

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**EVALUACION DE UN MODELO INTEGRAL DE MEDIDAS DE
MITIGACIÓN DE RIESGO, APLICABLES A LA IMPORTACION
DE SEMILLA DE SANDÍA**

[*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai]

NORMA ALEJANDRA ELIZALDE JIMENEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2009

La presente tesis titulada: EVALUACION DE UN MODELO INTEGRAL DE MEDIDAS DE MITIGACIÓN DE RIESGO, APLICABLES A LA IMPORTACION DE SEMILLA DE SANDÍA [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai], realizada por la alumna: Norma Alejandra Elizalde Jiménez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado; ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



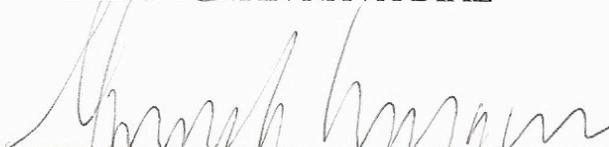
DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES

ASESOR:



DR. CRISTIAN NAVA DIAZ

ASESOR:



DR. GERARDO LEYVA MIR

DEDICATORIA

A mis Padres Félix Elizalde Márquez y Virginia Jiménez Peña, con profundo amor y agradecimiento por el gran apoyo y motivación para la realización de este proyecto personal de crecimiento profesional. Que Dios los Bendiga.

A mi esposo, M.C. Pedro Carranza Vázquez, por tu amor y apoyo en el proyecto de vida que compartimos día a día.

A mi hija Alejandra Carranza Elizalde "Coraloli", porque tu amor me resulta en una fuente inagotable de inspiración para dar lo mejor de mí y superarme día con día.

A mis hermanos Ana Elvira, Ada Elisa, Félix César, por el apoyo que me han brindado en todo momento.

A mis sobrinos, José Manuel, Ana Paola, Yuliana, Alan, Eder, Daniel, Idali, Tony, Víctor, José Manuel, Rubén, Karla y Lessly, como incentivo para su preparación en el futuro.

A mis suegros Pedro Carranza Aguirre y Lucila Vázquez Echartea y cuñados Margarita, Consuelo, José, Ángel, Maricruz y María del Socorro por sus bendiciones.

Al Dr. Carlos Sosa Moss (RIP), porque inspiro en mi la necesidad de la búsqueda incansable del conocimiento.

AGRADECIMIENTOS

A Dios quien me da la vida día a día y renueva mi fe en él para mostrarme que no existen imposibles.

A los millones de mexicanos que pagan impuestos, quienes a través del CONACYT, financiaron mis estudios de Maestría.

Al Dr. Javier Hernández Morales, por la acertada dirección de este trabajo de tesis y su apoyo como Consejero Particular para lograr un programa de formación académica solido y orientado a mi experiencia profesional.

Al Dr. Cristian Nava Díaz, por el gran apoyo en la asesoría para realizar este trabajo de tesis y la disposición incondicional para innovar e incursionar en nuevas áreas del conocimiento.

Al Dr. Gerardo Leyva Mir, por sus valiosas sugerencias las cuales enriquecieron el contenido de este trabajo.

Al Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y la Dirección General de Sanidad Vegetal por las facilidades prestadas para continuar con mi desarrollo profesional.

Al Dr. Javier Trujillo Arriaga, Director General de Sanidad Vegetal, por impulsar la formación de cuadros profesionales de alto nivel.

Al Dr. Jorge Hernández Baeza, Ing. Mario Puente Raya, Ing. Francisco Ramírez y Ramírez por su apoyo para la realización de este proyecto profesional.

A Ron y Anna Sequeira, por la confianza y oportunidad de vivir una experiencia profesional invaluable enmarcada con una entrañable amistad.

A Glenn Fowler y Yu Takeuchi por su inmensa disposición de compartir sus conocimientos para apoyar la realización de este trabajo.

A la Dra. Stephanie y Dr. Ken Bloem, por el gran apoyo para la realización de los cursos en la Universidad Estatal de Carolina del Norte, y su amistad durante mi estancia en CPHST.

A Bob y Emilia Griffin, por el apoyo y amistad brindados durante mi estancia en El PERAL en CPHST.

Al excelente equipo del Laboratorio de Análisis de Riesgo y Epidemiología (PERAL) del Centro de Ciencia y Tecnología Fitosanitario (CPHST), del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA-APHIS-PPQ) quienes incondicionalmente apoyaron mi estancia en su centro de trabajo haciendo de ésta, una experiencia inolvidable

A mis amigos, quienes han contribuido al logro de este proyecto a través de innumerables muestras de amistad Cristian Nava, Roció Hernández, Camilo Hernández, Jorge Aguilar, Barbará Hernández, Ángel Ramírez, Vicente Rosas, Martha Aguilera, Linda Luz Esparza y Crystal Lee.

A todos aquellos familiares y amigos quienes en complicidad apoyaron la realización de un codiciado anhelo profesional.

CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS	<i>iii</i>
INDICE DE FIGURAS	<i>iv</i>
INDICE DE GRAFICAS	<i>v</i>
INTRODUCCION GENERAL	1
CAPITULO 1	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1 Análisis de riesgo de plagas	10
3.2 Análisis geoespacial	12
4. RESULTADOS	14
4.1 Motivos para la evaluación del riesgo	14
4.2 Identificación, Biología y Epidemiología	14
4.3 Distribución mundial	15
4.4 Consecuencias de una introducción	17
4.5 Vías de introducción	20
4.6 Opciones de control	21
4.7 Opciones de mitigación de riesgo	22
4.8 Recomendación	23
4.9 Vacíos en información e incertidumbre	23
5. CONCLUSIONES	24
6. LITERATURA CITADA	26
CAPITULO 2	31
RESUMEN	32
ABSTRACT	33
1. INTRODUCCIÓN	34
2. ANTECEDENTES	36
2.1 Análisis de las medidas de manejo de riesgo fitosanitario	36

2.1.1 Tratamiento fitosanitario de alta mortalidad	36
2.1.2 Tratamientos fitosanitarios combinados o múltiples	40
2.1.3 Enfoques de sistemas	42
2.2 Análisis del marco regulatorio para la importación de semilla	45
2.2.1 Análisis del marco normativo para la importación de semilla a México	45
2.2.2 Análisis del procedimiento de importación de semilla a Estados Unidos	
.....	47
2.3 Análisis de riesgo y puntos críticos de control (HACCP, por sus siglas en	
inglés)	48
2.3.1 Propuesta Fitosanitaria de Análisis de Riesgo y Puntos Críticos de	
Control (P – HACCP, por sus siglas en inglés)	49
3. OBJETIVOS	52
4. MATERIALES Y MÉTODOS	53
4.1 Análisis del P - HACCP para <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (<i>Aac</i>) asociada	
con semilla de sandía	53
4.1.1 Descripción del sistema de comercialización de semilla de sandía ..	53
4.1.2 Identificación de riesgos fitosanitarios	53
4.1.3 Selección de puntos críticos de control	54
4.2 Modelo cuantitativo de evaluación de los puntos críticos de control	55
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
5.1.- Análisis de riesgo fitosanitario y puntos críticos de control (P-HACCP) en el	
sistema de comercialización de semilla de sandia infectada con <i>Acidovorax</i>	
<i>avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (<i>Aac</i>)	58
5.1.1 Descripción del sistema de comercialización de semilla de sandía	58
5.1.2 Riesgos fitosanitarios identificados	60
5.1.3 Puntos críticos de control identificados en el sistema de producción	
de semilla de sandía	62
5.2 Simulación probabilística para cuantificar el efecto de la mitigación del riesgo	
de introducción de semillas infectadas con <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	69
5.3 Papel de la industria en el P-HACCP	72
6. CONCLUSIONES	75
7. LITERATURA CITADA	77
ANEXO DEL CAPITULO 2	82

INDICE DE CUADROS

	Página
CAPITULO 2	
CUADRO	
1. Componentes del HACCP	49
2. Distribuciones empleadas en el modelo de simulación probabilística	56

INDICE DE FIGURAS

Página

CAPITULO 1

FIGURA

1.	Presencia de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> , y potencial de establecimiento en zonas con condiciones ambientales favorables en México y el mundo. NAPPFAST 2008	17
2.	Zonas potencialmente favorables para el establecimiento de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> en México, durante los meses de Mayo a Junio.....	21

CAPITULO 2

FIGURA

1.	Diagrama de Decisión para Identificar Puntos de Control Críticos.....	55
2.	Diagrama de flujo de los componente en el sistema de comercialización de semilla de sandía	60
3.	Campo productor de semilla de sandía en Ica, Perú	64
4.	Síntomas en fruto y follaje de <i>Acidovorax avenae</i> subsp <i>citrull</i>	66

INDICE DE GRAFICAS

Página

CAPITULO 2

GRAFICA

1. Comparativo de cantidades de semilla de sandía solicitas para importación en Kg 46

INTRODUCCION GENERAL

El incremento de la comercialización de productos agrícolas debido al tratado de libre comercio implica un mayor riesgo de introducción de plagas exóticas. El establecimiento de nuevas plagas puede ser costoso porque se incrementa el daño a los cultivos, se requiere de programas de control y representa restricciones cuarentenarias en el comercio. Por ejemplo, en los Estados Unidos, donde los daños anuales causados por insectos y ácaros exóticos han sido estimados en más de 17 billones de dólares (Follett y Neven, 2006).

El análisis de riesgo de plagas (ARP), proporciona la información necesaria a quienes toman las decisiones acerca del riesgo que representan las plagas que pueden ser introducidas a través de la importación de productos vegetales. Un análisis de riesgo típico incluye la evidencia científica, sus fuentes de consulta, fuentes de incertidumbre y criterios de raciocinio. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) a través de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF), establece la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias No. 11, titulada Análisis de Riesgo de Plagas para Plagas Cuarentenarias, incluido el Análisis de Riesgo Ambiental y Organismos Vivos Modificados (FAO, 2004).

Los requisitos generales para el ARP de acuerdo a la metodología FAO/CIPF, están integrados en tres etapas: 1) Iniciación del análisis de riesgo, 2) Evaluación del riesgo, y 3) Manejo del riesgo. El ARP basado en los lineamientos FAO/CIPF, ha sido formalmente aplicado para la toma de decisiones por parte de la Dirección General de Sanidad Vegetal en México (DGSV), desde su versión inicial publicada en 1996 (Elizalde-Jiménez, 2008). Para las autoridades de la DGSV, es importante actualizar sus métodos de ARP y compararlos con los métodos aplicados en otras partes del mundo.

Esta investigación retoma el análisis de la metodología empleada para evaluar el riesgo fitosanitario por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos a través del

Centro de Ciencia y Tecnología Fitosanitaria (CPHST, por sus siglas en inglés), del Departamento de Agricultura de Estados Unidos-Servicio de Inspección de Sanidad Vegetal y Animal-Protección Fitosanitaria y Cuarentena (APHIS – PPQ –CPHST), aplicada a *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* el cual atiende a una problemática actual ante la detección recurrente de esta bacteria en la importación de semilla de sandía de distintos orígenes. Lo anterior servirá de referencia para la comprensión de este esquema y la propia evaluación de riesgo de otras plagas cuarentenarias, ya que es una de las funciones que desempeña la Dirección General de Sanidad Vegetal.

En este documento se utilizó la metodología de análisis de riesgo y puntos críticos de control (Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP por sus siglas en inglés), en una versión adaptada al contexto de la seguridad cuarentenaria. Lo anterior para evaluar como las medidas fitosanitarias adoptadas durante el sistema de comercialización de semilla de sandía (pre y pos borde), en forma integral, aseguran la reducción del riesgo en comparación con el uso de una sola medida fitosanitaria. La propuesta será denominada de aquí en adelante sistema de P-HACCP tomando la ventaja del papel del sistema HACCP dentro del contexto de la seguridad alimentaria, ya adoptado por la industria y adicionando el componente de la seguridad cuarentenaria.

La propuesta de aplicar HACCP en el ámbito fitosanitario, tiene el potencial de prevenir la introducción de plagas cuarentenarias a través del comercio internacional de productos agrícolas. A través de la revisión de literatura se encontraron casos exitosos de la aplicación del HACCP en algunas áreas como recursos naturales y pesca. Sin embargo en estos casos no se observaron modelos de simulación que permitan el análisis del sistema sin que sucedan eventos adversos que permitan la cuantificación del efecto de la aplicación de una medida fitosanitaria correctiva (USFWS-NCTC, 2004; CONABIO, 2009). En esta investigación, se incorpora de forma innovadora un análisis cuantitativo basado en la simulación probabilística, que permite identificar y evaluar dichos puntos críticos de control. Con esta información es posible identificar el tiempo promedio que debe pasar para que *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (*Aac*) escape del

sistema de comercialización de la semilla de sandía y se introduzca a México país importador de semilla de sandía, es decir nos proporcionará como resultado el potencial de establecimiento de la plaga cuarentenaria, en vez del nivel de mortalidad asociado a una medida fitosanitaria en particular.

Se encontró que el sistema P-HACCP es un buen paradigma para integrar los diferentes elementos necesarios para agilizar el comercio y direccionar las necesidades de seguridad cuarentenaria. P-HACCP provee de una metodología genérica, respetable y transparente para el manejo del riesgo que adicionalmente facilita las necesidades de interacción entre las prácticas regulatorias y las de la industria. Donde no hay un esfuerzo para sistematizar los procedimientos regulatorios para el manejo del riesgo, ya que promete integrar muchas de las buenas prácticas existentes dentro de un protocolo mas optimizado y transparente, y por otro lado permite evaluar el esfuerzo de la industria productora de semilla quienes han ajustando sus sistemas de producción para disminuir el riesgo que representa esta plaga (Sequeira, 2006).

El potencial de mejora a través del uso de esta herramienta es que P-HACCP nos permite conocer el nivel de asociación de la bacteria en cada uno de los componentes del sistema de comercialización de la semilla de sandía, identificar los puntos críticos que requieren control, documentarlos y evaluar cuantitativamente a través de distribuciones probabilísticas la reducción de riesgo lograda a través de cada medida fitosanitaria aplicada, lo que permite el diseño de sistemas de mitigación de riesgo, que como un plus permite que la industria productora de semilla tome un papel activo en la aplicación de dichas medidas fitosanitarias.

Nuestro modelo P-HACCP, confiere consistencia en la solución del manejo de riesgo fitosanitario y brinda un respaldo científico a la toma de decisión (en un sistema de manejo de riesgo) de las autoridades en una Organización Nacional de Protección Fitosanitaria, en este caso la Dirección General de Sanidad Vegetal y del Área de Regulación Fitosanitaria.

Es importante resaltar que la bondad de la adaptación de este modelo, permite proyectar un impacto importante de mejora para la evaluación de sistemas de mitigación de riesgo fitosanitarios aplicados a otro tipo de productos vegetales de alto riesgo, como fruta fresca, material propagativo (cormos, bulbos, esquejes etc.), flores cortadas, etc.

LITERATURA CITADA

- FAO. 2004. Análisis de Riesgo de Plagas para Plagas Cuarentenarias, incluido el Análisis de Riesgos Ambientales y Organismos Vivos Modificados. NIMF No. 11. Normas Internacionales para medidas fitosanitarias. Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. Roma, Italia. 18 p.
- Follett, P. A., and Neven, L.G. 2006. Current trends in quarantine entomology. *Annual Review of Entomology*, 51:359-385.
- Elizalde-Jiménez, N.A. 2008. Evaluación de Riesgo Fitosanitario Aplicado a los OGM: Análisis, Manejo y Comunicación. Pp. 131-144. En: Bioseguridad en la Aplicación de la Biotecnología y el uso de los Organismos Genéticamente Modificados. Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados CIBIOGEM. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). México, D.F. 383 pp.
- USFWS. 2004. HACCP Planning for Natural Resource Pathways. National Conservation Training Center. USA. 54 pp.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2009. www.conabio.gob.mx. Consultada el 19 de noviembre de 2009.
- Sequeira, R.A., Takeuchi, Y., Kalaris, T. 2006. A Phytosanitary Hazard Analysis and Critical Control Point (P-HACCP) System as a New Alternative for SPS Quarantine Pest Risk Management and Trade Facilitation. North American Plant Protection Organization. Ft. McDowell, AZ.

CAPITULO 1

Evaluación del Riesgo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [(Schaad, Sowell, Goth, Colwell y Webb) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters y De Ley] Asociada a Semilla de Sandía [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai] de Importación a México

Norma Alejandra Elizalde-Jiménez, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA, Guillermo Pérez Valenzuela 127, Col. Del Carmén. Del. Coyoacán, México D.F. CP 04100; **Javier Hernández-Morales**, **Cristian Nava-Díaz**, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo Edo. de México CP 56230; **Santos Gerardo Leyva-Mir**, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, km 38.5 Carr. México-Texcoco, Chapingo, Edo. de México CP 56230; **Ronald A. Sequeira**, **Glenn Fowler**, and **Roger Magarey**, USDA-APHIS-PPQ, Center for Plant Health Science and Technology, Pest Epidemiological Risk Analysis laboratory, 1730 Varsity Dr., Raleigh, NC, EUA 27606. Correspondencia alejandra.elizalde@senasica.gob.mx

EVALUACIÓN DE UN MODELO INTEGRAL DE MEDIDAS DE MITIGACION DE
RIESGO, APLICABLES A LA IMPORTACION DE SEMILLAS DE

SANDÍA [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai]

Norma Alejandra Elizalde Jiménez, M.C

Colegio de Postgraduados, 2009

Se analizó el riesgo de introducción y establecimiento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, plaga cuarentenaria para México, asociada a semilla de sandía de importación, con base en el proceso de análisis de riesgo versión 5.02 APHIS-PPQ, modificado para evaluar este patógeno, incluyendo un análisis geoespacial para estimar el potencial de establecimiento de *A. avenae* subsp. *citrulli* en zonas productoras de sandía en México usando el sistema NAPPFAST. Los resultados del análisis indican que las zonas productoras de sandía ubicadas en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y la parte sur de Veracruz resultaron con mayor potencial de establecimiento, debido a que las condiciones climáticas favorecen la infección por la bacteria durante los meses de mayo y junio. Mientras que las zonas productoras en los estados de Sinaloa, Durango y Zacatecas, Estado de México, Hidalgo, Querétaro, Michoacán, Guanajuato, Tlaxcala y Puebla presentan menor potencial de establecimiento. La adopción de medidas fitosanitarias que minimicen este riesgo, es ampliamente recomendada.

Palabras clave adicionales: Plaga cuarentenaria, zonas de establecimiento, potencial.

ASSESSMENT OF AN INTEGRATED MITIGATION MEASURES MODEL TO IMPORT
SEED OF WATERMELON [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai].

Norma Alejandra Elizalde Jiménez, M.C

Colegio de Postgraduados, 2009

The risk of introduction and establishment of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (quarantine pest for Mexico) associated to watermelon seed importation was analyzed. The assessment was based on the process of risk analysis version 5.02 APHIS-PPQ, modified to evaluate this pathogen, including a geoespacial analysis to determine the potential of establishment of *A. avenae* subsp. *citrulli* in growing areas of watermelon in Mexico using the NAPPFAST system. Results of the analysis indicate that the growing areas of watermelon located in the states of Yucatan, Quintana Roo, Campeche, Tabasco, and Southern Veracruz have high risk of establishment, because climatic conditions favor infection by the bacterium during May and June, when the crop is susceptible. Whereas the watermelon-producing areas in the states of Sinaloa, Durango, Zacatecas, Mexico, Hidalgo, Queretaro, Michoacán, Guanajuato, Tlaxcala, and Puebla have low risk of establishment. The adoption of phytosanitary measures that minimize this risk is widely recommended.

Additional Keywords: Quarantine pest, establishment areas, potential.

