Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

BUENOS AIRES, 21 DIC 2004

VISTO el Expediente N° 0179928/2004 del Registro del INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS y

CONSIDERANDO:

Que a los fines de resguardar la calidad y sanidad de los materiales de propagación de plantas frutales pertenecientes al género *Pyrus, Malus* y *Cydonia* y/o sus partes que se encuentren en disponibilidad para la entrega al productor, es necesario establecer la normativa referente a la habilitación y funcionamiento de los Laboratorios que certificarán dicha calidad y sanidad.

Que las condiciones que debe reunir un laboratorio y las normas para su funcionamiento dependen de los análisis y del material que pretenda analizar.

Que en virtud del artículo 13 de la Ley Nº 20.247, los laboratorios de análisis deben estar inscriptos en el Registro Nacional de Comercio y Fiscalización de Semillas.

Que por los artículos 1°, 2° y 3° de la Resolución Nº 42 de fecha 6 de abril de 2000 se crean categorías que contemplan a los laboratorios.

Que la resolución N° 42 de fecha 6 de abril de 2000 en su ANEXO I establece que los laboratorios deberán cumplir previamente a su inscripción, con normas establecidas en la materia.

Que es necesario contar con laboratorios que certifiquen la calidad y sanidad de los mencionados materiales y establecer protocolos de habilitación a los cuales se deberán ajustar los laboratorios para inscribirse.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

Que la COMISION NACIONAL DE SEMILLAS, creada por la Ley de Semillas y Creaciones Fitogenéticas N° 20.247, se ha pronunciado favorablemente según surge del Acta N° 315 del 12 de agosto de 2004.

Que la Dirección de Asuntos Jurídicos del INASE, ha tomado la intervención que le compete.

Que el suscripto es competente para el dictado del presente acto administrativo en virtud de lo establecido por la resolución N° 148 del 3 de setiembre de 2004 de la SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS, que le asigna las funciones inherentes a la presidencia del Directorio del INASE con las facultades previstas en el artículo 23 de decreto N° 2.817 del 30 de diciembre de 1991.

Por ello,

EL PRESIDENTE A CARGO DEL INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS

RESUELVE:

ARTICULO 1º.- Apruébase las NORMAS DE FUNCIONAMIENTO DE LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES DE FRUTALES DE HOJA CADUCA DE VIVERO Y SUS PARTES PERTENECIENTES A LOS GENEROS *Pyrus*, *Malus* y *Cydonia* que como ANEXOS I a VII forman parte integrante de la presente resolución.

ARTICULO 2º.- Es de cumplimiento obligatorio para todos los laboratorios comprendidos en la presente Norma lo dispuesto en la Resolución Nº 218/2004.

ARTICULO 3°.- Los interesados deberán presentar la solicitud mencionada en el ANEXO I ante la Dirección de Calidad del Instituto Nacional de Semillas en la que se consignarán datos del propietario, dirección del laboratorio, profesionales responsables,

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

instalaciones, equipos e instrumental y demás aspectos que se fijan en la presente resolución.

ARTICULO 4°- Los diagnósticos de enfermedades comprendidas por esta Norma se mencionan en el Anexo III. La disponibilidad de instrumental y equipo se mencionan en los ANEXOS II y IV.

ARTICULO 5°- Los métodos para liberar tejidos vegetales de patógenos se fijan en el Anexo V.

ARTICULO 6°.- Los certificados que deberán utilizar los laboratorios se detallan en el ANEXO VII de la presente resolución.

ARTICULO 7° - Los profesionales responsables quedarán sujetos a lo dispuesto en el punto 2 del Anexo III de la Resolución N° 42 de fecha 6 de abril de 2000.

ARTICULO 8°- Comuníquese, publíquese, dése a la Dirección Nacional del Registro Oficial y archívese.

RESOLUCION Nº 1227

Ing. Agr. JOSE L. RUSSO
A/C PRESIDENTE
Instituto Nacional de Semillas

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

ANEXO I

SOLICITUD DE HABILITACION DE LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES DE FRUTALES DE HOJA CADUCA DE VIVERO O SUS PARTES PERTENECIENTES AL GENERO *Malus, Pyrus y Cydonia.*

PROPIETARIO

Nombre y Apellido o razón social.....

Domicilio.....CP.....Localidad.....Provincia.....

Teléfono/Fax/Correo electrónico.....

LABORATORIO

Nombre del Laboratorio.....

Domicilio.....CP.....Localidad.....Provincia... ....

Teléfono/Fax/Correo electrónico.....

PROFESIONALES RESPONSABLES

Jefe o Director Técnico

Nombre y Apellido ..... LE/LC/DNI Nº.....

Domicilio.....CP.....Localidad.....Provincia.....

Título expedido por .....Matr. Prof. Nº ..... .

Teléfono/Fax/Correo electrónico .....

Reemplazante autorizado

Nombre y Apellido ..... LE/LC/DNI Nº.....

Domicilio.....CP.....Localidad.....Provincia.....

Título expedido por .....Matr. Prof. Nº .....

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

Teléfono/Fax/Correo electrónico .....

INSTALACIONES

Agregar plano o croquis.

INSTRUMENTAL Y EQUIPOS

Agregar el detalle correspondiente de acuerdo a las normas de la presente resolución.

CONSTANCIA DE HABILITACION MUNICIPAL

.....

Firma del propietario o representante

.....

Firma del profesional responsable

.....

Firma del reemplazante autorizado

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

ANEXO II

NORMAS DE FUNCIONAMIENTO DE LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES DE FRUTALES DE HOJA CADUCA DE VIVERO O SUS PARTES PERTENECIENTES AL GENERO *Malus, Pyrus y Cydonia.*

1- DISPOSICIONES GENERALES

El alcance de esta Normativa es referente a los diagnósticos obligatorios de enfermedades transmitidas por injerto a:

Plantas de partida

Material Fundación

Plantas de Reserva

Plantas Madres de Base

Plantas Madres de Certificadas,

de las siguientes especies: Manzano (*Malus sylvestris* Mill); Peral (*Pyrus communis* L.), Membrillero (*Cydonia oblonga* Mill).

La repetición de los diagnósticos y la duración de las pruebas de diagnóstico se hará según los esquemas de certificación empleados.

Los laboratorios de diagnóstico de enfermedades de plantas frutales de las especies. mencionadas y sus partes, deberán cumplir las siguientes normas y proporcionar al responsable técnico y/o analista las condiciones necesarias para el desarrollo y desempeño de su/s función/es.

El responsable técnico y/o analista deberá tener conocimiento del compromiso y los objetivos de estas normas.

Los conceptos omitidos y/o no previstos en estas normas serán resueltos por la Dirección de Calidad del INASE de acuerdo a su competencia.

Tanto el Director Técnico como el reemplazante autorizado deberán estar capacitados en técnicas de detección mediante métodos biológicos y bioquímicos de enfermedades de plantas de las especies citadas, según normas técnicas indicadas por la Dirección de Calidad del INASE, u otras que demuestren ser adecuadas para tal fin. Los mismos avalarán con su firma los certificados que expidan haciéndose responsable de su contenido. Deberán participar en las reuniones técnicas convocadas por el INASE.

Los analistas (o técnicos) deberán poseer entrenamiento e idoneidad en el diagnóstico de enfermedades transmisibles por injerto de plantas frutales de las especies mencionadas y sus partes, participar en cursos y reuniones técnicas.

Se deberá proveer entrenamiento para el personal auxiliar.

2- INSTALACIONES

Debido a la naturaleza de los diagnósticos necesarios para la certificación sanitaria de plantas frutales de las especies de *Malus, Pyrus y Cydonia* citadas y sus partes, toda entidad dedicada a esta actividad, deberá contar con una sección de laboratorio y una de invernadero, de acuerdo a la metodología utilizada, adecuadamente equipados.

El ingreso de personas ajenas a estas instalaciones debe limitarse al mínimo necesario para disminuir los riesgos de contaminación. No se permitirán visitas en áreas de Materiales Candidatos y Plantas Iniciales.

