sequía (en el cual la planta se encuentra en estrés hídrico) aumenta la humedad del suelo por lluvia o riego (Nurhadi, 1997)<sup>1</sup>.

El exceso de humedad en el suelo, en terrenos arcillosos con mal drenaje favorece su desarrollo y dispersión; los terrenos ácidos y pobres en calcio reúnen condiciones adecuadas para el desarrollo del hongo (Moore *et al.*, 1995)<sup>1</sup>.

## 2.3. Síntomas

El mal de Panamá es considerado como una clásica enfermedad de marchitamiento vascular, al causar la disrupción del sistema de translocación de agua, provocar síntomas foliares sistémicos y el colapso final de las plantas afectadas. El patógeno invade el tejido vascular (xilema) de las plantas a través de las raíces provocando su decoloración y marchitamiento (INIAP, 2012)<sup>3</sup>.

Los síntomas externos producidos por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 se caracterizan por un amarillamiento uniforme de las hojas más adultas a lo largo del margen foliar que continúa hacia la nervadura central, hasta que las hojas quedan completamente marchitas y de color café; puede o no manifestarse un agrietamiento en la base del pseudotallo.

En sus inicios este síntoma puede confundirse con los producidos por deficiencia de potasio, especialmente bajo condiciones de sequía y frío. Todas las hojas se abrumen en la unión del peciolo con el pseudotallo y quedan colgadas de la planta (Fig. 1) (Thurston, 1989; Arroyo *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1995)<sup>1</sup>.



**Fig. 1.** Plantas de banana con las hojas jóvenes erizadas y el resto en forma de "falda" colgando del pseudotallo.  
Fuente: Dr. Miguel Dita

Los síntomas internos se caracterizan por una decoloración vascular y se observan al cortar las raíces, el cormo o el pseudotallo.

Esta decoloración amarilla, marrón o café-oscuro, progresa hacia los haces vasculares del pseudotallo y algunas veces del raquis. La primera decoloración vascular se observa en las vainas de las hojas externas del pseudotallo y las más internas se decoloran al final (Thurston, 1989; Moore *et al.*, 1995)<sup>1</sup>.

Al realizar un corte vertical del pseudotallo de una planta infectada por Mal de Panamá se observan líneas color marrón, rojo o amarillo; mientras que en un corte transversal se observan en forma de anillos (Fig. 2). *Foc* raza 4 siempre presenta áreas manchadas cuyo color cambia de marrón a púrpura, llamadas "bolsillos gomosos".



**Fig. 2.** Pseudotallo de banana con una coloración en forma de anillo, síntoma interno característico de *Foc* RT 4.  
Fuente: Dr. Miguel Dita.

El Mal de Panamá puede ser confundido fácilmente con el Falso Mal de Panamá, debido a los síntomas similares que ambos ocasionan. Sin embargo, el Falso Mal de Panamá se debe a condiciones abióticas, en éste, el amarillamiento empieza en las hojas bajas o viejas.

El margen de cada hoja se torna de verde pálido a amarillo, aparecen rayas necróticas rodeadas por un margen amarillo y la hoja muere finalmente (*Foc* R4T presenta amarillamiento uniforme) (Fig.3). Las hojas inferiores mueren y se cuelgan del pseudotallo como una falda (De Beer *et al.*, 2001)<sup>1</sup>.





**Fig. 3.** A) Amarillamiento ocasionado por el Falso Mal de Panamá. Fuente: Z. De Beer.  
 B) Amarillamiento ocasionado por *Foc* R4T. Fuente: Dr. Miguel Dita.

Cuando el pseudotallo de una planta que muestra los síntomas de la enfermedad del Falso Mal de Panamá se corta transversalmente, aproximadamente a unos 50 cm., por encima del nivel del suelo, a menudo se ven filamentos vasculares decolorados de color rojo vino y no existen bolsillos gomosos como en el caso de *Foc* R4T.

El pseudotallo, a la altura de 50-100 cm. por encima del nivel del suelo contiene muchos filamentos vasculares rojo vino decolorados, tanto en las plantas afectadas por el Falso Mal de Panamá, como en las plantas afectadas por *Foc* R4T. En las plantas afectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* R4T, la decoloración es más o menos continua y puede ser trazada hacia la parte inferior del pseudotallo.

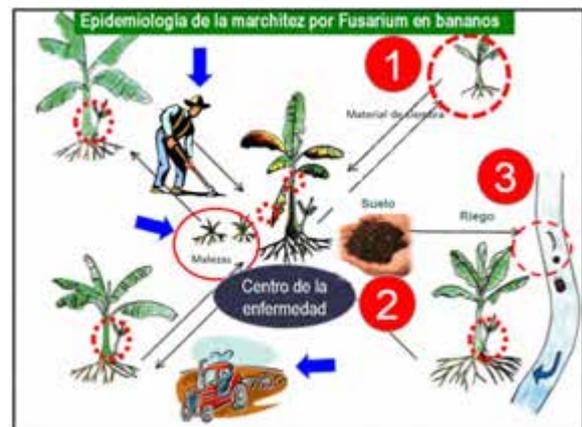
En el caso del Falso Mal de Panamá, los filamentos vasculares decolorados usualmente no son continuos, ocurriendo en regiones cortas de unos 10 cm de largo, separados por áreas anchas. Cuando se parte el rizoma en una planta con el Falso Mal de Panamá, se ven manchas marrones y filamentos blancos.

#### 2.4. Mecanismos de dispersión

El patógeno se dispersa principalmente a través del movimiento de material de propagación y residuos infectados (Davis, 2005)<sup>1</sup>.

*Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* R4T, también se puede propagar a través del suelo adherido a los implementos de siembra o a los vehículos. Las esporas del patógeno, así como el material infectado, son transportados hacia los canales de drenaje por el agua de lluvia y a través del agua de riego estas esporas infectan nuevas áreas.

Por otra parte, el patógeno puede infectar raíces de ciertas malezas sin provocar síntomas visibles y pueden permanecer en estas plantas en ausencia de plátano o banano (Moore *et al.*, 1995)<sup>1</sup>.



**Fig. 5.** Medios de diseminación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. Fuente: Pérez, 2013.

### 3. HOSPEDANTES

Thurston (1989)<sup>1</sup> señala que *Foc* raza 4 funge como saprófito o ligeramente parasítico. Por lo que la habilidad para sobrevivir en malezas y pasto podría explicar la persistencia del hongo en suelos sin banano.

El patógeno puede invadir las raíces de ciertas malezas, sin

llegar a producir síntomas visibles, pudiendo permanecer en estas plantas en ausencia de banano o plátano. (INIAP, 2012)<sup>3</sup>

Cuadro 1. Hospedantes primarios de *Foc* raza 4.

Nombre científico	Nombre común
<i>Musa sp.</i>	Plátano y banano
<i>Heliconia sp.</i>	Heliconia

Fuente: (INIAP, 2012)<sup>3</sup>

Cuadro 2. Hospederos secundarios de *Foc* raza 4

Nombre científico	Nombre común
<i>Heliconia caribea</i>	Platanillo
<i>Paspalum fasciculatum</i>	Gramolote
<i>Panicum purpurascens</i>	Pará
<i>Commelina diffusa</i>	Siempre viva

Fuente: (INIAP, 2012)<sup>3</sup>

#### 4. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL

Desafortunadamente, una nueva raza de Mal de Panamá, que ha sido denominada raza 4 tropical, se la ha reportado en zonas productoras del sureste de Asia, afectando severamente a plantaciones comerciales de Cavendish en Filipinas, convirtiéndose de esta manera en una seria amenaza para la producción de banano y plátano en el hemisferio occidental (INIAP, 2012)<sup>3</sup>.

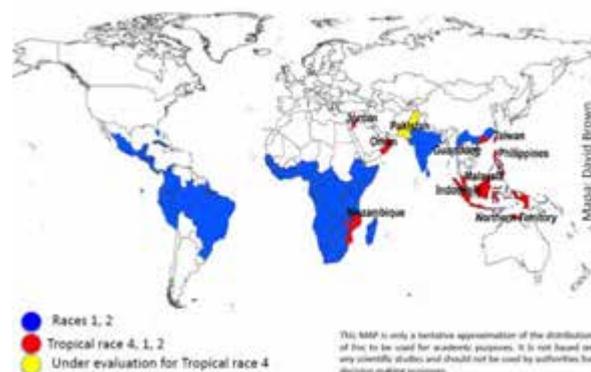


Fig. 5. Distribución actual de la raza tropical 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Fuente: Dita, M. 2014<sup>5</sup>.

#### 5. IMPORTANCIA DE LA PLAGA

Históricamente, la enfermedad Marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá ha sido la más importante del banano y en la actualidad es una de las 10 plagas más importantes en la agricultura a nivel mundial (OIRSA, 2009)<sup>1</sup>.

La entrada y establecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical al continente Americano, ocasionaría una gran afectación en la producción de banano de exportación y en los plátanos (OIRSA, 2009)<sup>1</sup>, cuantiosas pérdidas económicas y un impacto social importante.

##### 5.1. Estatus de la plaga en Ecuador

De acuerdo a la Resolución No. 116 "Listado de plagas cuarentenarias no presentes en Ecuador" de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del agro - AGROCALIDAD, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 está reportada como plaga cuarentenaria ausente en el país.

##### 5.2. Importancia económica de la plaga

El Mal de Panamá empezó en Panamá (de ahí su nombre) en

la década de los cuarenta, afectando a más de 50 mil hectáreas del cultivo en América, a un costo de alrededor de US \$ 2,300,000.00 (OIRSA, 2009)<sup>1</sup>.

A lo largo de la historia el Mal de Panamá ha tenido efectos devastadores en la economía de muchos países del Caribe y fue la primera causa de cambios en el uso de la tierra. En 1923, Costa Rica exportaba más de 11 millones de racimos y para 1941 la exportación se redujo a 1.4 millones. Posteriormente en 1972 se hacía referencia a que en un periodo de 50 años, 40,000 ha de banano fueron destruidas o abandonadas en América Central debido a este problema (Thurston, 1989)<sup>1</sup>.

En la actualidad, el Mal de Panamá R4T ataca miles de hectáreas de cultivo de banano en Asia, ha echado a perder miles de toneladas de banano en países productores como China, Filipinas, Taiwán, Indonesia y Australia (OIRSA, 2009). En Indonesia más de 8 millones de plantas en plantaciones tradicionales y más de 5,000 ha en plantaciones comerciales del cultivar Cavendish han sido afectadas con pérdidas alrededor de 75 millones de dólares (Pérez-Vicente, 2004)<sup>1</sup>.

El cultivo de banano en el Ecuador, representa el primer rubro de exportación, habiéndose exportado en el 2013, más de 5 millones 559 mil 757 toneladas, generando más 2 millones 375 mil 986 dólar de valor FOB. Este aspecto convierte a esta musácea en uno de los principales contribuyentes al fisco nacional.

Adicionalmente la industria bananera genera en el país una importantísima actividad comercial y una gran cantidad de empleos directos e indirectos, ya que es uno de los pocos rubros en que su sistema

de producción, cosecha y comercialización se lleva a cabo a lo largo del año (INIAP, 2012)<sup>3</sup> (Banco Central del Ecuador, 2014)<sup>4</sup>.

Por otra parte, se debe enfatizar también que el plátano en nuestro país, es uno de los productos considerados base de la seguridad alimentaria y una fuente generadora de empleo y divisas a través de su exportación (INIAP, 2012)<sup>3</sup>

## 6. MEDIDAS PARA EVITAR EL INGRESO *Foc* R4T.

Organismos Internacionales Regionales y gobiernos de varios países productores de banano y plátano como Ecuador, Colombia, Costa Rica, México, Panamá, entre otros, han sugerido una serie de medidas para evitar el ingreso de la raza 4 tropical a Latinoamérica y el Caribe, las que se resumen a continuación:

- Evitar importar cornos, hijuelos y todo tipo de material vegetativo de la familia de las musáceas, de cualquier país donde el hongo ha sido reportado.
- Evitar la importación de plantas in vitro y material de propagación de Heliconias procedentes de países donde se ha reportado la presencia del hongo.
- Evitar la importación de muestras de suelo de cualquier país donde el hongo ha sido reportado.
- Realizar una inspección minuciosa de los medios de transporte procedentes de países afectados, para verificar que vengan libres de suelo contaminado.
- Capacitar a los inspectores de sanidad vegetal sobre el reconocimiento de la sintomatología de la enfermedad a nivel de campo.

- Implementar técnicas de diagnóstico del patógeno, para disponer de una eventual entrada inesperada del patógeno. (INIAP, 2012)<sup>3</sup>

En Ecuador, todo envío que contenga germoplasma y material de reproducción de musáceas, debe cumplir con lo establecido en la Resolución AGROCALIDAD 048 del 17 de mayo del 2011, que establece las medidas y los requisitos generales y específicos para la importación de plantas in vitro de musáceas *Musa* spp., obtenido por biotecnología moderna cultivo de meristemas).

Además se estableció el Procedimiento AGROCALIDAD PEE/BM/02., diagnóstico PCR convencional para la detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (AGROCALIDAD, 2014)<sup>7</sup>

## 7. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA PLAGA

### 7.1. Control cultural

Las medidas culturales tendientes a evitar el desarrollo y propagación de la plaga deben ir encaminadas hacia el logro de dos objetivos fundamentales: 1) el incremento del vigor de la planta, con la cual se obtendría una mayor resistencia a la plaga y 2) crear en el suelo un ambiente que no sea favorable para el hongo. Para el efecto, es necesario realizar una serie de prácticas para el buen manejo del cultivo tales como:

- Encalar el suelo de manera oportuna, cuando el análisis detecte pH ácidos y bajos contenidos en calcio.
- Implementar un programa de fertilización de acuerdo al análisis del laboratorio, principalmente foliar. Se recomienda

emplear adecuadamente la fertilización a base de potasio, en razón de que este elemento está relacionado con la mayor o menor resistencia de la planta a las enfermedades. En tal sentido, cualquier factor que limite la absorción de potasio por la planta (Exceso de sodio en el suelo o una aireación deficiente del mismo), favorecerá el desarrollo de la plaga.

- Desinfectar los hoyos cuando se encuentren plantas enfermas.
- Prácticas y medidas fitosanitarias así como también otros métodos de control integrado.
- Detección y erradicación temprana de plantas infectadas como prácticas eficientes para impedir el movimiento de material hacia áreas libres de la plaga.
- Evitar encharcamientos, como consecuencia de suelos arcillosos y con mal drenaje.
- Desinfección de herramientas y maquinaria agrícola. (INIAP, 2012)<sup>3</sup>

### 7. 2. Control biológico

En aislamientos de la rizosfera del banano, se encontró que la bacteria *Pseudomonas fluorescens* inhibía el crecimiento de *Foc* raza 4 *in vitro* y también inhibía la germinación de las conidias. Las pruebas en campo mostraron que reducían significativamente los niveles de plantas afectadas con marchitez cuando era aplicado al suelo 90 días antes de la inoculación del patógeno. Las evaluaciones hechas en plantaciones comerciales demostraron que ninguna de las plantas tratadas por la bacteria, fue atacada por el Mal de Panamá. La aplicación de *P. fluorescens*

en pre-colonización de la bacteria reducía la colonización del *Fusarium* a las raíces en un 72% (Esquivel, 2009)<sup>1</sup>.

## 7. LITERATURA CITADA

1. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-CNRF). 2011. Mal de Panamá raza 4 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raza 4). Ficha técnica. SAGARPA-SENASICA. México, D.F. 9p.

2. CAB *International*. 2014. Crop Protection Compendium.

3. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias – INIAP. 2012. La raza tropical 4 de mal de Panamá: Amenaza

potencial para la industria bananera y platanera del Ecuador. Boletín No. 418. Quevedo – Ecuador.

4. Banco Central del Ecuador. 2014. Estadísticas Económicas. Sector Externo.

5. Dita, Miguel. 2014. Presentación del CIBB. Guayaquil – Ecuador.

6. Pérez, Luis. 2013. Epidemiología de la Marchitez por *Fusarium* de las musáceas o mal de Panamá. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).

7. Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCALIDAD. 2014. Resoluciones.

## Anexo 2.- PLAN NACIONAL DE ACCIÓN PARA CONTROLAR Y ERRADICAR POSIBLES FOCOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical (Foc R4T)

### 1. Introducción

AGROCALIDAD, a través de La Dirección de Sanidad Vegetal, establece el "PLAN DE ACCIÓN PARA CONTROLAR Y ERRADICAR POSIBLES FOCOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical (Foc R4T)", de aplicación en todo el territorio ecuatoriano.

#### 1.1. Objetivo

Proporcionar las bases técnicas y los procedimientos para la implementación de acciones fitosanitarias para erradicar, contener o suprimir en forma apropiada posibles brotes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*, en las zonas de producción de musáceas y heliconáceas en el Ecuador.

#### 1.2. Alcance

El Plan de Acción recoge las medidas que deben adoptarse contra el mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* Raza 4 tropical) con el fin de impedir su dispersión ante la aparición de un foco y, en su caso, determinar su distribución para controlarlo y erradicarlo. El procedimiento se aplicará en aquellos lugares donde se realizan actividades de producción, cosecha, y/o empaque de musáceas y heliconáceas del territorio ecuatoriano, en los cuales se hayan identificado focos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* Raza 4 tropical.

#### 1.3. Ámbito de aplicación

Este Plan de Acción será aplicado en las zonas de producción de musáceas y heliconáceas del territorio ecuatoriano, a través de la Dirección de Sanidad Vegetal y procesos desconcentrados a nivel nacional.

## Sección 2. Procedimientos

### 2.1. Hallazgo inicial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* Raza 4 tropical (Foc R4T)

Cuando se tenga sospecha de la presencia de mal de Panamá (Foc R4T), a través de las prospecciones, inspecciones, de las notificaciones pertinentes, o de cualquier otro medio, deben adoptarse una serie de medidas cautelares orientadas a confirmar o desmentir la presencia de la enfermedad y a evitar su dispersión mientras se define la situación. Estas medidas son las siguientes:

1. Confirmar presencia o ausencia del brote (hasta confirmar la presencia o ausencia del brote, se procederá a la inmovilización del material vegetal y/o frutos del área sospechosa).
2. Determinar la/s fuente/s primaria/s de la sospecha de contaminación.
3. Establecer medidas complementarias adecuadas basadas en el nivel de riesgo estimado, para evitar cualquier dispersión potencial del organismo (ej. Delimitar el área con posible presencia del brote).
4. Si existe riesgo de contaminación de material vegetal que se dirija a otro sitio, debe informar inmediatamente a la coordinación respectiva.

El hallazgo de uno o más casos sospechosos de incursiones o brotes de Foc R4T podrá realizarlo tanto el sistema de vigilancia de plagas de AGROCALIDAD, así como un ente no oficial (por ejemplo un productor, un investigador independiente, etc.).