1. INTRODUCCIÓN

Con el incremento de la comercialización de productos agrícolas debido al tratado de libre comercio, el riesgo de la introducción de plagas exóticas también se incrementa. El establecimiento de nuevas plagas puede ser costoso porque se incrementa el daño a los cultivos, se requiere de programas de control y representa restricciones cuarentenarias en el comercio. Por ejemplo, en los Estados Unidos, donde los daños anuales causados por insectos y ácaros exóticos han sido estimados en más de 17 billones de dólares (Follett y Neven, 2006). Francia, Holanda, Dinamarca, Estados Unidos, Japón, Alemania e Inglaterra exportan a México el 80% de las semillas en general. El otro 20% lo conforman países asiáticos y sudamericanos, destacando Brasil en los primeros lugares (DOF, 1995). El análisis de riesgo de plagas (ARP), proporciona la información necesaria a quienes toman las decisiones acerca del riesgo que representan las plagas que pueden ser introducidas a través de la importación de productos vegetales. Un análisis de riesgo típico incluye la evidencia científica, sus fuentes de consulta, fuentes de incertidumbre y criterios de raciocinio. En el ámbito fitosanitario, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) a través de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF), establece la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias No. 11, titulada Análisis de Riesgo de Plagas para Plagas Cuarentenarias, incluido el Análisis de Riesgo Ambiental y Organismos Vivos Modificados (FAO, 2004). Los requisitos generales para el ARP de acuerdo a la metodología FAO/CIPF, están integrados en tres etapas: 1) Iniciación del análisis de riesgo, 2) Evaluación del riesgo, y 3) Manejo del riesgo. El ARP basado en los lineamientos FAO/CIPF, ha sido formalmente aplicado para la toma de decisiones por parte de la Dirección General de Sanidad Vegetal en México (DGSV), desde su versión inicial publicada en 1996 (Elizalde-Jiménez, 2008). Para las autoridades de la DGSV, es importante actualizar sus métodos de ARP y compararlos con los métodos aplicados en otras partes del mundo.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio fue identificar el potencial de riesgo asociado a la introducción, establecimiento y dispersión de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [(Schaad, Sowell, Goth, Colwell y Webb) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters y De Ley] en México, asociado a la importación de semilla de sandía [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai]. Así como obtener información en bases de datos acerca de la biología del patógeno.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Análisis de riesgo de plagas

Para cumplir con los objetivos, se consultaron las bases de datos del CABI, AGRICOLA y AGRIS, y las bibliotecas Central y del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, la biblioteca del Colegio de Postgraduados, la biblioteca del Centro de Ciencia y Tecnología Fitosanitaria (CPHST, por sus siglas en inglés), del Departamento de Agricultura de Estados Unidos-Servicio de Inspección de Sanidad Vegetal y Animal-Protección Fitosanitaria y Cuarentena (USDA-APHIS-PPQ), y la biblioteca de la Universidad Estatal de Carolina del Norte (NCSU). El proceso de análisis de riesgo de la introducción y establecimiento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (*Aac*) se basó en lo propuesto por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Servicio de Inspección y Sanidad Agropecuaria (APHIS) y Protección Cuarentenaria de las Plantas (PPQ) (USDA, 2000). Este Proceso de evaluación de riesgo corresponde a la versión 5.02, adaptada a la evaluación de insectos y patógenos (USDA, 2005; 2007) e incluyó los siguientes pasos: 1) Inicio del proceso. Se documentó las razones de la evaluación de riesgo de *Aac* asociada a la semilla de sandía de importación, considerando su categoría cuarentenaria, los antecedentes de detección en México y la importancia económica potencial. 2) Identificación, biología y epidemiología. Para la evaluación de las consecuencias de introducción de *Aac*

con base de diversos factores de riesgo, se obtuvo información en bases de datos acerca de la identificación taxonómica, características morfológicas, biología y epidemiología del patógeno. 3) Distribución geográfica mundial. Si el patógeno se introdujera a México se esperaría que su comportamiento estuviera relacionado al de sus áreas nativas si los hospedantes y clima fueran similares, por lo que se consultaron diversas fuentes de información para realizar un listado de los países donde ocurre el patógeno. Esta información se analizó con base en el sistema NAPPFAST 2008, para conocer cuántas zonas climáticas en México son similares a las zonas donde *Aac* está presente y se retomó en la categorización de hábitat favorable. 4) Consecuencias de una introducción. Se categorizaron cinco elementos de riesgo correspondientes a: a) hábitat favorable para la bacteria de acuerdo a la disponibilidad de zonas productoras de sandía en una etapa susceptible y condiciones climáticas favorables en México; b) rango de hospedantes presentes en México; c) potencial de dispersión después de su introducción a México, considerando los patrones reproductivos de la bacteria, su capacidad de movilidad y factores que faciliten su dispersión como viento y agua; d) impacto económico, en esta categoría se consideró la capacidad de *Aac* de causar daños directos o indirectos, como disminución en la producción de los cultivos que afecta, reducción en el valor de la sandía y las pérdidas de mercados que ha ocasionado en donde está presente; e) impacto ambiental, se incluyen los impactos directos como disrupción ecológica, reducción de la biodiversidad, y la estimulación de programas de control químico. 5) Vías de introducción. Se identificó el potencial de introducción a México de *Aac* a través de la importación de semilla de sandía. 6) Opciones de control. Se documentaron las medidas de control para la exclusión de *Aac*, así como control cultural y control químico. 7) Opciones de mitigación de riesgo. Se documentaron las medidas fitosanitarias como adoptadas por distintas Organizaciones Nacionales de Protección Vegetal, para disminuir el riesgo de *Aac*. 8) Recomendación. Para formular las medidas de mitigación más apropiadas considerando el rango de riesgo. 9) Vacíos en información e incertidumbre. Necesidades en investigación sobre el rango de hospedantes de *Aac*.

10) Conclusión. El Riesgo potencial de *Aac*, el cual corresponde a la suma acumulativa de los rangos de las consecuencias de introducción. Los elementos de riesgo se calificaron como: bajo 1 punto, medio 2 puntos y alto 3 puntos. El valor acumulado es un indicador del potencial biológico de *Aac* para establecerse, dispersarse y causar impacto económico y ambiental en México. Para un rango de riesgo acumulado entre 5-7 puntos, la categoría es baja, por lo cual no se requieren medidas fitosanitarias específicas; la inspección en el punto de entrada se esperaría que proporcionaría suficiente seguridad cuarentenaria. Para un rango de riesgo entre 8-11 puntos, la categoría es media, por lo que medidas fitosanitarias específicas podrían ser necesarias. Si el rango de riesgo se encuentra entre 12-15 puntos, la adopción de medidas fitosanitarias específicas son ampliamente recomendadas, y la inspección en el punto de entrada se considera insuficiente seguridad cuarentenaria.

3.2 Análisis geoespacial

En el análisis geoespacial para identificar áreas de riesgo de establecimiento y dispersión de *Aac*, se empleó el sistema NAPPFAST (NCSU-APHIS Plant Pest Forecast System), desarrollado por la Universidad Estatal de Carolina del Norte (NCSU) y Servicio de Inspección y Sanidad Agropecuaria (APHIS). NAPPFAST es un sistema útil en el análisis de riesgo, es usado para generar mapas basados en parámetros climáticos para plagas exóticas e incluye un modelo genérico de infección. El sistema de NAPPFAST tiene 2 bases de datos separadas. La base de datos que corresponde a Norte América comprende más de 2000 estaciones meteorológicas, las cuales tienen una resolución por cuadrante de 10 km usando una interpolación 3D (Magarey *et al.*, 2007). Con ayuda de esta interface se desarrolló el modelo genérico de infección, con base en la propuesta de los Doctores Roger Magarey y Glenn Fowler (analistas de riesgo del Centro de Ciencia y Tecnología de Protección Fitosanitaria, USDA-APHIS-PPQ). El modelo de infección de *Aac* consideró los siguientes parámetros: $T_{min} = 26$, $T_{opt} = 17$, $T_{max} = 32^{\circ}C$, $W_{min} = 6$ h, precipitación > 2 mm por día, con al menos 30 minutos al 50% de

humedad en las hojas y con humedad relativa del 90% (Hu *et al.*, 1997; Zitter, 1998). El período en que el follaje y fruta son más susceptibles se definió en los meses de mayo y junio. Cada día fue calificado entre 0 y 1 para infección y esos valores fueron acumulados con base en un registro histórico climático de 10 años para México. Al menos 30-45 días favorables para infección fue usado como umbral para representar alto riesgo y 5 días bajo riesgo. Con esta información se crearon diferentes capas de información con la ayuda del sistema geográfico Arcview, y se generó un mapa correspondiente a los principales estados productores de sandía en los Estados Unidos de América y México en la estación de producción en mayo y junio.

RESULTADOS

4.1. Motivos para la evaluación del riesgo

La evaluación del riesgo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) asociado a la semilla de sandía de importación, se debe a que es una bacteria cuarentenaria, aún no reportada en México. En este sentido la Dirección General de Sanidad Vegetal y laboratorios aprobados han detectado a esta bacteria en semilla de sandía de importación en al menos 16 ocasiones en el período 2000-2008. Se han registrado pérdidas de hasta 100% en sandía y melón (*Cucumis melo* L.) cantalupe como consecuencia de esta enfermedad. El patógeno es una amenaza significativa para la producción de las cucurbitáceas en Estados Unidos y a nivel mundial (Schaad *et al.*, 2003).

4.2. Identificación, Biología y Epidemiología

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* agente causal de la mancha bacteriana del fruto (MBF) o bacterial fruit blotch (BFB) en inglés, , se encuentra clasificada taxonómicamente de la siguiente forma, Dominio: Bacteria, Phylum: Proteobacteria, Clase: Betaproteobacteria, Orden: Burkholderiales, Familia: Comamonadaceae, Género, especie y subespecie: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* . Es una bacteria Gram negativa, aeróbica obligada y móvil con un solo flagelo polar. La morfología de la célula es en forma de bastón, su tamaño varía de 0.02 a 0.08 por 1.0 a 5.0 μm . En agar nutritivo forma colonias redondas con márgenes irregulares de color beige a amarillo, convexas, lisas a ligeramente granulares y con una zona marginal translúcida. Las colonias no fluorescen en medio B de King (Schaad *et al.*, 2001; 2003). La severidad de la enfermedad es modificada por alta humedad y temperatura así como fuertes corrientes de viento. En Estados Unidos el desarrollo de la bacteria es favorecido por el clima templado húmedo como el que existe en Florida en los meses de mayo y junio, época de producción de sandía. La enfermedad puede progresar rápidamente en estas condiciones climáticas (Latin y Hopkins, 1995). El ciclo de la enfermedad en la mayoría

de los cultivos hospedantes aparentemente inicia con semilla contaminada y representa la fuente de inóculo, posteriormente la bacteria infecta los cotiledones de la plántula cuando ésta emerge de la testa de la semilla. *Aac* puede sobrevivir por varios años en semillas que han sido secadas y almacenadas. La mayoría de la producción de sandía en los Estados Unidos es aún por siembra directa de semilla, pero el trasplante también se está haciendo más común. La irrigación aérea dispersa con efectividad la bacteria a plántulas vecinas en invernaderos, lo que puede resultar en altos números de plántulas infectadas las cuales pueden llegar a los campos de producción y significar el mecanismo a través del cual la bacteria puede diseminarse. Generalmente los trasplantes no presentan síntomas (Latin y Hopkins, 1995). En el campo, el desarrollo de síntomas y la dispersión de *Aac* en el follaje y frutos es más rápida durante el verano, cuando el clima es cálido y soleado con lluvias en ráfagas. *Aac* se dispersa desde las lesiones de las hojas a las flores y frutos a través del agua salpicada durante la lluvia o en la irrigación. Las lesiones en las hojas en el campo no resultan en defoliación, pero son un importante reservorio de la bacteria para la infección de frutos recién formados, los cuales son más vulnerables a la infección del patógeno. La bacteria penetra a través de estomas en la superficie de los frutos donde desarrolla lesiones pequeñas y acuosas de 3 a 7 días después. Los frutos maduros de sandía están cubiertos con una capa de cera que sella a los estomas y previene la entrada de la bacteria en el fruto. Una vez que la capa de cera se ha formado, las sandías maduras pueden ser únicamente invadidas por la bacteria a través de heridas. Las lesiones en la superficie cesan su alargamiento después de la cosecha (Hopkins *et al.*, 1995).

4.3. Distribución mundial.

La bacteria fue reportada por primera vez en 1965 en Georgia, Estados Unidos (Sowel y Schaad, 1979), posteriormente se encontró en Guam y Tinian, en 1987 y en campos de producción comercial de sandía en Florida en 1989 (Smodi *et al.*, 1991). No se tiene certeza del origen de la bacteria, sin embargo, se presume que la región Xinjiang del Este de China puede estar implicada en la introducción de esta bacteria a los Estados

Unidos (Gitaitis y Walcott, 2007). La presencia de *Aac* ha sido reportada en Asia: China, Xinjiang (Zhao *et al.*, 2001), Japón (Ogiso *et al.*, 2001), Turquía (Demir, 1996), Israel (Burdman *et al.*, 2005); Norte América: Estados Unidos: Alabama, Arkansas, California (CABI/EPPO, 1999; Hopkins *et al.*, 1995), Delaware (CABI/EPPO, 1999; Evans y Mulrooney, 1991), Florida (CABI/EPPO, 1999; Somodi *et al.*, 1991), Georgia (CABI/EPPO, 1999; Hopkins *et al.*, 1995), Illinois (Babadoost y Pataky, 2002), Indiana (CABI/EPPO, 1999; Latin y Rane, 1990), Iowa, Maryland, Mississippi, Missouri, Carolina del Norte (CABI/EPPO, 1999; Hopkins *et al.*, 1995), Oklahoma (CABI/EPPO, 1999; Jacobs *et al.*, 1992), Oregon (CABI/EPPO, 1999; Hamm *et al.*, 1997), Carolina del Sur (CABI/EPPO, 1999; Hopkins *et al.*, 1995), Texas (Black *et al.*, 1994; CABI/EPPO, 1999); Tipitapa, Nicaragua, en 1997 debido al uso de semilla contaminada, se ha reportado que la enfermedad fue erradicada (Muñoz y Monterroso, 2002); Brasil: Rio Grande do Norte (Assis *et al.*, 1999); Australia (CABI/EPPO, 1999): Queensland (CABI/EPPO, 1999; O'Brien y Martin, 1999); Guam, Islas Mariana del Norte (CABI/EPPO, 1999; Wall *et al.*, 1990) (Fig 1).

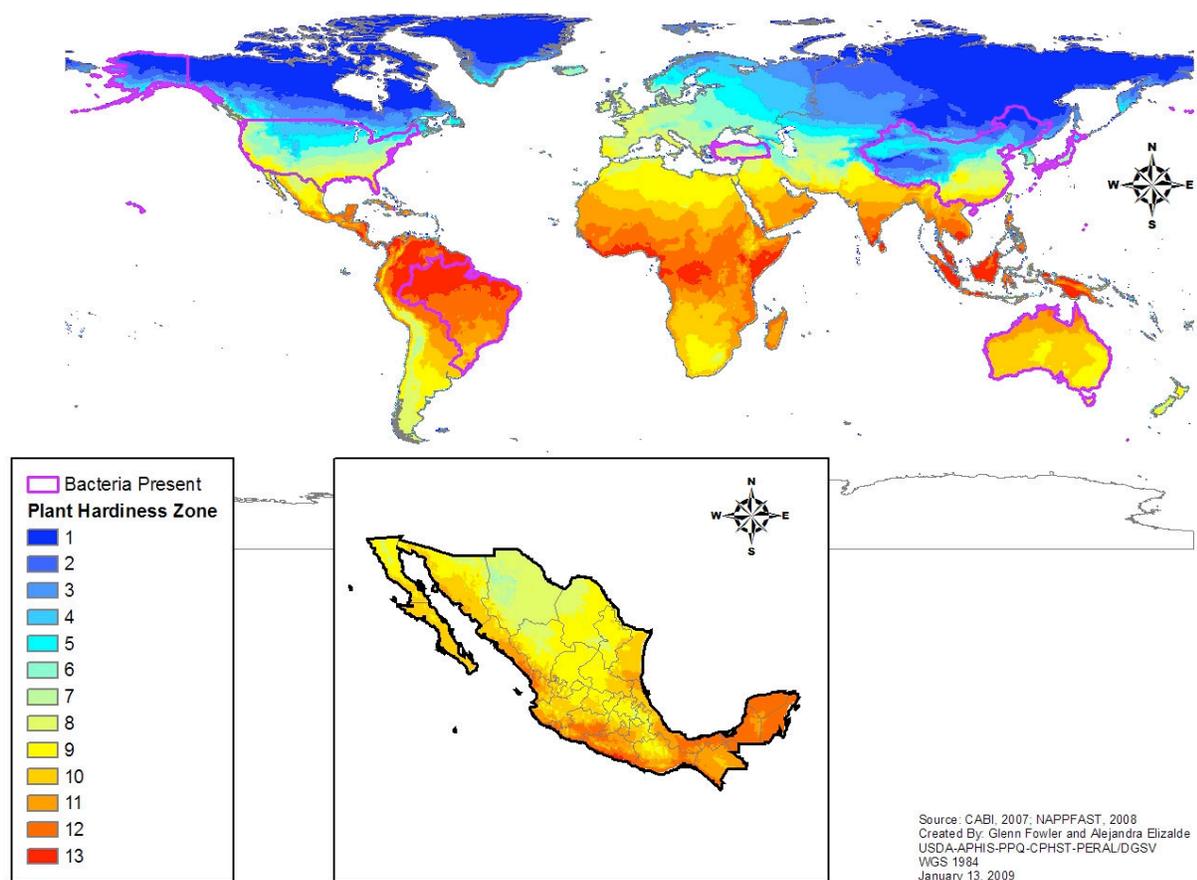


Figura 1. Presencia de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, y potencial de establecimiento en zonas con condiciones ambientales favorables en México y el mundo. NAPPFAST 2008.

4.4. Consecuencias de una introducción

Elemento de riesgo 1, hábitat favorable. La evaluación de riesgo NAPPFAST fue hecha para evaluar las condiciones climáticas favorables de México para *Aac* en sandía. De acuerdo con esta información, las zonas con alto potencial de establecimiento de la plaga en México, con 30 y 45 días acumulados de condiciones favorables para el desarrollo de la infección durante los meses de mayo y junio, se ubican en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y la parte sur de Veracruz. Las zonas que podrían considerarse con menor potencial de establecimiento en las que se

acumulan entre 5-10 días favorables se ubican en los estados de Sinaloa, Durango, Zacatecas, México, Hidalgo, Querétaro, Michoacán, Guanajuato, Tlaxcala y Puebla (Fig. 2). Con base en lo anterior, se asignó para este elemento de riesgo una categoría de media, porque ataca y sobrevive en sandía en 2 ó 3 zonas climáticas en México.

Elemento de riesgo 2, rango de hospedantes. *A. avenae* subsp. *citrulli*, tiene como hospedantes primarios a *Citrullus lanatus* (sandía) y *Cucumis melo* (melón); secundarios: *C. sativus* L. (pepino), *Cucurbita moschata* Duch. ex Poir. (calabaza), y *C. pepo* L. (calabacín) (Latin y Hopkins, 1995). La sandía, el melón cantalupe y rocío de miel (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* H. Jacq.), aparentemente son los más susceptibles, con síntomas foliares y manchas en el fruto, estos dos últimos cultivos están considerados en riesgo ante esta enfermedad (Isakeit *et al.*, 1997). Se han desarrollado síntomas en follaje en calabaza, pepino y otras cucurbitáceas a través de la inoculación, pero se han observado síntomas en frutos en estos hospedantes. Citron (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai var. *Citroides* (L.H. Bailey) Mansf.), una maleza común en la parte sur de Estados Unidos, y presente en México, puede comportarse como un hospedante alternativo. En estudios de laboratorio se pueden inducir síntomas en follaje de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), berenjena (*Solanum melongena* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.), pero no en fruto. De acuerdo a lo anterior, la categoría para el elemento de riesgo correspondiente al rango de hospedantes para la bacteria *Aac*, es media, pues la bacteria ataca múltiples especies de plantas dentro de la familia de las cucurbitáceas, varias de las cuales se encuentran en México. En este caso en particular se identificaron las zonas productoras de sandía (Fig. 1).