El personal (tanto técnicos como auxiliares) deberá restringir su movimiento dentro de las instalaciones a las tareas que tienen asignadas.

a) - Laboratorios

El área del laboratorio y cada una de sus dependencias deberán ser compatibles con el volumen de muestras que se procesen y con el personal disponible. Se deberá establecer una separación eficaz entre zonas vecinas cuando se desarrollen en ellas actividades incompatibles. El acceso y el uso de todos los sectores que influyan sobre la calidad de estas actividades, deberán ser definidos y controlados. Estos sectores estarán detallados en un croquis que deberá presentarse al momento de la solicitud de habilitación.

El laboratorio deberá disponer de los siguientes sectores:

- Recepción y registro de muestras: Con acceso externo, que asegure independencia de las demás dependencias.
- Sector de acondicionamiento de muestras.
- Sector para el desarrollo de técnicas de eliminación de patógenos (cultivo de meristemas, injertos de ápices, etc.).
- Sector para el desarrollo de aislamientos de hongos y bacterias (flujo laminar).
- Sector para el desarrollo de técnicas serológicas (DAS-ELISA).
- Sector para el desarrollo de técnicas moleculares (optativo)
- Sector para la detección de nemátodes.
- Sector del lavado del material, preparación de medios y esterilización.
- Sector para almacenamiento de drogas.
- Sector para el almacenamiento de materiales de vidrio y plástico.
- Sector de oficinas.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

b) - Invernaderos

ASPECTOS REFERENTES A CONDICIONES REQUERIDAS PARA EL MANTENIMIENTO SANITARIO.

En el caso de frutales de pepita los cuidados para evitar infecciones no son tan estrictos como para frutales de carozo ya que hasta el momento, la única forma conocida de transmisión de los DOS (2) virus de testado obligatorio es por multiplicación vegetativa.

Por lo tanto, lo más importante en estas especies es que las plantas estén lo suficientemente separadas como para evitar el contacto entre sí y que estén cultivadas en macetas para evitar contacto con el suelo.

Las *Plantas Iniciales*, *Plantas de Partida, Plantas de Reserva, Material Fundación*, y cuando corresponda las *Plantas Madres de Base,* y las *Plantas Indicadoras Leñosas* y *Herbáceas,* deberán mantenerse en recintos bajo condiciones de absoluto aislamiento a los fines de evitar cualquier contaminación. La estructura de los invernaderos debe cumplir con los siguientes requisitos:

Normas generales de higiene:

- La estructura debe impedir el ingreso del agua de lluvia superficial del ambiente circundante. Se debe prever la elevación del plano del invernadero.
- El piso debe garantizar el completo aislamiento entre los recipientes y el terreno. Si está previsto enterrar los recipientes, el medio de soporte debe ser de granza u otro material inerte que asegure un eficiente drenaje. Entre la base del recipiente y el terreno debe haber una separación de por lo menos 20 cm.
- El techo debe ser rígido. Los laterales deben ser de pared doble.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

- Se deberá controlar la correcta conservación de las estructuras y materiales de cobertura.
- Doble puerta con cerradura.
- Nuevas introducciones en cuarentena, deberán ubicarse en invernaderos separados.
- Provisión de agua no contaminada.
- Pisos limpios.
- Desinfectantes de amplio espectro en las esponjas o baños para pies.
- Materiales y herramientas desinfectadas y utilizadas sólo para un cultivo en referencia.
- Desinfectar las manos e implementos antes de cada operación.
- Desinfectar los implementos entre cada corte o grupo de cortes dependiendo de la etapa de propagación
- El personal deberá usar botas de látex o plásticas, limpias desinfectadas, libres de tierra y ropa limpia.
- Prohibición de fumar
- No se permitirán visitas en áreas de *Materiales Candidatos* y *Plantas Iniciales.*
- Para los invernaderos de plantas indicadoras, deberá haber una zona oscura para el etiolado de las plantas.

Suelo o medio de cultivo

- Para las plantas herbáceas, el medio de desarrollo deberá ser nuevo o esterilizado.
- Para las plantas leñosas puede ser necesario un medio en base a suelo esterilizado.

Contenedores para el crecimiento de las plantas:

- Los contenedores deberán ser nuevos o desinfectados (los de poliestireno expandido deben ser reemplazados cada vez).
- El material de empaque para el transporte de las plantas, deberá ser nuevo o desinfectado.

Almacenamiento del material de propagación:

- El establecimiento deberá contar con instalaciones con frío y oscuridad adecuadas para el almacenamiento de estacas sin raíz, bulbos, plantas enraizadas y otros materiales de propagación.

Plantación:

- Cada planta deberá implantarse en un contenedor individual, que deberá estar separado al menos 20 cm del suelo.
- Debe evitarse la contaminación cruzada durante los tratamientos de inmersión (tratamientos hormonales, etc.).
- Cada cultivar (o clon) deberá encontrarse correctamente identificado.
- Cada planta de cada cultivar (o clon) deberá mantenerse separado de los demás cultivares (o clones).
- Las plantas, en ningún caso, deberán tocarse entre sí.

Durante la estación de crecimiento:

- Deberán controlarse las plagas en forma regular y sostenida, con alternancia de productos para asegurar un control efectivo.
- No se deberán emplear productos que puedan enmascarar los síntomas de los patógenos especificados en el Anexo III de la presente Resolución.

- Deberá evitarse el salpicado de la parte aérea de las plantas durante el riego.

- En general, se deberán evitar heridas en las plantas.

- Las flores deberán ser removidas antes de abrir para evitar infecciones virales por polen (es aconsejable emplear colmenas propias). Debido a esto, se deberá dejar un monte (razonablemente aislado) a cuyas plantas no se les quite las flores, para poder observar las características de la variedad.

C - PLANTAS CULTIVADAS EN EL CAMPO

ASPECTOS REFERENTES A CONDICIONES REQUERIDAS PARA EL MANTENIMIENTO SANITARIO (válido para las distintas categorías de plantas del sistema de certificación como para las plantas indicadoras).

Normas generales de higiene:

- El establecimiento deberá contar con provisión de agua sin contaminación. Deberán evitarse campos donde puedan entrar aguas de drenaje.

- Los materiales y herramientas deberán ser desinfectados y utilizados sólo para el cultivo especificado.

Suelo o medio de crecimiento:

- Deberán considerarse el/los cultivos previos a la implantación de las plantas obtenidas en los Sistemas de Certificación con respecto al riesgo de infecciones producidas por patógenos habitantes del suelo.

El suelo donde se plantarán las plantas obtenidas en los Sistemas de Certificación deberá analizarse y encontrarse libres de los siguientes nematodos vectores:

Criconomella spp.; Longidorus spp.;Melodoigyne spp.;Pratylenchus spp.; Xiphinema spp.

Contenedores:

- Para el transporte de las plantas, deberán emplearse embalajes nuevos o desinfectados.

Almacenamiento del material de propagación:

- El establecimiento deberá poseer instalaciones con frío y oscuridad adecuadas para el almacenamiento de estacas, plantas enraizadas y otros materiales de propagación.

Aspectos a tener en cuenta durante la estación de crecimiento:

- Deberán controlarse las plagas en forma regular y sostenida, con alternancia de productos para asegurar un control efectivo.
- No deberán emplearse productos que puedan enmascarar los síntomas de los patógenos especificados en el Anexo III de la presente Resolución.
- En general, se deberán evitar heridas en las plantas.
- Las flores deberán ser removidas antes de abrir para evitar infecciones virales por polen en plantas de Subcategorías cultivadas al exterior.

3- EQUIPAMIENTO

El laboratorio y el / los invernáculos deberán estar provistos de todos los equipos y de los materiales de referencia necesarios para la ejecución correcta de los ensayos. Todos los equipos deberán ser mantenidos en adecuado estado de funcionamiento.

4- INSTRUCCIONES PARA EL FUNCIONAMIENTO

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

PROCEDIMIENTOS: Cada laboratorio y el / los invernáculos deberán contar con una carpeta donde consten todos los procedimientos operativos e instrucciones de trabajo actualizados conjuntamente con los otros registros que más adelante se detallan para permitir la/s auditoria/s por parte del INASE.

DOCUMENTACION:

- Libro de registro de muestras.
- Boletín interno de análisis.
- Certificados de análisis.
- Archivo de documentos.
- Bibliografía técnica.
- Registro de reactivos.
- Registro de equipos.
- Registro de aplicación de agroquímicos.