Se debe elaborar una denuncia fitosanitaria (Anexo 3) sobre este hallazgo en un plazo no mayor a 48 horas a fin de que AGROCALIDAD confirme o desmienta mediante los respectivos análisis de laboratorio. Si el resultado de laboratorio es negativo, las acciones de emergencia se detendrán en este punto.

El hallazgo del mal de Panamá es motivo para que se inicie una fase de alerta de protección fitosanitaria contra un probable brote de Foc R4T en cultivos de importancia económica para el Ecuador.

### 2.1.2. Diagnóstico

Una vez recibida la denuncia sobre el hallazgo inicial o sospecha de mal de Panamá, personal de AGROCALIDAD acudirá al sitio donde se presume la presencia de la plaga, para establecer un diagnóstico preliminar.

Si amerita darle seguimiento o confirmación del diagnóstico, se requerirá del envío de muestras a un laboratorio reconocido por AGROCALIDAD para la confirmación.

La falta de confirmación del diagnóstico no será obstáculo para que con base en el diagnóstico preliminar se implementen acciones de emergencia que estén orientadas a la contención y/o erradicación de la plaga, como son:

- Eliminación de hospedantes con síntomas y/o potencialmente infectados;
- Establecimiento de área o áreas bajo cuarentena que implica la restricción de movilización de vías de dispersión de Foc R4T desde el (o las) área(s) infestada (s).

Si se aplican medidas de erradicación, deberán tomarse muestras de las plantas que se eliminen a fin de obtener una confirmación posterior de la plaga, siguiendo el procedimiento descrito para la toma y envío de muestras.

Es de suma importancia tener en cuenta que para la toma, manipulación y transporte de las muestras deben acatarse las medidas de bioseguridad necesarias para evitar la dispersión de la plaga. (Ver anexo 9)

Si los resultados de confirmación del diagnóstico son negativos, se detendrá el proceso de emergencia y se harán las notificaciones necesarias para comunicar que la amenaza ya no existe o que se trató de una falsa alarma.

Si los resultados de diagnóstico preliminar y/o confirmación del diagnóstico son positivos, los técnicos de Vigilancia Fitosanitaria deberán:

- Aumentar los monitoreos en las zonas y sectores aledaños donde se ha confirmado la presencia de la plaga, los mismos que se intensificarán en un radio de 5 km del foco afectado tratando de cubrir toda la superficie de la zona en un lapso no mayor a una semana, teniendo como fin delimitar el área afectada por Foc R4T, a través de Vigilancia activa.
- Se realizará un levantamiento de información y monitoreos en la provincia afectada y las provincias aledañas, para lo cual se inspeccionarán visualmente el 15 % de la superficie total de cultivos comerciales y no comerciales de musáceas y heliconáceas.

Los procedimientos de Vigilancia Fitosanitaria se realizarán acorde a lo establecido en el Manual Operacional de Vigilancia Fitosanitaria emitido mediante resolución N° 154 del 23 de septiembre del 2010.

### 2.1.3. Procedimiento de toma de muestras de plantas enfermas

Se tomarán las muestras según lo establecido en el Anexo 9.

### 2.1.4. Determinación de lugares con mayor probabilidad de ser infectados para monitoreo de zona con posible foco de Foc R4T

Para determinar las localidades y lugares con mayor probabilidad de ser infectados debido a incursiones iniciales de Foc R4T se debe tomar en cuenta los criterios siguientes:

- El área circundante al brote (donde se encuentra la planta o plantas enfermas y con síntomas) a una distancia de 7,5 m de la planta o plantas enfermas y con síntomas tiene una alta probabilidad de estar infestada por el hongo y por tanto, las plantas hospedantes ubicadas dentro de esta área.
- Si el brote está cerca de un cauce, existe la posibilidad que sea originado a partir de otro brote ubicado aguas arriba, por lo que, en estos casos, todas las áreas de la cuenca o subcuenca aguas arriba tendrían alguna probabilidad de contener un brote y deberían ser monitoreadas mediante encuestas de delimitación, detección o monitoreo.
- Si el o los brotes se ubican cerca de caminos o carreteras, las áreas con hospedantes en la ruta o rutas de estos podrían considerarse como áreas con probabilidad de haber sido infectadas.
- Las áreas en las que se comparte la mano de obra, uso de maquinaria agrícola o se haya intercambiado (movilizado en una o en ambas direcciones) materiales de propagación de musáceas y heliconáceas con el lugar de producción o campo donde ocurra la incursión o brote; deben considerarse con probabilidad alta de estar infectadas.

### 2.1.5. Activación del Plan de Acción

La activación del Plan se la realiza con la detección de un caso sospechoso de Foc R4T.

Hasta obtener la confirmación del diagnóstico por el laboratorio de referencia es necesario zonificar el área afectada, desde la planta que se presume con mal de Panamá se toma un radio de 7,5 metros y se procede a delimitar 3 zonas como se muestra a continuación:



El ingreso a estas zonas debe realizarse por el mismo lugar siguiendo las prácticas establecidas a continuación:

- Disponer de entradas únicas con lavapiés, estos deben contar con un material esponjoso saturado de una solución desinfectante a base de amonio cuaternario para la desinfección del calzado de los trabajadores y ruedas de equipos que accedan al área controlada; es recomendable proteger los lavapiés de la lluvia y el sol con un techo rústico que debe estar a una altura y anchura que permita el paso de equipos o personas según sea el caso. El mantenimiento de los lavapiés debe ser periódico eliminando el suelo o lodo que pueda acumularse en los mismos, debe reemplazárselo si muestra un gran deterioro. La solución desinfectante debe ser periódicamente renovada de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- Eliminar todas las plantas de la zona roja. De no ser posible, eliminar las plantas que presenten síntomas. La eliminación debe realizarse mediante la aplicación de glifosato para que toda la planta muera
- Aplicar herbicidas en las zonas roja y amarilla con el propósito de eliminar posibles hospedantes secundarios.
- No mover el barbecho de las zonas roja y amarilla.
- Construir zanjas de 20 x 20 cm de profundidad alrededor de las plantas afectadas para limitar la escorrentía superficial de agua desde éstas a plantas vecinas y al resto de la plantación. Si la pendiente es muy elevada se deben cavar zanjas que retengan la escorrentía en los puntos más bajos de la pendiente.
- Tratar con desinfectantes a vehículos, herramientas y objetos en general procedentes del área delimitada como sospechosa de estar infestada de Foc R4T.
- Aislar la zona verde, mediante cercado u otro tipo de barrera, estableciendo puntos de acceso únicos al área con desinfectantes para manos y calzados.

### 2.1.6. Declaratoria de Área bajo cuarentena

La declaratoria de área bajo cuarentena se debe hacer una vez recibida la confirmación del diagnóstico, por el laboratorio de referencia, bajo lo establecido en la Ley de Sanidad Vegetal y su Reglamento.

### 2.1.7. Manejo de focos de Foc R4T después de la confirmación del diagnóstico.

Una vez confirmada la presencia de Foc R4T por parte de los laboratorios de referencia se procede a implementar medidas de erradicación de la plaga. Dado que la plaga es de importancia económica es necesario explicar al dueño del área afectada que aunque el resto de la plantación no presente síntomas, es necesario destruirlas ya que el patógeno podría dispersarse por el resto de la plantación, es necesario que el MAGAP posea una estrategia de compensación por la eliminación de plantas afectadas.

Para la erradicación se deben aplicar las siguientes medidas:

#### a. Zona roja

Zona afectada por la presencia de la bacteria Foc R4T

#### Manejo de la Zona Roja

- Encerrar con cinta o alambre de púa el área afectada incluyendo las plantas aparentemente sanas a 5 metros alrededor de la planta enferma. Esta zona queda en cuarentena dentro de la finca y solo podrá ingresar la persona que vaya a hacer los tratamientos y esté entrenada para ello. Se debe evitar el ingreso de animales al foco.
- Dejar una sola entrada al foco con el fin de poner un lavapiés: recipiente plástico o de espuma que contenga una solución bactericida para desinfectar calzado. Esta solución puede ser: amonio cuaternario, hipoclorito de sodio (mitad de blanqueador y mitad de agua) o yodo al 10%.
- Inyectar en forma helicoidal a 50 cm de la base hacia arriba todas las plantas de la zona roja, a través del uso de una jeringa graduada, para lo cual se debe usar una solución de glifosato (36.7% de equivalente ácido) al 10%. Esto equivale a una parte del producto formulado por nueve partes de agua, según la siguiente tabla.

Tipo de planta	No. de sitios de inyección	Volumen total
Planta madre	3	45 ml
Pseudotallo cosechado	4	20 ml
Hijos menos de 1 m	2	20 ml
Hijos más de 1m	3	30 ml
Hijos más de 2m	3	45 ml

Fuente: OIRSA 2013

- Realizar una nueva aplicación a los 21 días a los rebrotes de las plantas.
- Proceder a eliminar todas las plantas desde el extremo del perímetro hacia el centro (la o las últimas en eliminarse serán, las plantas infectadas con síntomas; se debe eliminar los otros hospedantes de la plaga existentes en la zona (Ver anexo 4) **No se debe, bajo ninguna circunstancia, cortar las plantas y dejar los tejidos expuestos.**

- Cuando las plantas estén totalmente muertas y con cantidad mínima de agua en los tejidos, arrancar y picar en el sitio las cepas y tallos, evitando el salpique durante el corte.
- En el área donde se realiza la eliminación de plantas se cava una zanja de 20- 30 cm de profundidad alrededor del perímetro a fumigar. Esta zanja facilitará la colocación de la carpa de fumigación al permitir sellar sus bordes con suelo y al mismo tiempo evitará la escorrentía superficial en caso de lluvias. La zanja debe ser construida de manera que la planta considerada como centro del brote quede en el centro del área a fumigar.
- Proceder a la desinfección del suelo y los residuos de plantas por fumigación o incineración en un diámetro de 15 m.
- Desinfectar la herramienta permanentemente.
- Mantener el control permanente de malezas usando herbicida, no utilizar herramientas para el control de malezas
- Utilizar ropa, botas y herramienta exclusivamente para la zona roja.
- No extraer plantas afectadas, ni sacarlas de la plantación
- No arrojar las plantas afectadas a canales de drenaje o ríos.
- Realizar una evaluación mensual del área erradicada

#### **b. Zona amarilla**

Zona de seguridad que sirve para impedir el desarrollo de la plaga al resto de la finca.

#### **Manejo de la zona amarilla**

- Marcar la zona con cintas a 7,5 metros alrededor de la zona roja con el fin de evitar el paso de personal no autorizado al lote. Solo se debe permitir el ingreso a esta zona a las personas conocedores del plan de manejo de la enfermedad. En esta zona queda prohibido el paso de vehículos y personas.
- Controlar totalmente malezas con herbicidas a fin de eliminar hospedantes de la bacteria en el suelo.

#### **c. Zona verde**

Corresponde al área restante de la finca que no ha sido afectada por la bacteria. De esta zona se puede comercializar el producto cumpliendo el Plan de trabajo del anexo 4.

#### **Manejo de la zona verde**

- Inspeccionar permanentemente el cultivo para detectar la presencia de plantas con síntomas de la plaga.
- Sembrar material certificado procedente de fincas libre de la plaga.
- Evitar el ingreso de personas, animales y vehículos.
- Desinfestar herramientas, botas, vehículos y sitios de parqueo con hipoclorito, yodo, etc.
- Capacitar a trabajadores en identificación y manejo de la plaga.
- Evitar causar heridas en las plantas con implementos de trabajo o maquinaria.

En las fincas o sitios que sean abandonados o semi abandonadas y se determine la presencia de Foc R4T se procederá a eliminar las plantas afectadas, por cuenta del productor y en su defecto por personal oficial. Los gastos que se generen por esta actividad deberán ser cubiertos por el propietario o representante legal del mismo conforme lo determina la Ley de Sanidad Vegetal.

Los viveros que se dediquen a la reproducción o comercialización de planta o rizomas de musáceas deberán presentar un diagnóstico fitosanitario por cada lote de 1,000 plantas de la misma edad o con una diferencia de dos meses.

## **2.2. Medidas fitosanitarias aplicables en zonas donde se ha reportado la plaga**

### **2.2.1. Eliminación de brotes**

Cuando se determine la presencia del mal de Panamá, los propietarios, representantes legales o responsables de predios o viveros de musáceas, deberán eliminar las plantas infectadas y las existentes en la zona roja en base al procedimiento establecido en el punto 2.1.7.

Una vez eliminados los brotes, se procederá a la aplicación de productos químicos que hayan demostrado eficazmente el control de Foc R4T, si el producto no existiere en el país se aplicara el artículo 3 de la decisión 767 de la CAN.

### **2.2.2. Movilización**

- Queda prohibida la movilización de material de propagación de musáceas y/ o todo tipo de material vegetal, hasta que se levante la restricción en la zona.
- El interesado en movilizar fruta de musáceas producida en zonas bajo control fitosanitario en cuya plantación no se haya detectado mal de Panamá, deberá cumplir con el Protocolos para la movilización interna y exportación de musáceas y heliconáceas proveniente de predios libres de Foc R4T. Ver Anexo 4
- Protocolos para la movilización interna y exportación de plátano y otras musáceas proveniente de predios libres de Foc R4T y verificar que el embarque no contenga suelo, material de propagación y/o follaje de musáceas y heliconáceas, y que esté amparado con la Guía Fitosanitaria de Movilización expedida en origen en la que se indique como “requisito adicional” lo siguiente: “La fruta se moviliza libre de Foc R4T”

El personal oficial, expedirá el certificado fitosanitario para la movilización de la fruta proveniente de campo o empaadora, de acuerdo a la normatividad establecida por AGROCALIDAD, siempre y cuando se cumplan los requisitos estipulados.

### **2.2.3. De la detección de nuevos focos y muestreo de plantaciones**

- Los propietarios, representantes legales o responsables de predios, o viveros, ubicados en zonas bajo control fitosanitario, deberán realizar muestreos periódicos bajo la supervisión de personal oficial de AGROCALIDAD. Asimismo, deberán permitir el acceso a los predios, al personal oficial para verificar y/o certificar la presencia o ausencia del mal de Panamá.
- En las zonas donde no se ha encontrado la plaga, las actividades de monitoreo para detectar el mal de Panamá, deben llevarse a cabo durante todo el año con una periodicidad mensual, intensificándose en las épocas de mayor precipitación.
- Para detectar el agente patogénico, el muestreo será al azar, para lo cual se deberá utilizar la metodología que consiste en seleccionar 5 sitios de muestreo, en cada sitio se deberán muestrear 4 plantas.

Para realizar el cálculo de incidencia de Foc R4T se debe aplicar la fórmula:

$$\text{Incidencia de mal de panamá} = \frac{\text{Área afectada (m}^2\text{)}}{\text{Área total sembrada (m}^2\text{)}} \times 100$$

- Las muestras con síntomas sospechosos, colectadas en zonas libres donde no se ha reportado la plaga, deberán ser enviadas a un laboratorio de diagnóstico de acuerdo a los procedimientos establecidos para ello.

#### 2.2.4. De la plantación y replantación de predios

Para replantar o establecer nuevas plantaciones, el productor deberá utilizar plantas o rizomas provenientes de plantaciones o viveros registrados y que garanticen estar libres de plagas, mediante un análisis de laboratorio negativo al mal de Panamá, emitido por un laboratorio de diagnóstico reconocido por AGROCALIDAD.

En los sitios del predio, en el que se hayan implementado medidas de eliminación, no deberán ser replantados hasta 1 año posterior a la medida, con previo análisis patológico de suelo.

### 3. Bibliografía

- AGROCALIDAD 2013. Memorias Curso de Capacitación sobre diagnóstico y manejo del mal de Panamá de las musáceas. Quevedo- Ecuador
- CABI (CAB International). 2014. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK.
- Dita M. et.al. 2013. Plan de Contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* en un país de la región del OIRSA
- Sotomayor I. 2012. La Raza 4 tropical de mal de Panamá: Amenaza potencial para la industria bananera y platanera del Ecuador. Boletín Divulgativo N° 48 INIAP. Pichilingue. Ecuador



#### **Anexo 4.- Protocolos para la producción libre plátano y otras musáceas proveniente de predios libres de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4 tropical (Foc R4T)**

### **1. Introducción:**

La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro – AGROCALIDAD, como Autoridad Nacional Sanitaria, Fitosanitaria y de Inocuidad de los Alimentos en Ecuador, regula y controla la Sanidad Vegetal, mediante la generación y aplicación de normas nacionales, considerando la normativa internacional en el marco del Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (Acuerdo MSF) de la OMC, la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF), las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF) y de la Comunidad Andina (CAN).

En este contexto, para garantizar la situación fitosanitaria del banano y plátano de exportación, establecido por los mercados internacionales, AGROCALIDAD establece las siguientes condiciones técnicas fitosanitarias que deben cumplir los productores interesados en producir y exportar musáceas y heliconáceas.

### **2. Registro:**

#### **2.1. Registro fitosanitario:**

Todas las personas naturales o jurídicas que realizan actividades de producción y exportación de musáceas y heliconáceas dentro del territorio ecuatoriano deberán solicitar su registro en AGROCALIDAD para ser declarado como predio libre de Foc R4T y cumplir con la implementación del presente protocolo.

#### **2.2. Registro de Centros de acopio:**

Todas las personas naturales o jurídicas que se dediquen al acopio y consolidación dentro del proceso de comercialización y exportación de musáceas y heliconáceas, deberán solicitar su registro en AGROCALIDAD cumpliendo con la Resolución 138, así como con la implementación del presente protocolo.

### **3. Sistema de detección y monitoreo en campo**

**3.1. En campo:** consiste en realizar observaciones diarias en el área de producción, al 100% de las plantas, considerando especialmente los linderos de la finca y áreas de mayor presencia de malezas y de labores atrasadas, con el manejo de registros. Las observaciones deben incluir la revisión de hijos de agua e hijos de espada. Con esta información establecer la incidencia de la plaga y la severidad del daño

**3.2. En empacadoras:** consiste en el análisis en forma visual de la presencia del Mal de Panamá en el 100% de los racimos que ingresan al área de empaque tomando un dedo y partiéndolo para descartar o aceptar la presencia del síntoma de la plaga, con el manejo de registros.

Para confirmar la ausencia de la plaga se deberá realizar análisis de laboratorio de una muestra representativa de plantas del predio

#### 4. Plan de Capacitación

La capacitación al personal (supervisores) de la finca es la base para un buen sistema de vigilancia a través del monitoreo, tanto para la detección de todos los estados de desarrollo, como para el control del mal de Panamá, considerando la obligación de cada empresa estructurar un programa de capacitación, un registro de asistencia del personal, respaldo fotográfico y que cuente con un cronograma de capacitación mensual.