Elemento de riesgo 3, potencial de dispersión. La bacteria puede ser introducida y dispersada en el campo por medio de semilla infectada, plántulas infectadas, o la diseminación natural a través de plantas hospederas como plantas voluntarias de sandía o cucurbitáceas silvestres contaminadas (Fressehaie y Walcott, 2005). *Aac* puede sobrevivir por varios años en semillas que han sido secadas y almacenadas. Hopkins *et al.* (1996), señalan que el almacenaje de las semillas a 12°C por 12 meses

no redujo el nivel de infección. En muestras de semillas colectadas de frutos con síntomas se ha obtenido porcentajes de infección por arriba del 80% (CABI, 2007). Una vez en que la bacteria lograra introducirse a una zona productora de sandía en México, tendría un alto potencial reproductivo, ya que bajo condiciones favorables de temperaturas entre 27-30°C y 90% de humedad, se observan los primeros puntos cloróticos dos días después de la inoculación, convirtiéndose en una necrosis después de tres días. Silveria *et al.* (2003), señalan que el período de incubación incluso puede presentarse en un rango de 1.3 a 2.7 días. Por otro lado, los invernaderos emplean sistemas de irrigación que favorecen la dispersión de la bacteria por salpique, lo que deriva en plántulas infectadas que llegan al campo, donde conforme las plantas van creciendo en el campo, el patógeno se dispersa a otras hojas de la planta o a otras plantas vecinas. Las plántulas de sandía voluntarias infectadas pueden servir como una fuente de inóculo local en la siguiente temporada. Las malezas infectadas de la familia de las cucurbitáceas también pueden ser una amenaza en subsecuentes cultivos de sandía (Latin y Hopkins, 1995). Con base en la capacidad reproductiva de la bacteria, su habilidad para sobrevivir en la semilla, plántulas y su posible dispersión a través del sistema de irrigación y el viento se asignó un rango de riesgo alto asociado con el potencial de dispersión.

Elemento de riesgo 4, impacto económico. *Aac* puede causar pérdidas en la producción en sandía, ya que posterior a la detección de *Aac* en los Estados Unidos, éstas fueron del 90% del total de la fruta destinada al mercado. En 1994, debido a la dispersión de la bacteria, se reportaron pérdidas en miles de hectáreas distribuidas en al menos diez Estados de la Unión Americana (Hopkins *et al.*, 1996). Desde entonces, la enfermedad ha representado una amenaza para la industria de la sandía en este país. En los últimos años, la enfermedad se ha presentado en pocos campos pero ha devastado varios de éstos, algunos han resultado en pérdidas totales de la fruta. Las pérdidas por productor han sido del orden de los \$100,000 dólares en muchos de estos casos. También ha causado pérdidas económicas en varios campos e invernaderos de sandía y melón durante el periodo de 2000 a 2003, en diferentes regiones de Israel (Burdman *et al.*, 2005; CABI, 2007). Por otro lado, ocasiona pérdidas en el mercado, por ejemplo,

a mediados de los 90's, para evitar el costo de la litigación, debido a demandas por productores afectados por el presunto uso de semilla de sandía infestada, diversas compañías suspendieron su venta en varios Estados del Sureste de Estados Unidos, consideradas zonas de alto riesgo para la ocurrencia de brotes de la bacteria, resultando en pérdidas económicas para las compañías y los productores. Incluso los síntomas más leves en fruto (aspecto grasoso, acuoso, oscuro o manchado) impiden su comercialización, produciendo pérdidas cuantiosas de mercado (Latin y Hopkins, 1995). Con base en lo anterior, *Aac* tuvo un alto rango de riesgo para el impacto económico, ya que causa al menos tres de los impactos económicos previstos en este elemento de riesgo.

Elemento de riesgo 5, impacto ambiental. Según el Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad (SNIB) de CONABIO, de acuerdo a especies registradas en bases de datos de proyectos realizados por esta institución, México cuenta con un total de 207 especies de la familia cucurbitácea. Ello indica que hay evidencia de plantas hospedantes, sin embargo, ninguna está considerada en amenaza o en peligro de extinción en México, aunque algunas de ellas se reportan con escasa presencia. El impacto ambiental del patógeno se puede categorizar como medio, considerando que por un lado puede ocasionar disrupciones importantes en hábitats críticos en donde se reportan estas 207 especies y que incluyen huerto, bosque tropical, selva baja caducifolia, matorral xerófilo con cactáceas columnares, bosque de pino-encino, ruderal, entre otros y su control requeriría de un programa de manejo que puede implicar el uso del control químico o biológico (CONABIO, 2009, comunicación personal).

4.5. Vías de introducción

La principal vía de introducción y dispersión de la bacteria ha sido mediante la transmisión por semilla, debido a que *Aac* puede sobrevivir por varios años en semillas que han sido secadas y almacenadas (Latin y Hopkins, 1995; Silveira *et al.*, 2003; Sowel y Schaad, 1979).

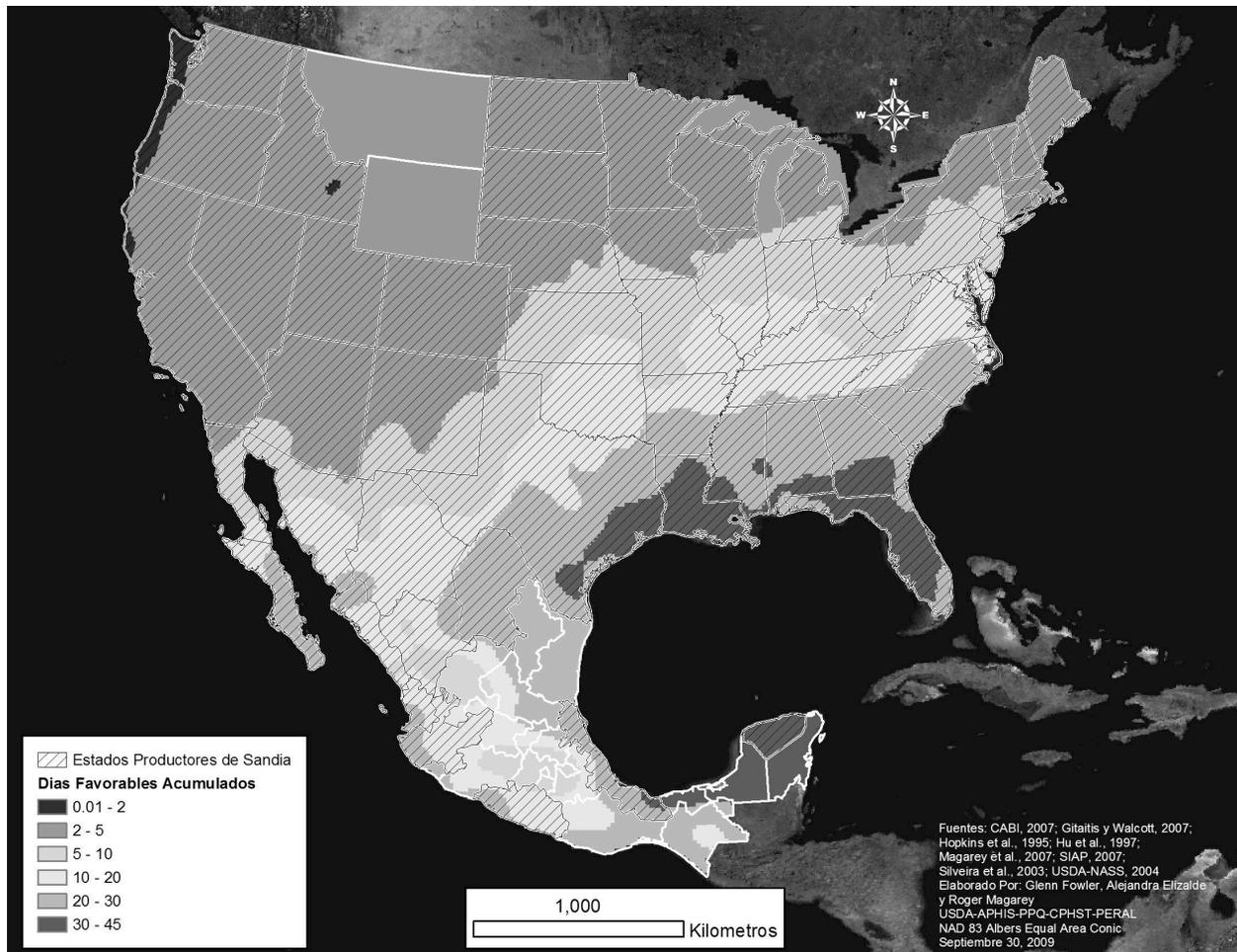


Figura 2. Zonas potencialmente favorables para el establecimiento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* en México, durante los meses de Mayo a Junio.

4.6. Opciones de control

Exclusión del patógeno. Como parte de las medidas de prevención, los productores usan semilla libre de *Aac* y certificada. Adicionalmente, para la producción comercial se establecen los lotes fundación de semilla en regiones con climas fríos y secos, regiones semiáridas donde se logra un escape a la transmisión del patógeno a la semilla, además de una prueba negativa para *Aac* mediante la siembra de un mínimo de 10,000 plántulas por lote en invernadero bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura para comprobar que está libre de la bacteria (Gitaitis y Walcott, 2007).

Control cultural. Se recomienda eliminar malezas y restos de cultivos, ya que pueden actuar como reservorio de la bacteria, no abandonar los cultivos al final del ciclo, proteger los primeros estados vegetativos de las plantas, tener cuidado para no transportar la bacteria con las operaciones habituales que se hacen en el cultivo, o con la ropa, calzado y herramientas de trabajo, realizar las labores de cultivo siguiendo siempre el mismo recorrido por pasillos y filas, evitar visitas excesivas a la plantación, desinfectar los útiles de trabajo, mesas de secado con una solución de fosfato trisódico al 10% ó 2% NaOCl antes y después de su uso, usar variedades resistentes o tolerantes, cuando existan, desinfectar el suelo mediante solarización antes de realizar la plantación, desinfectar el agua de riego (desinfección de balsa y estructuras de riego). Controlar las condiciones climáticas en el invernadero manteniendo adecuada ventilación, baja humedad y temperatura, así como control en el suministro de agua para disminuir períodos de humedad en las hojas (Hopkins *et al.*, 1996).

Control químico. Las aplicaciones de fungicidas que contengan cobre como Manzate 200, Kodice DF y CHAMP 2 en dosis recomendables, han reducido la incidencia de síntomas de la bacteria cuando las aplicaciones se inician en la primera floración y una semana antes de la fructificación (Hopkins *et al.*, 1995; Hopkins, 1997).

4.7. Opciones de mitigación de riesgo

Entre las medidas de mitigación de riesgo para la importación de semilla de sandía de distintos orígenes y procedencias, el país exportador cumple con la certificación de la semilla de acuerdo a los procedimientos de su Organización Nacional de Protección Fitosanitaria y lo manifiesta en la declaratoria adicional del Certificado Fitosanitario Internacional (CFI), de la siguiente forma: “El cultivo fue oficialmente inspeccionado durante el periodo de cultivo y se encontró libre de la mancha bacteriana del fruto (*A. avenae* subsp. *citrulli*)”, o bien “No se ha reportado la presencia de *A. avenae* subsp. *citrulli* en el estado de producción”, apoyada por una inspección en el campo del país exportador durante el periodo de crecimiento para declarar libre de la plaga. Otras medidas fitosanitarias corresponden a una prueba de diagnóstico antes de la

exportación, la aplicación de un tratamiento cuyos detalles se deben señalar en el CFI, inspección y prueba de diagnóstico en el punto de ingreso al país importador.

Tratamiento químico a la semilla. La prevención de la transmisión de *Aac* a través de la semilla es la forma más efectiva de control. Para ello se recomienda el tratamiento a la semilla con Tsunami 1.25%, cuyo ingrediente activo es ácido peroxiacético (AP), el cual a bajas concentraciones tiene una actividad antimicrobial y ha sido evaluado como uno de los desinfectantes que pueden erradicar eficazmente a *Aac* de semilla contaminada, así como otras enfermedades que se transmiten por semilla en sandía; éste puede ser aplicado con seguridad a semillas cosechadas de sandía triploide sin afectar la calidad de la semilla y la germinación (Block, 2001). El protocolo de tratamiento más efectivo aplicado a la semilla en Estados Unidos correspondió a 30 minutos con ácido peroxiacético a 1600 µg/mL, seguido por el secado para disminuir la humedad de semilla en un horno secador a 40°C (Hopkins *et al.*, 2003).

4.8. Recomendación

Revisión de las medidas fitosanitarias aplicadas en México para la mitigación de riesgo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* asociada a la importación de semilla de sandía.

4.9. Vacíos en información e incertidumbre.

Es necesario la investigación para descartar la afectación en solanáceas, ya que no hay reportes en campo, únicamente a nivel de laboratorio a través de inoculación (Rueda-Puente, 2006).

4. CONCLUSIONES

1. El rango de riesgo total de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* es alto en México, al obtener un valor de 12 puntos acumulado de los elementos de riesgo categorizados: podría atacar y sobrevivir en sandía en 2 ó 3 zonas climáticas en México similares a las zonas donde el patógeno está presente; ataca múltiples especies de plantas pero todas dentro de la familia de las cucurbitáceas; presenta un alto potencial de dispersión (reproducción en 2 días, dispersión a grandes distancias sobre semilla y plántulas, y a través de sistemas de irrigación y lluvia); presenta un alto potencial de causar severos daños económicos en zonas productoras de sandía; podría tener un impacto ambiental al ocasionar disrupciones importantes en hábitats críticos en México donde se reportan alrededor de 207 especies de cucurbitáceas.
2. De acuerdo al análisis geoespacial NAPPFAST, México representa un hábitat favorable para la bacteria de acuerdo a la disponibilidad de material hospedante y condiciones climáticas. Las zonas con mayor potencial de establecimiento de la plaga en México, con 30 y 45 días acumulados de condiciones favorables para la infección de la bacteria, se ubican en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y la parte sur de Veracruz.
3. De las zonas con mayor potencial de establecimiento de la bacteria en México, únicamente se cuenta con información que señala que en Yucatán presenta producción de sandía en los meses de mayo a junio, lo que puede influir en el establecimiento del patógeno.
4. El análisis geoespacial no incluyó otros hospedantes como melón, pepino, calabaza, por lo que sería recomendable realizar el pronóstico con base en los parámetros definido en el sistema NAPPFAST.
5. Dado el alto potencial de riesgo de la plaga, la adopción de medidas fitosanitarias específicas es ampliamente recomendada. La inspección en el puerto de entrada se

considera insuficiente para proveer seguridad fitosanitaria. La certificación de las medidas fitosanitarias aplicadas durante la producción de la semilla de sandía, incluyendo el tratamiento a la semilla con ácido peroxiacético puede considerarse en la mitigación de riesgo.

6. La evaluación del riesgo de *A. avenae* subsp. *citrulli* bajo el proceso utilizado está científicamente fundamentado, lo que ayuda a disminuir la subjetividad, y le confiere transparencia a la toma de decisión en el establecimiento de medidas fitosanitarias.

5. LITERATURA CITADA

- Assis, S.M.P., Mariano, R.L.R., Silva-Hanlin, D.M.W., and Duarte, V. 1999. Bacterial fruit blotch caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 24:191.
- Babadoost, M., and Pataky, N. 2002. First report of bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Illinois. *Plant Disease* 86:443.
- Black, M.C., Isakeit, T., Barnes, L.W., Kucharek, T.A., Hoover, R.J., and Hodge, N.C. 1994. First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Texas. *Plant Disease* 78:831.
- Block, S.S. 2001. Peroxygen Compounds. pp. 185-204. In: *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Fifth edition. Lippincott, Williams and Wilkins Press. Philadelphia, PA, USA. 1504 p.
- Burdman, S., Kots N., Kritzman, G., and Kopelowitz, J. 2005. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. *Plant Disease* 89:1339-1347.
- CABI. 2007. *Crop protection compendium*, 2007 ed. CAB International. Wallingford, UK. Encyclopedic media tool.
- CABI/EPPO. 1999. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Distribution Maps of Plant Diseases*, Map No. 787. CAB International. Wallingford, UK.
- Demir, G. 1996. A new bacterial disease of watermelon in Türkiye: bacterial fruit blotch of watermelon (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*) (Willems *et al.*). *Journal of Turkish Phytopathology* 25:43-49.
- DOF. 1995. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-029-FITO-1995 requisitos y especificaciones fitosanitarios aplicables a semilla para siembra, de importación. *Diario Oficial de la Federación (DOF)*, 20 septiembre 1995. México, D.F. 53 p.
- Elizalde-Jiménez, N.A. 2008. Evaluación de Riesgo Fitosanitario Aplicado a los OGM: Análisis, Manejo y Comunicación. pp. 131-144. En: *Bioseguridad en la Aplicación de la Biotecnología y el uso de los Organismos Genéticamente Modificados*. Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos

- Genéticamente Modificados_CIOBIOGEM, UPND y GEF. México, D.F. 383 p.
- Evans, T.A., and Mulrooney, R.P. 1991. First report of watermelon fruit blotch in Delaware. *Plant Disease* 75:1074.
- FAO. 2004. Análisis de Riesgo de Plagas para Plagas Cuarentenarias, incluido el Análisis de Riesgos Ambientales y Organismos Vivos Modificados. NIMF No. 11. Normas Internacionales para medidas fitosanitarias. Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. Roma, Italia. 18 p.
- Follett, P. A., and Neven, L.G. 2006. Current trends in quarantine entomology. *Annual Review of Entomology* 51:359-385.
- Gitaitis, R., and Walcott, R.R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 45:371-97
- Hamm, P.B., Spink, D.S., Clough, G.H., and Mohan, K.S. 1997. First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Oregon. *Plant Disease* 81:113.
- Hopkins, D.L., Stall B., Kucharek, T., Gay, D., Gitaitis, R., Cook, W., Kenath, A., and Latin, R. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon. Special interstate cooperative publication. University of Florida, The university of Georgia, Clemson University and Purdue University. 5 p. <http://plantpath.ifas.ufl.edu/takextpub/FactSheets/sicp1.pdf>. Consultado el 21 de enero 2009.
- Hopkins, D.L., Cucuzza, J.D., and Watterson, J.C. 1996. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. *Plant Disease* 80:529-532.
- Hopkins, D. L., Thompson, C. M., Hilgren, J., and Lovic, B. 2003. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon. *Plant Disease* 87:1495-1499.
- Hu, P.F., Young, M.J., Triggs, M.C., and Wilkie, P.J. 1997. Pathogenic relationships of the subspecies of *Acidovorax avenae*. *Australasian Plant Pathology* 26:227-238.
- Isakeit, T., Black, M.C., Barnes, L.W., and Jones, J.B. 1997. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Disease* 81:694.

- Jacobs, J.L., Damicone, J.P., and McCraw, B.D. 1992. First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Oklahoma. *Plant Disease* 76:1185.
- Latin, R. X., and Rane, K.K. 1990. Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. *Plant Disease* 74:331.
- Latin, R.X., and Hopkins, D.L. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon: The hypothetical exam question becomes reality. *Plant Disease* 79:761-765.
- Magarey, R.D., Fowler, G.A., Borchert, D.M., Sutton, T.B., Colunga-Garcia, M., and Simpson, J.A. 2007. NAPPFAST an internet system for the weather-based mapping of plant pathogens. *Plant Disease* 91:336-345.
- Muñoz, M., and Monterroso, D. 2002. Identification of *Acidovorax avenae citrulli* in watermelon seeds in Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66:101-104.
- O'Brien, R.G., and Martin, H.L. 1999. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 39:479-485.
- Ogiso, H., Fujinaga, M., and Shimizu, T. 2001. Occurrence of watermelon bacterial fruit blotch in Nagano prefecture. *Annual Report of the Kanto-Tosan Plant Protection Society* 48:33-36.
- Rueda-Puente, E.O., Tarazón-Herrera, M.A., García-Hernández, J.L., Murillo-Amador, B., Holguín-Peña, R.J., Flores-Hernández, A., Sánchez-Arizpe, A., Flores-Olivas, A. y Preciado-Rangel, P. 2006. Producción de Antisuero contra la Mancha Bacteriana del Fruto [*Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (Schaad, Sowell, Goth, Colwell y Webb) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters y De Ley] y su Detección en el Cultivo de Sandía (*Citrullus vulgaris* Schrad.) en la Comarca Lagunera, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24:129-136.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. The American Phytopathological Society. Third Edition. St. Paul, Minnesota, USA. 373 p.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., and Randhawa, P. 2003. Emergence of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a crop-threatening disease of watermelon and

- melon. Lacobellis, N.S., Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J.W., Morris, C.E., Murillo, J., Schaad, N.W., Stead, D.E., Surico, G., Ullrich, M.S. (eds.). Document Title: Presentations from the 6th International Conference on *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens, Maratea, Italy, September 15-19, 2002. Kluwer Academic Publishers. pp. 573-582.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2007. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx>. Consultada el 25 de Julio 2008.
- Silveira, E.B., Michereff, S.J., e Mariano, R.L.R. 2003. Severidade da mancha-aquosa em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Fitopatologia Brasileira 28:171-175.
- Somodi, G.C., Jones, J.B., Hopkins, D.L., Stall, R.E., Kucharek, T.A., Hodge, N.C., and Watterson, J.C. 1991. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Disease 75:1053-1056.
- Sowel, G.Jr., and Schaad, N.W. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon: Seed transmission and resistance of plant introductions. Plant Disease Reporter 63:437- 441.
- USDA. 2000. Guidelines for pathway – initiated pest risk assessment. Version 5.02. Animal and Plant Health Inspection (APHIS). Plant Protection and Quarantine (PPQ). Permits and Risk Assessment. Commodity risk analysis branch. Riverdale, MD, USA. 30 p.
- USDA. 2005. Risk analysis for *Phytophthora ramorum* Werres, de Cock and In't Veld, causal agent of Phytophthora Canker (Sudden Oak Death), Ramorum Leaf Blight, and Ramorum Dieback. Animal and Plant Health Inspection (APHIS). Plant Protection and Quarantine (PPQ). Center for Plant Health Science and Technology (CPHST). Raleigh, NC, USA. 77 p.
- USDA. 2007. Risk analysis of potencial consequences associated with the introduction of the Red Palm Mite, *Raoiella indica*, into the United States. Animal and Plant Health Inspection (APHIS). Plant Protection and Quarantine (PPQ).