Libro de registro de muestras:

Este libro deberá contar con hojas numeradas con un sistema que asegure la inalterabilidad de los registros, preferentemente en posición horizontal, que pueda ser completadas en forma manual o una mecánica tipo PC con sistema de seguridad.

Allí se registrarán todas las muestras que ingresen al laboratorio y al invernáculo a las que se hallan emitido o no certificado (muestras de control interno de calidad, particulares, de entrenamiento, ensayo de referencia, muestras de fiscalización y otras), con número correlativo que corresponderá al número de diagnóstico de la misma. Se deberán detallar los datos mínimos obligatorios que hacen a la identificación de las muestras como: número

de diagnóstico o test, fecha de recepción, remitente, procedencia u origen, especie, cultivar, categoría, número de lote, fecha y número de certificado de análisis y todos aquellos datos que se consideran necesarios para la identificación de la muestra.

Las muestras deberán registrarse en secuencia numérica en orden cronológico de recepción.

Muestras:

Las muestras ingresadas deberán ser identificadas con su respectivo número de recepción.

Las muestras deberán ser empaquetadas en bolsas plásticas de polietileno junto con una etiqueta resistente o identificada con marcador indeleble. La bolsa deberá ser envuelta firmemente alrededor del material para evitar espacios de aire excesivos y entrada de agua y debe ser colocada en una segunda bolsa. Esta bolsa deberá ser sellada o cerrada fuertemente con un cordel o una banda elástica y ser rotulada nuevamente con la firma del responsable de la extracción y del Director Técnico o Representante de la empresa.

La temperatura de conservación de muestras vegetales debe ser de 4ºC, y podrán ser conservadas por un lapso máximo de 48 horas.

Las muestras ingresadas deberán ser identificadas con su respectivo número de recepción.

El protocolo de extracción de las muestras se describe en el ANEXO VI.

Boletín interno de análisis:

Se emitirá un boletín interno por cada muestra. Este boletín deberá estar identificado con el mismo número de recepción que posee la muestra en el Libro de Registro de Muestras.

El Boletín Interno contará con la información indispensable para la ejecución del diagnóstico o test tales como: número de diagnóstico o test, determinaciones solicitadas, fecha de inicio y finalización del análisis, y otras informaciones complementarias.

Aquí se registrarán los resultados obtenidos de los diagnósticos o tests, datos e identificación del técnico (si las etapas están desarrolladas por distintos técnicos, cada uno deberá indicar la etapa que le corresponda mediante firma y aclaración).

Archivo de documentos:

Los Libros de Registro de Muestras, Boletines Internos, y Certificados emitidos se archivarán durante un periodo de cinco (5) años y estarán a disposición de los inspectores del Instituto Nacional de Semillas, cuando ellos lo soliciten.

Registro de reactivos:

En este libro figurarán todos los reactivos empleados en el diagnóstico de los patógenos citados en el Anexo III de la presente Norma. Para cada reactivo se anotará fecha de compra, marca, Nº de artículo, fecha de vencimiento. Se aconseja además, anotar lugar de conservación en el laboratorio, precauciones con el reactivo (si las tuviera) y antídoto (si lo tuviera).

Registro de aplicación de agroquímicos:

En este libro se anotarán todas las aplicaciones de productos (fungicidas, bactericidas, viricidas, fumigantes, fertilizantes, insecticidas, nematicidas, etc) que se realicen en plantas, sus partes y suelo.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

Se anotará, para cada aplicación, producto empleado (principio activo, marca comercial, concentración y formulación), dosis empleada, fecha de aplicación y si la misma fue realizada sobre planta y sus partes y/o en el suelo. _

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

ANEXO III

PLAGAS DE INDEXADO O TESTADO OBLIGATORIO

Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) (*Trichovirus*)	
Indicadoras leñosas (campo)	*Malus platycarpa* (3/ - /2 años) (anillos clorótios y diseños lineares en l hojas). *Malus sylvestris* R 12740 7A (3/-/2 años) (muerte de ramillas, distorció de hojas).
Indicadoras leñosas (invernadero)	*Malus platycarpa* (3/20/8 semanas) (anillos clorótios y diseños lineares en las hojas). *Malus sylvestris* R 12740 7A (3/22/4 semanas) (muerte de ramillas, distorción de hojas).
Indicadoras herbaceas	*Chenopodium quinoa*,
Pruebas serológicas o moleculares	DAS-ELISA (48 horas, obligatoria). Optativas: RT-PCR, IC-RT-PCR (2 horas).
Transmisión natural	Desconocida.
Apple mosaic virus (ApMV) (*Ilarvirus*)	**SOLO PARA TESTEAR EN MANZANO**
Indicadoras leñosas (campo)	Golden Delicious(3/-/2 años) (mosaico clorótico en las hojas) Lord Lambourne (3/-/2 y) (mosaico clorótico en las hojas
Indicadoras leñosas (invernadero)	No se recomiendan
Indicadoras herbáceas	*Cucumis sativus*
Pruebas serológicas o moleculares	DAS-ELISA (48 horas)
Transmisión natural	Desconocida

Aclaración: La metodología y la duración de las pruebas son indicativas.

* En los test realizados sobre indicadoras leñosas los números colocados entre paréntesis indican:

- el primer número representa el número de repeticiones de la planta indicadora.
- el segundo número representa la temperatura requerida en invernadero para la aparición de síntomas.
- el tercer número representa la duración (aproximada) de la prueba.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

ANEXO IV

TECNICAS PARA LA DETECCION DE LAS PLAGAS DE INDEXADO O TESTADO OBLIGATORIO

I) PRUEBAS BIOLOGICAS (Indexing)

I.A) PLANTAS INDICADORAS LEÑOSAS PERENNES. Transmisión por Injerto

El uso de indicadoras leñosas es todavía un paso inevitable en cualquier sistema de certificación de plantas leñosas porque hay enfermedades, algunas muy importantes, que solo pueden identificarse en hospedantes diferenciales leñosos. Quiere decir que aunque se empleen plantas indicadoras herbáceas, de más rápida visualización de síntomas, siempre deberán utilizarse plantas indicadoras leñosas.

Conducidas en el campo:

Sobre pies francos (que están libres de virus porque los virus de estos frutales no se transmiten por semilla), se injertan dos yemas: una, la inferior corresponde a la planta que se desea testar y otra, la superior, corresponde a la planta indicadora. Esto se realiza a yema dormida (en el mes de febrero) y se hacen 3 repeticiones de cada test. En la primavera siguiente se favorece el desarrollo de la indicadora desbrotando el portainjerto y cortando el crecimiento de la planta a testar, sobre la cual se observarán los síntomas típicos de la virosis. Los síntomas son normalmente específicos y de elevado valor como diagnóstico para muchas enfermedades.

Se deben controlar riegos, malezas, plagas (aplicar fungicidas, insecticidas, etc), y demás tareas de manejo, hasta la aparición de síntomas.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

Las indicadoras mantenidas en el campo deberán observarse 2 años o más, y para algunas enfermedades por lo menos 2 periodos de fructificación (4-5 años).

I.B) PLANTAS INDICADORAS HERBACEAS. Transmisión mecánica

Su empleo permite la detección de los virus que se transmiten mecánicamente.

La transmisión mecánica consiste en poner en contacto un patógeno con células vegetales susceptibles en las que se han producido manualmente microheridas en la pared celular, para dejar la membrana plasmática expuesta al patógeno.

Cuando se inoculen *Ilarvirus*, como los mismos se inactivan a 37ºC, no se podrán emplear las manos para inocular, y el inóculo deberá estar en hielo con un antioxidante.