Las capacitaciones abarcarán los siguientes temas:

- a) Importancia del mal de Panamá Foc R4T en musáceas y heliconáceas de exportación
- b) Caracterización Epidemiológica y Etológica del mal de Panamá Foc R4T
- c) Manejo adecuado de la plantilla de monitoreo
- d) Plan de contingencia ante la presencia del mal de Panamá Foc R4T

#### 5. Plan de manejo Integrado de plagas

Con el propósito de mantener bajos los niveles de incidencia de la plaga, la finca debe disponer y aplicar un Plan de Manejo Integrado de Plagas que señale los procedimientos a seguir en aquellos lugares del cultivo.

El plan puede considerar las siguientes estrategias:

- a) Nutrición
- b) Control biológico
- c) Manejo cultural
- d) Control mecánico
- e) Control físico
- f) Control químico

#### 6. Plan de contingencia de las plantaciones ante un posible brote de Mal de Panamá.

Los responsables técnicos de las fincas en los lugares de producción deberán presentar el plan de contingencia fundamentada en lo que hace la finca contra lo que hará frente al incremento de los porcentajes de la incidencia y severidad de la plaga, es decir los procedimientos a seguir en aquellos lugares de producción (campo) y empaque, donde se haya determinado presencia del MOKO. Los puntos a seguir son los siguientes:

- a) Realizar monitoreo integrado del 100% de la finca.
- b) Cuarentenar al área con presencia de la plaga y eliminación de plantas con síntomas de Mal de Panamá, y comunicar a AGROCALIDAD.
- c) Incrementar el manejo integrado, cultural (sanidad del racimo) y químico (corbatas o fundas con clorpirifos).
- d) Tomar acciones de prevención en los procesos previos al enfunde.
- e) De encontrarse presencia de plaga en los racimos de corte, estos deben SER ELIMINADOS (Incinerados)
- f) En el área de almacenamiento y pegado de cajas, embale y estiba de fruta, se establecerán medidas de higiene, orden, limpieza y control de todo tipo de insectos.
- g) Para su ejecución se establecerá una hoja de control verificando cada uno de los puntos críticos: limpieza de bodega (de acuerdo a la norma INEN 1927), muestreo de insectos en cartón y pallets, uso de cortina protectora y ventiladores.

- h) Realizar control de malezas como práctica cultural necesaria, cada 6 semanas en invierno y 8 semanas en verano.

## 7. Verificación por AGROCALIDAD

Una vez cumplido los requisitos documentales se procederá a la inspección para la verificación del cumplimiento del protocolo.

Una vez verificado, se presentará un reporte de inspección. En caso de ser aprobado, se emitirá una Certificación de cumplimiento del Protocolo.

Se elaborará un listado oficial de las personas naturales o jurídicas certificadas en el **“Protocolo para la producción libre plátano y otras musáceas proveniente de predios libres de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4 tropical (Foc R4T)”**

En caso de ser desaprobado, se dará un plazo prudencial dependiendo del incumplimiento para que el interesado pueda hacer las correcciones necesarias y se realizará una nueva inspección.

## 8. Inspección de material a exportarse

La inspección fitosanitaria en plantas empacadoras y centros de acopio y puertos de embarque se realizará conforme a la guía de procedimientos de inspección de banano y otras musáceas de exportación aprobada mediante Resolución 138, en caso de presencia de la plaga se notificará al exportador y productor con el propósito de dar seguimiento en lugar de origen del problema.

#### Anexo 5.- Lista de Hospederos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* R4T

*Chloris inflata* (sin. *Chloris barbata*)

*Commelina diffusa*

*Heliconia caribaea*

*Heliconia chartacea*

*Heliconia collinsiana*

*Heliconia crassa*

*Heliconia latispatha*

*Heliconia mariae*

*Heliconia rostrata*

*Heliconia vellerigera*

*Musa acuminata*

*Musa balbisiana*

*Musa schizocarpa*

*Musa textilis*

*Ensete ventricosum*

*Euphorbia heterophylla*

*Panicum purpurascens*

*Paspalum fasciculatum*

*Tridax procumbens*

#### Referencias

- CABI (CAB International). 2014. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK.
- Hennessy, C.; Walduck, G.; Daly, A.; Padovan, A. 2005. Weed hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* tropical race 4 in northern Australia. Australasian Plant Pathology 34: 115-117.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias – INIAP. 2012. La raza tropical 4 de mal de Panamá: Amenaza potencial para la industria bananera y platanera del Ecuador. Boletín No. 418. Quevedo – Ecuador.
- Wardlaw, CW. 1972. Banana diseases: including Plantain and Abaca. London, UK. Longman. 878 p.

## **Anexo 6.- Plan de comunicación para la prevención del mal de panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* R4T) en ECUADOR.**

### **1. Antecedentes**

El Mal de Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc R4T), ha sido la plaga más destructiva de las musáceas y está considerada entre las 10 más importantes en la agricultura. Provocó la desaparición de clones de alta aceptación en América Latina y el Caribe (ALC) como Gros Michel y el Caribe (ALC) como Gros Michel y el Manzano.

### **2. Objetivos de Comunicación**

- Difundir e informar de forma directa a los involucrados (Productores, Exportadores, importadores Autoridades, Instituciones, Homólogos) sobre cómo y por qué prevenir el ingreso del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Raza 4 tropical) al país.
- Generar conciencia sobre la importancia de la plaga y los posibles daños que causaría si ingresa a nuestro país.
- Resaltar la ausencia de esta plaga en nuestras plantaciones a través de material impreso y audiovisual a la audiencia.
- Liderar una campaña de prevención a nivel regional, a través de un Taller Regional con los principales países productores de banano.

### **3. Público objetivo**

- Medios de comunicación y líderes de opinión.
- Productores, comerciantes y transportistas
- Exportadores e importadores
- Técnicos de AGROCALIDAD
- Instituciones homólogas

### **4. Estrategias**

- Generar contenido junto con la Dirección de Sanidad Vegetal e instituciones homólogas sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Raza 4 tropical y difundirlos a través de varios canales de comunicación.
- Realizar talleres de capacitación sobre conceptos, buenas prácticas y técnicas fundamentales en la prevención de plagas.
- Crear y promover espacios en que el público objetivo pueda informarse y sensibilizarse sobre qué es *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Raza 4 tropical y las problemáticas que produciría su ingreso a la región y al país.

-Realizar una campaña de sensibilización sobre la importancia del banano (y otras musáceas) en la economía del país y de la región. Se resaltarán las acciones implementadas por los principales países productores de banano.

## 5. Mensajes

*“Ecuador es libre de Foc R4T. Trabajemos juntos para prevenir su ingreso al país”*

*“El Mal de Panamá es una plaga altamente destructiva. Sigamos las reglas para mantenerla fuera de nuestro país”*

*“Juntos por un país sin Foc R4T”.*

## 6. Plan de Acción de comunicación

### a. Medios de comunicación y líderes de opinión.

Designación de vocero: Esta persona, designada por el Ministro, será la encargada de brindar información oficial.

Difusión en sabatina o cadena nacional

Agenda con medios.- Generar relación con los medios para la socialización de la información.  
Redes sociales: Establecer una comunicación permanente y oportuna en las redes sociales (Facebook, Twitter, Youtube, entre otros).

Hashtags:

*#Ecuador sin Foc R4T*

*#MaldePanamá (la información debe estar en el sitio web)*

*#Agrocalidad previene el #MaldePanamá (arte con todo lo que estamos haciendo)*

*#BuenasPrácticas para prevenir el #MaldePanamá (tríptico con buenas prácticas culturales)*

*#Ecuador no presenta signos del hongo Foc R4T*

*No se ha detectado signos del hongo Foc R4T dentro de la región sudamericana. #MaldePanamá*

Comunicado de Prensa: El boletín debe hacer referencia a las actividades ejecutadas por AGROCALIDAD para evitar el ingreso de la plaga. El boletín se basará en información del área técnica. Puntos que deberán ser mencionados: Monitoreos y controles en puerto y frontera. Bloqueo de ingreso de material de propagación de los países donde se encuentra el foco. Taller de capacitación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 tropical realizado en Diciembre del 2013. Antecedentes.

## 6.2 Productores, comerciantes, transportistas, importadores, exportadores y técnicos de AGROCALIDAD

Realizar material audiovisual e impreso informativo sobre *Fusarium Raza 4*. El material será difundido a este público directamente por AGROCALIDAD. Además se difundirá en capacitaciones que se brindarán al sector productor y a los técnicos de la institución. El material audiovisual e impreso debe tener un mensaje claro sobre cómo evitar el ingreso de la plaga.

**Material impreso:** Trípticos, Dípticos, Volantes, Afiches, Cartillas, Roll ups, vallas, rótulos.

**Video:** Video instructivo sobre manejo de esta plaga (técnicos AGROCALIDAD). Video de sensibilización sobre la importancia del banano en la economía del país, cómo se vería afectado si ingresará *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Raza 4 tropical y cómo prevenir su ingreso (productores, comerciantes, transportistas, importadores y exportadores). Los videos se difundirán en las pantallas led de los aeropuertos de Quito y Guayaquil.

Contacto con aerolíneas para definir la posibilidad de difundir un video en las pantallas de los aviones.

Concientizar de forma general a los usuarios de la declaración de productos vegetales. No se debe puntualizar en la plaga porque puede desencadenar rumores y crisis. Se puede usar paneles informativos.

**Cuñas radiales:** Se realizarán cuñas radiales en tres idiomas: español (dialecto sierra y costa), Kichwa y Shuar.

**Capacitación-Talleres:** Debe constar dentro del Plan de Contingencia Técnico, capacitaciones a productores, importadores y transportistas. Enfocarse, prioritariamente en el personal de aeropuertos y puntos de control fronterizo. Se distribuirá material audiovisual en capacitaciones y talleres. Las capacitaciones deben realizarse semestralmente.

Se realizará una capacitación sobre manejo de crisis y comunicación de riesgo a los técnicos de Agrocalidad involucrados. La capacitación se realizará en Planta Central y tendrá una duración de un día. Se entregará material informativo elaborado por la Coordinación de Relaciones Internacionales y Comunicación.

**Obras de teatro** Se designarán lugares prioritarios, como puntos fronterizos, donde se llevarán a cabo obras de teatro enfocadas en las buenas prácticas de comercio, importación y producción de banano y otras musáceas. Las obras de teatro tendrán una duración máxima de 30 minutos y cerrarán su mensaje enfocándose en que en el país no se encuentra esta plaga y las acciones que está tomando Agrocalidad para prevenir su ingreso.

## 6.3 Instituciones homólogas

**Reunión regional:** Presentar las actividades que cada país está realizando en contra de esta plaga Socializar el Plan de Prevención generado por AGROCALIDAD.

Liderar a nivel regional como autoridad sanitaria ecuatoriana las acciones de prevención a nivel regional. Estrechar las relaciones internacionales a nivel regional

Implementar los mismos parámetros de prevención a nivel regional con los principales países exportadores de banano: Colombia, Perú, Venezuela, Costa Rica, Brasil, México

#### 6.4 Alianzas interinstitucionales

SENAE

MAGAP

INIAP

Correos del Ecuador

Sector AEBE

Ministerio de Comercio Exterior (Oficinas comerciales)

Ministerio de Relaciones Exteriores (Embajadas, consulados)

Ministerio del Interior (Subsecretaría de Migración)

#### 6.5 TALLER REGIONAL CONTRA EL MAL DE PANAMÁ

Objetivos:

- Presentar las actividades que cada país está realizando en contra de esta plaga Socializar el Plan de Prevención generado por AGROCALIDAD.
- Liderar a nivel regional como autoridad sanitaria ecuatoriana las acciones de prevención a nivel regional.
- Estrechar las relaciones internacionales a nivel regional.
- Implementar los mismos parámetros de prevención a nivel regional con los principales países exportadores de banano.

**Anexo 7.- Temas de capacitación para *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* R4T**

	<b>Tema</b>	<b>Subtema</b>
1	<b>Especies de Fusarium como fitopatógenos</b> Características importantes que hacen de <i>Fusarium</i> una plaga de gran impacto: plantas hospedantes, sitios donde se encuentra y tiempo de permanencia.	
2	<b>Aspectos históricos y distribución</b> Breve historia desde el primer reporte de <i>Fusarium</i> a nivel mundial, hasta la distribución actual.	
3	<b>Factores de riesgo de la entrada de Foc R4T</b> Descripción general: síntomas similares entre razas de <i>Fusarium</i> , pobre conocimiento y conciencia entre productores, falta de acceso a semilla limpia, fácil dimeminación, alta dependencia a reducido número de clones, limitadas opciones de manejo, insuficientes fondos para la investigación.	
4	<b>Posición taxonómica</b> Clasificación general de <i>Fusarium</i> dentro de los taxones correspondientes, los cuales estarán ordenados de forma jerárquica.	
5	<b>Síntomas</b>	<p><b>Externos</b> Marchitamientos, quiebre de hojas, brotes pequeños, deformidades en racimos y dedos, maduración temprana, rajaduras.</p> <p><b>Internos</b> Síntomas en: cormo (rizoma), pseudotallo, racimos, raquis, colinos, plantas jóvenes y plantas adultas.</p> <p><b>Diferencias de síntomas entre Fusarium y Moko</b> Identificación de principales síntomas internos y externos, que permitan diferenciar al técnico o productor en el campo, entre una afectación de <i>Fusarium</i> y una de <i>Ralstonia</i>.</p>
6	<b>Diseminación</b> Vías de dispersión: semilla infectada, herramientas y maquinaria, suelo (largo período de latencia), residuos infectados, insectos, agua.	
7	<b>Epidemiología</b> Descripción de los factores que influyen en el progreso y diseminación de esta plaga.	

8	<b>Manejo Integrado</b>	<p><b>Prevención</b> Medidas cuarentenarias, de certificación y registro, que impidan la entrada del fitopatógeno, contempladas en el Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium</i>.</p> <p><b>Control cultural</b> Saneamiento del cultivo Procedimiento de erradicación contemplado en el Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium</i>. Importancia de realizar estudios en fitopatología y mejoramiento, para el uso de variedades en sitios específicos.</p> <p><b>Control biológico y químico</b> Recalcar que estos tipos de control son muy limitados e inefectivos en campo.</p>
9	<p><b>Sistema de detección y monitoreo en campo</b> En base a los Protocolos para la producción libre de plátano y otras musáceas proveniente de predios libres de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 4 tropical (Foc R4T)</p>	
10	<p><b>Toma y envío de muestras</b> Adecuada toma y envío de muestras de <i>Fusarium</i>, siguiendo el instructivo específico que se incluye en el Plan Nacional de Contingencia para <i>Fusarium</i>.</p>	

**Anexo 8.-** Manual de procedimientos técnicos para el registro y certificación de centros de producción, viveros y productores de material vegetal de propagación de banano y otras musáceas

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y  
CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y  
PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO  
Y OTRAS MUSÁCEAS**

Edición No: 0

Fecha de Aprobación:

PROCESO: SANIDAD VEGETAL

SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO

REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4

REPÚBLICA DEL ECUADOR

MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, ACUACULTURA  
Y PESCA

AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA  
CALIDAD DEL AGRO – AGROCALIDAD



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA ECUATORIANA  
DE ASEGURAMIENTO  
DE LA CALIDAD DEL AGRO

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL  
REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN,  
VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE  
PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS

Paginación:

Página 1 de 22

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>		<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

### TABLA DE RESPONSABILIDADES

	Nombre	Cargo	Firma
<b>Elaboración</b>	Ing. Gustavo García	Coordinador Control Material Propagativo	
	Ing. Andrés Donoso	Profesional Fitosanitario	

	Nombre	Cargo	Firma
<b>Revisión técnica</b>			
Dirección de Sanidad Vegetal		Director Sanidad Vegetal	
Coordinación Cuarentena Vegetal		Coordinador Subproceso	
Coordinación Acceso a Mercados Internacionales		Coordinador Subproceso	
Coordinación Programas Específicos		Coordinador Subproceso	
Coordinación Material Propagativo		Coordinador Subproceso	
Carchi		Coordinador Provincial	
Esmeraldas		Coordinador Provincial	
Pichincha		Coordinador Provincial	
Guayas		Coordinador Provincial	
El Oro		Coordinador Provincial	
Manabí		Coordinador Provincial	

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>		<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

Loja		Coordinador Provincial	
Sucumbíos		Coordinador Provincial	
Cotopaxi		Coordinador Provincial	
Azuay		Coordinador Provincial	
Imbabura		Coordinador Provincial	
Chimborazo		Coordinador Provincial	
Tungurahua		Coordinador Provincial	
Bolívar		Coordinador Provincial	
Cañar		Coordinador Provincial	
Los Ríos		Coordinador Provincial	
Santo Domingo		Coordinador Provincial	
Santa Elena		Coordinador Provincial	
Orellana		Coordinador Provincial	
Napo		Coordinador Provincial	
Pastaza		Coordinador Provincial	
Morona Santiago		Coordinador Provincial	
Zamora Chinchipe		Coordinador Provincial	
Galápagos		Coordinador Provincial	
Jurídico		Director Jurídico	
	<b>Nombre</b>	<b>Cargo</b>	<b>Firma</b>
<b>Aprobación</b>		Director Ejecutivo	
Fecha entrada en vigencia: xx-xx-xxxx		Versión: 01	

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y          CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y          PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO          Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
PROCESO: SANIDAD VEGETAL	SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO	
REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4		

### Sección 1. Control, expedición, revisión y distribución del documento

Este documento y sus subsiguientes revisiones son expedidos y controlados por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCALIDAD. El documento es distribuido a todas las localidades dentro de la República de Ecuador, donde se ejecutan las actividades y procesos descritos en el mismo.

El documento se expide solo en copias controladas a los funcionarios identificados en la siguiente tabla, esto asegura que cuando se realizan cambios al documento, los funcionarios identificados se hagan responsables de su aplicación.