Center for Plant Health Science and Technology (CPHST). Raleigh, NC, USA. 24 p.

USDA-NASS. 2004. Census of agriculture 2002. United States Department of Agriculture. National Agricultural Statistics Service. <http://www.agcensus.usda.gov/Publications>. Consultado el 15 de Julio 2008.

Wall, G.C., Santos, V.M., Cruz, F.J., Nelson, D.A., and Cabrera, I. 1990. Outbreak of watermelon fruit blotch in the Mariana Islands. *Plant Disease* 74:80.

Zhao TingChang, Sun FuZai, Wang BingWan, and Hui WenGuang. 2001. Pathogen identification of Hami melon bacterial fruit blotch. *Acta Phytopathologica Sinica* 31:357-364.

Zitter, T.A, Hopkins D.L, and Thomas C.F. 1998. *Compendium of Cucurbit Diseases*.

CAPITULO 2

Evaluación Probabilística de un Modelo Integral de Medidas de Mitigación de Riesgo denominado P- HACCP de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [(Schaad, Sowell, Goth, Colwell y Webb) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters y De Ley] Aplicada a la importación de semilla de sandía [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai].

Norma Alejandra Elizalde-Jiménez, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA, Guillermo Pérez Valenzuela 127, Col. Del Carmén. Del. Coyoacán, México D.F. CP 04100; **Javier Hernández-Morales**, **Cristian Nava-Díaz**, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo Edo. de México CP 56230; **Santos Gerardo Leyva-Mir**, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, km 38.5 Carr. México-Texcoco, Chapingo, Edo. de México CP 56230; **Ronald A. Sequeira**, **Glenn Fowler**, and **Yu Takeuchi** USDA-APHIS-PPQ, Center for Plant Health Science and Technology, Pest Epidemiological Risk Analysis laboratory, 1730 Varsity Dr., Raleigh, NC, EUA 27606. Correspondencia alejandra.elizalde@senasica.gob.mx

EVALUACIÓN PROBABILÍSTICA DE UN MODELO INTEGRAL DE MEDIDAS DE MITIGACION DE RIESGO, DENOMINADO P-HACCP DE *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [(Schaad, Sowell, Goth, Colwell y Webb) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters y De Ley] APLICADA A LA IMPORTACION DE SEMILLA DE SANDÍA [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai]
Norma Alejandra Elizalde Jiménez, M.C
Colegio de Postgraduados, 2009

En este capítulo se examinaron las medidas de mitigación del riesgo para prevenir la introducción y diseminación de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) asociada a semilla de sandía de importación. Para ello se utilizó una adaptación de la metodología HACCP (Análisis de riesgo y puntos críticos de control, por sus siglas en inglés), denominada sistema P-HACCP, la cual retoma la ventaja del sistema HACCP dentro del contexto de la seguridad alimentaria, ya adoptado por la industria y se adiciona el componente de la seguridad cuarentenaria. Esta metodología permitió identificar siete puntos críticos de control en el sistema de comercialización de semilla de sandía, donde se requiere de la adopción de medidas fitosanitarias que minimicen el riesgo de introducción y diseminación de *A. avenae* subsp. *citrulli*. También se desarrollo un modelo de simulación probabilística que permite evaluar la reducción de riesgo en forma cuantitativa interpretada como la probabilidad de introducción y establecimiento en términos de años hasta que ≥ 1 semilla infectada con *A. avenae* subsp. *citrulli* escape del sistema y germine en el país importador.

Palabras clave: P-HACCP, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

PROBABILISTIC ASSESSMENT OF A MITIGATION MEASURES OF AN
INTEGRATED MODEL CALLED P-HACCP OF *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*
[(Schaad, Sowell, Goth, Colwell y Webb) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters y
De Ley] TO IMPORT SEED OF WATERMELON
[*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai]
Norma Alejandra Elizalde Jiménez, M.C
Colegio de Postgraduados, 2009

In this chapter, discussed risk mitigation measures to prevent the introduction and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (*Aac*) associated with import watermelon seed are discussed. A modification of the HACCP (analysis of risk and critical points of control by its acronym) called P-HACCP system which takes advantage of the HACCP system within the context of food safety that the industry has already taken and appends to safeguarding continuum was used in this research. This methodology allow us to identify seven critical points of control during watermelon seed production, which requires adoption of phytosanitary measures to minimize the risk of introduction and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. A simulation probabilistic model enabling assess reducing risk in quantitative terms interpreted as likelihood of introduction of 1 seed infected with a *A. avenae* subsp. *citrulli* and establishment in terms of years was developed.

Additional keywords: P-HACCP, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

1. INTRODUCCIÓN

La compañía productora de alimentos Pilsbury, pionera del concepto de HACCP (Análisis de riesgo y puntos críticos de control, por sus siglas en inglés), fue tan eficiente en este concepto que logro proveer de alimentos al programa espacial de los Estados Unidos (NASA) a principios de los 60's. Desde entonces, el HACCP ha sido reconocido y usado alrededor del mundo como un método proactivo para asegurar la pureza en el producto. La planeación HACCP es ampliamente usada y aceptada por la industria por una buena razón, funciona. En forma similar, HACCP ha sido adoptado en el área de recursos naturales para remover o reducir a un nivel aceptable especies de riesgo antes de ser introducidas a nuevas áreas (Buchanan,1990, USFWS -NCTC, 2004).

La propuesta de aplicar HACCP en el ámbito fitosanitario, tiene el potencial de prevenir la introducción de plagas cuarentenarias a través del comercio internacional de productos agrícolas. A través de la revisión de literatura se encontraron casos exitosos de la aplicación del HACCP en algunas áreas como recursos naturales y pesca. Sin embargo, en estos casos no se observaron modelos de simulación que sin que sucedan eventos adversos se pueda cuantificar el efecto de la aplicación de una medida fitosanitaria preventiva o correctiva (USFWS-NCTC, 2004; CONABIO, 2009).

El proceso de planeación estratégico de HACCP elimina o minimiza riesgos (contaminantes) en puntos críticos de control y en la aplicación fitosanitaria desarrollada en este documento de tesis contempla como forma innovadora un análisis cuantitativo que permite identificar y evaluar dichos puntos críticos de control.

La caracterización presentada en este documento a manera de estudio de caso examina las medidas de mitigación de riesgo para prevenir la introducción de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) asociada a semilla de sandía, la cual corresponde a uno de los patógenos que se han detectado en forma más recurrente en semilla de sandía de importación. Las detecciones normalmente son resultado de los

análisis de diagnóstico a los que se someten las semillas antes de la introducción al territorio nacional, y en caso de obtenerse un resultado positivo la semilla se retorna o se destruye, lo que implica un impacto en la industria comercializadora de las mismas.

En este trabajo se utilizó la metodología HACCP adaptada al contexto fitosanitario o a la seguridad cuarentenaria. Lo anterior para evaluar cómo las medidas fitosanitarias adoptadas durante el sistema de comercialización de semilla de sandía, en forma integral, aseguran la reducción del riesgo en comparación con el uso de una sola medida fitosanitaria. La propuesta de manejo será denominada de aquí en adelante sistema de P-HACCP tomando la ventaja del papel del sistema HACCP dentro del contexto de la seguridad alimentaria, ya adoptado por la industria y adicionando el componente de la seguridad cuarentenaria. La evaluación de este sistema está basada en la simulación probabilística, a través de la cual podemos identificar el tiempo promedio que debe pasar para que *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* (Aac) escape del sistema de comercialización de la semilla de sandía.

Actualmente para la aplicación de medidas fitosanitarias no hay protocolos, lineamientos o metodologías consistentes, los planes de trabajo y otros documentos que capturan los requisitos fitosanitarios son siempre desarrollados de forma ad-hoc. Se ha encontrado que existen pocos lineamientos disponibles y desarrollados por la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria, o bien otros que han sido desarrollados bajo lineamientos previstos por cada país y que actualmente se encuentran en curso.

Hemos encontrado que el sistema P- HACCP es un buen paradigma para integrar los diferentes elementos necesarios para agilizar el comercio y direccionar las necesidades de seguridad cuarentenaria. P – HACCP provee de una metodología genérica, respetable y transparente para el manejo del riesgo que adicionalmente facilita las necesidades de interacción entre las prácticas regulatorias y las de la industria. Donde no hay un esfuerzo para sistematizar los procedimientos regulatorios para el manejo del riesgo, los grupos de la industria tal vez desearían considerar paradigmas como el

P-HACCP, ya que promete integrar muchas de las buenas prácticas existentes dentro de un protocolo mas optimizado y transparente (Sequeira, 2006).

2. ANTECEDENTES

2.1 Análisis de las Medidas de Manejo de Riesgo Fitosanitario

2.1.1 Tratamiento fitosanitario de alta mortalidad

Para el uso de este tipo de tratamiento se aplica cuando la plaga represente un alto riesgo por ejemplo, moscas de la fruta; cuando la tasa de infestación inicial sea muy alta; que la plaga se alimente internamente o sea difícil de detectar; que la eficacia del tratamiento pueda ser fácilmente establecida, y que el tratamiento no sea sustancialmente fitotóxico para el producto vegetal.

La aplicación de un tratamiento de alta mortalidad, basado en la prueba estadística comúnmente llamada “probit 9”, resulta en 99.9968% de eficacia, este estándar fue propuesto por Baker en 1939. Este nivel de seguridad fue inicialmente sugerido para moscas de la fruta, más tarde éste fue adoptado para otros insectos de importancia cuarentenaria (Burditt, 1982; Paull y Armstrong, 1994; Aegerter y Folwell, 2000).

En este tipo de medida fitosanitaria se puede observar que el efecto de cada tratamiento se evalúa por separado hasta que se logra comprobar que la aplicación de cierta dosis, durante un cierto periodo de exposición, deriva en el parámetro establecido de 32 sobrevivientes en un 1 millón de individuos tratados. Para alcanzar la mortalidad probit 9 a un nivel de confianza del 95%, un mínimo de 93,613 insectos deben ser probados sin sobrevivencia. Este nivel de mortalidad ha sido adoptado por Estados Unidos, como el nivel de seguridad cuarentenaria a cumplir (Follet y Neven 2006).

Otros países (Japón, Australia, y Nueva Zelandia) aceptan la eficacia del tratamiento de cuarentenarios de 99.99% (en el nivel de confiabilidad del 95%), que es obtenida tratando 29,956 insectos sin sobrevivientes (Couey y Chew, 1986), Japón requiere a 30.000 individuos en tres o cuatro ensayos (Sproul, 1976). Nueva Zelandia requiere tres réplicas de 10.000 insectos tratados, y Australia acepta 30,000 insectos tratados sin sobrevivientes (Heather y Corcoran, 1992). Estadísticamente, el número de los insectos tratados en cada réplica es poco importante cuando no hay sobrevivientes, pero puede ser importante cuando hay sobrevivientes (Follett y Neven, 2006).

Un ejemplo de este tipo de tratamientos es la aplicación de bromuro de metilo ya que consistentemente reúne las especificaciones de probit 9. Es un fumigante con amplio espectro en plagas, que puede aplicarse a una gran variedad de productos vegetales. Así mismo tiene otras ventajas, resulta efectivo para varios patógenos, no presenta un efecto adverso en los productos vegetales tratados, es fácil de usar y es fácil de entender su modo de acción. Sin embargo, es un producto que destruye la capa de ozono, por lo que se ha acordado, dentro del protocolo de Montreal, que su uso se limite a la aplicación cuarentenaria y se descontinúe paulatinamente hasta su desuso en el año 2010 (Aegerter y Folwell, 2000).

Otro tratamiento de alta mortalidad y considerado de alto nivel de seguridad cuarentenaria es basa en radiación. En este proceso la prevención de la emergencia de la plaga, es usada como un criterio de efectividad. Mansour (2003), realizó una investigación en la que señala que el uso de radiación ionizada como un tratamiento fitosanitario contra la palomilla de la manzana en frutos infestados, es factible y requiere relativamente dosis bajas. En este caso la prevención de la emergencia de la palomilla se logra a una dosis de no más de 200 Gy. En el estudio se menciona que aunque la demostración de seguridad de probit 9 a un nivel de confianza de 95%, requiere pruebas acumulativas en 93 613 individuos en frutos, no se observaron sobrevivientes de una población tratada de 30, 000 individuos (LD99.99 a el 95%) lo cual es considerado adecuado por varios países.

Otro ejemplo es el tratamiento de frutos de mango infestado con larvas de tercer instar con irradiación de rayos gama (Cobalto – 60), para inhibir la emergencia de adultos. Las dosis de 76.9, 87.3, 91.4 y 112.7 Gy fueron estimadas para proveer un nivel de seguridad cuarentenaria de 99.9968% (probit 9) inhibiendo la emergencia de adultos de *A. oblicua*, *A. serpentina*, *A. ludens* y *C. capitata* respectivamente. En el estudio se usaron mangos infestados con un total de 100,000 larvas de cada especie, los resultados obtenidos en el laboratorio fueron confirmados usando una dosis de 100Gy para especies de *Anastrepha* y 150 Gy para *C. capitata*. No se observó emergencia de adultos para ninguna de las cuatro especies comparadas con el 80% de emergencia observado en el control (Bustos *et al.*, 2004).

En este sentido, los Tefrítidos han sido el grupo más estudiado de plagas cuarentenarias en la irradiación; las dosis mínimas absorbidas confirmadas con largos periodos de prueba confirman que proporciona un control al nivel del probit 9 (99.9968%) en un rango entre 50 a 250 Gy. Un trabajo considerable se ha hecho con la mosca del mediterráneo, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann), una de las plagas cuarentenarias más importantes en todo el mundo, y las dosis sugeridas para proporcionar seguridad cuarentenaria han variado extensamente. El hecho de que los insectos todavía están vivos por un cierto tiempo después de que la irradiación ha sido uno de los obstáculos principales a su uso. La irradiación puede ser el tratamiento más ampliamente aplicado desde el punto de vista cuarentenario considerando que mantiene la calidad de fruta. Sin embargo, algunas frutas importantes enviadas a través de las barreras cuarentenarias (mangos y cítricos) pueden sufrir por las dosis de hasta 150 Gy cuando son aplicadas en escala comercial donde mucha de la carga de la fruta recibe \ 300 Gy. Afortunadamente, algunos de los tefrítidos importantes que atacan estas frutas, tales como *Anastrepha* spp., se pueden controlar con dosis más bajas (Hallman, 1999).

Mangan *et al.* 1997 aplicó el enfoque de Baker (1990) para cítricos y mangos colectados de varias partes de México. Como es bien sabido para las moscas de la frutas, la distribución de la cantidad de larvas por fruta refleja el comportamiento de la

hembras de ovipositar grupos de huevecillos. Aunque el porcentaje de fruta infestada frecuentemente fue muy bajo (<5% en fruta con manejo) la media de pupas producidas por fruto infestado fue usualmente mayor que 4 mangos, naranjas y toronjas. Las tangerinas fueron una excepción con un número de 1.5 y 1.6 pupas por fruto. Usando los registros de pre inspección de acuerdo al procedimiento de USDA- APHIS para determinar el número de frutos por embarque (ambos tamaños de fruta y tipo de material de empaque fueron incluidos) mostraron que la mayoría de muestras del campo permita la sobrevivencia de un par de pupas aún con un tratamiento probit 9. Las especies de frutas con mayor número de larvas por fruto tuvieron más riesgo de permitir pares de larvas sobrevivientes que aquellos con menor número de larvas.

Mangan *et al* (1997), usando las ecuaciones propuestas por Couey y Chew (1986) para los requerimientos en el corte de fruta, determinaron si la frecuencia de fruta infestada podría exceder el número que podría permitir un apareamiento a un intervalo de confianza de 99%. Los niveles de infestación fueron analizados en tamaño de embarque comercial de mango, toronja, tangerinas y naranjas. Muchos embarques, seguidos de un tratamiento pos cosecha probit 9 (99.9968 de mortalidad), podrían exceder un máximo límite de plaga de 2 ó 3 sobrevivientes por embarque. Ésto sugirió que el sistema de certificación que reduce las poblaciones en campo y la selección de fruta en la empacadora eran necesarios aún de la aceptación y alta mortalidad del tratamiento pos cosecha.

Derivado de esto, el uso de probit 9 enfrenta algunos problemas como medida fitosanitaria de mitigación de riesgo. El efecto que tiene el tratamiento sobre la plaga está basado en la mortalidad de la misma, o como en los casos descritos en la inhibición del desarrollo de cierto porcentaje de la población tratada y se descuida el aspecto de la sobrevivencia.

En este sentido, existen reportes de que aún empleando un sistema de importación aplicando un tratamiento nivel probit 9, frecuentemente ocurren fallas en la prevención de la entrada de una plaga. Mangan y Hallman (1998) dan diversos ejemplos de

tratamiento de calor que han fallado para proveer la seguridad cuarentenaria. También se han reportado fallas en los sistemas de tratamiento en frío, aunque con menos frecuencia, es también sabido que permite la sobrevivencia de moscas de la fruta. Un ejemplo de esto fue la detección de moscas del Mediterráneo en naranjas clementinas exportadas a los Estados Unidos desde España, donde el sistema empleado es probablemente el tratamiento más común para cítricos embarcados desde una región afectada por esta mosca de la fruta, utilizado ampliamente en todo el mundo, pero el sistema falló para prevenir la introducción de fruta infestada a los puertos en Estados Unidos (USDA, 2002).

2.1.2 Tratamientos fitosanitarios combinados o múltiples

También se han propuesto los tratamientos cuarentenarios combinados o múltiples. Éstos son una aplicación seriada de dos o más tratamientos simples, los cuales por sí solos no alcanzan la seguridad cuarentenaria interpretada como 99.9968% de mortalidad, pero la logran cuando son aplicados en combinación. Los tratamientos deberán ser aditivos y posiblemente sinérgicos. Ésto es basado en el concepto de que la sobrevivencia de la plaga en el producto vegetal es reducida al aplicar tratamientos cuarentenarios consecutivos. La combinación o el uso de tratamientos múltiples tal vez pueda ser usada efectivamente cuando un solo tratamiento no es práctico, o bien tal vez sea incluido como parte de un enfoque de sistemas, por ejemplo, el caso del programa de certificación como libre de la mosca del Caribe *Anastrepha suspensa* (Loew) en Florida, que combina el tratamiento en frío mas fumigación (Mangan y Sharp, 1994).

Los autores también señalan que la aplicación de estos tratamientos combinados, mantienen la independencia que se ha previsto en la aplicación de dos medidas de mitigación como sucede en un enfoque de sistemas. Sin embargo, para el planteamiento de este trabajo, se realizaron varias sesiones de trabajo con un equipo de analistas de riesgo y el estadístico Net Jones del Centro de Ciencia y Tecnología Fitosanitaria (CPHST, por sus siglas en inglés), éste último, a través de desarrollar la

expresión matemática que involucra la aplicación de tratamientos combinados, notó que existe interacción entre los tratamientos para lograr la mortalidad al nivel cuarentenario necesario. En este sentido la expresión matemática podría expresarse de la siguiente forma:

$$M_{cn} = t_1 + t_2 + \dots + t_n + (-1) t_1 t_2 + (-1) t_1 t_3 + \dots + (-1) t_{n-1} t_n + (-1^2) t_1 t_2 t_3 + \dots + (-1^2) t_{n-2} t_{n-1} t_n + \dots + (-1^{n-1}) t_1 t_2 \dots t_{n-1} t_n$$

Donde el número de tratamientos es igual a 1 hasta n; el efecto de cada tratamiento t_n tiene una varianza igual a σ^2_n ; y el efecto de cada tratamiento t_n tiene una covarianza con t_m , donde m toma un rango de valores desde 1 a n pero $m \neq n$ simultáneamente, y $\sigma_{mn} = 0$ (El requerimiento para independencia).