Conducidas en invernadero:

1. Se deben emplear, al menos cinco plantas (repeticiones) por planta indicadora.
2. Tomar tejidos jóvenes de la planta infectada como los pétalos o las hojas jóvenes recientemente expandidas. Se supone que contienen una concentración elevada del patógeno.
3. Colocar en un mortero, (homogeneizador u otro) hojas jóvenes, buffer (por lo común fosfato, pH 7) y triturar el tejido permitiendo que las células rotas vuelquen su contenido en el buffer.
4. Filtrar el homogenizado a través de gasa (previamente humedecida con el buffer), recogiendo el extracto.
5. Inocular el extracto en la cara superior de las hojas de la planta indicadora. Seleccionar tejidos jóvenes (hojas recién expandidas, hojas primarias muy jóvenes o cotiledones). Etiolar las plantas indicadoras, manteniéndolas en la oscuridad el día previo a la inoculación, incrementa su susceptibilidad.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

6. La penetración del patógeno requiere de pequeñas heridas que se realizan adicionando un abrasivo a la savia infectada o espolvoreando las hojas que se van a inocular.

7. Identificar las hojas inoculadas, de manera de poder dedicarles especial atención en espera de la aparición de síntomas, y de desestimar alteraciones que pudieran evidenciarse con anterioridad, en otras hojas. Pueden marcarse las hojas inoculadas mediante una pequeña perforación en su extremo apical, con la punta de un lápiz.

8. Aplicar el extracto sobre las hojas friccionando suavemente. El extracto se puede aplicar con los dedos (usando guantes), una varilla de vidrio, un pincel, el pilote del mortero o un trozo de gasa.

9. Las heridas realizadas deben ser pequeñas. No deben inducir el proceso de cicatrización por parte de la planta, matando las células expuestas al patógeno. En ese caso no se logrará la penetración del patógeno.

10. Si el extracto forma una capa sobre las hojas, puede ser retirada lavando la superficie foliar con agua usando una pizeta o colocando las hojas bajo agua corriente.

11. Mantener las plantas inoculadas en invernadero bajo condiciones controladas (en general: temperatura 20 - 26ºC, HR 70 –80 %, fotoperíodo, 16 h luz, complementando con luz artificial, si se requiere.

12. Mantener las plantas bajo observación hasta la aparición de síntomas.

II) PRUEBAS SEROLÓGICAS

PRUEBA DE ELISA

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

El método de ELISA permite la prueba en gran escala de los virus de frutales para los cuales se dispone de antisueros, sean mono o policlonales. Sin embargo, los métodos serológicos tienen ciertas limitaciones debido a que los patógenos pueden estar en baja concentración en las plantas y escapar a la sensibilidad de la técnica, pueden estar distribuidos irregularmente y no ser recogida en el muestreo para analizar material infectado, o ser estacionalmente indetectables generalmente porque la temperatura ambiente lo inactiva.

II.A) DAS-ELISA (doble sandwich de anticuerpo)

Drogas y Equipo mínimo requerido:

Kits completos (inmunoglobulinas, inmunoglobulina marcada con fosfatasa alcalina).

Sustrato para revelado: p-nitrofenil fosfato de sodio.

Drogas para preparar las soluciones tampón, en las diferentes etapas.

Agitador magnético.

Destilador.

Placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno con fondo plano y de una capacidad de 200 µl de capacidad por pocillo de excelente calidad.

Pizetas de plástico de volúmenes variables.

Micropipetas de volúmenes variables o varias de volúmenes fijos.

Tips estériles adaptables a las micropipetas.

Pipetas multicanal 8 o 12 (capacidad: 50 a 200µl) (optativo).

Peachímetro rango de pH de 0 a 14, resolución 0,01, error +/- 0,1 rango de temperatura de 0,5 a 100 ºC, 1 ºC de resolución, +/- 1 ºC de error.

Estufa de cultivo de temperatura regulable (rango temperatura ambiente a 50 ºC).

Material de vidrio o plástico necesarios.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

Balanza analítica, capacidad 120gr, resolución 0,001gr.

Heladera y freezer (-20 ºC).

Lector de microplaca (espectofotómetro 405nm).

Testigos positivos.

Testigos sanos.

PROTOCOLO

Cobertura de la placa con anticuerpos (sensibilización de la placa)

1. Ajustar la inmunoglobulina (Ig) a la dilución óptima (determinada previamente en una placa de calibración) con tampón de sensibilización (buffer coating). Colocar 200 ul de esa dilución en cada celdilla.

2. Cubrir la placa con polietileno para evitar deshidratación e incubar durante 4 horas a 37°C.

3. Vaciar la placa y lavarla llenando las celdillas con tampón de lavado, dejar reposar 3 minutos y vaciar la placa. Repetir tres veces el lavado.

Preparación y agregado del antígeno:

4. Identificar las muestras y macerarlas con tampón de extracción en una relación p/v adecuada (generalmente entre 1/3 y 1/10). Conservar a 4°C hasta su utilización.

5. Lavar la placa (3 veces con tampón lavado) y llenar las celdillas con 180 ul del sobrenadante de las muestras. Es necesario emplear varios testigos sanos y enfermos ambos provenientes de distintas plantas. Debe llenarse al menos una celdilla con tampón extracción como blanco.

6. Cubrir la placa con polietileno para evitar la deshidratación y mantenerla a 4°C durante 16 a 18 horas (toda la noche).

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

7. Lavar la placa (3 veces con tampón lavado), hasta que no se observen restos vegetales (3 ó más lavados) y en forma cuidadosa para evitar que el contenido de una celdilla no pase a otra.

Agregado del conjugado enzimático:

8. Diluir el conjugado, según la concentración previamente determinada (placa de calibración), en tampón de conjugado (tampón enzima). Colocar 180 ul por celdilla.

9. Cubrir la placa con polietileno para evitar deshidrataciones e incubar durante 4 horas a 37ºC.

10. Lavar la placa (3 veces con tampón lavado) y realizar el último lavado con tampón de sustrato.

Adición del sustrato:

11. En el tampón de sustrato disolver entre 0,6 a 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato y colocar 200 ul en cada celdilla.

Tener en CUENTA que el p-nitrofenilfosfato es cancerígeno y los tampones empleados contienen azida sódica, razón por la cual no debe entrar en contacto con la piel.

12. Dejar la placa en oscuridad y observarla periódicamente cada 15 min.

Las muestras infectadas (reacción positiva) son aquéllas que presentan coloración amarilla, cuya intensidad varía de acuerdo a la concentración del virus en la muestra. Esta prueba cualitativa es, además, cuantitativa ya que se estima la concentración de virus a través de la lectura de absorbencia a una longitud de onda de 405 nm (A405) mediante el empleo de un espectrofotómetro vertical.

<u>BUFFERS PARA DAS-ELISA</u>

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

PBS *(buffer fosfato salino)*

(en g/l) pH 7,4

ClNa 8

KH_2PO_4 0,2

Na_2HPO_4 1,15

KCl 0,2

NaN_3 0,2

Buffer de lavado *(PBS + Tween-20)*

PBS

Tween-20 ..... 0,5 ml / litro.

Buffer de sensibilización

(tampón coating) (en g/l) pH 9,6

Na_2CO_3 1,59

$NaHCO_3$ 2,93

NaN_3 0,2

Buffer de extracción

PBS

Tween-20 ..... 0,5 ml/l

PVP .....20 g/l.

Agregar en el momento de usar 2% de leche.

Buffer de conjugado *(tampón enzima)*

PBS

Tween-20 ..... 0,5 ml/l

PVP .....20 g/l

Ovoalbúmina ..... 2 g/l.

Agregar en el momento de usar 2% de leche.

Buffer de sustrato pH 9,8

Dietanolamina ..... 97 ml/l

H_2O ..... 800 ml/l

NaN_3 ..... 0,2 g/l

PROTOCOLOS DE DETECCIÓN DE VIRUS LISTADOS EN ANEXO III

1) *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* (ACLSV)

1.A) INSPECCIÓN VISUAL

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

En general este virus afecta al manzano, peral y membrillero en forma latente, es decir, sin presencia de r síntomas. Sólo manifiesta síntomas en la variedad Golden Delicious de manzano consistentes en manchas rugosas en los frutos, y en diferentes *Malus* ornamentales que se usan como indicadoras: *M. platycarpa*, *M. floribunda*, Spy 227). En peral los síntomas consisten en anillos y bandas cloróticas sobre hojas de la variedad Beurre Hardy. En membrillero también produce anillos y líneas cloróticas. Si bien es considerado latente, existen estudios que evidencian reducción en el crecimiento y producción de las plantas afectadas, aún sin síntomas visibles. Además se le atribuyen fallas en el prendimiento de injertos en viveros, sobre todo en la combinación peral-membrillero.