Este documento se encuentra disponible en la página web: [www.agrocalidad.gob.ec](http://www.agrocalidad.gob.ec) y será distribuido a los siguientes funcionarios:

Copia del Manual No.	Funcionario	Localidad
1	Archivo AGROCALIDAD	Quito-Planta Central
2	Dirección de Sanidad Vegetal	Quito-Planta Central
3	Dirección Jurídica	Quito – Planta Central
4	Subproceso de Vigilancia Fitosanitaria	Quito-Planta Central
5	Subproceso de Cuarentena Vegetal	Quito-Planta Central
6	Subproceso de Acceso a Mercados Internacionales	Quito-Planta Central
7	Coordinación AGROCALIDAD Carchi	Tulcán
8	Coordinación AGROCALIDAD Imbabura	Ibarra
9	Coordinación AGROCALIDAD Pichincha	Quito
10	Líder AGROCALIDAD Aeropuerto Mariscal Sucre	Quito
11	Coordinación AGROCALIDAD Cotopaxi	Latacunga
12	Coordinación AGROCALIDAD Tungurahua	Ambato
13	Coordinación AGROCALIDAD Chimborazo	Riobamba
14	Coordinación AGROCALIDAD Bolívar	Guaranda

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y          CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y          PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO          Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>		<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

15	Coordinación AGROCALIDAD Cañar	Azogues
16	Coordinación AGROCALIDAD Azuay	Cuenca
17	Coordinación AGROCALIDAD Loja	Loja
18	Coordinación AGROCALIDAD Esmeraldas	Esmeraldas
19	Coordinación AGROCALIDAD Manabí	Portoviejo
20	Líder Puerto Marítimo Manta	Manta
21	Coordinación AGROCALIDAD Los Ríos	Babahoyo
22	Director Técnico Proceso Desconcentrado AGROCALIDAD Guayas	Guayaquil
23	Líder AGROCALIDAD Aeropuerto José Joaquín de Olmedo	Guayaquil
24	Líder AGROCALIDAD Puerto Marítimo Guayaquil	Guayaquil
25	Coordinación AGROCALIDAD El Oro	Machala
26	Coordinación AGROCALIDAD Sucumbíos	Nueva Loja
27	Coordinación AGROCALIDAD Orellana	Francisco de Orellana
28	Coordinación AGROCALIDAD Napo	Tena
29	Coordinación AGROCALIDAD Pastaza	Puyo
30	Coordinación AGROCALIDAD Morona Santiago	Morona Santiago
31	Coordinación AGROCALIDAD Zamora	Zamora Chinchipe
32	Inspectores Fitosanitarios	Nivel Nacional
33	Biblioteca de AGROCALIDAD	Quito – Planta Central

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		<b>Edición No: 0</b>
		<b>Fecha de Aprobación:</b>
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>	<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

Dadas las características de dinamismo de las acciones que contempla este Manual y todos aquellos aspectos que en determinado momento pueden ser objeto de reglamentación, se requiere una constante actualización mediante la sustitución de hojas. Las hojas que sean modificadas serán sustituidas por nuevas las cuales deberán llevar la fecha en la cual se efectuó la modificación y la disposición legal que la autoriza.

Cualquier modificación del presente Manual requerirá de la aprobación del Director Ejecutivo de AGROCALIDAD.

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y          CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y          PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO          Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
PROCESO: SANIDAD VEGETAL	SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO	
REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4		

## Sección 2. Tabla de contenido

sección 1. control, expedición, revisión y distribución del documento.....	4
sección 2. tabla de contenido .....	7
sección 3. introducción .....	8
3.1. Objetivos.....	8
3.2. Alcance.....	8
3.3. Definiciones y abreviaturas .....	8
3.4. Base legal.....	10
3.5 Punto oficial de contacto, organización nacional de protección fitosanitaria de la república de ecuador .....	10
Sección 4. Procedimiento para el registro y certificación de viveros y productores de partes vegetativas y plántulas de banano y musáceas. ....	11
Sección 5. Control post certificación .....	15
Sección 6. Modificaciones de información del registro y certificación.....	15
Sección 7. Renovación de la certificación .....	16
Sección 8. Cancelación del certificado.....	16
Sección 9. Obligaciones del propietario o representante legal .....	16
Sección 10. Sanciones pos-certificación .....	17

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y          CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y          PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO          Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
PROCESO: SANIDAD VEGETAL	SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO	
REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4		

### Sección 3. Introducción

#### 3.1. Objetivos

- a) Establecer los procedimientos para el registro y certificación de viveros, laboratorios, centros de propagación de partes vegetativas, plántulas, y multiplicadores de plantas así como de los comercializadores de plantas de banano y musáceas.
- b) Garantizar que el material de propagación vegetal de los viveros provengan de INIAP, centros de investigación o laboratorios certificados reconocidos por AGROCALIDAD.

Definir los criterios para las sanciones pos-registro y certificación que tuvieran lugar por el incumplimiento de la normativa legal vigente.

#### 3.2. Alcance

Este manual se aplica a todas las personas naturales o jurídicas que realizan actividades de producción y comercialización de partes vegetativas, plántulas y plantas de banano y musáceas dentro del territorio ecuatoriano a través de la Dirección de Sanidad Vegetal y procesos desconcentrados de AGROCALIDAD.

#### 3.3. Definiciones

El manual se basa en los conceptos y definiciones establecidos en la NIMF N° 5 Glosario de términos fitosanitarios, de la CIPF. Adicionalmente se citan las siguientes definiciones:

<b>Centros de propagación/producción vegetativa</b>	Espacio físico o local donde se realiza el proceso de multiplicación vegetal, sean estos laboratorios de cultivo <i>in-vitro</i> , o viveros.
<b>Clon</b>	Grupo de individuos de ascendencia genética común, propagados vegetativamente por semillas, así como los micro-propagados por segmentos de tejidos o por células en el laboratorio. (Manual propagación IICA-AGROCALIDAD).
<b>Control fitosanitario</b>	Aplicación de prácticas que puede incluir sustancias o agro-químicos que permite el control de plagas. (Manual propagación IICA-AGROCALIDAD).
<b>Control oficial</b>	Observancia activa de la <b>reglamentación fitosanitaria</b> y aplicación de los procedimientos fitosanitarios obligatorios, con el propósito de erradicar o contener las <b>plagas cuarentenarias</b> o manejar las <b>plagas no cuarentenarias reglamentadas</b> (véase el Suplemento n. ° 1 del Glosario) [CIMF, 2001].
<b>Comercializador</b>	Persona natural o jurídica que acopia y comercializa material vegetal de propagación.
<b>Cultivar o variedad</b>	Nombre genérico que se utiliza para referirse indistintamente a variedades, líneas, híbridos o clones que se estén utilizando como materiales comerciales para siembra.

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y          CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y          PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO          Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
PROCESO: SANIDAD VEGETAL	SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO	
REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4		

	(Manual propagación IICA-AGROCALIDAD).
<b>Examen visual</b>	Examen físico de <b>plantas, productos vegetales</b> u otros artículos reglamentados utilizando solo la vista, una lupa, un estereoscopio o microscopio para detectar plagas o contaminantes sin realizar pruebas ni procesos [NIMF n.º 23, 2005].
<b>Fumigación</b>	<b>Tratamiento</b> con un agente químico que alcanza al <b>producto básico</b> en forma total o principalmente en estado gaseoso [FAO, 1990; revisado FAO, 1995].
<b>Inspección</b>	Examen visual <b>oficial</b> de <b>plantas, productos vegetales</b> u otros <b>artículos reglamentados</b> para determinar si hay <b>plagas</b> y/o determinar el cumplimiento con las <b>reglamentaciones fitosanitarias</b> [FAO, 1990; revisado FAO, 1995; anteriormente <b>inspeccionar</b> ].
<b>Inspector</b>	Persona autorizada por una <b>Organización Nacional de Protección Fitosanitaria</b> para desempeñar sus funciones [FAO, 1990].
<b>Legislación</b>	Cualquier decreto, ley, reglamento, directriz u otra orden administrativa que promulgue un gobierno [NIMF n.º 3, 1996].
<b>Legislación fitosanitaria</b>	Leyes básicas que conceden la autoridad legal a la <b>Organización Nacional de Protección Fitosanitaria</b> a partir de la cual pueden elaborar las <b>reglamentaciones fitosanitarias</b> [FAO, 1990; revisado FAO, 1995].
<b>Norma</b>	Documento establecido por consenso y aprobado por un organismo reconocido, que proporciona, para un uso común y repetido, reglas, directrices o características para actividades o sus resultados, con el fin de conseguir un grado óptimo de orden en un contexto dado [FAO, 1995; definición de <b>GUÍA ISO/IEC 2:1991</b> ].
<b>Plaga</b>	Cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las <b>plantas o productos vegetales</b> [FAO 1990; revisado FAO, 1995; CIPF, 1997].
<b>Plantas</b>	Plantas vivas y partes de ellas, incluidas las <b>semillas</b> y el <b>germoplasma</b> [FAO, 1990; revisado CIPF, 1997; aclaración, 2005].
<b>Plantas in Vitro</b>	Clase de producto básico para plantas en un medio aséptico y en un contenedor cerrado [FAO, 1990; revisado CEMF, 1999; CIMF, 2002 anteriormente plantas en cultivo de tejidos
<b>Plántula</b>	Embrión en crecimiento o planta joven que emerge de la semilla mientras depende de sus propios constituyentes. Consiste en plúmula y radícula.
<b>Reglamentación fitosanitaria</b>	Norma <b>oficial</b> para prevenir la <b>introducción</b> y/o <b>dispersión</b> de las <b>plagas cuarentenarias</b> o para limitar las repercusiones económicas de las <b>plagas no cuarentenarias reglamentadas</b> , incluido el establecimiento de procedimientos para la <b>certificación fitosanitaria</b> [FAO, 1990; revisado FAO, 1995; CEMF, 1999; revisado CIMF, 2001].
<b>Reproducción asexual</b>	Multiplicación de individuos mediante segmentos de tallo, hojas, anteras, para incrementar su número sin alterar las características genéticas iniciales del material de partida o plantas madre.
<b>Semillero</b>	Área de terreno que dispone de las condiciones adecuadas para ser utilizadas en la siembra de semillas o material vegetal. (Manual propagación IICA-AGROCALIDAD).
<b>Tratamiento</b>	Procedimiento <b>oficial</b> para matar, <b>inactivar</b> o eliminar <b>plagas</b> o ya sea para esterilizarlas

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y          CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y          PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO          Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
PROCESO: SANIDAD VEGETAL	SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO	
REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4		

	o desvitalizarlas [FAO 1990; revisado FAO, 1995; NIMF n.º 15, 2002; NIMF n.º 18, 2003; CIMF, 2005].
<b>Viveristas</b>	Personas dedicadas a la producción y comercialización de plantas en vivero. (Manual propagación IICA-AGROCALIDAD).
<b>Vivero</b>	Ambiente que permite el desarrollo de material vegetal en condiciones controladas. (Manual propagación IICA-AGROCALIDAD).
<b>Retoños/Yemas, cormos o hijos</b> <b>y</b>	Partes vegetativas que, una vez separados de la planta madre, pueden realizar su ciclo de crecimiento y producción, reproducción vegetativa o asexual.

### 3.4. Base legal

- a) La Ley de Sanidad Vegetal y su Reglamento codificación 315 de 16 de abril de 2004; Acuerdo Ministerial N° 446, publicado en el Registro Oficial 342 del 22 de Diciembre de 1993.
- b) Decreto Ejecutivo N°1449 de creación de AGROCALIDAD, de fecha 22 de noviembre de 2008, publicado en el Registro Oficial 479 del 2 de diciembre del 2008.
- c) Ley de semillas codificación 2004-12, registro oficial N° 315 de 16 de abril de 2004, reglamento edición especial 1 registro oficial 20 marzo 2003.

### 3.5 Punto oficial de contacto, Organización Nacional de Protección Fitosanitaria de la República de Ecuador

El punto oficial de contacto en la República de Ecuador es la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCALIDAD. Todas las comunicaciones en relación con este Manual Operacional deben ser dirigidas a:

Director Ejecutivo de AGROCALIDAD

Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro - AGROCALIDAD

República de Ecuador

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-316 y Amazonas, Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 9no. Piso.

Teléfono: 593 2 2 543 319

Fax: 593 2 2 543 319

e-mail: [direccion@agrocalidad.gob.ec](mailto:direccion@agrocalidad.gob.ec); relaciones.internacionales@agrocalidad.gob.ec

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>	<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

**Sección 4.** Procedimiento para el registro y certificación de viveros y productores de partes vegetativas y plántulas de banano y musáceas.

#### 4.1 Registro

Para obtener el Registro de Productor – Comercializador de partes vegetativas, y plántulas, semillas de banano y musáceas (viveros), el propietario o representante legal deberá presentar a AGROCALIDAD los siguientes documentos:

- a) Carta de solicitud de Registro como productor – comercializador suscrita por el propietario o representante legal de la empresa. En caso de que éste actúe por medio de un mandatario, deberá adjuntar una copia del poder y cédula, firmada por el propietario o representante legal.
- b) Documento de Identidad, Copia del RUC o RISE.
- c) Copia de cédula de identidad de la persona natural o del representante legal.
- d) Copia de los estatutos que constituyen la personería jurídica. Si fuese necesario.
- e) Nombramientos legalizados de la persona jurídica en el Registro Mercantil. Si fuese necesario.
- f) Dirección, teléfono, persona de contacto, ubicación georeferenciada en UTM del vivero o establecimiento.
- g) Listado del material vegetal de banano y musáceas que produce o compra: especie, variedades o clones, origen, cantidad.
- h) Presentar documento de procedencia del material. Trazabilidad de plantas madre
- i) Croquis de la ubicación del lugar en el que se encuentre el vivero o establecimiento de propagación de banano y musáceas.
- j) Comprobante de pago de los servicios para la inspección según el tarifario establecido por AGROCALIDAD vigente.

Además de lo señalado anteriormente, la aprobación del registro estará sujeta a los resultados del informe de inspección.

#### 4.2 Requisitos técnicos para el registro, certificación de viveros, productores de partes vegetativas, plántulas de banano y musáceas:

Poseer instalaciones, equipos y materiales que garanticen una adecuada producción de material de banano y musáceas como:

- a) Áreas, invernaderos o viveros identificados y separados para: germinación, adaptación, climatización cuarentena, crecimiento y almacenamiento, distribución y venta del material de banano y musáceas.
- b) Material vegetativo, procedente de centros de investigación, laboratorios u otros establecimientos registrados por AGROCALIDAD.
- c) Áreas separadas e identificadas según la especie, variedad o clon.
- d) Productos químicos utilizados deben ser aprobados y registrados
- e) Plan de manejo fitosanitario y de producción de plantas de banano y musáceas.

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
PROCESO: SANIDAD VEGETAL	SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO	
REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4		

- f) Letreros con la identificación de las áreas establecidas en los numerales anteriores.
- g) Tener personal capacitado en manejo, y control de plagas.
- h) Si el propietario o representante legal tiene más de un establecimiento de producción, deberá registrar todos los establecimientos, realizando el pago respectivo de cada uno por separado y llenando el formulario respectivo para cada lugar.
- i) Para la comercialización se deberá solicitar la emisión de la guía de movilización de material vegetal (ver anexo 1).
- j) Etiquetas de identificación de lotes y camas de plantas y del material propagativo previo a su comercialización y que contengan la siguiente información:
  - 1) Fecha de siembra
  - 2) Código de registro del vivero
  - 3) Especie
  - 4) Variedad o clon
  - 5) Lugar de procedencia (nombre del laboratorio de ser el caso)

### 4.3 Inspección

Una vez presentada la documentación requerida, el personal autorizado en cada coordinación provincial realizará la verificación documental a la que hace referencia el presente manual, e informará a la autoridad para que disponga realizar la inspección.

En la inspección del vivero se realizará la verificación de todos aquellos ítems que se señalan en este manual, luego de lo cual se procederá a llenar el formulario correspondiente (ver anexo 2) "Solicitud de Registro de Centros de producción y venta de material vegetal de propagación".

### 4.4 Criterios técnicos para la inspección

Con el objeto de unificar los criterios de inspección y supervisión para que la evaluación sea objetiva, se establecen las siguientes consideraciones:

- a) Verificar que las partes vegetativas, plántulas y el material provengan de campos de productores, centros de investigación públicos o privados, registrados y certificados por AGROCALIDAD.
- b) Cuando el material de propagación sea importado verificar que se dé cumplimiento a la Resolución 048 que establece los requisitos fitosanitarios para la importación de plantas in vitro de musáceas.
- c) Las plantas deben estar libre de plagas (thrips, araña roja, cochinillas, pulgón, mosca blanca) y las que se transmiten por la semilla asexual como: bacteriosis, llaga estrellada, elefantiasis, mal de Panamá y virosis (BBrMV y BSV), plagas como picudos y nemátodos.
- d) El suelo debe estar libre de hongos (*Fusarium oxysporum* f *sp cubense*) y bacterias (*Ralstonia solanacearum*), situación que debe justificarse mediante análisis en un laboratorio registrado en AGROCALIDAD, el laboratorio de la Institución será el laboratorio de referencia.
- e) Constatar que la fuente de abastecimiento de agua proviene de lugares libres de contaminación.

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>	<b>Edición No: 0</b>
	<b>Fecha de Aprobación:</b>
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>	<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>	

- f) Que los suelos tengan una inclinación y drenaje adecuado.
- g) Todo material (equipo o herramientas) utilizado en el proceso de multiplicación vegetal debe estar desinfectado.
- h) En caso de utilizar sustratos, verificar que se dé cumplimiento a lo especificado en el artículo 8 de la Resolución 108 publicada en el registro oficial 90 de 17 de diciembre de 2009.
- i) Si se trata de un vivero permanente verificar que las instalaciones dispongan entre otros aspectos de: cercas, cortinas rompevientos, eras de germinación o germinadores, caminos, sistema de irrigación, umbráculos, etc.
- j) Verificar, en caso de utilización de productos químicos, que éstos se encuentren registrados en AGROCALIDAD, así como también las personas naturales o jurídicas que realizan la aplicación.
- k) Toma de muestras (según Resolución de laboratorios)

#### **4.5 Norma ISO/IEC 17025 Laboratorios**

Instalaciones y Condiciones Ambientales.

La norma dice que; las instalaciones del laboratorio para ensayos y/o calibraciones, asegurando que las condiciones ambientales no invaliden los resultados o afecten adversamente la calidad requerida de cualquier medición. Los requisitos técnicos para las instalaciones y las condiciones ambientales que puedan afectar el resultado de los ensayos y calibraciones deben estar documentados.

El laboratorio debe hacer seguimiento, controlar y registrar las condiciones ambientales, requeridas por especificaciones, métodos y procedimientos pertinentes o cuando estas condiciones influyan en la calidad del resultado, por lo que se debe poner atención;

- a) A la esterilidad biológica
- b) Polvo
- c) Interferencia electromagnética.
- d) Radiación
- e) Humedad
- f) Suministro eléctrico
- g) Temperatura
- h) Niveles de Ruido y Vibraciones.

Debe haber una separación eficaz entre las áreas cercanas en las cuales se realizan actividades incompatibles, para prevenir la contaminación cruzada. Se controlará el acceso y uso de las áreas que afecten la calidad de los ensayos y/o calibraciones.

Se deben tomar medidas para asegurar el orden y la limpieza del laboratorio, preparando procedimientos especiales.

Para los laboratorios y otros establecimientos de multiplicación in vitro es necesario se tomen en consideración los siguientes aspectos:

- a) Verificar la existencia de por lo menos tres áreas completamente diferenciadas y separadas.

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y          CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y          PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO          Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>	<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

- b) Área o Cabina de flujo laminar.
- c) Esta área deberá estar limpia para realizar cualquier trabajo en su interior, asegurando de esta manera su condición aséptica.
- d) Esta zona debe estar completamente aislada de las otras, se debe evitar que entre el polvo o los insectos.