La independencia entre tratamientos no es clara, matemáticamente la interpretación indica dependencia. Este planteamiento nos llevó a considerar que es necesario identificar si en la aplicación de una serie de medidas fitosanitarias, en vez de basarse en la independencia, debe basarse en la dependencia y tratar de establecer cómo afecta la varianza entre ellas, incluso la covarianza. Aunque no fue factible proseguir en el análisis estadístico, resulta interesante hacer mención del tipo de reflexiones que se realizaron en este grupo de análisis, con la intención de que este tema se pueda retomar e investigar con mayor profundidad en un futuro.

Por lo que la búsqueda de nuevas alternativas, tomando en cuenta la eficacia y el impacto de las diferentes opciones en la reducción del riesgo a un nivel aceptable se deben evaluar considerando los siguientes factores: La eficacia biológica, costo/beneficio de la implementación, impacto en las regulaciones existentes, impacto comercial, impacto social, consideraciones de la política fitosanitaria, tiempo para implementar una nueva regulación, eficacia contra otras plagas cuarentenarias, impacto ambiental. Por ejemplo, en una comparativa el costo en la aplicación de irradiación se incrementa de 2 a 14 veces con respecto de la aplicación de Bromuro de metilo. El almacenamiento en atmosfera controlada incrementa el costo en un rango de 174 a 256 % sobre el costo de aplicación de bromuro de metilo. El uso de fosfina fue 108 y 117 % arriba del costo de aplicación de bromuro de metilo (Aegerter y Folwell, 2001).

El problema con el paradigma de probit 9 ha sido abordado en varios documentos (Mangan *et al.*, 1994, Líquido *et al.*, 1995, Líquido *et al.*, 1996). Así mismo, se han propuesto algunas alternativas para expresar la seguridad cuarentenaria bajo otras perspectivas, como la aplicación de tratamientos combinados y el diseño de enfoques de sistemas (Mangan y Sharp, 1997; USDA, 2002, Sequeira, 2006). Sin embargo, la meta del desarrollo de un modelo conceptual para el manejo del riesgo fitosanitario aún no se ha logrado.

2.1.3 Enfoques de sistemas

El modelo se ha retomado de la práctica que se ha seguido en la industria aeroespacial, NASA, por más de treinta años, basado en la ciencia y práctica de “Sistemas de Ingeniería”. Éste se define como la disciplina del desarrollo de sistemas complejos en la ingeniería; en el empleo de este concepto como medida de protección fitosanitaria, se integran varios factores biológicos y físicos con procedimientos operacionales para acumulativamente proveer seguridad cuarentenaria. El reto es proveer confianza basada en su eficiencia, es decir, los enfoques de sistemas, están específicamente diseñados para controlar plagas y asegurar que un producto vegetal o subproducto reúna los estándares fitosanitarios especificados por el país importador (National Plant Board, 2002).

El concepto de enfoque de sistemas reúne los lineamientos cuarentenarios desarrollados a principios de los 1990’s como una alternativa a un solo tratamiento cuarentenario postcosecha. Se han desarrollado métodos computacionales que determinan el número esperado de plagas sobrevivientes bajo diferentes combinaciones de tratamientos pre-cosecha y post-cosecha, los cuales pueden ser usados con el enfoque de sistemas (Mangan, 2008).

Así, este concepto se consolidó en el ámbito fitosanitario a través de la publicación de la norma Internacional para la aplicación de medidas sanitarias y fitosanitarias No. 14. Titulada enfoque de sistemas. La definición provista por la Convención Internacional de

Protección Fitosanitaria es la Integración de diferentes medidas de manejo del riesgo de las cuales, al menos dos actúan independientemente, logrando como efecto acumulativo el nivel adecuado de protección contra las plagas reglamentadas (FAO, 2002).

El enfoque de sistema no requiere la ausencia de la plaga cuarentenaria de las áreas de producción; en vez de esto, múltiples medidas en diferentes etapas durante la producción y embarque de los productos agrícolas son empleadas para disminuir la probabilidad de exportar productos infestados, combinando medidas de control en campo y postcosecha se mejora la seguridad cuarentenaria, reduciendo la necesidad de tratamientos post cosecha dañinos (Heather y Corcoran, 1992).

Aquí el punto clave es que al menos dos de las medidas seleccionadas deben tener independencia y efecto aditivo en la reducción de introducción de plagas. Cualquier otra medida puede ser interdependiente, es decir el éxito de una medida es influenciado por el éxito o fracaso de otra medida, aún de que sea independiente (Liquido *et al.*, 1995).

Entonces la evaluación práctica de ensamblar secuencias de elementos de mitigación en un enfoque de sistemas está en función de la probabilidad de protección provista, y puede ser cuantificada, como un producto de la secuencia de medidas de mitigación del riesgo determinadas. En este sentido, Estados Unidos a través de APHIS – PPQ, ha usado como alternativa de expresión de riesgos basados en modelos cuantitativos usualmente utilizando análisis de escenarios probabilísticos y simulación estocástica (Montecarlo) como en el caso de Aguacate Hass de México, Clementinas de España, Frutos de cítricos asintomáticos procedentes de áreas donde el cáncer de los cítricos se encuentra presente (USDA, 2002a, USDA, 2002b, USDA, 2003b). En estos casos, las expresiones cuantitativas no fueron de riesgo, *sensu stricto*, pero preliminarmente enfoca cuál es la probabilidad de introducción o la probabilidad de ocurrencia y no expresa claramente cuál es la probabilidad de establecimiento.

Los componentes del enfoque de sistemas pueden variar ampliamente pero comúnmente incluye numerosas medidas de mitigación a través de la cadena productiva tales como: monitoreo de plagas, trampeo y muestreo, tratamiento en campo, prácticas culturales, variedades resistentes, medidas postcosecha, periodos limitados para la cosecha, definición de ventanas de venta, restricción en la cosecha del producto basada en su nivel de maduración. El uso de enfoques de sistemas han resultado en programas exitosos, aunque ha sido difícil expresar el nivel de efectividad de los mismos (Líquido *et al.*, 1995).

La combinación de tratamientos pre cosecha para el control de plagas y las medidas aplicadas en postcosecha en empacadoras a través de la selección y corte, como en los enfoques de sistemas en general, requiere un análisis componente por componente relacionado al costo, eficacia y análisis de riesgo y probablemente siempre sean específicas para plagas, productos agrícolas, la ecología del área de producción y los requerimientos del país importador (Mangan, 2008).

2.2 Análisis del Marco Regulatorio para la Importación de Semilla

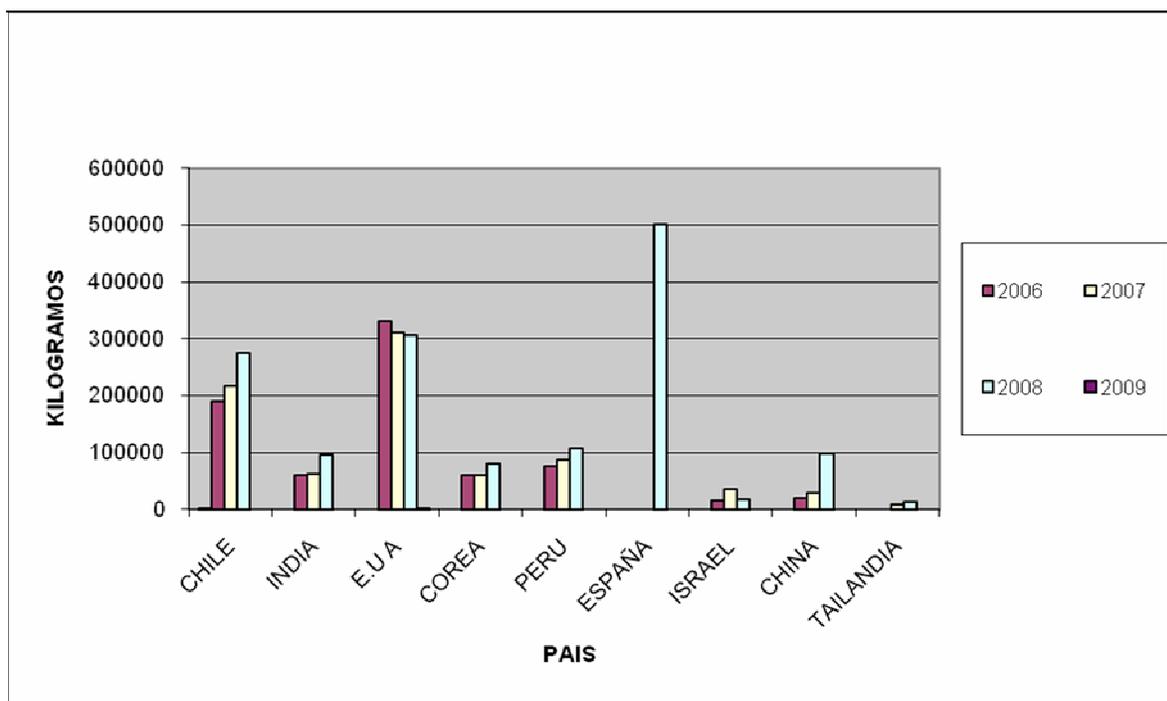
2.2.1 Análisis del Marco Normativo para la Importación de Semilla a México

México regula la importación de material propagativo en virtud de la autoridad de la Ley Federal de Sanidad Vegetal. Los requisitos fitosanitarios para la importación de material vegetal propagativo, incluidas las semillas con propósitos de uso agrícola, están basados en la realización de un análisis de riesgo de plagas, considerando las plagas cuarentenarias asociadas a la vía de importación, presentes en el país de origen y en el de procedencia, en caso de reexportaciones, lo anterior, con base en lo establecido por la NOM-006-FITO-1995: Requisitos mínimos que deberán cumplir los vegetales, sus productos y subproductos que se pretendan importar cuando éstos no estén establecidos en una norma oficial específica (DOF, 1995). Este esquema permite evaluar el riesgo que representan las plagas cuarentenarias asociadas a un producto en el origen especificado.

En este sentido y con el objetivo de salvaguardar la sanidad vegetal, la regulación fitosanitaria referente a semilla para siembra se establece en el proyecto de Norma Oficial Mexicana “PROY-NOM-029-FITO-2002, requisitos y especificaciones fitosanitarias aplicables a semillas para siembra”, mismo que da a conocer los requisitos fitosanitarios para 748 productos correspondientes a 36 países (DOF, 1995).

En esta propuesta regulatoria, se plantean como principales medidas fitosanitarias: a) la aplicación de un solo tratamiento fitosanitario poscosecha b) la certificación fitosanitaria c) inspección y toma de muestra en el punto de entrada al país. Aunque aún la aplicación de un tratamiento preventivo, generalmente a base de un producto químico, es el método más común de control aplicado a plagas cuarentenarias asociadas a semillas, existe un amplio rango de alternativas para prevenir la introducción de este tipo de plagas (DOF, 1995).

Debido a que este proyecto de Norma, no se ha logrado consolidar en una Norma definitiva, cuando existe el interés de importar material vegetal propagativo de un determinado producto, el interesado puede solicitar los requisitos fitosanitarios a la DGSV, y en base al artículo 24 de la Ley Federal de Sanidad Vegetal, si esta Dependencia cuenta con dichos requisitos fitosanitarios, emitirá al interesado una hoja de requisito fitosanitario (tramite SENASICA-02-22), en la cual se encuentran establecidas las medidas fitosanitarias aplicables para su importación. En la página Web del SENASICA (<http://senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/reqfito/>) se cuenta con un “Sistema de Consulta de Requisitos Fitosanitarios en línea”, donde se pueden consultar los requisitos fitosanitarios establecidos por la Secretaría para la importación de vegetales, sus productos y subproductos. En la gráfica 1, se muestra un comparativo de las cantidades de semillas de sandía solicitadas para su importación a la DGSV, de acuerdo a su origen.



Gráfica 1. Comparativo de cantidades de semilla de sandía solicitadas para importación en Kg.

2.2.2 Análisis del procedimiento de importación de semilla a Estados Unidos

En el Acta de Protección Vegetal Capítulo 7, parte 361 se establece los requisitos fitosanitarios para la importación de la semilla botánica a Estados Unidos, incluyendo los lotes pequeños que tienen como uso final la experimentación (mejoramiento genético). En esta regulación se enlistan los cultivos para los cuales se permite la importación divididos en cultivos agrícolas porque se producen directamente en el campo y cultivos vegetales porque se cultivan en invernaderos (CFR, 2008).

El procedimiento de importación está sujeto a otras cuarentenas específicas, en otras palabras si existen plagas de importancia cuarentenaria se manejan en otras cuarentenas de particular interés donde se establece una cuarentena con requisitos específicos.

Para realizar la importación se requiere solicitar un permiso. Todos los lotes de semilla deberán venir acompañados de una declaratoria estableciendo el tipo de semilla (de acuerdo a la lista de especies que se citan en la lista de semillas agrícolas y hortalizas, variedad, y origen de cada lote o muestra y el uso para el cual la semilla está siendo importada). También se debe indicar si la semilla ha sido tratada, indicando el nombre del producto o proceso usado en el tratamiento. Todos los lotes de semilla deberán ser muestreados e inspeccionados en el primer punto de entrada y permanecer ahí hasta que sea liberado por un inspector del Servicio de Inspección de Sanidad Agropecuaria del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (APHIS-USDA) (CFR, 2008).

Existen algunas excepciones para la toma de la muestra, éstas aplican cuando se importa una muestra que será procesada, las semillas en tránsito, las semillas que no exceden cierta cantidad y se utilizará para incrementar la semilla (no con intenciones de experimentación o mejoramiento) y retornos (semillas que fueron producidas en Estados Unidos y se ingresan nuevamente). Las muestras son inspeccionadas con la intención de detectar la presencia de semillas de malezas que se encuentran cuarentenadas para Estados Unidos. Si durante la inspección no se encuentra ningún

contaminante el cargamento es liberado, pero si se detecta algún contaminante la muestra se envía a un laboratorio para su diagnóstico (CFR, 2008).

2.3 Análisis de riesgo y puntos críticos de control (HACCP, por sus siglas en inglés)

El análisis de riesgo y puntos críticos de control (HACCP, por sus siglas en inglés), es el lineamiento mundialmente reconocido para el manejo del riesgo en procesos. Este es un proceso formal para identificar riesgos, nominar puntos críticos de control de riesgo (PCC) y establecer un proceso de verificación usado para manejar los riesgos consistentemente en un ciclo de producción (McMahon, 2007).

Como una base estructural para una forma estratégica de pensar, HACCP enfoca la atención de la planeación en PCC, en donde se puede evitar o eliminar los riesgos documentados e identificados y los métodos usados para remover dichos riesgos. Los planes HACCP bien concebidos, le permiten a las personas encargadas de tomar las decisiones el poder analizar los riesgos de propagación de especies no deseadas (CONABIO, 2009).

En el Cuadro 1 se muestra una comparativa de los pasos del HACCP aplicado en el área de producción de alimentos (NACMCF, 1992; Sequeira *et al.*, 2002; Sequeira *et al.*, 2006) y la modificación hecha para ajustarse al uso de recursos naturales (USFWS-NCTC, 2004).

Cuadro 1. Componentes del sistema HACCP

Pilsbury	USFWS-NCTC
Conducción del análisis de riesgo	Descripción de la actividad
Determinar puntos críticos de control	Identificación de riesgos potenciales
Establecimiento de límites críticos	Diagrama de la secuencia de acciones en el paso 1
Establecimiento de procedimientos de monitoreo	Análisis de los riesgos identificados en el paso 2
Establecimiento de acciones correctivas	Finalización del plan HACCP
Establecimiento de procedimientos de verificación	
Establecimiento de procedimientos de documentación	

2.3.1 Propuesta Fitosanitaria de Análisis de Riesgo y Puntos Críticos de Control (P – HACCP, por sus siglas en inglés)

La búsqueda de una nueva alternativa nos lleva a retomar las propias prácticas que la industria tiene implementadas bajo el concepto “Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP)”, como una alternativa para la aplicación de medidas sanitarias y fitosanitarias, P–HACCP mejoraría el manejo de riesgo fitosanitario y la facilitación del comercio (Sequeira *et al*, 2006).

El concepto HACCP se ha enfocado a la bioseguridad, donde se interpreta como un programa específicamente diseñado para la industria viverista en Australia, para apoyar a los productores en la evaluación de sus actuales y futuros riesgos asociados con insectos, patógenos y malezas, que puedan impactar adversamente en sus procesos de comercialización de productos y guiar la implementación de estrategias de manejo de riesgos en puntos críticos de control, estableciendo estrictos procesos cuarentenarios internos para el material vegetal importado y exportado. El programa

valida muchas de las mejores prácticas de manejo empleadas bajo el Sistema de Acreditación de Industria del Viverismo en Australia (McMahon, 2007).

En la acuicultura el HACCP se ha utilizado para evitar la dispersión de malezas a través del uso de maquinaria en diferentes cuerpos de agua. Y para evitar la contaminación de la cría de peces sebo para la pesca (USFWS-NCTC, 2004).

En este documento se examina un enfoque para evaluar las medidas de mitigación de riesgo para prevenir la introducción de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* asociadas a la semilla de sandía. La propuesta considera la modificación del enfoque del análisis de amenazas con base en el análisis de los riesgos fitosanitarios y un sistema de puntos críticos de control adaptado a las medidas de seguridad cuarentenaria, en cada uno de los componentes de la cadena de comercialización de semilla de sandía.

En la elección de un set de medidas de mitigación bajo el modelo P-HACCP, no solo implica un excelente conocimiento del grado de efectividad y el impacto que tienen en la disminución del riesgo del establecimiento del patógeno, también el impacto económico que conlleva la implementación de las medidas con respecto al costo.

En este sentido esta herramienta de planificación ofrece identificar riesgos, documentarlos y evaluarlos. Sin embargo sin un método de planeación este enfoque aplicado al área fitosanitaria podría resultar subjetivo e inconsistente. Una planeación efectiva brinda consistencia en la solución del manejo fitosanitario. El proceso de planeación permite identificar necesidades de investigación, así como los mejores procedimientos necesarios para evitar la dispersión de una plaga cuarentenaria a través del comercio internacional.

Sequeira *et al* (2002) ha ilustrado el enfoque de las vías de introducción de plagas debido al movimiento de mercancías y el establecimiento de la plaga como una serie de componentes. La probabilidad de la entrada y establecimiento de la plaga incluyen factores como el tamaño del embarque, probabilidades de que la semilla se encuentre

infectada o infestada, la plaga pueda sobrevivir a la cosecha de los productos vegetales, a la selección de fruta en la cosecha, al tratamiento poscosecha, mortalidad durante el empaque (corte de fruta) y embarques, después llegar a un hábitad adecuado y con hospederos susceptibles bajo condiciones favorables, nótese que los componentes y sus probabilidades deben tener unidades comunes y ser independientes y entonces precauciones contra métodos “simplemente combinados” dentro de un modelo (como el sugerido por Mangan y Sharp 1994). La distribución de la mortalidad para el mismo tratamiento para cítricos seguido de diferentes distribuciones en Mangan *et al.*, 1998 indicaron que aún de que se contara con información de los tratamientos poscosecha podían simplemente ser combinados.

El análisis del modelo P –HACCP, entonces, nos llevó a reflexionar el papel que juega la interacción entre medidas fitosanitarias, con respecto de la independencia que debe mantener una medida fitosanitaria como lo establece la definición del enfoque de sistemas. Estadísticamente podría decirse que la interacción entre la aplicación de una medida fitosanitaria y otra, le confiere dependencia entre dichas medidas, como se comentó anteriormente.

Este planteamiento, nos lleva a considerar la posibilidad de explorar el uso de un sistema en el que comprobadamente exista interacción y dependencia para lograr el nivel adecuado de seguridad cuarentenaria; un modelo que integre bajo otra perspectiva las medidas fitosanitarias. Por lo que es necesario estudiar el concepto de manejo de riesgo como un proceso evolutivo que tome probit 9 como punto de partida y tienda a desarrollar expresiones conceptuales comprensivas de los sistemas cuarentenarios o procesos de manejo regulatorio de forma tal que resulten en sistemas transparentes y respetables.