1.B) *ACLSV* MEDIANTE DAS - ELISA

Materiales:

1. Emplear yemas dormidas, flores y/o brotes de yemas invernantes (ramilletes de hojas hasta 5 cm de longitud).
2. Enfriar las muestras (constituidas por cuatro submuestras, tomadas en cada cuadrante de la copa) en el momento que se recogen, ubicándolas en una conservadora. Mantenerlas enfriadas hasta su análisis por DAS-ELISA dentro de las 48 h de recogidas.

DAS -ELISA

Seguir el protocolo descripto (del presente anexo) teniendo en cuenta:

1. Antisueros: emplear las diluciones de acuerdo a las especificaciones consignadas por el laboratorio expendedor.
2. Moler 0,5 g del material en buffer extracción [PBS) 1:10 p/v, en frío.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

3. Analizar las muestras por duplicado (esto es fundamental debido a la variabilidad de las muestras).
4. Incorporar por placa seis (6)controles negativos (tejidos provenientes de seis (6) plantas libres del virus analizado), tres controles positivos (tejidos de plantas infectados con el virus analizado) y un control blanco (buffer).
5. Leer las reacciones en un lector de ELISA.
6. Considerar DAS- ELISA positivas las lecturas de absorbancia (A_{405}) superiores la media de los testigos sanos, más tres veces el desvío estándar.

Buffer extracción

Tween 20 ..... 0,5 ml/l

Polivinilpirrolidona [PVP] ..... 2 %

Sulfito de sodio ..... 1,3 g/l

1.C) DETECCION DEL ACLSV POR RT-PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERAS POR TRANSCRIPCION REVERSA) (Camdresse, T. IAM Plant Biotech Unit. Plant Patholog Webpages).

Equipo mínimo requerido para RT - PCR Y PCR:

Centrífuga

Tubos para extracción y PCR (tipo eppendorf)

Autoclave

Destilador o equipo de ósmosis inversa (con o sin prefiltro)

Equipo para obtener agua ultrapura

Incubador (hasta 60 ºC)

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

Fuente de poder

Cuba para electroforesis para geles de agarosa

Termociclador

Transiluminador de UV

Máquina de fotos (digital con filtro UV o Polaroid o similar)

Primers y drogas indicados

Materiales

1. Emplear yemas dormidas, flores y/o brotes de yemas invernantes (ramilletes de hojas hasta 5 cm de longitud).
2. Enfriar las muestras (constituidas por cuatro submuestras, tomadas en cada cuadrante de la copa) en el momento que se recogen, ubicándolas en una conservadora. Mantenerlas enfriadas hasta su análisis por DAS-ELISA dentro de las 48 h de recogidas.
3. Antisueros: emplear las diluciones de acuerdo a las especificaciones consignadas por el laboratorio expendedor.

Preparación de la muestra

1. Homogeneizar 500 mg de hojas en 2 ml de PBS-Tween PVP DIECA (PBS 1X; 0,05 Tween 20 + 20 mM dietiditiocarbamato, de sodio., 2 % PVP 25K)
2. Clarificar el homogenato por centrifugación 10 min a 13.000g
3. Colocar 200 µl del sobrenadante en un tubo Eppendorf + 20µl de SDS al 10 %. Incubar 15 minutos a 55 °C
4. Precipitar el SDS con 100 µl de 3M acetato de potasio durante 5 minutos sobre hielo
5. Centrifugar 5 min a 13.000 g. Mezclar el sobrenadante con 700µl 6M NaI (preparado en 1. % $Na_2 SO_3$·) + 10 µl de silica pH 2 autoclavada, a 1,2 g /ml.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

6. Agitar intermitentemente 10 min a temperatura de laboratorio.
7. Centrifugar un minuto a 5000g. Lavar el precipitado dos veces y resuspender en 0,5 ml solución ml de lavado (20 mM Tris pH 7,5; 1mM EDTA; 100 mM NaCl; 50 % etanol)
8. Resuspender el precipitado 400 µl de agua libre de nucleasa e incubar 5 min a 55 °C
9. Centrifugar 2 min a 13.000g y colectar el precipitado de sílica .
10. Colectar 300µl de muestra, transferirla a un tubo limpio y almacenarla a –20 °C

Primers

Primer de transcripción reversa (A52): 5´-CAGACCCTTATTGAAGTCGAA-3´ (posición 7213-7233 on ACLSV P863). El primer de sentido complementario (A53): 5´-GGCAACCCTGGAACAGA-3´

El fragmento amplificado será de 358pb

RT-PCR:

Mezcla de la reacción:

10 mM Tris HCl pH 8,8

1,5 mM $MgCl_2$

50 mM KCl

0,3 % Triton X 100

250 µM dNTPs

1 µM de cada primer

0,5 U AMV transcriptasa reversa

1U Taq polimerasa adicionar en cada tubo

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

Volumen final de la mezcla: 45 µl.

Agregar a esta mezcla, 5 µl del ácido nucleico extraído.

Amplificación. Reacción RT: 15 minutos 42° C; 5 min 92° C. Amplificación: 20 segundos 92° C; 20 segundos 54° C; 40 segundos 72° C, 40 ciclos.

Electroforesis. En gel de agarosa 1,5 %1 corrido con 1X TBE buffer, teñido con bromuro de etidio. El producto final del PCR será de 358 pb

2) *Apple mosaic virus* (ApMV)

2.A) INSPECCION VISUAL

Los síntomas consisten en manchas de diferentes tamaños y colores desde el amarillo hasta el blanco sobre hojas de manzano, más intensamente sobre algunas variedades como Granny Smith, Lord Lambourne, Golden Delicious, Gala y sus clones. Estos síntomas se observan claramente a principios de primavera dado que con temperaturas superiores a 18ºC se enmascaran. También pueden observarse necrosis de los tejidos decolorados hacia fin de primavera

2.B) *ApMV* MEDIANTE DAS - ELISA

Seguir lo indicado en 1.B)

PROTOCOLOS DE PATÓGENOS CUYO TESTADO NO ES OBLIGATORIO.

Si en las inspecciones visuales a viveros, se presentasen dudas respecto a la presencia de los patógenos que se mencionan a continuación, los análisis para su detección en laboratorio se realizarán siguiendo exclusivamente los protocolos que se detallan.

La presencia o ausencia de estos patógenos se informará en el ítem "Observaciones" del Certificado.

BACTERIAS

1) *Pseudomonas syringae pv. syringae*

1.A) INSPECCIÓN VISUAL

Es común observarla en la variedad de pera *Packham's Triumph.* Los primeros síntomas de la enfermedad se observan en floración y consisten en pequeñas lesiones negras sobre la superficie exterior de sépalos, receptáculo y pedicelos. Las lesiones se agrandan rápidamente y producen un marchitamiento de todo el racimo floral y hojas adyacentes. Hojas, flores y frutos recién formados se ponen negros y quedan adheridos al árbol por un tiempo variable, que puede alcanzar el invierno. Esta característica la diferencia de los daños producidos por heladas primaverales en que los órganos afectados caen rápidamente. Generalmente la infección progresa hacia los dardos que, en ataques intensos, mueren. Es así que el árbol toma un aspecto esquelético, con ramas y frutos bien visibles al haber menor producción de follaje. Esto hace que los frutos sean de menor tamaño y no aceptables comercialmente. Las zonas más sombreadas del árbol son las más perjudicadas, es decir, la parte baja e interna de la copa.

1.B) AISLAMIENTO

Medio de cultivo selectivo KBC (King´s) (King *et al.*, medio B modificado por Ovod 1995. En Developments in Plant Pathology. K. Rudolfph T.J. Burr, J. Mansfield, D. Stead, A Vivian,and J. Von Kietzell, eds. Vol 9:526-531).