Área desarrollo in vitro: Es el área donde se colocará el explante después de la siembra, y donde además se desarrollará durante todas fases del programa. El explante, será colocado sobre repisas de vidrio, con iluminación artificial. Verificar que contenga por lo menos:

- a) Repisas de Vidrio de varios pisos (recomendable)
- b) Lámparas de tubo fluorescente.
- c) Frascos u otro material necesario.
- d) Condiciones de temperatura y humedad relativa controladas.

Área de trabajo: Es un área de tránsito abierto, en este lugar se recibe, procesa y desinfecta todo (sustrato, medio de cultivo, material), para que entre asépticamente a las cámaras. Verificar que dispongan de al menos:

- a) Balanza analítica
- b) Refrigeradora
- c) Autoclave
- d) Lavaplatos
- e) Cocina
- f) Termómetro

#### 4.6 Informe técnico de inspección

El técnico de AGROCALIDAD deberá presentar en un plazo no mayor a 24 horas luego de realizada la inspección un informe de evaluación de los requisitos exigidos para el registro de viveros.

Si el informe del técnico es favorable, AGROCALIDAD realizará el registro y emitirá el certificado de funcionamiento de viveros y/o centros de propagación. (Permiso de funcionamiento).

En caso de que no se cumpla con los requisitos se comunicará por escrito al interesado, indicando las causas por las cuales no ha sido aprobada su solicitud y por lo tanto no se registra y se suspende el trámite. El interesado luego de haber realizado los correctivos podrá solicitar una nueva inspección; AGROCALIDAD procederá como si fuera la primera vez.

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>	Edición No: 0
	Fecha de Aprobación:
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>	<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>	

#### 4.7 Emisión del Certificado de Calidad Fitosanitaria

El certificado se emitirá previo informe favorable del técnico de AGROCALIDAD, el cual le permitirá registrar al establecimiento para funcionar (al establecimiento) con normalidad. Para la renovación del registro (previo a la emisión del certificado de funcionamiento) (ver anexo 3), el propietario o representante legal cumplido los dos años deberá presentar las actualizaciones respectivas a la información presentada en el registro inicial.

La solicitud para cada caso será tramitada en cada coordinación provincial, si una persona natural o jurídica ya está registrada en AGROCALIDAD, no deberá registrarse por otra ocasión, pero si actualizará la información bajo los términos establecidos en este manual y además cumplirá con el procedimiento administrativo.

AGROCALIDAD emitirá el certificado que incluye un código, el mismo que tendrá una vigencia de dos años y garantizará que el establecimiento reúne todas las condiciones técnicas, fitosanitarias y que comercializa material genético proveniente de centros de investigación, laboratorios o jardines clonales registrados.

Las oficinas autorizadas para expedir el certificado de registro del centro de propagación de material vegetativo serán las oficinas de AGROCALIDAD ubicadas en las provincias. El registro y emisión del certificado certificación permiten establecer una base de datos a nivel nacional de los viveros y/o centros de material de propagación que funcionan en el país.

#### Sección 5. Control post certificación

Los técnicos autorizados en cada una de las provincias realizarán visitas de supervisión a los viveros o establecimientos de producción de plantas de banano y musáceas, durante el tiempo de vigencia de la certificación, a fin de ejercer el seguimiento y control, pudiendo suspender o revocar la misma, por incumplimiento de las obligaciones del productor o comercializador o su representante legal. Durante la inspección, AGROCALIDAD se reserva el derecho de tomar muestras de material vegetal, suelo o agua, para su respectivo análisis en el laboratorio de AGROCALIDAD (laboratorio acreditado por la OAE).

##### 5.1 Supervisión

Se realizarán dos supervisiones pos-registro en el transcurso del año, pudiéndose realizar otra inspección por pedido expreso del propietario o para verificar alguna denuncia. Durante la supervisión se determinará la conformidad con los requisitos específicos para la certificación en base a los criterios establecidos por AGROCALIDAD.

El certificado podrá ser revisado a petición de terceros, pudiendo ser ratificado o revocado previa la inspección.

#### Sección 6. Modificaciones de información del registro y certificación

Una vez emitido el certificado de registro y certificación para producir y comercializar partes vegetativas y plántulas y plantas de banano y musáceas, ante posibles cambios de los datos consignados en la solicitud de registro, estos deberán ser comunicados a AGROCALIDAD.

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>	<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

La solicitud de cambios a realizar deberá estar acompañada por los documentos justificativos según sea el caso.

### **Sección 7. Renovación de la certificación**

Para la renovación de la certificación, los interesados deberán solicitarla a AGROCALIDAD al menos con 30 días de anticipación a su vencimiento y deberá acompañarse de la Solicitud de registro respectiva y los documentos de actualización en caso de ser necesario. AGROCALIDAD, no concederá la renovación de la certificación en aquellos casos en los que, los técnicos responsables de las inspecciones reporten el incumplimiento de cualquiera de las disposiciones establecidas en el presente Manual de procedimientos o incumplan las normas vigentes.

### **Sección 8. Cancelación del certificado**

Son causales de cancelación del registro las siguientes:

- a) Notificaciones por escrito del abandono de la actividad por parte del propietario del vivero o centro de producción de partes vegetativas y plántulas y plantas de banano y musáceas.
- b) No renovación del certificado para su normal funcionamiento.
- c) Incumplimiento de la presente normativa.
- d) Incumplimiento de las disposiciones legales vigentes.
- e) A solicitud documentada por terceras personas naturales o jurídicas y constatación por los técnicos de AGROCALIDAD.

### **Sección 9. Obligaciones del propietario o representante legal**

- a) Informar por escrito a AGROCALIDAD, los cambios que se realicen con respecto a lo que consta en la solicitud de registro que permite su funcionamiento.
- b) Conforme lo dispone el art. 36 del reglamento a la Ley de Sanidad Vegetal, los propietarios de viveros o establecimientos de propagación de material vegetal están obligados a mantener registros sobre especies, variedades, procedencia del material vegetal utilizado, tratamientos fitosanitarios efectuados y destino del material de propagación Vegetal deberá también mantener un archivo con toda la documentación técnica-administrativa que justifique la producción, venta, movilización (copia de las guías) y otras actividades del vivero o centro de producción de plantas de banano y musáceas. Esta información será entregada a los inspectores de Sanidad
- c) Informar sobre abandono de la actividad, para que AGROCALIDAD en base a la normativa vigente, proceda según sea necesario.
- d) En este caso el propietario está obligado a eliminar (quemar) todo el material existente, ya que a futuro podría constituirse en un foco de infección.
- e) Permitir la entrada y facilitar el trabajo del personal técnico autorizado de AGROCALIDAD.
- f) Poner a disposición del inspector de AGROCALIDAD la información requerida y brindarle todas las facilidades para realizar la inspección o supervisión.

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>	<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

- g) Informar de forma inmediata a AGROCALIDAD a través de sus oficinas provinciales sobre el apareamiento o presencia de plagas.
- h) Separar y destruir las plántulas muertas, débiles, mal formadas, raquíticas o en estado de marchitez irreversible.
- i) Colocar en un lugar visible del vivero o centro de producción de banano y musáceas el correspondiente certificado de registro.
- j) Para la comercialización "El propietario" deberá adjuntar un análisis de laboratorio que demuestre que el material a comercializar está libre de plagas.

#### **Sección 10. Sanciones pos-certificación**

La clausura será una sanción inmediata que se aplicará a quienes no cuenten con el respectivo registro Si en la inspección post-certificación se detecta el cometimiento de alguna infracción, se notificará al presunto responsable de la misma, para que en el término de 3 días conteste los cargos que se le formulan.

Con la contestación o en rebeldía se abrirá la causa a prueba por el término de 6 días, luego de la cual el funcionario resolverá en un plazo de tres días.

Los establecimientos que no obstante hubiesen sido clausurados, siguiere multiplicando o expendiendo material de propagación, serán sancionados de conformidad a la Ley sin perjuicio del decomiso e incineración del material indicado.

Como lo establece el Art. 38.- del reglamento a la Ley de Sanidad Vegetal, los inspectores de Sanidad Vegetal verificarán el estado fitosanitario del material vegetal con fines de propagación. En caso de encontrarse material en mal estado fitosanitario, el propietario obligatoriamente deberá aplicar medidas de control cuyos costos estarán a su cargo.

Las inspecciones se realizarán previa coordinación con la fuerza pública.

#### **10.1 Criterios para establecimiento de sanciones pos registro**

- a) Falta de señalética en el interior o exterior del centro de producción de plantas.
- b) Falta de materiales para la propagación.
- c) Falta de personal técnico o de apoyo insuficiente.
- d) Documentación desactualizada.
- e) Acumulación de aguas lluvias u otro tipo de líquidos en el interior del vivero.
- f) Plantas en fundas que no reúnan las condiciones técnicas para su conservación.
- g) Presencia de basura, líquidos o materiales extraños.
- h) Deterioro de la infraestructura interna del establecimiento.
- i) Falta de registros de la procedencia del material genético.
- j) Falta o deterioro de herramientas.

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		<b>Edición No: 0</b>
		<b>Fecha de Aprobación:</b>
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>	<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

- k) Deficiencia en las instalaciones para el suministro de agua.
- l) Mezcla de material genético de diferentes variedades.
- m) Detección de material genético de procedencia desconocida.
- n) Falta de control fitosanitario.
- o) Presencia de productos químicos no autorizados (herbicidas, lubricantes, combustible, insecticidas).

La clausura será una sanción inmediata al establecimiento que incumpla con algún ítem dentro de la presente normativa.

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		<b>Edición No: 0</b>
		<b>Fecha de Aprobación:</b>
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>	<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

**Sección 11. Anexos**

Anexo 1. Guía de Movilización

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		<b>Edición No: 0</b>
		<b>Fecha de Aprobación:</b>
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>	<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

Anexo 2. Solicitud de Registro

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		Edición No: 0
		Fecha de Aprobación:
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>	<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

Continuación Anexo 2.

CROQUIS DE UBICACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO O EMPRESA

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL REGISTRO Y CERTIFICACIÓN DE CENTROS DE PRODUCCIÓN, VIVEROS Y PRODUCTORES DE MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE BANANO Y OTRAS MUSÁCEAS</b>		<b>Edición No: 0</b>
		<b>Fecha de Aprobación:</b>
<b>PROCESO: SANIDAD VEGETAL</b>	<b>SUBPROCESO: CONTROL MATERIAL PROPAGATIVO</b>	
<b>REQUISITO DE LA NORMA: 4.2.3 / 4.2.4</b>		

Anexo 3. Permiso de funcionamiento

**Anexo 9.-** Instructivo específico de toma y envío de muestras de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* raza 4 tropical para el laboratorio de biología molecular vegetal



INSTRUCTIVO

INSTRUCTIVO DE MUESTREO PARA  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4-  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
DIAGNÓSTICO VEGETAL

INT/BM/24

Rev. # 3

Hoja 1 de 13



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA ECUATORIANA  
DE ASEGURAMIENTO  
DE LA CALIDAD DEL AGRO

## LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### INSTRUCTIVO INT/BM/24

INSTRUCTIVO DE MUESTREO PARA *Fusarium oxysporum* f. sp.  
*cubense* raza tropical 4 - LABORATORIO DE BIOLOGÍA  
MOLECULAR DIAGNÓSTICO VEGETAL

Rev. 3

ELABORADO	REVISADO	REVISADO	APROBADO
Responsable Técnico	Responsable de Área	Responsable Calidad	Director Laboratorios

*Handwritten mark*



## ÍNDICE

<b>1. OBJETO</b>	4
<b>2. ALCANCE</b>	4
<b>3. REFERENCIAS</b>	4
3.1. Documentos utilizados en la elaboración	4
3.2. Documentos a utilizar conjuntamente con el INT	4
<b>4. GENERAL</b>	5
4.1. Definiciones	5
4.2. Abreviaturas	5
<b>5. DESCRIPCIÓN GENERAL</b>	6
5.1. Identificación de las muestras	6
5.2. Materiales	7
5.3. Consideraciones generales.	7
<b>6. MUESTREO</b>	8
6.1. Tipo de muestra	8
6.2. Procedimiento de muestreo	8
<b>7. ANEXOS</b>	9
Anexo 1. Etiqueta de envío de muestras	10
Anexo 2. Orden de trabajo	11
Anexo 3. Descripción de síntomas	12

## 1. OBJETO

El presente instructivo tiene por objeto proporcionar las condiciones específicas para la toma y envío de muestras sospechosos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4 para el correspondiente análisis en el Laboratorio de Biología Molecular.

## 2. ALCANCE

El instructivo será aplicado por los inspectores fitosanitarios de la Dirección de Sanidad Vegetal para el muestro de musáceas y plantas hospedantes sospechosas de estar infectadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4 para su diagnóstico en el Laboratorio de Biología Molecular.

## 3. REFERENCIAS

### 3.1. Documentos utilizados en la elaboración

- PGC/LA/01, Procedimiento para la Gestión de Documentos.
- Ley de Sanidad Vegetal y su Reglamento, Codificación 8, Registro Oficial Suplemento 315 de 16 de Abril del 2004, Republica de Ecuador.
- FAO. (2005). NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS.
- FAO. (1996). NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS
- FAO. (2006). NIMF n° 5. Glosario de términos fitosanitarios.
- FAO. (2006). NIMF n° 27. Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas.
- FAO. (2004). NIMF n° 11. Análisis de riesgo de plagas para plagas cuarentenarias, incluido el análisis de riesgos ambientales y organismos vivos modificados.
- FAO. (2008). NIMF n° 31. Metodologías para muestreo de envíos.
- Dita, M. A., Echegoyén P. E. & Pérez L. F. (2013). Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. En un país de la región del OIRSA. OIRSA, El Salvador.
- Buddenhagen, I. (2009). Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of 'tropical race 4' to better manage banana production. ISHS Acta Horticulturae 828: International Symposium on Recent Advances in Banana Crop Protection for Sustainable Production and Improved Livelihoods.

### 3.2. Documentos a utilizar conjuntamente con el INT

- Historial de modificaciones.
- PEE/BM/02. Procedimiento específico de ensayo para el diagnóstico *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4 en el Laboratorio Biología Molecular.

#### 4. GENERAL

##### 4.1. Definiciones

- \* **Control (de una plaga):** Supresión, contención o erradicación de una población de plagas.
- \* **Cuarentena:** Confinamiento oficial de artículos reglamentados para observación e investigación o para inspección, prueba o tratamiento adicional.
- \* **Diagnóstico de plaga:** Proceso de detección e identificación de una plaga.
- \* **Erradicación:** Aplicación de medidas fitosanitarias para eliminar una plaga de un área
- \* **Foc:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*.
- \* **Foc RT4:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza tropical 4. Raza con capacidad patogénica sobre variedades del subgrupo Cavendish y otros clones de bananos y plátanos en condiciones del trópico húmedo caliente (ver raza). Los aislados de esta raza pertenecen hasta el momento al Grupo de Compatibilidad Vegetativa 01213 (Buddenhagen, 2009).
- \* **Hongos:** Designa a un grupo de organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y las setas. Se clasifican en un reino distinto al de las plantas, animales y bacterias. Esta diferenciación se debe, entre otras cosas, a que poseen paredes celulares compuestas por quitina, a diferencia de las plantas, que contienen celulosa. Actualmente se consideran como un grupo heterogéneo, polifilético, formado por organismos pertenecientes por lo menos a tres líneas evolutivas independientes (Dita, M. A., Echegoyén P. E. & Pérez L. F. 2013).
- \* **Muestra:** Individuo o grupo de individuos extraídos de una población mediante un procedimiento de muestreo.
- \* **Muestreo:** Procedimiento mediante el cual se recolecta muestras representativas de una especie o especies para realizar un análisis.
- \* **Plaga:** Cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales (NIMF N°5).
- \* **Plaga cuarentenaria:** Plaga de importancia económica ya que representa un potencial peligro, aun cuando la plaga no esté presente o, si está presente, no está extendida y se encuentra bajo control oficial.
- \* **Raza:** Grupo de individuos de una especie con atributos fenotípicos y genéticos comunes que los diferencian de la población general de la especie. En el caso de los patógenos de las plantas se refiere a genes de avirulencia que definen las relaciones patógeno-hospedero. En el caso de Foc/Musa spp., se ha aplicado el término de raza a poblaciones que tienen el atributo de infectar clones específicos y no tiene sentido genético, por lo cual las razas definidas pueden realmente tener individuos con diferencias de patogenicidad en relación a otros clones (Dita, M. A., Echegoyén P. E. & Pérez L. F. 2013).

##### 4.2. Abreviaturas

- SGC: Sistema de Gestión de Calidad y Competencia Técnica, basado en los requisitos de la norma NTE INEN ISO/IEC 17025.  
DL: Director de Laboratorios



## INSTRUCTIVO

### INSTRUCTIVO DE MUESTREO PARA *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4- LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DIAGNÓSTICO VEGETAL

INT/BM/24

Rev. # 3

Hoja 6 de 13

- RC: Responsable de Calidad  
RT: Responsable Técnico  
A: Analista  
NA: No aplica  
Foc RT4: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4  
GPS: Sistema de posicionamiento global o Global Positioning System en inglés  
DSV: Dirección de Sanidad Vegetal

## 5. DESCRIPCIÓN GENERAL

El presente instructivo expone los lineamientos para la toma, conservación y envío de muestras de musáceas y plantas hospedantes al Laboratorio de Biología Molecular. El ensayo que se realiza en el laboratorio servirá para la confirmación de la presencia o ausencia de Foc RT4.

El muestreo para programas de monitoreo o sospecha debido a la presencia parcial o total de síntomas o afecciones características que definen la enfermedad producida por el fitopatógeno, será llevado a cabo por la autoridad competente.

Los técnicos o inspectores fitosanitarios de AGROCALIDAD serán encargados de las actividades de recolección y toma de muestras en puntos de control (puerto, aeropuerto, entre otros), localidades, viveros, entre otros, así como también, serán responsables de la preservación y envío de muestras de plantas o partes de tejido vegetal (hojas, tallos, raíz entre otros) según este instructivo de muestreo para ser remitidos al Laboratorio de Biología Molecular para análisis confirmatorio por PCR. Las muestras de plantas recolectadas deben enviarse a los laboratorios de AGROCALIDAD-Tumbaco para el diagnóstico de Foc RT4, bajo medidas de conservación y seguridad.

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no puede ser distinguido morfológicamente de otras "formas especiales" causantes de marchitez en otros hospedantes, *F. oxysporum* endófitos no patógenos, saprófitos y antagonistas. Por lo que es necesario que se analice en un laboratorio por Biología Molecular.