Los modelos permiten estudios que serían imposibles con el sistema real, permiten realizar estudios de sistemas que hasta ahora no existen, en corto tiempo, y permite la repetición de un evento, que ocurriría solamente una vez en un sistema real y la estimación de la probabilidad de que este evento ocurra. Un modelo es una forma muy

útil de resumir el conocimiento actual de un sistema. La elaboración de un modelo deja ver las deficiencias de la información sobre un sistema. Por medio de un análisis de sensibilidad es posible identificar las variables, los parámetros, y las funciones más importantes del modelo. Si el modelo es una fiel representación del sistema, éste podría probar la sensibilidad del sistema mismo (Arneson, 1991).

3. OBJETIVOS

Caracterizar el sistema de comercialización de semilla de sandía de importación, usando la aplicación P – HACCP, para identificar Puntos Críticos de Control que eviten la introducción y dispersión del patógeno de alto riesgo *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac), lo cual será usado para informar las políticas fitosanitarias en relación al comercio de semilla de sandía y fundamentar decisiones al respecto por parte de las autoridades en una Organización Nacional de Protección Fitosanitaria.

Desarrollar un modelo de simulación probabilística, para evaluar cuantitativamente las medidas de mitigación de riesgo implementadas en los puntos críticos de control, permitiendo interpretar la probabilidad de introducción y dispersión en términos de años hasta que ≥ 1 semilla infectada con *A. avenae* subsp. *citrulli* escape del sistema, y se establezca en México (país importador).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Análisis del P- HACCP para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) asociada con semilla de sandía

4.1.1 Descripción del sistema de comercialización de semilla de sandía

Se describen los pasos que corresponden al sistema de producción de semilla de sandía en los cuales se consideró una acción fitosanitaria, por lo tanto no se cubrieron todas las operaciones de la producción de semilla. Esta actividad se describió considerando el enfoque de la producción de semilla con fines de mejoramiento a nivel experimental y posteriormente se complementó con la producción de lotes fundación para la producción de semillas en forma comercial.

En un diagrama de flujo se indica la secuencia de actividades involucradas en el sistema de comercialización de la semilla de sandía, y en éste se incluyeron las principales actividades en las que se presentan, por un lado la posibilidad de la infección de la semilla por la bacteria y por otro las que pueden representar una medida de mitigación de riesgo.

4.1.2 Identificación de riesgos fitosanitarios

Se identifican los riesgos fitosanitarios que pueden ser diseminados en forma no intencional a una nueva área, es decir, los riesgos que deben de ser eliminados de vías específicas. En este caso en particular se identificó como riesgo la probabilidad de introducción y dispersión de la bacteria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, a través de la importación de semilla de sandía a México.

4.1.3 Selección de puntos críticos de control

Para cada riesgo significativo identificado debe haber uno o más puntos críticos de control (PCC) donde se pueda controlar el riesgo. Los PCC son puntos en la actividad, donde acciones de control especificadas por P - HACCP son usadas para controlar aquellos riesgos clasificados como importantes. Muchos puntos no identificados como PCC en el diagrama de flujo pueden resultar ser puntos críticos de control valiosos en donde medidas de prevención rutinarias ayudarían a alcanzar los objetivos generales. Sin embargo, la planeación en el sistema P -HACCP puede perder el enfoque si se identifican innecesariamente muchos puntos como PCC. Únicamente los mejores puntos para controlar riesgos importantes se consideran PCC. La diferenciación entre PCC y puntos de control varía de actividad a actividad y depende de la operación. Al designar PCC, se debe considerar todas las leyes estatales que se apliquen y que puedan dictar la identificación de un PCC. Por ejemplo, en algunos estados es ilegal transportar ciertas especies por vía terrestre.

Se definieron los puntos críticos de control (PCC) utilizando un árbol de decisión como el que se muestra en la Figura 1, y posteriormente fueron rectificadas mediante el uso del análisis de sensibilidad. Se consideró si en este paso se mitiga el riesgo, y si es el mejor lugar para la mitigación de acuerdo a la asociación biológica de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* con la semilla. El diagrama de flujo del sistema de comercialización de la semilla de sandía sirvió de apoyo para el análisis de los componentes involucrados en éste y justificar aceptar o rechazar los PCC.

Las medidas de control son acciones que pueden ser usadas para prevenir o eliminar un riesgo o reducirlo a un nivel aceptable. Un riesgo debe ser controlado si es razonable que éste pueda ocurrir, y si al no controlarlo adecuadamente, resultará en un riesgo inaceptable de propagación de especies indeseables a nuevos hábitats.

La forma en la que hasta el momento se ha evaluado la efectividad del sistema es haciendo uso del monitoreo de los puntos críticos de control, esto permite detectar

fallas en el sistema y aplicar una medida correctiva. En el caso de recursos naturales las acciones correctivas se ponen en práctica posterior a la detección de la falla en el sistema. Situación que comprometería la seguridad cuarentenaria, aplicado bajo este sistema de evaluación.

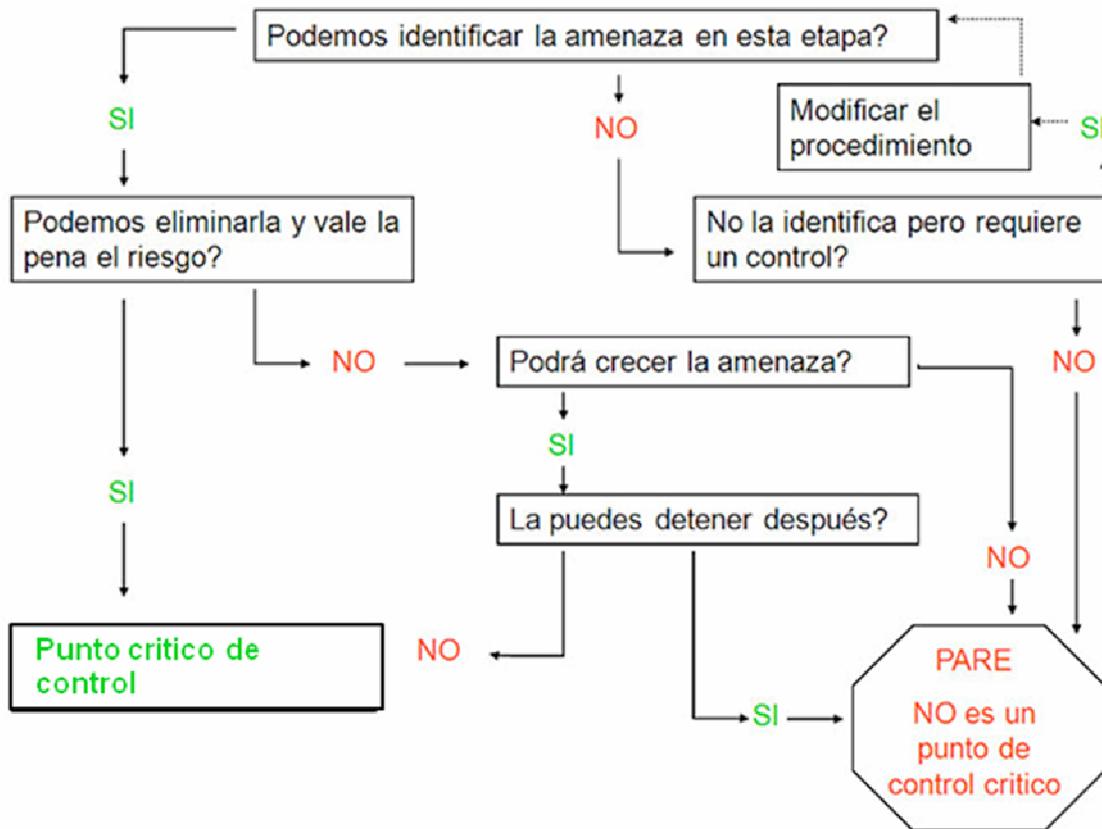


Figura 1. Diagrama de Decisión para Identificar Puntos de Control Críticos

4.2 Modelo cuantitativo de evaluación de los puntos críticos de control

Como una aportación para la evaluación analítica y validación del modelo propuesto de P – HACCP en el sistema de comercialización de semilla de sandía y su asociación con el patógeno de alto riesgo *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*, se desarrolló un modelo probabilístico a través del cual se evaluó la efectividad de la propuesta fitosanitaria-

HACCP, basado en la experiencia en el desarrollo de modelos cuantitativos de los investigadores Ron Sequeira y Glen Fowler, analistas de riesgo del Centro de Ciencia y Tecnología de Protección Fitosanitaria CPHST, del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA-APHIS-PPQ). Para ello se realizó una estancia de investigación en las oficinas de CPHST en Raleigh, Carolina del Norte.

La simulación probabilística está basada en las distribuciones probabilísticas binomial y pert como se muestra en el Cuadro 2 y con base en la cual se asignaron los valores de acuerdo a las características de la información relacionada con los puntos críticos de control adaptado de Auclair *et al.*(2005).

Cuadro 2. Distribuciones empleadas en el modelo de simulación probabilística.

Distribución	Parámetros	Fórmula en @Risk
Binomial	n, p	= riskbinomial(n,p)
Pert	mínimo, más probable, máximo	= riskpert (min, mas probable, max)

Después de cuantificar los puntos críticos de control, se construyó un modelo estocástico usando Excel (Microsoft Corporation, 2007) y @Risk 4.52 software profesional para modelar probabilidades (Palisade Corporation, 2003). En el modelo de simulación se utilizó el muestreo por hipercubo latino en un arreglo aleatorio de uno y 10,000 interacciones (Auclair *et al.*, 2005).

El modelo de simulación probabilística permite interpretar la probabilidad de introducción y establecimiento en términos de años hasta que ≥ 1 semilla infectada escape del sistema, es decir que una semilla de segunda generación, infectada con *A. avenae* subsp *citrulli* germine en el país importador. Este valor corresponde al producto matemático de la distribución representando los componentes del sistema de comercialización de semilla de sandía, considerados puntos críticos de control en el manejo del riesgo del patógeno. Esta forma de interpretación permite tener una mejor idea del nivel de seguridad cuarentenario que se logra con respecto de la forma

tradicional de basarse en el nivel de mortalidad que logra un solo tratamiento o una secuencia de medidas fitosanitarias mediante un enfoque de sistemas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- Análisis de riesgo fitosanitario y puntos críticos de control (P-HACCP) en el sistema de comercialización de semilla de sandía infectada con *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac)

5.1.1 Descripción del sistema de comercialización de semilla de sandía

La revisión sobre el proceso de producción de semilla de sandía, se basó en la información proporcionada por el Doctor Wehner, del Departamento de Ciencias Hortícolas, de la Universidad Estatal de Carolina del Norte, quien es el líder del programa de mejoramiento genético de esta especie y otras cucurbitáceas en la estación experimental de Cultivos Hortícolas en Clinton, Carolina del Norte.

Con base en la información detallada sobre la producción de semilla, se conformó el diagrama de flujo que describe la secuencia de actividades que permite posteriormente realizar la identificación los puntos críticos de control, como parte fundamental del sistema P-HACCP.

En este sentido la opinión de los expertos y las visitas al campo, resultaron muy valiosas. Por lo que también se visitó la estación de investigación de cultivos hortícolas en Clinton, Carolina del Norte. La estación desarrolla una gran variedad de programas para apoyar la industria vegetal de Carolina del Norte. Uno de sus objetivos es ayudar a los productores a resolver problemas en la producción a corto y mediano plazo, identificar y evaluar alternativas en producción y mantener sustentabilidad. Uno de los programas de investigación es dirigido a sandía.

El diagrama de flujo de las actividades para la producción de semilla de sandía fue validado por la Doctora Ellington, asistente de campo del Doctor Wehner, de acuerdo al proceso de producción de semilla con fines de mejoramiento genético, para la producción de frutos sin semilla, variedades resistentes, manejo fitosanitario, etc. En el

sistema de producción el aspecto fitosanitario es considerado desde el momento de la elección de la semilla, para el caso particular de la bacteria, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, se requiere que la semilla cuente con un certificado fitosanitario expedido por las autoridades fitosanitarias del país donde se produce la semilla que respalde la compañía que la comercializa, que se encuentra libre del patógeno, ya que la enfermedad hace algunos años fue un problema muy importante en Estados Unidos, aunque en la actualidad ha disminuido.

En la estación Clinton la producción de la semilla, no cuenta con un sistema HACCP, debido a que sus propósitos son de investigación, sin embargo de acuerdo a su experiencia consideraron factible la implementación del P-HACCP, como un nuevo concepto en el manejo fitosanitario. La información obtenida se sistematizó conforme se presenta en la Figura 2.

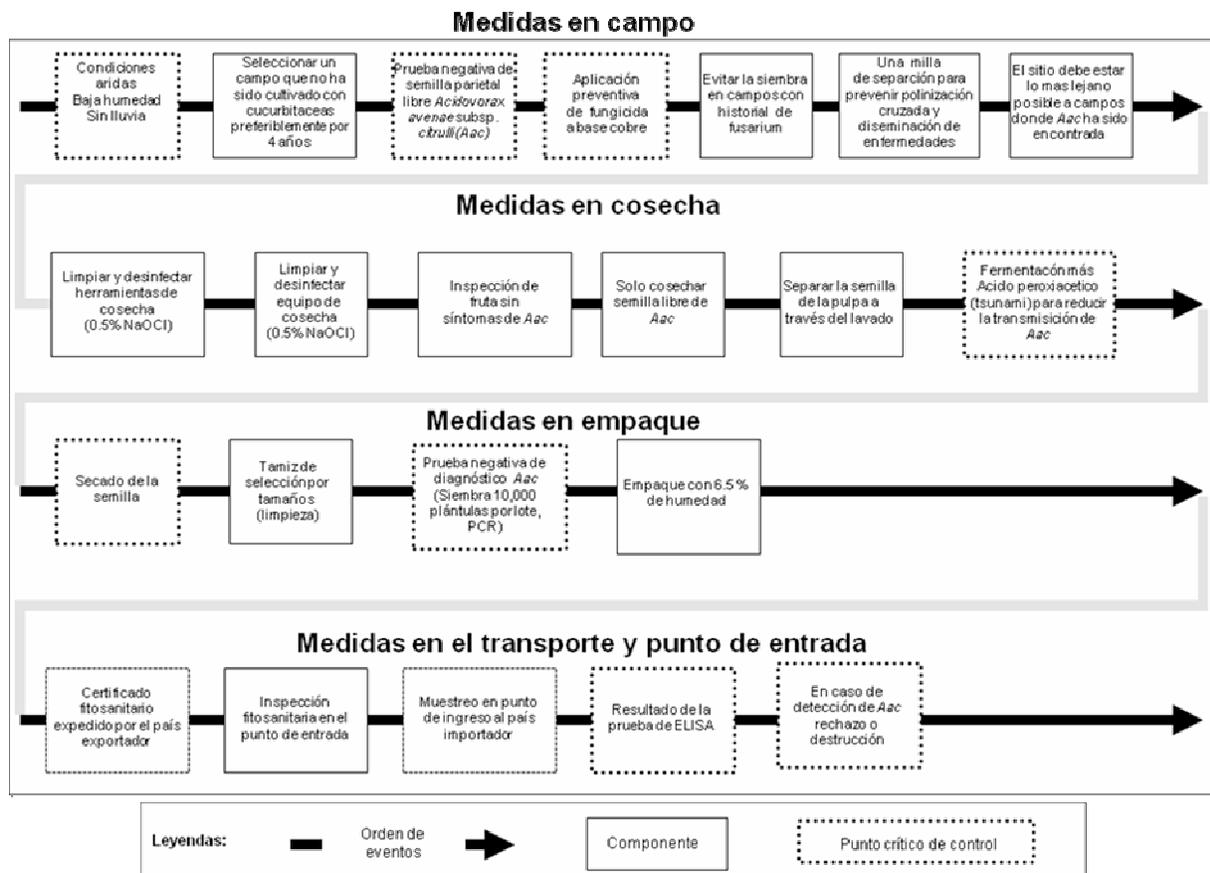


Figura 2. Diagrama de flujo de los componentes en el sistema de comercialización de semilla de sandía.

5.1.2 Riesgos fitosanitarios identificados

El riesgo de introducción y establecimiento de este patógeno está basado en la evaluación de riesgo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) asociado a la importación de semilla de sandía realizada en el capítulo I de este documento. A través de dicha evaluación se concluyó un alto riesgo, de acuerdo a la calificación de los elementos de riesgo en la siguiente forma, el hábitat en México es favorable ya que podría atacar y sobrevivir en sandía en 2 o 3 zonas climáticas en México similares a las zonas donde el patógeno está presente.

En cuanto al rango de hospedantes *Aac*, ataca múltiples especies de plantas dentro de la familia de las cucurbitáceas, algunas de estas especies se encuentran en México, como la sandía, melón, pepino y calabaza. Observa un alto potencial de dispersión ya que logra reproducirse en un periodo de 2 días en promedio, y en la semilla y plántulas, así como su posible dispersión a través de sistemas de irrigación, lluvia e incluso vientos fuertes. El impacto económico de *A. avenae* subsp. *citrulli* se relaciona con las pérdidas en producción del orden de 100,000 dólares por productor en Estados Unidos, además de afectar el mercado de la semilla de sandía en general. El impacto ambiental de *A. avenae* subsp. *citrulli* por un lado puede ocasionar disrupciones importantes en hábitats críticos en México donde se reportan alrededor de 207 especies de cucurbitáceas y que incluyen bosque tropical, selva baja caducifolia, matorral xerófilo con cactáceas columnares, bosque de pino-encino, ruderal, donde las condiciones ecológicas podrían ser alteradas tras el empleo de un programa de manejo que puede implicar el uso del control químico.

De acuerdo al análisis geoespacial NAPPFAST, México representa un hábitat favorable para la bacteria de acuerdo a la disponibilidad de material hospedante y condiciones climáticas. Las zonas con mayor potencial de establecimiento de la plaga en México, con 30 y 45 días acumulados de condiciones favorables para la infección de la bacteria, se ubican en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y la parte sur de Veracruz. Las zonas con menor potencial de establecimiento donde se acumulan entre 5-10 días favorables se ubican los estados de Sinaloa, Durango, Zacatecas, México, Hidalgo, Querétaro, Michoacán, Guanajuato, Tlaxcala y Puebla.

Dado el alto potencial de riesgo de la plaga la adopción de medidas fitosanitarias específicas es ampliamente recomendada. La inspección en el puerto de entrada se considera insuficiente para proveer seguridad fitosanitaria. La certificación de las medidas fitosanitarias aplicadas durante la producción de la semilla de sandía, incluyendo el tratamiento a la semilla con ácido peroxiacético, puede considerarse en la mitigación de riesgo.

5.1.3 Puntos críticos de control identificados en el sistema de producción de semilla de sandía

Las medidas fitosanitarias tienen que ser descritas en términos de su eficacia. Éstas se caracterizan por observaciones biológicas o experimentación de lo que ocurre con *A. avenae* subsp. *citrulli* cuando se aplica una medida fitosanitaria documentada. Ejemplos de medidas preventivas para aplicaciones fitosanitarias son los controles a nivel de campo que reducen la oportunidad de utilizar semilla infectada, la aplicación de tratamientos de desinfección a la semilla, etc.

Los puntos críticos de control (PCC) no necesariamente incluyen todos los puntos identificados donde existe una asociación entre una plaga cuarentenaria y la mercancía de preocupación. La Figura 2 muestra las posibles medidas aplicadas a los componentes de un sistema de comercialización de semilla de sandía. En éste se destacan los componentes que pueden constituir un PCC.

La evaluación del modelo integral de medidas de mitigación de riesgo se basó en 15 componentes del sistema de comercialización de la semilla de sandía, con énfasis en 7 puntos críticos de control a lo largo de 5 vías, en las que puede ocurrir la infección o la diseminación del patógeno.

Las vías y componentes evaluados corresponden a los siguientes: Vía 1. Infección natural, componente 1. Selección del sitio de producción, componente 2. Cantidad de semilla, componente 3. Semillas de sandía infectadas con *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (*Aac*) bajo condiciones naturales, componente 4. Supervivencia de *Aac* a la aplicación de un tratamiento de desinfección; Vía 2. Infección a través de maquinaria, componente 5. Diseminación del patógeno a través de la maquinaria; Vía 3. Infección a través de la segunda generación, componente 6. Semillas infectadas que escapan de la detección, componente 7. Semilla por fruto y capacidad de germinación; Vía 4. Infección a través de la exportación, componente 8. Supervivencia de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, componente 9. Sensibilidad de detección de *Acidovorax avenae*

subsp. *citrulli* a través de pruebas de diagnóstico como PCR y de una prueba negativa para *Aac* mediante la siembra directa en condiciones controladas, componente 10. Sobrevivencia de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* al tratamiento de agua caliente, componente 11. Sobrevivencia de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* al sellado del empaque, componente 12. Certificación Fitosanitaria por parte del país exportador; Vía 5. Probabilidad de importación, componente 13. Cantidad de semilla importada por país, componente 14. Inspección y toma de muestra en el punto de entrada, componente 15. Sensibilidad a la detección de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* a la prueba de ELISA.