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

	g/l
Proteasa pectona	20,00
K_2HPO_4	1,50
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1,50
Glicerol	15,00 ml
Agar	15,00

Preparar 900 ml de medio KB y agregar

Ácido bórico autoclavado 1,5 % solución acuosa ..... 100,0 ml

Cefalexina (solución stock 10 mg/ml en agua destilada) ..... 8,0 ml

Cicloheximida (solución stock 10 mg/ml en agua destilada 75 % metanol) 2,0 ml

Los pigmentos flurescentes se producen 1-2 días luego de generarse las colonias (observar a la luz U.V.)

1.C) ESQUEMA GATT

GelatinA: licuación; Aesculin: hidrólisis; Tirosinase: actividad; y Tartrato: utilización). *P. s. pv syringue*: $G^+ A^+ T^- T^-$; *P.s. morsprunorum*: $G^+ A^+ T^- T^-$. Razas intermedias divergen en uno o más de las cuatro pruebas.

2) *Agrobacterium tumefaciens*

2.A) INSPECCIÓN VISUAL

El síntoma típico es la formación de tumores de forma y tamaño variables, que pueden estar localizados en cuello, raíces o tallos de las plantas. La superficie es blanca en agallas nuevas, pero con el tiempo va tomando el color de los tejidos del órgano sobre el cual se

forman y finalmente se oscurecen por la muerte de las células superficiales. Presenta grietas y el tamaño varía desde el de un poroto hasta 15 cm o más de diámetro

2.B) AISLAMIENTO A PARTIR DEL SUELO

Se pesan 2 k de tierra, a los que se añaden 2 l de agua estéril y se dejan en agitación en un matraz durante 16-24 horas a temperatura ambiente. Se centrifugan a continuación porciones de la suspensión a 1.300 r.p.m. durante 30 minutos para eliminar las partículas más groseras y se recoge el sobrenadante que se vuelve a centrifugar a 12.000 r.p.m., resuspendiéndose el precipitado en 400 ml de agua estéril. Se siembran 0,1 ml de dicha suspensión en medios selectivos de los tres biovares de *A. tumefaciens* pudiéndose escoger los de Schroth, et al (1); New y Kerr (2) y Roy y Sasser (3), ya que se desconocerá qué biovar o biovares podemos encontrar en el suelo. Es conveniente hacer diluciones del precipitado resuspendido y sembrarlas también para poderse llegar hasta 10^{-9}.

De esta forma se obtendrán colonias aisladas de *Agrobacterium* que serán más fácilmente purificables y que podrán ser cuantificadas. Las placas se incubarán a 25ºC.

Para el caso de que las poblaciones de *A.tumefaciens* presentes en el suelo sean inferiores a los límites de sensibilidad de la siembra directa, es conveniente utilizar paralelamente el enriquecimiento en medio líquido selectivo. Para ello se usará el precipitado resuspendido en 400 ml de agua, del que se utilizarán tres porciones de 2,5 ml añadiendo a cada una de ellas 2,5 ml de medio selectivo de cada uno de los tres biovares, pero sin agar. Se incubarán en estufa a 25-28ºC y al cabo de 4 días se sembrará 0,1 ml de cada tubo de enriquecimiento en placas de cada jno de los medios selectivos respectivos, haciendo diluciones hasta 10^{-12}.

De esta forma se incrementa la sensibilidad del método de detección con respecto a la siembra directa, aunque la población de *Agrobacterium* presente en el suelo ya no podrá ser cuantificada.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

Aclaración: el aislamiento de *A.tumefaciens* a partir de suelos, es generalmente difícil, debido a que las poblaciones en suelo son escasas. Es decir, que si no se consigue aislar *A.tumefaciens* del suelo es posible que dicha bacteria esté presente, pero que las poblaciones sean demasiado bajas para ponerlas en evidencia con las técnicas utilizadas.

2.C) AISLAMIENTO A PARTIR DE TUMORES

Seleccionar tumores jóvenes o partes de crecimiento reciente (color claro y epidermis fina), lavarlos con cepillo con agua de canilla y luego con agua estéril. Si los tumores son viejos, deben ser desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,5 % por 10 minutos y lavarlos con agua estéril (tres veces). Otra opción para los tumores viejos, consiste en flamearlos.

Dejar secar y escoger zonas tiernas y claras. Cortar fragmentos (con bisturí estéril) de 0,5 cm de lado y "dislacerarlos" en cajas de Petri con 5 ml de agua destilada estéril. Macerar por 30 minutos (el tiempo de los tumores viejos puede ser de hasta 6 horas).

Sembrar una gota del dislacerado en medios de cultivo apropiados (5 aislamientos por muestra). Incubar a 25ºC a la oscuridad (cajas de Petri invertidas).

Los medios recomendados son PYGA o Agar nutritivo, o bien los selectivos para cada biovar (Biovar 1: Schroth et al; Biovar 2: New y Kerr y Biovar 3:Roy y Sasser).

Es conveniente emplear testigos para comparar velocidad de crecimiento.

Pruebas fisiológicas:

Las colonias tipo *Agrobacterium* que aparezcan en las placas, tanto del aislamiento a partir de suelo como a partir de tumores, deberán ser caracterizadas rápidamente mediante la pruebas de Gram, utilización de glucosa y presencia de enzima ureasa.

Luego se debe verificar su poder patógeno

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

Verificación del poder patógeno:

Las cepas de *Agrobacterium* que aparecen en los medios selectivo, resultantes del aislamiento de suelo, como las aisladas a partir de tumores, pueden ser *A.tumefaciens* o *A.radiobacter*, no pudiendo ser distinguidas morfológica, fisiológica, bioquímica ni serológicamente. Como *A.radiobacter* es un habitante común de muchos suelos, será necesario comprobar la virulencia de los cultivos aislados, una vez purificados. La verificación del poder patógeno puede realizarse por inoculación en planta o también detectando el T-DNA en la bacteria mediante hibridación de ácidos nucleicos.

Se aconseja emplear como indicadoras plantas herbáceas, ya que la aparición de tumores es mucho más rápida que en leñosas, pero también puede emplearse sobre la misma planta huésped de la que procede la bacteria problema. Las herbáceas utilizadas son: tomate, *Kalanchoe*, girasol, *Datura,* tabaco, etc, cultivados en invernadero.

Las plantas indicadoras a emplear deben ser jóvenes, en activo crecimiento.

Deben ser inoculadas en el tallo, a 2 ó 3 alturas, empleando una aguja con cultivo puro o suspensión de 10^9 cel/ml (el cultivo debe tener una edad de 24 ó 48 horas, no más). No deben cubrirse las heridas. Mantener las plantas a 20 - 25ºC (nunca a 30ºC porque no aparecen los síntomas buscados).Se deben emplear como testigos, dos plantas, una sin inocular (pero realizando las heridas con aguja con agua destilada estéril) y la otra inoculada con una cepa patrón.

La observación de síntomas (presencia de agallas o tumores) debe verse a partir de los 15 días, a los 30 y a los 60 días. Pasado este período, si todas las inoculaciones fueran negativas y el testigo positivo mostrara tumores se considerarán las cepas como no patógenas. Tener en cuenta que en *Datura* aparecen frecuentemente cicatrizaciones exuberantes que luego no continúan su desarrollo, por lo que se considerará la inoculación negativa.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

A modo indicativo, el tomate suele expresar síntomas a partir de los 21 días y la *Kalanchoe* a partir de los 30 días.

NOTA: las pruebas sobre rodajas de zanahoria ó rábano, no son confiables, ya que pueden dar falsos positivos.

MEDIOS DE CULTIVO PARA *Agrobacterium tumefaciens*

MEDIO PYGA

	g/l
Bactopeptona	5
Extracto de levadura	3
Glicerol	10 ml
Agar	20
Agua destilada	1 l

Ajustar ph a 7 - 7,5. Autoclave 121ºC, 20 minutos.

Autoclavar 20 min a 120ºC

En este medio crecen los *Agrobacterium* de los tres biovares, pero como no es selectivo, también aparece en gran cantidad la flora acompañante. Las colonias de *Agrobacterium* aparecen a las 48 -72 horas y son blancas, mucosas, con formar redondeada y contorno liso.