### 5.1. Identificación de las muestras

- Las muestras que ingresan al Laboratorio de Biología Molecular serán codificadas según el procedimiento PGT/LA/06.
- Cada muestra será etiquetada (Anexo 1) y acompañada de una orden de trabajo (Anexo 2). La información general que contendrá dicha orden debe asegurar la trazabilidad de la muestra, requiriéndose datos como: provincia, cantón, parroquia, sector, localidad, predio o finca, propietario, fecha y hora de la visita, ubicación geográfica exacta (GPS), código, número de formulario, información específica del cultivo como: variedad, estado fenológico, exención del cultivo raza, síntomas, entre otros. El formulario deberá disponer de firmas y datos solicitados.
- Cada recipiente, tubo, envase, funda o empaque debe estar etiquetado y prestar las condiciones de esterilidad o limpieza necesarios para que contengan la muestra e impedir cualquier contaminación, fuga y posible diseminación in-situ o ex-situ.

*Man*

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	INSTRUCTIVO	INT/BM/24
	<b>INSTRUCTIVO DE MUESTREO PARA</b> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza tropical 4- <b>LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b> <b>DIAGNÓSTICO VEGETAL</b>	Rev. # 3
		Hoja 7 de 13

## 5.2. Materiales

Los materiales necesarios para toma y envío de muestras de musáceas sospechosas, se enlistan a continuación.

### Toma y envío de muestras de plantas enfermas

- Guantes quirúrgicos.
- Machetes y cuchillos.
- Sobres o fundas de papel
- Papel absorbente (esterilizado) o rollo de papel nuevo
- Plástico
- Marcadores permanentes
- Desinfectantes: hipoclorito de sodio al 2% o productos a base de amonio cuaternario.
- Caja térmica de espuma flex
- Cinta adhesiva
- Geles refrigerantes
- Etiquetas adhesivas
- Mono de seguridad desechable blanco o ropa exclusiva para actividad de muestreo.
- Botas de caucho
- Protector plástico para botas
- Tapa bocas

## 5.3. Consideraciones generales.

- Cualquier planta perteneciente a variedades del subgrupo Cavendish (AAA) o a plátanos de cocción (AAB) con síntomas típicos de marchitez por *Fusarium* (ver Anexo 3, descripción de síntomas) debe ser considerados como un evento sospechoso de Foc RT4.
- Se debe planificar la ruta de muestreo, haciendo un diagrama del campo y de las rutas de inspección que se seguirán con la información provista en el informe técnico del evento sospechoso desarrollado por la DSV.
- El personal de muestreo deberá contar con la debida instrucción para llevar a cabo las tareas y en especial la primera etapa de contención ante la sospecha.
- Es necesario desinfectar las herramientas antes y después de la toma de muestras (cuchillo, navajas, tijeras de podar u otros objetos) desechar guantes (previa desinfección) y otros materiales descartables en forma segura para su destrucción
- La falta de confirmación del diagnóstico no será obstáculo para que con base en el diagnóstico preliminar en campo, se implementen acciones de emergencia contempladas en el plan de contingencia, especialmente las orientadas a la contención y erradicación de la plaga, establecimiento de área o áreas bajo cuarentena, lo cual implica la restricción de movilización de vías de dispersión de Foc RT4 desde el (o las) área(s) infestada(s).
- Las muestras tomadas y enviadas para el diagnóstico en laboratorio, deben ser tratadas como si estuvieran infectadas con Foc R4T, por tanto es imperativo se sigan todas las normas de bioseguridad para una plaga cuarentenaria.
- Se debe eliminar el material sospechoso (toda planta reportada capaz de albergar al patógeno) en condiciones adecuadas.

*Unat*



- El hallazgo de un evento sospechoso es motivo para iniciar la fase de alerta cuarentenaria fitosanitaria contra un probable brote del patógeno, siendo necesario el levantamiento de un informe técnico por parte de la DSV.

## 6. MUESTREO

### 6.1. Tipo de muestra

Las muestras que deben ser tomadas son aquellas que el patógeno puede infectar:

- Raíces
- Rizomas o cormos
- Pseudotallos
- Peciolos

### 6.2. Procedimiento de muestreo

Para la detección de la plaga en plantas cultivadas (tejido vegetal), será necesario tener conocimiento de los síntomas y los signos asociados con este fitopatógeno (Anexo 3, Foto 1 y 2). Además es necesario verificar que todos los materiales estén a la mano antes de realizar la toma de muestras.

- Para verificar los síntomas externos se debe realizar un corte en el pseudotallo aproximadamente a 50 cm de la base de la planta.
- Cubrir el suelo con el plástico y realizar un corte que vaya desde la parte superficial de la planta hasta los vasos centrales y observar cuidadosamente las capas de vasos vasculares.
- Las primeras capas de tejido vegetal que se desprendan deben ser apoyadas en una funda plástica y no directamente en el suelo, así como también las herramientas a utilizar.
- Examinar la presencia de necrosis característica de la infección por *Fusarium* (Anexo 3, Foto 3), si existiera, proceder a tomar un fragmento de este pseudotallo que sea representativo y evitar áreas donde exista descomposición avanzada.
- Las muestras deben consistir en fragmentos de al menos 15 cm de pseudotallo con necrosis interna que indican la infección del patógeno.
- Envolver la muestra con suficiente papel absorbente y colocar en una funda de papel, sellar con cinta y etiquetar.
- La funda de papel y el papel absorbente deben ser esterilizadas por calor (horno) o vapor de agua (autoclave) previo a su uso. Si se trata de rollo de papel nuevo y recientemente adquirido no es necesaria la esterilización.
- Una vez colectada la muestra, colocar el fragmento de pseudotallo inicialmente retirado en la posición original, envolver y cubrir el área con cinta adhesiva. Esta operación busca no dejar expuestos tejidos de la planta o plantas muestreadas y evitar la esporulación del patógeno, el contacto de insectos u otros animales, así como la exposición a la lluvia y el viento.
- En caso de no visualizar síntomas en el pseudotallo, recolectar un pedazo de tejido de rizoma pequeño (5 cm x 5cm) que muestre necrosis vascular. Esto no se recomienda si la pudrición en el rizoma está avanzada. Este pedazo de tejido de rizoma debe ser tomado bajo las mismas condiciones como para el pseudotallo.
- No utilizar fundas plásticas para almacenar la o las muestras colectadas.

- Etiquetar la muestra usando la etiqueta del anexo 1, misma que debe adherirse a la funda de papel.
- Colocar las muestras en una caja espuma flex con geles refrigerantes. Para el envío de la muestra al laboratorio de Biología Molecular se debe preservar la muestra entre 4 y 8°C.
- Puede muestrearse raíz o peciños dependiendo del estado de la infección y teniendo los mismos cuidados que en el muestreo de pseudotallo.

#### 6.2.2. Envío de la muestra al laboratorio

- Enviar la muestra o muestras recolectadas y debidamente conservadas al Laboratorio de Biología Molecular en un plazo máximo de 24 horas después de recolección.
- Adjuntar a la muestra con la orden de trabajo correspondiente, en la cual se describan los datos necesarios de la muestra (Anexo 2)

#### 6.2.3. Condiciones de rechazo de la muestra

- Las muestras que presenten excesiva descomposición no serán procesadas en el laboratorio y se procederá a la correspondiente eliminación por tratarse de una sospecha de un patógeno cuarentenario siguiendo el procedimiento de Tratamiento y eliminación de desechos (INT/BM/23).
- Muestras deterioradas, que presenten marchitez excesiva, líquidos (exudados), mal empacadas o incorrectamente identificadas no serán recibidas por el laboratorio y serán eliminadas por tratarse de una sospecha de un patógeno cuarentenario.
- Muestras de tejido de la planta que no correspondan al sitio propio donde se aloja el patógeno que se desea analizar, tampoco serán recibidas. Es decir muestras de frutos o de hojas, solo las detalladas en el punto 6.1.
- Muestras que no hayan mantenido la cadena de frío.

### 7. ANEXOS

Anexo 1. Etiqueta de envío de muestra

Anexo 2. Orden de trabajo

Anexo 3. Descripción de síntomas

*Qman*

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	INSTRUCTIVO	<b>INT/BM/24</b>
	<b>INSTRUCTIVO DE MUESTREO PARA</b> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza tropical 4-	Rev. # 3
	<b>LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b> <b>DIAGNÓSTICO VEGETAL</b>	Hoja 10 de 13

**Anexo 1. Etiqueta de envío de muestras**

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	<b>LABORATORIOS</b> <b>AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE</b> <b>LA CALIDAD DEL AGRO- AGROCALIDAD</b> <b>FITOPATOLOGIA-ENTOMOLOGIA-NEMATOLOGIA</b>		
	Código Muestra No. _____ Ubicación: _____ Provincia _____ Cantón _____ Parroquia _____ Coord X. _____ Coord Y. _____ Altura _____ Cultivo: _____ Tipo de análisis: _____ Fecha de recolección: _____ Fecha de envío: _____ Recolector: _____		

*Max*



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA ECUATORIANA  
DE ASEGURAMIENTO  
DE LA CALIDAD DEL AGRO

INSTRUCTIVO  
**INSTRUCTIVO DE MUESTREO PARA  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza tropical 4-  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
DIAGNÓSTICO VEGETAL**

INT/BM/24

Rev. # 3

Hoja 11 de 13

**Anexo 2. Orden de trabajo**



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA ECUATORIANA  
DE ASEGURAMIENTO  
DE LA CALIDAD DEL AGRO

**LABORATORIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
ORDEN DE TRABAJO ÁREA VEGETAL**

PG/LA/03-FO02

Rev. 2

No. secuencial: .....

Hoja .... de .....

Fecha de Recepción: .....

No. de Factura/Memorando: .....

Por USD \$: .....

**DATOS DEL CLIENTE**

PERSONA O EMPRESA SOLICITANTE: .....

PERSONA DE CONTACTO: .....

Externo  Interno

DIRECCIÓN: .....

PROVINCIA: .....

CANTÓN: .....

TEL: .....

EMAIL: .....

**DATOS DE LA MUESTRA**

TIPO DE MUESTRA:

VEGETAL: Hojas  Semillas  Tallo  Ramas  Frutos  Brotes  Tubérculos  Bulbos Cormos  Planta  Raíz   
Plasmida  Grano  Otro

ENTOMOLÓGICA: Adulto  Larva  Otro

NEMATOLÓGICA: Especímenes

AI SLADO: Bacteriano  Fungico  Otro

CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA: Natural  Refrigerada  Envase apropiado  Etiquetado  Cantidad Adecuada: SI  NO

PAIS: .....

PROVINCIA: .....

CANTÓN: .....

PARROQUIA: .....

DESTINO: .....

ORIGEN: .....

PERMISO FITOSANITARIO N°: .....

LOTE: .....

N° DE CAJA: .....

ACTIVIDAD DE ORIGEN: Cuarentena Vegetal  Acceso mercados  Vigilancia Fitosanitaria  Material propagativo  Otro

CULTIVO: .....

ÁREA DE CULTIVO: .....

VARIEDAD: .....

EDAD: .....

ESTADO FENOLOGICO: .....

MUESTREADO POR: .....

FECHA DE MUESTREO: .....

COORDENADAS: X: .....

Y: .....

Altitud: .....

mm: .....

**TIPOS DE ANÁLISIS**

CÓDIGO MUESTRA	IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	PRE-DIAGNÓSTICO	*ANÁLISIS SOLICITADO	DESCRIPCIÓN SÍNTOMAS / DAÑOS

\*Análisis solicitado: Laboratorio de Biología Molecular-Área Vegetal: Análisis PCR convencional o PCR tiempo real

Plazo de entrega resultados: .....

Observaciones: .....

Aceptado:

SI

NO

Recibido por:

Entregado por:

Firma: .....

Nombre: .....

Firma cliente: .....

Nombre: .....

CI: .....

Solicitar a la Dirección de Laboratorios la orden de trabajo, este anexo solo servirá como referencia.

*Max*



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA ECUATORIANA  
DE ASEGURAMIENTO  
DE LA CALIDAD DEL AGRO

INSTRUCTIVO

**INSTRUCTIVO DE MUESTREO PARA  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4-  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
DIAGNÓSTICO VEGETAL**

INT/BM/24

Rev. # 3

Hoja 12 de 13

### Anexo 3. Descripción de síntomas

#### Síntomas externos

El primer síntoma externo usualmente es color amarillo en los peciolos de las hojas bajas o más lejas. Posteriormente, las hojas se amarillan progresivamente y se colapsan gradualmente en el peciolo ó más comúnmente, hacia la base de la nervadura central, eventualmente se secan, se tornan cafés y cuelgan alrededor del pseudotallo (Foto 1). Debido a que las hojas jóvenes son las últimas en presentar síntomas, con frecuencia permanecen erectas, por lo que le da a la planta una apariencia “erizada”.



**Foto 1.** Planta de banano Cavendish mostrando síntomas del Mal de Panamá caracterizado por el amarillamiento de las hojas. Crédito: Dita M. A.

No hay diferencias en los síntomas que producen las diferentes razas de Foc en Musa. Por lo tanto las razas no pueden diferenciarse entre sí con base en los síntomas que provocan.

La enfermedad se caracteriza por producir dos tipos de síntomas externos: “síndrome” de la hoja amarilla y “síndrome” de la hoja verde.

**“Síndrome” de hoja amarilla:** Es el síntoma más clásico y característico externo de la marchitez por *Fusarium* de los bananos. Se caracteriza inicialmente por la aparición de un amarilleo en los márgenes de las hojas más viejas (este síntoma puede ser inicialmente confundido con la deficiencia de potasio, especialmente en condiciones de seca o frío). El amarilleo de hojas progresa de las hojas más viejas a las más jóvenes (Foto 2). Las hojas gradualmente colapsan en el peciolo o más comúnmente hacia la base de la nervadura central y cuelgan para formar “una falda” de hojas muertas alrededor del pseudotallo.

**“Síndrome” de hoja verde:** En contraste con el síndrome de hoja amarilla, en algunos clones las hojas de las plantas afectadas permanecen predominantemente verdes hasta que los peciolos se doblan y las hojas colapsan (Foto 2).

*Man*



**Foto 2.** Síntomas externos de la marchitez por *Fusarium* en banano. En la izquierda una planta mostrando clorosis generalizada en las hojas (“síndrome de la hoja amarilla”) en estado avanzado de la enfermedad. En la derecha planta afectada por la marchitez por *Fusarium* con hojas verdes (“síndrome de la hoja verde”). Crédito: Pérez, L. V. y Dita, M. A.

### Síntomas internos

Los síntomas internos se caracterizan por una coloración vascular que comienza con el amarilleo del tejido vascular en las raíces y cormos, el cual progresa para formar un haz vascular continuo coloreado de amarillo, amarillo pálido, café oscuro, rojo o pardo en el pseudotallo, el cual es muy característico de la enfermedad (Foto 3). En clones muy susceptibles pueden observarse haces coloreados en los peciolos de las hojas. El corno puede sobrevivir por algún tiempo y los hijuelos rara vez manifiestan síntomas, por lo que es posible que el material de siembra sirva como diseminador del hongo.



**Foto 3.** Síntomas internos de la marchitez por *Fusarium* en banano. A la izquierda corte longitudinal del pseudotallo de banano mostrando decoloración café rojiza de los vasos afectados en la periferia. En centro y la derecha cortes longitudinales mostrando la afectación a lo largo de los vasos del pseudotallo. Crédito: Dita, M. A.

**Anexo 10.-** Diagnóstico PCR convencional para la detección de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubeense* raza 4 tropical

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	<b>PROCEDIMIENTO ESPECIFICO DE ENSAYO          DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA          DETECCIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp.  <i>cupense</i> raza tropical 4</b>	<b>PEE/BM/02</b>
		Rev. 2
		Hoja 1 de 12



## LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### PROCEDIMIENTO PEE/BM/02

### DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza tropical 4

Rev. 2

ELABORADO	REVISADO	REVISADO	APROBADO
			
Responsable Técnico	Responsable de Área	Responsable Calidad	Director Laboratorios

*mar*  
R



	<b>PROCEDIMIENTO ESPECIFICO DE ENSAYO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza tropical 4</b>	<b>PEE/BM/02</b>
		Rev. 2
		Hoja 3 de 12

## ÍNDICE

<b>1. OBJETO</b>	<b>5</b>
<b>2. ALCANCE</b>	<b>5</b>
<b>3. ITEMS A ENSAYAR, PARAMETROS Y RANGOS DE APLICACIÓN</b>	<b>5</b>
<b>4. REFERENCIAS</b>	<b>5</b>
4.1. Documentos utilizados en la elaboración	5
4.2. Documentos a utilizar conjuntamente con el PEE	5
<b>5. GENERAL</b>	<b>6</b>
5.1. Políticas	6
5.2. Definiciones	6
5.3. Abreviaturas	6
5.4. Instrucciones de Seguridad	7
5.5. Control de Calidad	7
5.6 Responsabilidades	7
<b>6. DESCRIPCIÓN</b>	<b>8</b>
6.1 Equipos, materiales y reactivos	8
6.2 Condiciones ambientales	9
6.3 Identificación de items de ensayo, preparación y verificaciones previas a ser realizadas	9
6.4 Realización	10
6.4.1 Extracción de ADN	10
6.4.2 Preparación de mezclas maestras para la PCR	10
6.4.3 Amplificación por PCR para identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza tropical 4	10
6.5 Método de Registro y Datos a ser registrados	12
6.6 Tratamiento de Resultados. Incertidumbre asociada	12
6.6.1 Cálculos	12

*Dr. Juan R.*

	<b>PROCEDIMIENTO ESPECIFICO DE ENSAYO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza tropical 4</b>	<b>PEE/BM/02</b>
		Rev. 2
		Hoja 4 de 12

6.6.2 Aseguramiento de la Calidad	12
6.6.3 Criterios de aceptación o rechazo de los resultados	12
7. ANEXOS	12

*Coman*  
*RE*

	<b>PROCEDIMIENTO ESPECIFICO DE ENSAYO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza tropical 4</b>	<b>PEE/BM/02</b>
		Rev. 2
		Hoja 5 de 12

## 1. OBJETO

El presente procedimiento tiene por objeto definir los pasos a seguir para realizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar la presencia del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza tropical 4.

## 2. ALCANCE

Este procedimiento deberá ser aplicado por el personal técnico autorizado del Laboratorio de Biología Molecular del área vegetal para la detección del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza tropical 4 mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

## 3. ITEMS A ENSAYAR, PARAMETROS Y RANGOS DE APLICACIÓN

La determinación *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza tropical 4, se realiza sobre el ADN extraído de muestras de plantas infectados. El ensayo de PCR se utiliza como una prueba confirmatoria de la presencia o ausencia del patógeno.