Los 7 componentes en los que se consideró el mejor lugar para la mitigación de riesgo de acuerdo a la asociación biológica de *Aac* con la semilla de sandía se describen a continuación, según la vía a la que corresponde el componente considerado como punto crítico de control.

Vía 1. Infección natural

Componente 1: Selección del sitio de producción / Punto crítico de control (PCC)

Las zonas de producción de la semilla básica, se establecen en regiones donde se sabe que *A. avenae* subsp. *citrulli* (*Aac*) no ocurre, principalmente por que cuenta con climas fríos y secos, y corresponde a una región semiárida donde estas condiciones permiten el escape de la transmisión del patógeno a la semilla. Asimismo, la producción de semilla se realiza en áreas aisladas, alejadas de otros sitios productores de fruto de sandía u otros posibles hospederos como cucurbitáceas. Adicionalmente estos campos son protegidos con mallas antiafidos para evitar la incidencia de otros patógenos transmitidos por este tipo de vectores (Kucharek y Roberts, 2005). Las acciones para mitigar el riesgo de la infección de *Aac* en semillas de sandía, en este componente, lo convierten en un punto crítico de control, ya que si estas acciones no son realizadas en este componente, ya no pueden ser efectuadas en el siguiente.



Figura 3. Campo productor de semilla de sandía en Ica, Perú.

Componente 4. Sobrevivencia de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* a la aplicación de un tratamiento de desinfección a la semilla / Punto crítico de control (PCC).

En la aplicación del tratamiento se debe tomar en cuenta dónde está la bacteria en la superficie o en el embrión de la semilla. Para el caso de *Aac* las empresas productoras de semilla han reemplazado la utilización de productos a base de cobre porque no erradica al patógeno, ya que no penetra el embrión de la semilla. El tratamiento a la semilla consiste en la fermentación con Tsunami 1.25%, cuyo ingrediente activo es ácido peroxiacético (AP), el cual a bajas concentraciones tiene una actividad antimicrobial y ha sido evaluado como uno de los desinfectantes que pueden erradicar eficazmente a *Aac*, así como otras enfermedades que se transmiten por semilla en sandía; éste puede ser aplicado con seguridad a semillas cosechadas de sandía sin afectar la calidad de la semilla y la capacidad de germinación, como ocurre con el tratamiento hidrotérmico (Block, 2001). El protocolo de tratamiento más efectivo

aplicado a la semilla en Estados Unidos correspondió a 30 minutos con ácido peroxiacético a 1600 µg/ml, seguido por el secado para disminuir la humedad de semilla en un horno secador a 40°C (Hopkins *et al.*, 2003). Considerando que la prevención de la transmisión de *Aac* a través de la semilla es la forma más efectiva de control, y la aplicación del tratamiento limpia tanto la superficie de la semilla como la apertura de la semilla, posterior a la germinación, éste se convierte en un punto crítico, dado que la mitigación del riesgo en la prevención de la infección, no se logrará en el siguiente componente.

Vía 3. Infección a través de la segunda generación

Componente 6. Semillas infectadas que escapan de la detección/ punto crítico de control.

La selección de la fruta de la cual se va a extraer la semilla, debe realizarse a través de una inspección de los síntomas típicos de *Aac* en frutos y follaje, los inspectores deben estar preparados para reconocer las variaciones en sintomatología. Con base en lo anterior no se deben cosechar semillas de campos con sospecha de síntomas similares a los de *Aac*, hasta que se confirme que no se trata de este patógeno (Figura 4). Ésto puede consistir en pruebas serológicas disponibles seguidos el aislamiento del patógeno y confirmando con una prueba de laboratorio más precisa.



Figura 4. Síntomas en fruto y follaje de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.

Vía 4. Infección a través de la exportación

Componente 8. Sobrevivencia de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* al procedimiento de secado de la semilla de sandía / Punto crítico de control

El secado debe ser rápido y se hace con una máquina especial para lograr entre el 6 y 8 % de humedad. Las semillas se deben exponer al secado en capas delgadas, las capas gruesas propician un secado deficiente. Así mismo un secado lento favorece la incidencia de la bacteria, por lo que se consideró un punto crítico de control.

Componente 9. Sensibilidad de detección de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* a través de pruebas de diagnóstico como la técnica de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y de una prueba negativa para *Aac* mediante la siembra directa en condiciones controladas/Punto crítico de control.

No hay 100% de desinfección en la semilla con la aplicación del tratamiento con tsunami. Prueba negativa para *Aac* mediante la siembra de un mínimo de 10,000 plántulas por lote en invernadero bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura para la expresión de síntomas de *Aac*, por tres semanas para comprobar que está libre de la bacteria (Gitaitis y Walcott, 2007). Considerando el potencial de devastación de la bacteria, un umbral alto fue establecido, una plántula infectada en 30, 000 es suficiente para rechazar el lote completo. Sin embargo la técnica presenta ciertas limitaciones como el tiempo que toma, la disponibilidad de espacio en el invernadero y en las plántulas que son moderadamente infectadas no muestran síntomas obvios y visibles para ser detectados.

Por esta razón la técnica de PCR clásico y tiempo real se ha propuesto como una técnica rápida y confiable (Bahar *et al.*, 2008). Sin embargo en la práctica esta técnica de diagnóstico no está estandarizada para el diagnóstico de semillas a nivel comercial ya que tiene ciertos problemas con inhibidores de la reacción, como la presencia de productos a base de cobre, por lo que únicamente se ha utilizado a nivel experimental, la sensibilidad es buena, pero genera falsos negativos y falsos positivos. Por otro lado, la técnica solo puede identificar la presencia de células, las cuales pueden estar muertas, DNA o antígenos libres, pero aún así el diagnóstico positivo no significa que la bacteria se encuentre viable, es decir que su capacidad patogénica no esté alterada (Gitaitis y Walcott, 2007). Los métodos de detección de *Aac* en lotes de semilla previo a su venta y distribución representan un punto crítico de control ya que la mitigación del riesgo en la prevención de la infección, no se logrará en el siguiente componente.

Componente 12. Certificación Fitosanitaria por parte del país exportador / Punto crítico de control

La Organización Nacional de Protección fitosanitaria del país exportador certificará con base al proceso de producción y evidencias que la industria documente que cumple con los requisitos del país importador. La mitigación del riesgo en la prevención de la infección, no se logrará en el siguiente componente, por lo que se considera un punto crítico de control.

Vía 5. Infección a través de la importación

Componente 14. Toma de muestra en el punto de entrada/Punto crítico de control

La toma de muestra se realiza con base en el manual de muestreo en el cual se establece el tamaño de muestra adecuado dependiendo del tamaño del lote y el tamaño de la semilla para lograr un nivel de confianza de 95%. La correcta toma de la muestra permite mitigar el riesgo de introducción y diseminación de la bacteria en este componente.

Componente 15. Sensibilidad a la detección de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* a la prueba de ELISA/ Punto Crítico de Control (PCC)

La prueba de diagnóstico ELISA puede presentar algunas desventajas en su empleo, la prueba se basa en una toma de muestra de 100 semillas. Esta técnica puede resultar ineficiente debido a que es una prueba de diagnóstico en la que el anticuerpo solo detecta presencia de Aac y no detecta si la bacteria tiene capacidad patogénica. Es una prueba que requiere de interpretación y si la calidad del lector de luminosidad no es buena, puede ser interpretada como falsos positivos o falsos negativos. El resultado del diagnóstico permite mitigar el riesgo de introducción y diseminación de la bacteria en este componente, lo cual ya no podrá ser controlado en el siguiente componente.

5.2 Simulación probabilística para cuantificar el efecto de la mitigación del riesgo de introducción de semillas infectadas con *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

La simulación probabilística del efecto de la mitigación del riesgo de introducción de semillas infectadas con *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* siguiendo en el tiempo los cambios de un modelo del sistema real de comercialización de semilla de sandía, ayuda a comprender el funcionamiento del sistema y evaluar diferentes estrategias (dentro de los límites impuestos por un criterio o conjunto de criterios) para la operación del sistema (Vose, 1996). La simulación incluye tanto la modelización como el uso del modelo para describir, explicar y predecir el comportamiento del sistema real. El modelo contiene sólo los aspectos esenciales del sistema real que representa. Aquellos aspectos del sistema que no contribuyen significativamente en su comportamiento no se deben incluir, ya que lo que harían sería obscurecer las relaciones entre las entradas y las salidas. A continuación se describen los componentes considerados en la entrada de datos del modelo probabilístico para lograr la cuantificación, sin embargo no representa una acción en la mitigación del riesgo en la infección de semillas de sandía con *Aac*. La salida del modelo de simulación probabilista se obtuvo en Excel, así como la gráfica que muestra la eficiencia del modelo se muestran en el Anexo de este capítulo.

Vía 1. Infección natural

Componente 2. Cantidad de semilla

En el modelo arbitrariamente se consideró una cantidad máxima de 20,000, un promedio de 40,000 y una máxima de 80,000 como la cantidad aproximada de semilla que producida por compañía.

Componente 3. Semillas de sandía infectadas con *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* bajo condiciones naturales.

La epidemiología de la plaga no está bien determinada, por lo que no es sencillo conocer la vía de infección natural en campo cuando la bacteria ha sido introducida por la propia semilla. Se considera que la infección de la semilla se produce en el campo cuando ésta germina y entra en contacto con la bacteria, que se encuentra en el endospermo de la semilla. Para asignar este valor se consideraron los reportes en estudios donde no se han aplicado medidas de control específicas para el control de la bacteria. Este escenario se prevé que las acciones de mitigación del componente 1, no fueron realizadas. De esta forma se ha estimado que la semilla de sandía infectada con *Aac* es una semilla infectada por cada 9,000 (Latin *et al.*, 1995).

Vía 2. Infección a través de maquinaria

Componente 5. Diseminación del patógeno a través de la maquinaria.

Se considera que el impacto que se tiene en la diseminación de la bacteria, a través de la maquinaria e implementos usados en invernaderos y almácigos para la producción de plántulas y durante la cosecha de frutos para extraer la semilla de sandía es mínimo. En este sentido, Latin *et al* (1995) reporta que el uso de soluciones de hipoclorito de sodio (cloro para uso doméstico al 10%) resulta en la disminución de los niveles de sobrevivencia de *Aac*.

Vía 3. Infección a través de la segunda generación

Componente 7. Semillas por fruto y capacidad de germinación

La segunda generación puede propiciar 2 tipos de semilla. Diploide, que puede producir una nueva generación, sin embargo si ésta resulta infectada no hay responsabilidad de la compañía productora, porque la infección pudo provenir de las condiciones en las

cuales se cultivó en el campo. Híbrida o triploide, produce semilla estéril, no es posible obtener nuevamente semilla.

La cantidad de semilla para fruto depende de la variedad. Por ejemplo la variedad Quetzaly que presenta frutos grandes produce entre 175 – 250 semillas, mientras que las variedades triploides fruta pequeña y dulce, produce entre 35 -50 semillas por fruto. Algunas frutas muy pequeñas, llamadas personales, producen en promedio 15 semillas.

El porcentaje de germinación estándar en semilla de sandía es de 95%, aunque existen factores como las altas temperaturas que disminuyen el porcentaje de germinación. Al respecto Demir y Van De Venter (2000) señalan que el tratamiento de la semilla a una temperatura de 60°C por periodos de 20 horas, disminuye el porcentaje de germinación a un 78% y que estas condiciones pueden presentarse durante el manejo de la semilla en la cosecha o el almacenamiento.

Vía 4. Infección a través de la exportación

Componente 10. Supervivencia de *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* al tratamiento de agua caliente

El tratamiento en agua caliente resulta inapropiado para la semilla de producción comercial, ya que indudablemente reduce la germinación de la semilla. No se aplica para remediar, es mejor desechar la semilla y no correr riesgos de dispersión. Este riesgo debe ser controlado en el componente anterior y en el tratamiento preventivo descrito en el componente 4, previendo la aplicación de un tratamiento de desinfección.

Componente 11. Supervivencia de *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* al sellado del empaque.

La carencia de oxígeno matan a la semilla por lo que los empaques de semillas no se sellan al vacío.

Vía 5. Infección a través de la importación

Componente 13. Cantidad de semilla importada por país

La cantidad aproximada de semilla que se importa en promedio por una compañía, o en promedio por año en México. De acuerdo a los registros en la Dirección General de Sanidad Vegetal durante el año del 2008 se expidieron hojas de requisitos que autorizaron un total de 1, 488, 554 kilogramos de semilla¹.

De esta forma el parámetro final en el modelo de simulación, designado como la probabilidad de introducción y dispersión en términos de años hasta que ≥ 1 semilla infectada escape del sistema, y logre germinar en el país importador es de 0.001 y el tiempo promedio hasta que esto suceda es de 1,000 años (Vose, 1996; Palisade Corporation, 2002, 2003).

5.3 Papel de la industria en el P-HACCP

Un aspecto vital de las responsabilidades de la industria es establecer y mantener registros que documenten la implementación de límites críticos o medidas fitosanitarias relacionadas con puntos críticos de control, así resulta en una continua auto inspección.

El Plan P-HACCP describirá técnicas, métodos y tratamientos que controlarán los riesgos identificados. La supervisión de límites de control especificados puede evitar acciones correctivas cambiando tratamientos antes de exceder un límite de control crítico. Por lo que es necesario tener en cuenta que la verificación y corroboración

¹ Rosas. 2009. Comunicación personal. Dirección General de Sanidad Vegetal.

serán claves en esta metodología. La documentación precisa, contribuye a verificar que los procedimientos P -HACCP estén controlando los riesgos fitosanitarios en forma efectiva. Las acciones correctivas deben ser descritas en un formato y deben ser implementadas para restablecer control tan pronto como se note un problema. La acción correctiva debe resolver problemas inmediatos así como suministrar soluciones a largo plazo. Fallas rutinarias en los límites de control significan que el plan P-HACCP necesita ser actualizado.

El plan P-HACCP debe contar con documentos de ayuda sobre verificación y otros archivos. La verificación es importante ya que asegura que los procedimientos en los PCC estén funcionando efectivamente. La revisión regular de documentos de control y de acción correctiva permite a los supervisores saber si los límites de operación están eliminando las plagas cuarentenarias. La verificación incluye exámenes para revisar si los planes P-HACCP están funcionando y si se están siguiendo. Además de verificar PCC, los planificadores de P-HACCP deben elaborar un calendario de verificación para el sistema completo.

La corroboración, un componente de la verificación, suministra evidencias objetivas de que el plan se basa en información científica y que representa un enfoque válido para controlar los riesgos fitosanitarios a través del manejo de recursos. El equipo P-HACCP o supervisores externos deben corroborar los componentes del plan antes de confiar en él mismo para el control de estos riesgos. Las estrategias de planificación deben revisarse regularmente y actualizarse para incorporar técnicas nuevas.

Varias Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria han establecido el reconocimiento a través de la certificación de los programas que integran diferentes componentes dando el enfoque P-HACCP, por ejemplo el Departamento de Agricultura, Pesca y Forestal de Australia, reconoce a través del sistema de manejo de granjas (The Farm Management System, FMS), unidades productoras de material propagativo (viveros), para fomentar a los productores primarios a adoptar las mejores prácticas de manejo y estar mejor preparados para el futuro a través del análisis de riesgo y un plan

de acción. Esto fomenta la identificación de riesgos (producción, ambiental, bioseguridad, fitosanitario, etc.) dentro de la planeación y requerir acciones para minimizar su impacto (McMahon, 2007).

Éste es un sistema de mejora continua que utiliza la asistencia para guiar a la industria hacia ciclos de cambio y adopción de tecnología. Este enfoque es adoptado para asegurar que las áreas que requieren mejorarse están siendo atendidas y continuamente revisadas, por ejemplo en el caso de riesgo fitosanitarios se mitigue a través de disciplinas cuarentenarias internas en materiales de importación y exportación. De esta forma, la industria y el gobierno aseguran un futuro sustentable para productores primarios, asimismo se da soporte a futuros accesos a nuevos mercados y preparar a la industria para potencializar la exportación (McMahon, 2007).

6. CONCLUSIONES

7. Los tratamientos cuarentenarios de nivel probit 9 son frecuentemente usados para plagas cuarentenarias de alto riesgo. La eficiencia de estos tratamientos asegura una eficacia de 99.9968 en la mortalidad. Sin embargo, bajo condiciones fluctuantes (variación en la tasa de infestación y patrones de distribución), este tipo de tratamiento puede ser insuficiente para garantizar la seguridad cuarentenaria requerida, ya que enfatiza sobre el nivel de mortalidad de la plaga y esto no tiene relación directa con la probabilidad de introducción al país importador de la población de plaga cuarentenaria sobreviviente.
8. La inspección convencional es una fuente relativa de información generalmente intensiva, poco eficiente y reactiva más que preventiva comparada con la metodología P-HACCP, para asegurar el cumplimiento de las medidas fitosanitarias. Usando una técnica de inspección convencional, la parte regulatoria únicamente puede determinar condiciones durante el tiempo de la inspección, lo cual provee de una visión limitada de las condiciones al momento de la inspección. Sin embargo, con la adopción de la metodología P-HACCP, se pueden determinar condiciones actuales y del pasado.
9. A través de la metodología P-HACCP se identificaron 5 vías asociadas a la introducción y diseminación de *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli* (*Aac*) en el sistema de comercialización de semilla de sandía, dónde 15 componentes fueron usados para modelar el sistema, y siete de ellos fueron identificados como puntos críticos de control.
10. La evaluación del sistema P-HACCP, mediante los valores de los 15 componentes usados el modelo de simulación probabilística del sistema de comercialización de semilla de sandía resultó en un tiempo promedio para que ≥ 1 una semilla infectada con *Aac* escape del sistema de comercialización de

semilla de sandía y se establezca en México (país importador) igual a 1,000 años.

11.P-HACCP claramente identifica a los importadores y exportadores como la parte final responsable para asegurar una buena condición fitosanitaria de los productos agrícolas durante su comercio. P-HACCP requiere que la industria, analice sus métodos de producción y manejo de plagas en una manera racional y con bases científicas para identificar los puntos críticos de control y para establecer límites críticos y procedimientos de monitoreo.

12.El sistema P-HACCP permite a la parte regulatoria determinar el grado de cumplimiento de la industria, tienen la oportunidad de ver atrás a través del tiempo y así estar más seguros de que el proceso está bajo control. De esta forma las Organizaciones de Protección Fitosanitaria pueden enfrentar el desafío de aplicar nuevos enfoques para asegurar los niveles adecuados de protección fitosanitaria, y reconocerlos e incluso hasta certificarlos.

13.P-HACCP puede ser utilizado para analizar en forma integral las medidas de mitigación de riesgo fitosanitario de productos agrícolas de alto impacto como: frutas, material propagativo, flores, etc.

7. LITERATURA CITADA

- Aegerter, A., F. and Folwell, R., J. 2001. Selected alternatives to methyl bromide in the postharvest and quarantine treatment of almonds and walnuts: an economic perspective. *Journal of Food processing Preservation*. 25:389-410.
- Arneson, P. A. 1991. Principios para modelar sistemas en manejo integrado de pestes. Department of Plant Pathology. Cornell University. Ithaca, New York. Pp.36.
- Auclair, A. N. D.; Fowler, G.; Hennessey, M.K.; Hogue, A.T.; Keena, M.; Lance, D.R.; McDowell, R.M.; Oryang, D.O. and Sawyer, A.J. 2005. Assessment of the Risk of introduction of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) in Municipal Solid Waste from the Quarantine Area of New York City to Landfills Outside of the Quarantine Area: A Pathway Analysis of the Risk of Spread and Establishment. *Journal Economic Entomology*, 98 (1):47- 60.
- Bahar, O., Efrat, M., Hadar, E., Dutta, B., Walcott, R.R. and Burdam, S. 2008. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant pathology*, 57(4):754-763.
- Baker, A. C. 1939. The basis for treatment of products where fruit flies are involved as a condition for entry into the United States. USDA Circ. 551.
- Baker, R. T., Cowley, J. M., Harte, D. S., Frampton, E. R. 1990. Development of a maximum pest limit for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in produce imported into New Zealand. *Journal Economic Entomology*. 83:13-17.
- Black, M.C., Isakeit, T., Barnes, L.W., Kucharek, T.A., Hoover, R.J., and Hodge, N.C. 1994. First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Texas. *Plant Disease* 78:831.
- Burditt. 1982. Food irradiation as a quarantine treatment of fruits. *Food Technology*. 36, 51-54.
- Bustos, M. E., Enkerlin, W., Reyes J. and Toledo J. 2004. Irradiation of Mangoes as a Postharvest Quarantine Treatment for Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *Journal Economic Entomology*. 97(2): 286-292 (2004).
- Buchanan, R. L. 1990. HACCP: A re-emerging approach to food safety. *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier Science Publishers Inc.