MEDIO AGAR NUTRITIVO

	g/l
Extracto de carne	3

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

Glucosa	2,5
Peptona	5
Agar	15
Agua	1 l

MEDIO PARA BIOVAR 1 (Medio de Schroth et al)

Consta de 2 partes. La primera se esteriliza en autoclave y la segunda por filtración, a través de filtro de membrana (tipo Millipore) de 0,22 µ.

	g/l
Manitol	10,00
NO_3Na	4,0
$Cl_2Mg\ 6\ H_2O$	2,0
Propionato cálcico	1,2
$SO_4\ Mg.\ 7H_20$	0,1
CO_3HNa	0,075
CO_3Mg	0,075
Agar	15,00
Agua destilada	1 l

Ajustar el pH a 7,1 con HCl 1 N. Autoclavar a 121ºC durante 20 minutos. Dejar enfriar hasta 50 - 55ºC y añadir estérilmente la segunda parte esterilizada por filtración, por filtro de membrana:

Berberina	275 mg/l
Selenito sódico	100 mg/l
Penicilina G (1,625 unidades/mg)	100 mg/

Cicloheximida	250 mg/l
Tirotricina	1 mg/l

Como la berberina y la cicloheximida son poco solubles en agua, conviene disolverlas previamente en 1 ml de alcohol.

En este medio crece el biovar 1 de *Agrobacterium.* Las colonias aparecen a los 2-4 días y son blanco -amarillentas, abombadas, mucosas, de forma redondeada y contorno liso, tomando color rojizo a los 6-7 días.

MEDIO PARA BIOVAR 2 (Medio de New y Kerr)

Consta de 2 partes. La primera se esteriliza en autoclave y la segunda por filtración, a través de filtro de membrana (tipo Millipore) de 0,22 µ.

	g/l
Eritritol	5,0
NO_3Na	2,5
KH_2PO_4	0,1
Cl_2Ca	0,2
ClNa	0,2
$MgSO_4.7H_20$	0,2
Biotina (solución al 0,02 por 100)	10,0 ml
Agar	15,00
Agua destilada	1 l

Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 1 N. Distribuirlo en matraces conteniendo cada uno 95 ml. Autoclavar a 121ºC durante 20 minutos. Dejar enfriar a 50ºC y añadir la segunda parte que consta de las siguientes soluciones de antibióticos esterilizados por filtración y conservadas a 4ºC:

Selenito sódico (solución de 0,1g/10 ml)	1,0 ml
Cicloheximida (solución de 0,1g/10 ml)	2,5 ml
Disolverla previamente en 1 ml de alcohol.	
Bacitracina (solución de 0,1g/10ml)	1,0 ml
Tirotricina (solución de 0,01g/ml)	0,1 ml

Este medio favorece el crecimiento del biovar 2 de *Agrobacterium*. Las colonias aparecen a los 4-5 días y son blancas, abombadas, mucosas, con contorno redondeado y bordes lisos, y toman color rojizo a los 7-10 días.

MEDIO PARA BIOVAR 3 (medio de Roy y Sasser)

	g/l
Adonitol	4
Acido bórico	1,0
Extracto de levadura	0,14
$MgSO_4$	0,2
K_2HPO_4	0,9
KH_2PO_4	0,7
NaCl	0,2
Agar	15,0
Clorotalonil, 4% (p/v) acuoso	0,5 ml
Agua destilada	1 l

En lugar del clorotalonil, puede emplearse cicloheximida (0,250g/l).

Ajustar el pH a 7,2, autoclavar a 121ºC durante 15 minutos, enfriar a 50ºC y añadir las soluciones siguientes después de disolverlas por separado en 10 ml de agua destilada (en forma aséptica):

Cloruro de trifeniltetrazolio	80 mg
D-cycloserina	20 mg
Trimetroprim (con una gota de HCl 1N en el agua destilada)	20 mg

Este medio se utiliza para aislar el biovar 3. Las colonias aparecen a los 3 -4 días a 25ºC. Son de color blanco perla o rosadas con centro rojo.

HONGOS

1) *Venturia inaequalis* y *Venturia pirina*

1.A) INSPECCION VISUAL

En infecciones tempranas si los pedúnculos son afectados las flores y los frutos jóvenes se caen. Los frutos que permanecen en el árbol se deforman. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen en las hojas jóvenes de las yemas florales y en el envés de los sépalos, se manifiesta por típicas manchas, las cuales al principio son translúcidas, más tarde toman una coloración verde olivácea , de aspecto aterciopelado y finalmente se necrosa el tejido afectado. Existen dos tipos de lesiones: lesiones bien definidas, más o menos circulares con las áreas sarnosas verdosas, las que ocurren en el lado superior de la hoja y lesiones tramadas con márgenes indefinidos las cuales pueden cubrir la mayor parte de la superficie inferior de la hoja. En el manzano las manchas sarnosas se presentan preferentemente en la cara superior, mientras que en el peral suelen aparecer con mayor frecuencia en la cara inferior de las hojas. Los ataques intensos producen desecamiento de amplias zonas de las hojas e incluso aceleran su caída, lo que origina debilitamiento del árbol. En flores: las manchas análogas a las de las hojas, se desarrollan sobre todos los órganos de la flor, excepto sobre los pétalos, siendo los más afectados pedúnculos y sépalos. En frutos: se producen manchas similares a las descriptas en las hojas, pero de

menor tamaño y más oscuras, el tejido infectado se suberiza y se desgarra si el fruto todavía está en crecimiento. Las ramitas del año también pueden ser afectadas, principalmente en el peral , pero ello ocurre con menor frecuencia que en los órganos anteriormente citados. Se manifiestan como pequeñas ampollas negruzcas que al final se desgarran.

NEMATODES

A) DETECCION DE NEMATODES EN SUELO

Muestreos.

1. En suelos húmedos tomar las muestras entre los 10 – 30 cm. En suelos secos tomar las muestras entre los 30-60 cm de profundidad. Eliminar los primeros 10 cm de suelo por estar sometidos a excesos de temperaturas.

Emplear un barreno semicilíndrico de 2,5 cm de diámetro. Barrenos-tornillos o herramientas

2. con menor diámetro no deben ser empleadas por riegos a dañar los nematodos durante el muestreo.
3. Tomar las muestras sobre un retículo imaginario de 20 submuestras por parcela de hasta 0,2 ha, y 40 submuestras en parcelas entre 0,2 y 4 ha.
4. Otro posible diseño (más intensivo pero también empleado) es dividir el sitio en unidades de 0,2 ha y tomar 60 submuestras en cada una de esas unidades.
5. Pueden tomarse muestras adicionales en los bordes que rodean el lugar.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

Extracción de los nematodes (Método descripto por Flegg (1967. Annals of Applied Biology 60:429-437) Su desarrollo no requiere equipamiento sofisticado.

1. Mezclar el suelo cuidadosa pero vigorosamente. Tomar 200 g de muestra y mezclarlos con 5 litros de agua. Dejar embeber a menos 1 h.
2. Filtrar a través de un cedazo de poros de 4 mm sobre un recipiente de 10 litros. Conservar los materiales retenidos sobre el filtro.
3. Llenar el recipiente hasta el borde (10 litros). Revolver el contenido para lograr la suspensión del suelo. Dejar reposar sólo 15 seg. y filtrar la suspensión a través de un filtro con poros de 150µm sobre un recipiente de 10 l. Conservar los materiales retenidos sobre el filtro.
4. Volver a llenar el recipiente hasta el borde (10 litros). Revolver el contenido para lograr la suspensión del suelo, dejar reposar 15 segundos y filtrar por un filtro con poros de 150 µm Recoger los restos retenidos sobre el filtro. Volver a repetir la operación. Es decir la muestra de suelo se lava tres veces.
5. Reunir los restos retenidos sobre el filtro en los 3 procesos de filtrado. Lavarlos mediante agua corriente, y transferirlos a un filtro de nylon con poros de 110 µm.
6. Preparar un embudo de vidrio colocando un tubo de goma en su parte inferior cerrado con una pinza.
7. Colocar el filtro con los materiales obtenidos en los filtrados del suelo de la muestra sobre el embudo de vidrio y agregar agua hasta que los restos de los filtrados queden sumergidos.
8. Dejar reposar 24 h y luego colectar alrededor de 25 ml del filtrado, en el tallo del embudo y observar con un aumento de 25 x.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

9. La prueba permite constatar la presencia de nematodes en la muestra. La identificación de especies requiere un taxónomo y las observaciones se efectúan a mayor magnificación.