## 4. REFERENCIAS

### 4.1. Documentos utilizados en la elaboración

- Ley de Sanidad Vegetal y su Reglamento, Codificación 8, Registro Oficial Suplemento 315 de 16 de Abril del 2004, Republica de Ecuador.
- FAO. (2005). NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS.
- FAO. (1996). NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS NIMF n° 27. Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas.
- Norma Internacional de Medidas Fitosanitarias NIMF No. 27.
- FAO. (2004). NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS. NIMF n° 11. Análisis de riesgo de plagas para plagas cuarentenarias, incluido el análisis de riesgos ambientales y organismos vivos modificados.
- Dita, M. A., Echegoyén P. E. & Pérez L. F. (2013). Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*. En un país de la región del OIRSA. OIRSA, El Salvador.

### 4.2. Documentos a utilizar conjuntamente con el PEE

- Historial de modificaciones.
- INT/FP/01. Instructivo específico de toma y envío de muestras para análisis de la posible presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza tropical 4 para el Laboratorio de Biología Molecular-Vegetal.
- PGC/LA/01: Procedimiento para la Gestión de Documentos.

*Ornan*  
AE

	<b>PROCEDIMIENTO ESPECIFICO DE ENSAYO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza tropical 4</b>	<b>PEE/BM/02</b>
		Rev. 2
		Hoja 6 de 12

## 5. GENERAL

### 5.1. Políticas

- Todos los documentos elaborados, como parte del SGC, deben ser administrados por el Departamento de Calidad.
- Todos los documentos se distribuyen en formato pdf.
- Los documentos emitidos por el Laboratorio de Biología Molecular pueden hacer referencia a otros documentos concretos, indicando los apartados, no repitiendo su contenido.
- El personal debe ser entrenado, calificado y autorizado para la correcta ejecución del ensayo.
- Se deben seguir todos los lineamientos de seguridad y bioseguridad del ensayo.

### 5.2. Definiciones

- \* **Foc RT4:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza tropical 4. Raza con capacidad patogénica sobre variedades del subgrupo Cavendish y otros clones de bananos y plátanos en condiciones del trópico húmedo caliente. Los aislados de esta raza pertenecen hasta el momento al Grupo de Compatibilidad Vegetativa 01213.
- \* **ADN:** Ácido desoxirribonucleico. Macromolécula de gran peso molecular constituida por tres sustancias distintas: ácido fosfórico, un monosacárido desoxirribosa, y una base nitrogenada cíclica que puede ser púrica (adenina o citosina) o pirimidínica (timina o guanina). Estructuralmente la molécula de ADN se presenta en forma de dos cadenas helicoidales unidas entre sí por puentes de hidrógeno.
- \* **PCR:** La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase chain reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínima cantidad, que en teoría bastaría con partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

### 5.3. Abreviaturas

SGC: Sistema de Gestión de Calidad y Competencia Técnica, basado en los requisitos de la norma NTE INEN ISO/IEC 17025.

DL: Director de Laboratorios

RC: Responsable de Calidad

RT: Responsable Técnico

A: Analista

BM: Biología Molecular

Foc R4T: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza tropical 4

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

NA: No aplica

pb: Pares de bases

*Handwritten signature*

	<b>PROCEDIMIENTO ESPECIFICO DE ENSAYO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza tropical 4</b>	<b>PEE/BM/02</b>
		Rev. 2
		Hoja 7 de 12

#### 5.4. Instrucciones de Seguridad

El personal del laboratorio deberá estar provisto de:

- Equipo de seguridad biológica
- Uniformes de laboratorio y mandil exclusivo para el área de PCR
- Cofia
- Mascarilla cubre bocas
- Guantes de nitrilo sin talco.

Manipular todo el material biológico como si fuera capaz de transmitir la enfermedad. Todo el proceso de extracción de ADN debe realizarse dentro de la cabina de bioseguridad. Las cabinas deben ser desinfectadas previamente con alcohol al 75%, UV durante un periodo de 15-20 minutos y desechar las puntas en guardianes.

Durante el proceso de electroforesis en la preparación del gel de agarosa, se debe tomar en cuenta el manejo adecuado del reactivo syber safe, para lo cual se recomienda el uso de doble guante.

Usar mascarilla y sorbona para la preparación del gel de electroforesis, ya que la agarosa es también un compuesto nocivo para la salud.

#### 5.5. Control de Calidad

Realizar control de calidad en los siguientes aspectos detallados a continuación:

- Revisar el correcto envío de la muestra, la documentación, el transporte, la cadena frío y la correcta identificación de las muestras.
- Usar controles de PCR en cada uno de los análisis.
- Verificar la calidad de los Ácidos nucleicos mediante geles de electroforesis o mediante el espectrofotómetro.
- Verificar la correcta amplificación de pesos moleculares.
- Revisión de caducidad de los reactivos.
- Revisar el buen funcionamiento de los equipos.
- Mantenimiento adecuado de los equipos y de las micropipetas.
- Correcto manejo de la bioseguridad en el laboratorio.
- Limpieza y desinfección adecuada de las áreas, superficies y equipos en especial cabinas.
- Personal capacitado.
- Realizar interlaboratorios anuales.

#### 5.6 Responsabilidades

Evitar contaminación de las muestras a causa de la sensibilidad de las pruebas, para esto se deben tomar precauciones especiales y evitar falsos positivos, por lo que se recomienda seguir los siguientes pasos como precaución:

- a. Mantener áreas separadas para la preparación de las pruebas y el manejo de los ácidos nucleicos.

*Manal*

- b. Mantener separados los equipos (como pipetas y minicentrífugas), y los materiales (como tubos para minicentrífuga y puntas de pipeta) para la preparación de las pruebas y el manejo de los ácidos nucleicos extraídos.
- c. Utilizar ropa de laboratorio limpia y guantes desechables sin talco (que no hayan sido utilizados antes) cuando se procesen las pruebas.
- d. Cambiar los guantes entre la manipulación de muestras y cada vez que se sospeche que pudo haber contaminación.
- e. Mantener los reactivos y tubos de reacción estériles tapados o envueltos.
- f. Identificar mediante rótulos o etiquetas al material contaminado.
- g. Usar preferentemente material plástico descartable y estéril (incluyendo puntas y tubos).
- h. Todo material que no sea descartable (ej.: vidriería) debe ser esterilizado en horno durante 2 horas a 80°C y autoclavado. Si se trabaja con material plástico no descartable, sumergir el mismo durante 60 min. en solución 0,5 M de NaOH, y enjuagar con agua destilada estéril.

## 6. DESCRIPCIÓN

### 6.1 Equipos, materiales y reactivos

#### 6.1.1 Equipos

- Termociclador
- Espectrofotómetro (Nanodrop)
- Micropipetas monocanal de volumen ajustable de (0.5 -10, de 10-100, 100 a 1000 µl) con precisión y exactitud verificada
- Vórtex
- Microcentrífuga
- Centrífuga refrigerada
- Refrigeradora de 0 a 4 °C
- Congelador de -20 °C
- Termóregistradores
- Cronómetro de laboratorio
- Termobloque
- Cabina de bioseguridad tipo 2 y PCR
- Sorbona
- Cámaras de electroforesis
- Transiluminador

#### 6.1.2 Materiales

- Microtubos de 1,5 ml, 2 ml, 0,2 ml libres de DNAsas y RNAsas.
- Puntas de pipetas con filtro desechables para micropipetas de volumen variable (10 ul, 20 ul, 100 ul, 200 ul, 1000 ul) libres de DNAsas y RNAsas.
- Puntas de pipetas sin filtro desechables para micropipetas de volumen variable (10 ul, 20 ul, 100 ul, 200 ul, 1000 ul) libres de DNAsas y RNAsas.
- Cajas para puntas
- Fundas de autoclavado volumen variable
- Basureros con identificación de basura común y de riesgo biológico
- Crioviales plásticos de 1.5 ml.
- Guantes de nitrilo

Mar  
A



- Gradillas
- Tijeras estériles
- Paños absorbentes
- Marcadores indelebles
- Cooler para PCR

### 6.1.3 Reactivos

- Agua libre de RNAsas y DNAsas
- dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato)
- Buffer PCR
- Cloruro de magnesio
- Primers o iniciadores forward y reverse.
- Enzima polimerasa.
- Buffer TBE 0.5X
- Syber Safe o cualquier tinción para ácidos nucleídos que esté disponible.
- Control positivo de referencia.

### 6.2 Condiciones ambientales

- Las condiciones ambientales del laboratorio para la ejecución del ensayo, deben encontrarse entre 17°C – 25°C.
- Si los análisis no se van a realizar inmediatamente, almacenar el ácido nucleído a 4°C, pero en el caso de dejarla para el siguiente día o posteriores, almacenar entre -70 a -80°C.
- Los iniciadores, enzimas, buffers y reactivos para llevar a cabo el ensayo de PCR deben ser alicuotados, almacenados a (-20°C) y deben verificarse siempre las fechas de caducidad de los reactivos.
- Se encuentra restringido al público el acceso a las instalaciones y solo el personal del laboratorio de Biología Molecular puede ingresar. Cualquier visita deberá ser autorizada previamente por la Dirección de Laboratorios y ser registrada.

### 6.3 Identificación de items de ensayo, preparación y verificaciones previas a ser realizadas

- Para realizar la identificación de items de ensayo seguir el instructivo correspondiente INT/BM/01 Manejo y preparación de items de ensayo.
- Aplicar luz ultravioleta antes y después de realizar trabajos dentro de la cabina de bioseguridad por un periodo mínimo de 15 minutos (solo con los instrumentos y sin ninguna muestra o reactivo).
- Verificar que el programa de amplificación esté presente en el equipo.
- Las superficies de trabajo, pipetas y centrifugas deben estar limpias y descontaminadas con cloro al 0.5% y soluciones limpiadoras de DNAsas y RNAAsas "DNAzap™" o "RNase AWAY®." para minimizar el riesgo de contaminación por ácido nucleído.
- Toda material plástico (puntas, microtubos y otros) deben ser nuevos y estériles. Para todo el procedimiento que implique contacto con el ADN de la muestra se debe usarse puntas con filtro libre de nucleasas o tratadas para la eliminación de las mismas.
- Todo material de vidrio deberá encontrarse limpio y estéril previo su uso.
- No debe encontrarse personal ajeno al laboratorio dentro de las instalaciones, cuando se esté realizando el ensayo, incluido visitas.

Ornan  
E

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASESORAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	<b>PROCEDIMIENTO ESPECIFICO DE ENSAYO          DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA          DETECCIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp.  <i>cupense</i> raza tropical 4</b>	<b>PEE/BM/02</b>
		Rev. 2
		Hoja 10 de 12

## 6.4 Realización

### 6.4.1 Extracción de ADN

Realizar la extracción de ADN de la muestra, siguiendo lo establecido en el instructivo de extracción de ADN de codificación INT/BM/28. Cabe mencionar que para el diagnóstico mediante PCR, se podrá aplicar kit de extracción de ADN.

### 6.4.2 Preparación de mezclas maestras para la PCR

Preparar la mezcla maestra (Master Mix) para la PCR con las concentraciones señaladas en las tablas 1 y 2. Añadir los volúmenes calculados de cada reactivo dentro de un microtubo, considerando el número de muestras, controles positivos y controles negativos que se van a incluir en el análisis. Con el fin de compensar pérdidas durante el pipeteo y residuos en el material, se deberá preparar la mezcla maestra con un exceso del 10% para cada reactivo que interviene en la reacción. Por ejemplo, si se requiere un volumen de 1 µl del Reactivo X por cada muestra y se van a preparar 5 muestras, el volumen final de Reactivo X será:

$$1 \mu\text{l} \times 5 \text{ muestras} = 5 \mu\text{l}$$

Para la preparación, se deberá multiplicar el volumen final por el 10% adicional para calcular el volumen total a ser tomado del Reactivo X:

$$5 \mu\text{l} * 1,1 = 5,5 \mu\text{l}$$

### 6.4.3 Amplificación por PCR para identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza tropical 4.

Combinar los reactivos que se indican en la siguiente tabla, en una cabina de bioseguridad del área designada como Master Mix.

**Tabla 1: Master Mix PCR**

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1 Rx	... Rx
H2O			28.75	
Buffer PCR green Flexi	5X	1X	10	
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1.5mM	3	
Dntps	10mM	0.2mM	1	
Primer Foc RT4-F* 5'-CACGTTAAGGTGCCATGAGAG-3'	25µM	0.5µM	1	
Primer Foc RT4-R* 5'-GCCAGGACTGCCTCGTGA-3'	25 µM	0.5µM	1	
Enzima Go Taq Hot Start	5U/µl	1.25 U/50µl	0.25	
Volumen final de reacción			45	

\* Dita et. al., 2013.

Volumen de la reacción final + el ADN: 45µl PCR mix + 5 µl ADN.

*Man*

	<b>PROCEDIMIENTO ESPECIFICO DE ENSAYO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza tropical 4</b>	<b>PEE/BM/02</b>
		Rev. 2
		Hoja 11 de 12

La primera columna desde la derecha está disponible para el cálculo del volumen necesario de cada reactivo según el número de reacciones a ser preparado, el cual corresponderá al número de muestras a analizar tomando en cuenta los controles. Una vez realizada la preparación del mix PCR, se procede a agregar el ADN en una cabina diferente a la de Master Mix.

La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador, el que tendrá el siguiente programa de amplificación.

**Tabla 2: Perfil térmico de amplificación**

Nº de ciclos	Temp °C	Tiempo min:seg
1	95	05:00
30 veces	95	01:00
	60	01:00
	72	01:00
1	72	10:00
1	4	∞

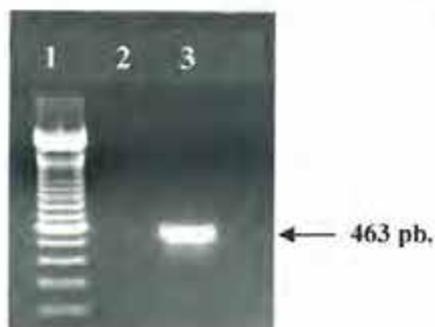
Tamaño de producto esperado: 463 pb

#### 6.4.4 Preparación Gel - Agarosa

Una vez preparado el gel de agarosa al 1,5%, cargar cada muestra y controles en un pocillo independiente, tomando 10 µl de producto de PCR anteriormente obtenido y adicionar en el primer pocillo 3 µl del marcador de peso molecular de 100 pb.

Correr el gel por aproximadamente 60 minutos, a 100 voltios, y visualizar en el fotodocumentador.

La corrida se realiza a 20-24 mA, en un buffer de TBE al 0.5 X. La imagen del gel que se obtiene en el fotodocumentador, es similar a la que se indica a continuación:



**Figura 1:** Gel de agarosa al 1,5% para el producto PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2: Control Negativo. Carril 3: Control Positivo de Foc RT4

*Handwritten signature*

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASESORAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRICULTOR	<b>PROCEDIMIENTO ESPECIFICO DE ENSAYO          DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA          DETECCIÓN DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp.  <i>cupense</i> raza tropical 4</b>	<b>PEE/BM/02</b>
		Rev. 2
		Hoja 12 de 12

### 6.5 Método de Registro y Datos a ser registrados

Registrar el resultado en el informe correspondiente (formato PGT/BM/09-FO01), en donde se reporta la presencia o ausencia de la banda en el peso específico.

### 6.6 Tratamiento de Resultados. Incertidumbre asociada

#### 6.6.1 Cálculos

N.A.

#### 6.6.2 Aseguramiento de la Calidad

Para el aseguramiento de la calidad de los resultados, se debe tener en cuenta que el fragmento de amplificación debe ser único y estar en el rango de tamaño esperado, que para este ensayo es de 463 pb.

#### 6.6.3 Criterios de aceptación o rechazo de los resultados

Los criterios de rechazo son:

- Muestras deterioradas, mal empacadas o incorrectamente identificadas no serán analizadas.
- Muestras con información incompleta o sin documentación serán devueltas, sin consideración alguna.
- Muestras que no correspondan al sitio propio donde se aloja el patógeno que se desea analizar, tampoco serán recibidas.
- Muestras contaminadas entre si antes y durante el envío. Solo serán consideradas las muestras perfectamente selladas.
- Toda muestra deberá ser correctamente destruida por tratarse de una sospecha de infección con Foc RT4
- Finalmente, queda a criterio del RT del BM la aceptación o el rechazo de la muestra en circunstancias no contempladas en este instructivo.

#### 6.6.4 Incertidumbre

N.A.

#### 6.6.5 Informe de Resultados

Emitir el Informe de resultados según el formato PGT/BM/09-FO01.

## 7. ANEXOS

N.A.

*Man*  


**Anexo 11.-** Resolución 048 que establece las medidas y los requisitos fitosanitarios generales y específicos para la importación de plantas in vitro de musáceas (*Musa spp.*) obtenido por biotecnología moderna

## RESUELVE:

**Artículo 1.-** Expedir la siguiente normativa que establece las medidas y los requisitos fitosanitarios generales y específicos para la importación de plantas *in vitro* de musáceas (*Musa spp.*) obtenido por biotecnología moderna (cultivo de meristemas).

### 1. CULTIVO MUSACEAS

Nombre científico: *Musa spp*

Familia: Musáceas

Caracterización de las partidas arancelarias por riesgo fitosanitario, según la resolución de la Comunidad Andina.