- CABI. 2007. Crop protection compendium. 2007 ed. CAB International. Wallingford, UK. Encyclopedic media tool.
- Couey, H. M., Chew, V. 1986. Confidence limits and sample size in quarantine research. *Jornal Economic Entomology*. 79:887-890.
- Code of Federal Regulations (CFR). 2008. Agriculture. Title 7, part 361.1 – 361.10. Importation of seed and screenings under the federal seed act. Federal Register.USA.
- Demir, I., and Van De Venter. 2000. The effect of heat treatment of watermelon seed on germination hypocotyl emergence and abscisic acid content. *Expl. Agric*, 36:453-458.
- DOF. 1995. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-029-FITO-1995 requisitos y especificaciones fitosanitarios aplicables a semilla para siembra, de importación. *Diario Oficial de la Federación (DOF)*, 20 septiembre 1995.
- FAO. 2002. Aplicación de medidas integradas en un enfoque de sistemas para el manejo del riesgo de plagas. Publicación 14. Convención Internacional de Protección Fitosanitarias. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. Roma, Italia.
- Follett, P. A. and Hennessey M. K. 2007. Confidence limits and sample size for determining nonhost status of fruits and vegetables to tephritid fruit flies as a quarantine measure. *Jornal Econ. Entomol.* 100: in press.
- Gitaitis, R., and Walcott, R.R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 45:371-97
- Hallman, G. J. 1999. Ionizing radiation quarantine treatments against tephritid fruit flies. *Postharvest Biology and Technology* 16 (1999) 93–106.
- Heather, N. W., Corcoran, R. J. 1992. Effects of ionizing energy on fruit flies and seed weevil in Australian mangoes. In Panel Proc. Final Res. Coord. Meet. Use Irradiat. Quar. Treat. Food Agric. Commod., Kuala Lumpur, Malaysia, Aug. 1990, pp. 43–52. Vienna: IAEA.
- Hopkins, D. L., Thompson, C. M., Hilgren, J., and Lovic, B. 2003. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon. *Plant Disease*, 87:1495-1499.

- Jang, E. B., Moffitt, H. R. 1994. Systems approaches to achieving quarantine security. pp 225-239. In Quarantine Treatments for Pests of Food Plants, ed. JL Sharp, GJ Hallman. Boulder: Westview Press.
- Latin, R., Tikhonova I., and Rane K. 1995. Factors affecting the survival and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon transplant production facilities. *Phytopathology* 85:1413-1417.
- Landolt, P. J., Chambers, D. L., Chew, V. 1984. Alternative to the use of Probit 9 mortality as a criterion for quarantine treatments of fruit fly (Diptera: Tephritidae)-infested fruit. *Journal Economic Entomology*, 77: 285-287.
- Liquido, N.J., R.L. Griffin, and Vick, K. V. 1995. Proceeding of Joint Workshops of the Agricultural Research Service and the Animal and Plant Health Inspection Service. U.S. Department of Agriculture. USA.
- Mangan, R.,L., Sharp, J.L. 1994. Combination Treatments. In Quarantine Treatments for Pests of Food Plants, ed. G. Hallman, JL Sharp, 239-247. Boulder: Westview Press. 290 pp.
- Magan, R., L. and Sharp, J .L. 1994. Combination and Multiple Treatment. in Sharp J.L. and Hallman G.J.1994. Quarantine Treatments for Pest of Food Plants. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. Westview Press . 299pp.
- Mangan R. L., Shellie K. C., Ingle S. J., Firko M. J. 1998. High temperature forced-air treatments with fixed time and temperature for 'Dancy' tangerines, 'Valencia' oranges and 'Rio Star' grapefruit. *Journal Economic Entomology*, 91:933-939.
- Mangan R. L., Frampton E. R., Thomas D. B., Moreno D. S. 1997. Application of the maximum pest limit concept to quarantine security standards for the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal Economic Entomology*, 90: 1433-1440.
- Mangan R. L., Hallman G. J. 1998. Temperature treatments for quarantine security: new approaches for fresh commodities. In *Temperature Sensitivity in Insects and Application in Integrated Pest Management* ed. GJ Hallman, DL Denlinger, 201-234. Boulder: Westview.
- Mansour, M. 2003. Gamma irradiation as a quarantine treatment for apples infested by Codling moth (Lep., Tortricidae) *J. Appl. Ent.* 127, 137-141.

- Maindonald, J.H. 1996. The Challenges of Pest Risk Analysis. In: Plant Quarantine Statistics, a Review. (P.W.Bartlett, G.R.Chaplin, and R.J. van Velsen Ed.). Horticultural Research and Development. Oct.
- Microsoft Corporation, 2007. Excel Spreadsheet 2007 version. Microsoft Corporation. Redmond, W.A.
- McMahon, S. 2007. Nursery Production. Farm Management System. Guiding Change and Technology Adoption on –Farm. Nursery & Garden Industry Australia Publications. Pp. 8.
- Mumford, J. D. 2002. Economic issues related to quarantine in international trade. *European Review of Agricultural Economics* 29(3):329-348.
- National Plant Board. 2002. Preventing the introduction of Plant Pathogens into the United States: The role and application of the 'Systems Approach'. <http://www.aphis.usda.gov/ppq/systemsapproach>.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 1992. Hazard analysis and critical control points system. *Int. J. Food Microbiol.* 16:1-23.
- Palisade Corporation. 2002. A concise summary of @Risk probability distribution functions. Newfield, N.Y. Palisade Corporation. 2002a. Newfield, N.Y.
- Palisade Corporation. 2003. @Risk 4.5, version 4.5.2. Palisade Corporation, Newfield, NY.
- Paull, R.E. and Armstrong, J.W. 1994. Introduction. In *Insect Pests and Fresh Horticultural Products: Treatments and Responses* (R.E. Paull and J.W. Armstrong, Eds.), CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Sequeira, R. A. 2002. Agricultural Risk Assessment. In *Invasive Arthropods in Agriculture, Problems and Solutions*, ed. GJ Hallman, CP Schwalbe, 139-156. Enfield: Science Publishers Inc.
- Sequeira, R.A., Takeuchi, Y., Kalaris, T. 2006. A Phytosanitary Hazard Analysis and Critical Control Point (P –HACCP) System as a New Alternative for SPS Quarantine Pest Risk Management and Trade Facilitation. North American Plant Protection Organization. Ft. McDowell, AZ.

- Sproul, A.N. 1976. Disinfestation of Western Australian Granny Smith apples by cold treatment against the egg and larval stages of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata* (Wied.)). *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 16(79):280–285.
- Shannon, M.J. 1994. APHIS. In Sharp J. L. and Hallman G. J. 1994. *Quarantine Treatments for Pest of Food Plants*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. Westview Press. 299pp.
- USDA. 2002. Amending Import Rules for Clementines From Spain: Final Regulatory Impact Analysis. Riverdale, MD: Animal and Plant Health Inspection Service. 19 pp.
- USFWS. 2004. HACCP Planning for Natural Resource Pathways. National Conservation Training Center. USA. 54 pp.
- Vose , D. 1996. *Quantitative risk analysis*. J. Wiley and Sons. New York. 329 pp.
- Wang, H.L., Cheng, A.H. 2001. Development of serological detection technique for bacterial fruit blotch *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbit crops. *Plant Pathology Bulletin*, 10(3):129-138.
- Walcott, R.R., Gitaitis, R.D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 84(4):470-474.
- Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K., Ley, J. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(1):107-119.
- Zhao TingChang, Sun FuZai, Wang BingWan, Hui WenGuang, 2001. Pathogen identification of Hami melon bacterial fruit blotch. *Acta Phytopathologica Sinica*, 31(4):357-364.

ANEXO CAPITULO 2

RESULTADOS DE LA EFICIENCIA DEL SISTEMA P-HACCP

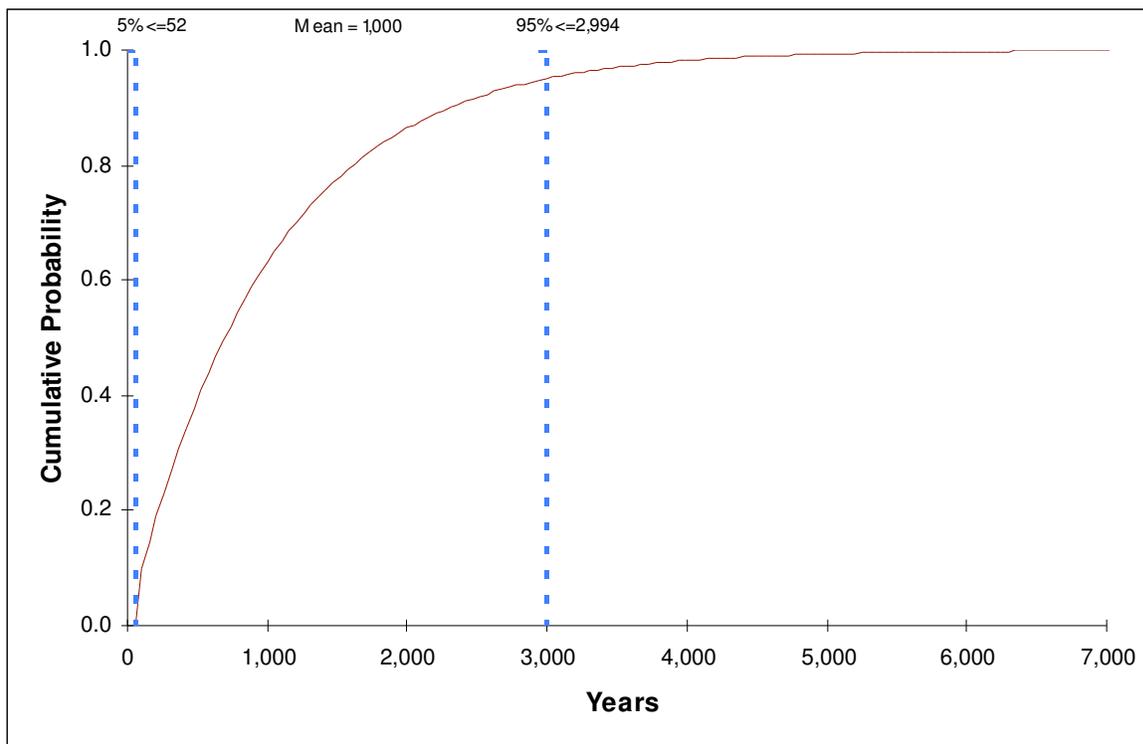


Figura 1. Resultados de la eficiencia del sistema P-HACCP

Simulación probabilística para cuantificar el efecto de mitigación de riesgo de introducción de semillas infectadas con *Acidovorax avenae* subsp. *citulli*

seeds produced by company	43,333,333	min,ml,max	20,000,000	40,000,000	80,000,000	probabilistic function
p(seeds infected naturally under ideal conditions)	0.000111111	point estimate	0,000111111			parameter
naturally infected seeds under ideal climate conditions	4,815.52					math/logic
p(fields have favorable conditions for infection)	2.488	min,ml,max	0,1	0,5	1	output
naturally infected seeds under field conditions	0.107843137					have data
p(survive copper fungicide)	268	s,n	10	100		can probably get data
infected seeds surviving copper fungicide	1,500					expert opinion probably needed
machines used to harvest seeds	0.003633961	min,ml,max	1,000	1,500	2,000	natural infection pathway
p(infected)	5	s,n	10	3,025		machine infection pathway
infected machines	0.0032					tool infection pathway
p(survives disinfection)	0	point estimate	0,0032			2nd generation infected seeds
infected machines after disinfection	0.000111111					exporting country inspection
p(infected machine infects seed)	0	point estimate				likelihood of importation
seeds infected by machines	5.74385E-05					importing country inspection
p(seed infected by machine is already naturally infected)	0	s,n	0.107843137	43,333,333		importing country establishment
seeds infected by machines already naturally infected	0					
seeds infected by machines not already naturally infected	15,000					
tools used to harvest seeds	0.00066072	min,ml,max	10,000	15,000	20,000	
p(infected)	10	s,n	1	3,025		
infected tools	0.0032					
p(survives disinfection)	0	point estimate				
infected tools after disinfection	0.000111111					
p(infected tools infects seed)	0	point estimate				
seeds infected by tools	5.74385E-05					
p(seed infected by tools is already naturally infected or infected by machinery)	0	s,n	-	43,333,333		
seeds infected by tools already naturally infected or infected by machines	0					
seeds infected by tools not already naturally infected or infected by machines	268					
1st generation infected seeds	0.3					
p(infected seeds escape detection)	80	min,ml,max	0,2	0,3	0,4	
infected seeds escaping detection	0.899920016					
p(seeds germinate)	241	s,n	9,000	10,000		
seeds germinate into fruit	100					
seeds per fruit	24100	min,ml,max	50	100	150	
2nd generation seeds	0.8					
p(infection in 2nd generation)	19280	min,ml,max	0,7	0,8	0,9	
infected 2nd generation seeds	0.5					
p(survives drying)	9,648	min,ml,max	0,4	0,5	0,6	
infected 2nd generation seeds survive drying	0.019607843					
p(PCR fails to detect infection)	189	s,n	1	100		
infected 2nd generation seeds escape PCR detection	0.039473684					
p(survive hot water treatment)	7	s,n	5	150		
infected 2nd generation surviving hot water treatment	0.005976096					
p(survive hermetic sealed container)	0	s,n	2	500		
infected 2nd generation seeds survive hermetic sealed container	0.151666667					
p(escape detection by exporting country NPPO)	0	min,ml,max	0,01	0,1	0,5	
infected 2nd generation seeds escape exporting country NPPO detection	0.90					
1st seeds produced by company	0					
p(seeds germinate)	43333,333					
2nd generation seeds germinate into fruit	0.899920016					
seeds per fruit	38,996,534					
2nd generation seeds produced by company	100					
proportion of 2nd generation seeds exported by company	3,899,653,400	min,ml,max	0,85	0,90	0,95	
2nd generation seeds exported by company	0.90					
2nd generation seeds imported by country	3,509,688,060	min,ml,max	100,000,000	250,000,000	500,000,000	
p(infected 2nd generations seeds imported by country)	266,666,667	s,n	3,509,688,060	0.90		
infected 2nd generation seeds imported by country	0.075980162					
p(infected seed not sampled by importing country)	0	s,n	99	100		
infected 2nd generation seeds not sampled by importing country	0.980392157					
infected 2nd generations seeds sampled by importing country	0					
p(ELISA fails)	0	s,n	10	100		
infected 2nd generation seeds escape ELISA detection by importing country	0.107843137					
2nd generation seeds that escape into importing country	0					
p(infected seed gets through)	0	p(infected seed gets through)	5,00E-04			
years until at least 1 infected seed gets through	0					
p(climate conducive for infection survival)	2000	min,ml,max	0,1	0,5	1	
2nd generation infected seeds that survive climate	0.516666667					
p(seeds germinate)	0	s,n	9,000	10,000		
2nd generation infected seeds that germinate	0.899920016					
p(infected seed germinates)	0	p(infected seed germinates)	4,00E-04			
years until at least 1 infected seed germinates	1000					

=ROUND(RiskPert(D1,E1,F1),0)	min,ml,max	20.000.000	40.000.000	80.000.000	probabilistic function
=D2	point estimate	0,000111111			parameter
=ROUND(RiskNormal(B1*B2,SQRT(B1*B2*(1-B2))),0)					math/logic
=RiskPert(D4,E4,F4)	min,ml,max	0,1	0,5	1	output
=RiskBinomial(B3,B4)					have data
=RiskBeta(D6+1,E6-D6+1)	s,n	10	100		can probably get data
=RiskBinomial(B5,B6)					expert opinion probably needed
=ROUND(RiskPert(D8,E8,F8),0)	min,ml,max	1,000	1,500	2,000	natural infection pathway
=RiskBeta(D9+1,E9-D9+1)	s,n	10	3,025		machine infection pathway
=RiskBinomial(B8,B9)					tool infection pathway
=D11	point estimate	0,0032			2nd generation infected seeds
=RiskBinomial(B10,B11)					exporting country inspection
=D12	point estimate				likelihood of importation
=RiskBinomial(B12,B13)					importing country inspection
=RiskBeta(D15+1,E15-D15+1)	s,n	=RiskBinomial(E	=ROUND(RiskPert(D1,E1,F1),0)		importing country establishment
=RiskBinomial(B14,B15)					
=IF(B16=0,B14,0)					
=ROUND(RiskPert(D18,E18,F18),0)	min,ml,max	10,000	15,000	20,000	
=RiskBeta(D19+1,E19-D19+1)	s,n	1	3,025		
=RiskBinomial(B18,B19)					
=D11	point estimate				
=RiskBinomial(B20,B21)					
=D12	point estimate				
=RiskBinomial(B22,B23)					
=RiskBeta(D25+1,E25-D25+1)	s,n	-	=ROUND(RiskPert(D1,E1,F1),0)		
=RiskBinomial(B24,B25)					
=IF(B26=0,B24,0)					
=RiskOutput("first generation infected seeds")+B7+B17+B27					
=RiskPert(D29,E29,F29)	min,ml,max	0,2	0,3	0,4	
=RiskBinomial(B28,B29)					
=RiskBeta(D31+1,E31-D31+1)	s,n	9,000	10,000		
=RiskBinomial(B7,B31)					
=ROUND(RiskPert(D33,E33,F33),0)	min,ml,max	50	100	150	
=B32*B33					
=RiskPert(D35,E35,F35)	min,ml,max	0,7	0,8	0,9	
=RiskOutput() + ROUND(RiskNormal(B34*B35,SQRT(B34*B35*(1-B35))),0)					
=RiskPert(D37,E37,F37)	min,ml,max	0,4	0,5	0,6	
=ROUND(RiskNormal(B36*B37,SQRT(B36*B37*(1-B37))),0)					
=RiskBeta(D39+1,E39-D39+1)	s,n	1	100		
=ROUND(RiskNormal(B38*B39,SQRT(B38*B39*(1-B39)),RiskTruncate(0,)),0)					
=RiskBeta(D41+1,E41-D41+1)	s,n	5	150		
=RiskBinomial(B40,B41)					
=RiskBeta(D43+1,E43-D43+1)	s,n	2	500		
=RiskBinomial(B42,B43)					
=RiskPert(D45,E45,F45)	min,ml,max	0,01	0,1	0,5	
=RiskOutput() + RiskBinomial(B44,B45)					
=B1					
=B31					
=ROUND(RiskNormal(B47*B48,SQRT(B47*B48*(1-B48))),0)					
=B33					
=ROUND(B49*B50,0)					
=RiskPert(D52,E52,F52)	min,ml,max	0,85	0,90	0,95	
=ROUND(B51*B52,0)					
=ROUND(RiskPert(D54,E54,F54),0)	min,ml,max	100.000.000	250.000.000	500.000.000	
=RiskBeta(D55+1,E55-D55+1)	s,n	=ROUND(Risk	=ROUND(B51*B52,0)		
=RiskBinomial(B46,B55)					
=RiskBeta(D57+1,E57-D57+1)	s,n	99	100		
=RiskBinomial(B56,B57)					
=B56-B58					
=RiskBeta(D60+1,E60-D60+1)	s,n	10	100		
=RiskBinomial(B59,B60)					
=RiskOutput() + B58+B61					
=RiskOutput() + IF(B62>=1,1,0)	p(infected seed gets through)	5,00E-04			
=RiskOutput() + 1+RiskNegbin(1,D63)					
=RiskPert(D65,E65,F65)	min,ml,max	0,1	0,5	1	
=RiskBinomial(B62,B65)					
=RiskBeta(D67+1,E67-D67+1)	s,n	9,000	10,000		
=RiskOutput() + RiskBinomial(B66,B67)					
=RiskOutput("p(infected seed germinate")+IF(B68>=1,1,0)	p(infected seed germinates)	4,00E-04			
=RiskOutput() + 1+RiskNegbin(1,D69)					