B) DETECCION DE VIRUS EN NEMATODES

A través de los nematodos puede testarse directamente la presencia de varios virus mediante ¨slash test¨ .

1. Cortar en pequeños trozos un número pequeño (más de 5) de nematodes adultos en buffer fosfato (pH 6,9).
2. Inocular la suspensión obtenida en hojas de *Chenopodium quinoa*.
3. Mantener las plantas inoculadas en invernadero a 18-25 °C en observación hasta aparición de síntomas (2-3 semanas).

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

ANEXO V

MÉTODOS PARA LIBERAR TEJIDOS VEGETALES DE PATÓGENOS

1) TERMOTERAPIA. La termoterapia disminuye la concentración de los patógenos en las plantas y acelera la multiplicación de las célula meristemáticas, permitiendo que algunos ápices (no todos) se encuentren libres de el patógeno al finalizar el tratamiento.

Desarrollo del tratamiento:

1. Para los portainjertos, enraizar estacas de la planta seleccionada para el tratamiento en tierra estéril. Para variedades comerciales injertar la yema de la planta sobre un portainjerto libre de virus en maceta y someter a esta planta a termoterapia.
2. Colocar las plantas enraizadas en cámaras de donde reciben una corriente de aire caliente durante el día y la noche.
3. Temperatura: 37 - 38ºC.
4. Fotoperíodo: de 16 h luz, suministrado por fluorescentes (gro lux)
5. Intensidad lumínica: 48.000µM $S^{-1\ m-2}$ (3,5 – 4,0 klux).
6. Riego: diario.
7. Humedad relativa: entre 60 y 80 %.
8. Tiempo: generalmente requiere entre 2-4 semanas.

2) CULTIVO *IN VITRO.*

2.A) PRODUCCION DE PORTAINJERTOS DE FRUTALES DE PEPITA POR MICROPROPAGACION

El trabajo deberá realizarse bajo condiciones de asepsia. Los procesos generales para obtener materiales libres de patógenos deberán considerar:

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

Materiales:

El material a micropropagar deberá extraerse de *Plantas Iniciales*, *Plantas de Partida*, *Plantas de Reserva* o *Materiales Fundación* que cumplan con todos los requisitos de Calidad Genética y Sanidad Certificada establecidos en la presente Normativa que hayan sido sometidas a termoterapia.

Cultivo:

1. Se deberá iniciar la micropropagación empleando embriones o ápices caulinares de 0,3-0,5 mm (meristema con uno o dos primordios foliares) preferentemente de yemas laterales.
2. Identificar el material sembrado. Las yemas se desarrollan, en general entre 6 a 12 semanas en medios adecuados.
3. Identificar la yema de origen al micropropagar el material generado. Esta identificación corresponderá a todo material micropropagado a partir de esa yema, es decir su línea de descendencia (clon).
4. El número de multiplicaciones *in vitro* no deberá superar los diez (10) ciclos de multiplicación una vez superada la fase de adaptación.
5. Adecuar el medio de cultivo para inducir el desarrollo de raíces.
6. Ajustar condiciones adecuadas para la aclimatación en el invernadero, de las plantas generadas.
7. Los medios de cultivo no deberán contener sustancias nocivas, ni antibióticos que puedan enmascarar la presencia de microorganismos.
8. Será motivo de rechazo el material cultivado en medios contaminados.
9. Realizar un pre-control sanitario antes de la cuarta (4°) multiplicación. El INASE tomará muestras de cada línea de descendencia (clon) para el análisis de los

patógenos que se estableció eliminar. La línea de descendencia que no supere este control será eliminada en su totalidad.

10. El laboratorio autorizado para realizar la micropropagación deberá llevar un Libro de Registro donde se anotarán todas las acciones realizadas durante la micropropagación (número de repiques, medios, número de individuos logrados, toma de muestras para análisis, análisis, resultados, depuraciones, etc.) por cada línea de descendencia.
11. Pre-control varietal. Se tomarán al menos tres (3) plantas por línea de descendencia clonal para el pre-control varietal. El productor las cultivará en sus instalaciones de aclimatación, e informará al Organismo Oficial responsable para que efectué las correspondientes inspecciones., Toda planta fuera de tipo, y las afectadas por plagas, serán eliminadas. Esta depuración debe ser anotada en el Libro de Registro.
12. Al año de desarrolladas las plantas se deberá realizar un segundo control sanitario (indexing y testado) de los clones obtenidos.
13. Cada línea de descendencia deberá estar claramente identificada con la clave (identificación de la yema inicial) que debe figurar en el Libro de Registro. En los recipientes de multiplicación figurará la clave y el número de multiplicación que corresponda.
14. El etiquetado y precintado de las plantas se realizará en envases cerrados de igual número de plantas.
15. En la etiqueta figurará "Producido *in vitro*".

2.B) INJERTO DE PUNTAS DE BROTES

La técnica requiere realizarse bajo condiciones de asepsia. Es especialmente apta para injertar ápices vegetativos de frutales de carozo infectados, sometidas a termoterapia.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

1. Cultivar plántulas de un portainjerto *in vitro* en un agar nutritivo adecuado en oscuridad,
2. Colectar brotes de aproximadamente 1 cm de longitud de la variedad infectada que se desea liberar del patógeno. Desinfectar los brotes en el laboratorio.
3. Remover las hojas inmaduras y luego extraer bajo lupa el ápice vegetativo (el meristema apical y dos o tres primordios foliares: alrededor de 0,1-0,2 mm).
4. Decapitar los portainjertos cultivados *in vitro*.
5. Colocar el ápice vegetativo de la variedad problema, cuidadosamente sobre el extremo decapitado de la plántula portainjerto.
6. Dejar desarrollarse la planta injertada en un medio nutritivo adecuado durante 5 a 15 semanas bajo 16 h luz.
7. Transplantar a suelo

2C) TRATAMIENTOS QUIMICOS *IN VITRO*

Para control de virus pueden incorporase virucidas al medio de cultivo. Los virucidas son específicos, por ejemplo:

- ribavirin es efectivo para eliminar ACLSV.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

ANEXO VI

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE MUESTRAS.

1. No se podrá muestrear cuando la temperatura del aire sea igual o superior a 30ºC o esté por debajo de los 4ºC.
2. Se dividirá el árbol en 4 sectores o cuadrantes, y se deberá tomar una muestra compuesta formada por material vegetal de los 4 sectores.
3. Las muestras serán colocadas en una bolsa cerrada, evitando la entrada de agua. Estas bolsas serán colocadas en heladoras con hielo no suelto o refrigerantes. Las muestras deben llegar al laboratorio refrigeradas.
4. Se enviará de inmediato la muestra al Laboratorio de Diagnóstico autorizado por el INASE, siendo el tiempo de conservación de la muestra no mayor a las 48 horas.

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

ANEXO VII

CERTIFICADO DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES DE PLANTAS FRUTALES DE PEPITA DE VIVERO O SUS PARTES

NUMERO DE MUESTRA: CODIGO DE LA MUESTRA:

CATEGORIA DE PLANTA: FECHA DE INGRESO.

Declaración del Responsable del Laboratorio

Certifico que el diagnóstico de enfermedades de plantas de vivero de ---(sp.)------ se ha realizado aplicando la metodología de análisis aprobada y se ha efectuado en el Laboratorio habilitado por el Instituto Nacional de Semillas, bajo el número de RNCFS:.....

ANALISIS SOLICITADOS:

Apple chlorotic leaf spot virus

Apple mosaic virus

OBSERVACIONES:

Firma del responsable Fecha de análisis

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
Instituto Nacional de Semillas

NOTA: el certificado debe estar escrito a máquina. Si el resultado de un análisis es negativo debe colocarse "Negativo", si es positivo se colocará "Positivo" y si no se ha realizado debe colocarse "_._".

El certificado carece de validez si no tiene membrete oficial del laboratorio y la firma del responsable autorizado, como así también el número y fecha de análisis.

No deben aceptarse certificados con alteraciones, enmiendas o raspaduras, no debidamente salvados.

En Observaciones se colocará la metodología de análisis efectuada.