Partida	Descripción del producto	Riesgo Fitosanitario
0602.20.00	Árboles, arbustos y matas, de frutas o de otros frutos comestibles, incluso injertados	4
0602.90.00 – Los demás	Las demás	4

La importación de plantas *in vitro* de musáceas (*Musa spp.*) obtenidas por biotecnología moderna (cultivo de meristemas), debe cumplir con los siguientes requisitos:

#### 1.1. Requisitos GENERALES:

- 1 Contar con un **permiso fitosanitario de importación** expedido por AGROCALIDAD, en el que se verifica el cumplimiento de los requisitos fitosanitarios establecidos en esta resolución.
- 2 Proceder de lugares de producción bajo control oficial y debidamente autorizado por el Organización Nacional de Protección Fitosanitaria del País Miembro exportador. Los centros de Producción de plantas *in vitro* de musáceas obtenido por biotecnología moderna, deberán ser aprobados por AGROCALIDAD, previa inspección y evaluación favorable.
- 3 Contar con un **certificado fitosanitario de exportación** expedido por el Servicio Oficial de Sanidad Agropecuaria del País exportador, en el que conste el cumplimiento de los requisitos fitosanitarios señalados en el permiso fitosanitario de importación.
- 4 Cumplir con las normas y recomendaciones establecidas en el FAO/IGPR de manera particular, establecer que todo material de musáceas importado al país lo será única y exclusivamente como Tejido *in vitro*, a fin de evitar la introducción de hongos o agentes patógenos de las raíces y en las raíces.
- 5 El producto será sometido a inspección en el punto de ingreso al

RESOLUCIÓN NO. 048

LA DIRECTORA EJECUTIVA DE LA AGENCIA ECUATORIANA DE  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO AGROCALIDAD

CONSIDERANDO:

**Que**, el artículo 13 de la Constitución de la República establece que las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales; el Estado ecuatoriano promoverá la soberanía alimentaria;

**Que**, el artículo 319 ibídem establece que "El Estado promoverá las formas de producción que aseguren el buen vivir de la población y desincentivará aquellas que atenten contra sus derechos o los de la naturaleza; alentará la producción que satisfaga la demanda interna y garantice una activa participación del Ecuador en el contexto internacional";

**Que**, resulta necesario actualizar los requisitos fitosanitarios aplicables al comercio exterior, de plantas *in vitro* de musáceas (*Musa* spp.) obtenido por biotecnología moderna (cultivo de meristemas);

**Que**, el Ecuador es el principal país exportador del banano con 169 320.79 ha de área de producción, aproximadamente, con una exportación anual que alcanza los 238 771 068 cajas de 18.14 kg de peso, registradas en el año 2005;

**Que**, el Ecuador debe prevenir el ingreso de plagas al cultivo de musáceas, susceptibles de ser transmitidas a través de plantas *in vitro*, o sea por introducción de plagas inexistentes en el país; o que existiendo pudieran incrementar su virulencia o agresividad;

**Que**, los principales países de destino del banano ecuatoriano son Italia, Rusia, Estados Unidos, Alemania, Bélgica, Chile, Japón y otros, en los cuales la aplicación de las normas fitosanitarias son muy rigurosas, obligando al Ecuador, en reciprocidad, a establecer medidas que regulen nuestras musáceas de exportación;

**Que**, la coordinación de certificación fitosanitaria con memorando N° 24, presenta un informe con recomendaciones para establecer los requisitos generales y específicos a la importación de material vegetal de propagación de musáceas obtenido por biotecnología;

**Que**, la FAO/IPGRI, en su Guía Técnica del movimiento del Germoplasma N° 15, Edición N° 2, publica el movimiento de <sup>N</sup>

germoplasma, con el propósito de establecer guías técnicas para cultivos específicos, que provean información relevante sobre la indexación de enfermedades y otros procedimientos, para ayudar al establecimiento de medidas fitosanitarias en el movimiento internacional del germoplasma;

**Que,** la Norma Internacional de Medidas Fitosanitarias NIMF N° 1 "Principios fitosanitarios para la protección de las plantas y aplicación de medidas fitosanitarias en el comercio internacional, en su literal a) enuncia: *"imponer y adoptar medidas fitosanitarias con respecto a la importación de plantas, productos vegetales y otros artículos reglamentados incluyendo por ejemplo, inspección, prohibición de la importación y tratamiento; y considerando que, el Ecuador, como país soberano, adopta las medidas fitosanitarias con el fin de proteger la sanidad vegetal y determinar el nivel adecuado de protección fitosanitaria;*

**Que,** corresponde al Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria – SESA (hoy AGROCALIDAD), establecer las medidas fitosanitarias necesarias para la importación del material vegetal *in vitro*, conforme consta en la Ley de Sanidad Vegetal, publicada en el Suplemento del Registro Oficial 315 del 16 de abril del 2004;

**Que,** mediante Decreto Ejecutivo N°1449 de 22 de noviembre de 2008, publicado en el Registro Oficial 479 del 02 de diciembre del 2008, se dispone la reorganización del Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria, transformándolo en Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro – AGROCALIDAD, adscrita al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca;

**Que,** AGROCALIDAD es la Autoridad Nacional Sanitaria, Fitosanitaria y de Inocuidad de los Alimentos, encargada de la definición y ejecución de políticas y de la regulación y control de las actividades productivas del agro nacional, respaldada por normas nacionales e internacionales, dirigiendo sus acciones a la protección y mejoramiento de la producción agropecuaria, la implantación de prácticas de inocuidad alimentaria, el control de calidad de los insumos, el apoyo a la preservación de la salud pública y el ambiente, incorporando al sector privado y otros actores en la ejecución de planes, programas, y proyectos específicos;

**Que,** el Doctor Ramón L. Espinel Martínez en calidad de Ministro de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP), mediante acción de personal No. 0253 del 26 de enero del 2011, nombra a la Dra. María Isabel Jiménez Feijoo como Directora Ejecutiva de AGROCALIDAD; y

En uso de las atribuciones legales que le concede el Art. 4 literal c) del Decreto Ejecutivo No. 1449, de fecha 22 de noviembre de 2008, publicado en el Registro Oficial No. 479 del 2 de diciembre de 2008,

Ecuador, por un Inspector de AGROCALIDAD y tomará una muestra para ser remitida al laboratorio, y el destino final será sujeto a los resultados del análisis.

En la espera de los resultados de los análisis eventuales, las plantas deberán ser mantenidas en un sitio calificado oficialmente como cuarentenario por AGROCALIDAD, durante un periodo mínimo de ocho semanas. Después de este tiempo las plantas podrán salir del invernadero o vivero, siempre que no exista observación particular contraria al del laboratorio.

- 6 Los envases utilizados para el transporte del material deben ser nuevos, de primer uso y debidamente sellados y etiquetados. En cada lote se debe marcar el origen, variedad, fecha de producción, laboratorio y número de lote.

## 1.2 REQUISITOS ESPECÍFICOS:

1. Según sea el País Miembro afectado:

Producto libre de:

En lo que concierne a virus, las plantas *in vitro* deben ser libres de: *Banana bunchy top virus (BBTV)*, *Cucumber mosaic virus (CMV)*, *Banana streak badnavirus (BSV)*, *Banana bract mosaic potyvirus (BBMV)*, *Banana bract mosaic virus (BBrMV)*, *Ábaca mosaic virus (ABTV)*, *Abaca mosaic virus (AbaMV)*, *Banana mild mosaic virus (BanMMV)*, *Banana virus X (BVX)* u otros virus filamentosos.

Para lo cual se necesita:

1. La obligatoria presentación de pruebas ligadas a la producción de plantas madres sanas.
2. La necesaria entrega de las pruebas inherentes a la producción de fragmentos de plantas madres sanas, por multiplicar.
3. Utilizar los métodos de laboratorio internacionalmente admitidos para los virus que se detallan en el cuadro 1:

**Cuadro 1.** Listado de virus que deben estar ausentes en el material vegetativo y métodos de identificación.

Virus	Métodos
<i>Banana bunchy top virus</i> (BBTV)	ELISA, SONDAS DE ÁCIDO NUCLEICO O PCR
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	ELISA
<i>Banana streak badnavirus</i> (BSV)	PCR, ELISA
<i>Banana bract mosaic virus</i> (BBrMV)	ELISA Y PCR Y SONDAS
<i>Ábaca bunchy top virus</i> (ABTV)	PCR Y ELISA
<i>Abaca mosaic virus</i> (AbaMV)	PCR, ELISA Y SONDAS
<i>Banana mild mosaic virus</i> (BanMMV)	PCR, ELISA, ISEM
<i>Banana virus X</i> (BVX)	PCR
Otros virus filamentosos	MICROSCOPIO ELECTRÓNICO Y PCR

Las indexaciones virológicas serán llevadas a cabo por un laboratorio especialista, inscrito y calificado por la Organización Nacional de Protección Fitosanitaria del país de origen, independientemente del laboratorio de cultivos *in vitro*, además según la recomendación de FAO/ JPIGR durante el proceso de multiplicación *in vitro* los medios de cultivo no deben incluir ningún tipo de antibióticos susceptibles de impedir la aparición de los microorganismos fúngicos o bacterianos.

Se prohíbe el ingreso de germoplasma y cualquier tipo de material de reproducción de musáceas (hijuelos, rizomas, cultivos de meristemas), procedentes de Australia, Filipinas, Islas Canarias, China, Indonesia, Malasia, Taiwán y el sur de África y de países que en el futuro reporten la presencia de *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* raza tropical 4, conocida como Foc RT-4.

## 2 PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE PLANTAS MERISTEMÁTICAS

Cumplir con el siguiente procedimiento de obtención de plantas meristemáticas:



#### a. Laboratorio

El laboratorio debe contar con materiales y equipos adecuados para el proceso de producción meristemática, en cada sección del laboratorio debe contar con los procedimientos o protocolos que determinan el uso del material para realizar el trabajo de multiplicación de plantas *in vitro*.

Las fases que comprende el proceso de multiplicación de plantas *in vitro* son:

#### **FASE 0: PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE**

##### a. Banco de Germoplasma

El material seleccionado en campo, que no debe provenir de organismos genéticamente modificados, se lo llevará a un lugar confinado en un invernadero bajo condiciones controladas de luz, temperatura y nutrición; libre de bacterias y hongos del suelo, así como de patógenos específicos de las musáceas; el material debe permanecer en observación hasta por 16 semanas, para descartar cualquier problema fitosanitario. En esta fase debe existir evidencia de toma de muestras para análisis de todos los virus detallados en el cuadro 1 de la sección 1.2 de esta resolución (Requisitos específicos) y de bacterias y hongos, en especial.

Esta fase resulta importante por las características que debe tener la planta que servirá para la micropropagación.

#### **FASE 1: ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO EN CONDICIONES DE ASEPSIA.**

El rastreo de la planta madre, que origina el explante, debe ser documentado en todo el transcurso del proceso del cultivo *in vitro*.

Una vez escogida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán las plántulas.

Antes de extraer los **explantes** se realizará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos y una vez desinfectado el material vegetal, se trabajará en cámaras de flujo laminar donde se extraen los explantes del material vegetal, y se colocan en un medio de cultivo dentro de frascos estériles para poder controlar la sanidad y la viabilidad de los explantes.

#### **FASE II: MULTIPLICACIÓN DE LOS BROTES.**

Durante esta fase se esperará que los explantes que sobrevivieron de la FASE 1, originen brotes.

Periódicamente, estos nuevos brotes se deben cultivar en un nuevo medio, mediante divisiones y resiembras en frascos con medio de cultivo. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar. En esta fase se realizan pruebas de virus y variación somaclonal.

### **FASE III: ENRAIZAMIENTO DE LOS EXPLANTES.**

#### **ENRAIZAMIENTO *IN VITRO***

Los brotes obtenidos deben transferirse durante la fase de multiplicación a un medio de cultivo específico. Esta operación se realiza en la cámara de flujo laminar.

En este momento las plántulas pueden ser exportadas, con los requerimientos fitosanitarios que el Ecuador exige; se debe comprobar en este estado, todas las garantías de inocuidad, de no diseminación de los patógenos a través del medio de cultivo *in vitro*.

Las plántulas importadas al Ecuador en cualquiera de sus fases II o III, deben venir en un medio de cultivo estéril sin materia orgánica; además, las plantas *in vitro* deben ser puestas en cuarentena durante un mínimo de ocho semanas, en lugares calificados oficialmente como cuarentenarios y bajo supervisión de AGROCALIDAD.

### **FASE IV: ACLIMATIZACIÓN DE LOS EXPLANTES ENRAIZADOS EN EL ECUADOR.**

Los explantes deberán ser aclimatados en condiciones técnicas y ambientales adecuadas para su normal desarrollo.

Este manejo debe asegurar que el medio de enraizamiento, así como las condiciones ambientales, garantice que las plantas se desarrollen libres de organismos patógenos a la vez que permite que los brotes tengan hojas bien desarrolladas.

La fase aquí descrita tiene una duración aproximada de cuatro semanas.

### **FASE V: ENDURECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS EN EL ECUADOR.**

Esta fase está destinada al crecimiento de las plántulas a partir del fin de la Fase IV hasta el estado denominado "lista para el campo". Las plantas se colocan en bolsas de plástico o maceteros individuales, con sustrato que cumpla con las normas exigidas por Agrocalidad en la Resolución 043 del 12 de mayo de 2011, donde se establece el manual de procedimientos para el registro de productores y comercializadores de sustratos utilizados en la propagación vegetativa.

El agua de riego y de nutrición se deberá evaluar al menos una vez al año, 

dependiendo de los riesgos, la calidad microbiológica y físico-química de las fuentes de agua a utilizar (pozo, canal abierto, embalses, ríos, lagos, etc.). Estas no deberán rebasar los límites máximos permisibles registrados en la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua; tal como se establece en el Texto Unificado del Ministerio del Ambiente.

Esta fase tiene una duración aproximada de seis a ocho semanas, al final de la cual, las matas están listas para su trasplante, inmunizadas, al campo.

## Artículo 2.-

### 1. De la calificación de los laboratorios para producir y comercializar plantas *in vitro* de banano al Ecuador.

- a. Los laboratorios calificados por la ONPF se comprometen a permitir el libre acceso de los técnicos a las instalaciones de producción, multiplicación y aclimatización; a los métodos de obtención del material vegetal que se multiplicará; y, a toda información que atañe a los procesos de garantías fitosanitarias;
- b. AGROCALIDAD, respetará la confidencialidad de toda la información formal o informal, que reciba por parte del laboratorio candidato;
- c. Durante el transcurso del primer año de producción de plantas *in vitro* el laboratorio que solicite su aprobación, deberá financiar los costos en que incurra AGROCALIDAD para brindar este servicio, par que *in situ* compruebe, corrobore y juzgue, si las garantías fitosanitarias ofertadas son suficientes;
- d. En caso que el laboratorio candidato sea descalificado, AGROCALIDAD, notificará al interesado, de las exigencias técnicas complementarias que deberá aplicar. La calificación surtirá efecto desde el momento en que se cumplan las disposiciones y luego de la elaboración de un informe técnico justificativo, elaborado en conjunto con un(os) experto (s) científicos independientes y acreditados, por organismos de reconocimiento internacional.

Si pasado 18 meses el laboratorio candidato no demuestra el cumplimiento de estas exigencias, una nueva visita de calificación, podrá ser exigida por AGROCALIDAD; y,

- e. En caso se constate la presencia de problemas fitosanitarios con el material introducido, que obligan a ordenar la destrucción del mismo, AGROCALIDAD, tiene la potestad de exigir, previa la recalificación del laboratorio candidato, una nueva visita de un representante de AGROCALIDAD a las instalaciones del laboratorio candidato, con la finalidad de comprobar las medidas que se han tomado para eliminar

estos inconvenientes. Este costo será financiado por el laboratorio notificado por la no conformidad.

## **2. De la calificación de los laboratorios para producir, multiplicar y comercializar plantas *in vitro* de banano en Ecuador.**

Los laboratorios nacionales de producción, multiplicación, aclimatización y comercialización de musáceas obtenidas por biotecnología, deberán someterse a un proceso de calificación de AGROCALIDAD.

### **Artículo 3.- Modificación de la Norma**

AGROCALIDAD, se reserva el derecho de variar sus exigencias fitosanitarias en el tiempo, en función de la evolución de los conocimientos científicos que atañen a los riesgos fitosanitarios o a los métodos para la detección de agentes patógenos.

En el caso de modificación de las exigencias fitosanitarias, AGROCALIDAD, informará de manera oficial a los laboratorios, con no menos de 18 meses de anticipación, previa a la puesta en vigencia de esta nueva norma. La notificación deberá ser acompañada de publicaciones científicas que justifican esta decisión.

Una notificación de esta naturaleza no puede en ningún momento derogar los procedimientos generales de garantías fitosanitarias del laboratorio y/o de su calificación ante los organismos pertinentes.

### **Artículo 4.- De las inspecciones**

En los lugares de cuarentenas calificados por AGROCALIDAD, o durante los periodos de cuarentena, AGROCALIDAD se reserva el derecho de:

- a. Acceder libremente a sus instalaciones en las horas de trabajo y proceder a la comprobación de los procedimientos y controles, así como, a tomar las muestras que considere necesarias;
- b. Verificar la aplicación de controles fitosanitarios específicos de los patógenos o sus vectores;
- c. Demostrar la aplicación de un sistema de trazabilidad de material vegetal en proceso de producción;
- d. Verificar que se cumplan las normas de cuidado y mantenimiento de las instalaciones, y de manera particular, se cumpla con la existencia de una zona circundante de amortiguación, de 10 metros de distancia y totalmente libre de malezas, con respecto a las instalaciones de los invernaderos y viveros;

- e. Ordenar que se limite el acceso, permitiéndose el ingreso, solamente al personal que labora en las instalaciones, u otros, debidamente autorizados.

**Artículo 5.-** Se prohíbe el ingreso de material vivo con raíces y se controlará el traslado por y dentro del país de este material de producción nacional.

**Artículo 6.-** Declarar a *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 4 tropical conocida como FOC RT-4 como plaga cuarentenaria ausente en el territorio ecuatoriano.

**Artículo 7.-** Prohibir el ingreso de germoplasma y cualquier material de reproducción de musáceas (hijuelos, rizomas, cultivo de meristemas), procedentes de países reporten la presencia de la plaga.

**Artículo 8.-** AGROCALIDAD adopta las medidas fitosanitarias necesarias para impedir la introducción de la plaga en el territorio nacional que son las siguientes:

- a) El germoplasma y material de reproducción de musáceas, procedentes de países que no reportan Foc RT-4, deberán estar amparados con un certificado fitosanitario con la siguiente declaración adicional: El país está libre de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 4 tropical (Foc RT-4)
- b) Certificación oficial de diagnóstico de laboratorio, que evidencia que el producto esté libre de la plaga.
- c) Inspección por personal técnico fitosanitario de AGROCALIDAD para determinar la situación fitosanitaria y toma de muestras para análisis de laboratorio.
- d) Cuarentena pocentrada insitu, durante el tiempo de adaptación, previo a la siembra en el campo definitivo. Se realizará tres inspecciones obligatorias de seguimiento de cuyos resultados dependerá el levantamiento de la misma y el destino final del material vegetal, sustratos utilizados y otros materiales contaminados.
- e) En caso de detección del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 4 tropical, en un envío de germoplasa o cualquier otro material de reproducción de musáceas, se procederá a la destrucción del mismo o devolución al país de origen. Los costos que demanden esta acción serán asumidos por el importador.

**Artículo 9.-** Todo material in vitro que ingrese al país, deberá contar con la respectiva certificación emitida por el Organismo Oficial de cada país, la cual garantice que el material vegetal in vitro que ingrese al Ecuador, está libre de las plagas cuarentenarias descritas en el artículo 1, numeral 2 de la presente Resolución.

**Artículo 10.-** Deróguese las resoluciones 009 de 19 de febrero de 2009 y la Resolución No. 031 de 31 de octubre de 2006, publicada en Registro Oficial No. 415 de 12 de diciembre de 2006.

**Artículo 11.-** Encárguese del cumplimiento de la presente resolución a la Dirección de Sanidad Vegetal de AGROCALIDAD.

**Artículo 12.-** Esta resolución entrará en vigencia a partir de su publicación en el Registro Oficial.

Dado en Quito a, **17. MAYO 2011**

**COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE**



**Dra. María Isabel Jiménez Feijó**  
**DIRECTORA EJECUTIVA**  
**AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL**  
**AGRO - AGROCALIDAD**

	NOMBRE	FECHA	FIRMA
TECNICO	Ing. Santiago Terán	11/05/2011	
LEGAL	Dra. Gisela Muñoz	11/05/2011	