



"2004 Año de la Antártida Argentina"

*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° 0162439/2004 del Registro del INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS, organismo descentralizado de la SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS del MINISTERIO DE ECONOMIA Y PRODUCCION, y

CONSIDERANDO:

Que a los fines de resguardar la calidad y sanidad de los materiales de propagación de plantas frutales pertenecientes al género *Prunus* 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 de Semillas y Creaciones Fitogenéticas N° 20.247, los laboratorios de análisis deben estar inscriptos en el Registro Nacional de Comercio y Fiscalización de Semillas del INASE.

Que por los artículos 1°, 2° y 3° de la Resolución N° 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.



"2004 Año de la Antártida Argentina"

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

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.

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° 317 del 12 de octubre de 2004.

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

Que el suscrito es competente para dictar el presente acto en virtud de lo dispuesto por la Resolución N° 814 del 3 de septiembre de 2004 de la SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS, que le asigna las funciones inherentes a la presidencia del Directorio del INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS.

Por ello,

EL PRESIDENTE A CARGO DEL INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS

RESUELVE:

ARTICULO 1°.- Apruébase las Normas de Funcionamiento de Laboratorios de Diagnóstico de Enfermedades de Frutales de Hoja Caduca de Vivero y sus Partes pertenecientes al género *Prunus* que como ANEXOS I a VII forman parte integrante de la presente resolución.

ARTICULO 2°.- Es de cumplimiento obligatorio para todos los laboratorios comprendidos en la presente Norma lo dispuesto en la Resolución N° 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



"2004 Año de la Antártida Argentina"

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

datos del propietario, dirección del laboratorio, profesionales responsables, 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 N° 226

DR. 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 *PRUNUS*.

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 N°.....

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

Título expedido porMatr. Prof. N°

Teléfono/Fax/Correo electrónico

Reemplazante autorizado

Nombre y Apellido LE/LC/DNI N°.....

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



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

Título expedido porMatr. Prof. N°

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 *PRUNUS*.

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: Almendro (*Prunus amygdalus* Batsch); Cerezo (*Prunus avium* L.), Ciruelo (*Prunus domestica* L., *Prunus salicina*, *Prunus triflora* y sus híbridos), Damasco (*Prunus armeniaca* L.); Duraznero (*Prunus persicae* L. Batsch), Guindo (*Prunus cerasus* L.).

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 de *Prunus spp.* 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.



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

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, bioquímicos y moleculares 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 *Prunus spp.* citadas y sus partes, toda entidad dedicada a esta actividad, deberá contar con una sección de laboratorio y una de invernáculo, 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.



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

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 y/o moleculares (DAS-ELISA, PCR).
- Sector para la detección de nemátodos.
- 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.

b) - Invernaderos

ASPECTOS REFERENTES A CONDICIONES REQUERIDAS PARA EL
MANTENIMIENTO SANITARIO.



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

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, de una red cuyo tamaño de malla evite el ingreso de insectos vectores de virus.
- Se deberá controlar la correcta conservación de las estructuras y materiales de cobertura.
- Compartimentos separados en el invernadero contruidos para excluir los artrópodos vectores importantes y destinados a mantener el *Material Candidato*, *Plantas Iniciales* y *Materiales Fundación*, *Plantas de Reserva* aislados de otras plantas. Este aislamiento es esencial para *Materiales Candidatos* y *Plantas Iniciales*, *Materiales Fundación*, *Plantas de Reserva* y recomendado para *Plantas Madres de Base*.
- Rotular los compartimentos del invernadero de acuerdo al tipo de material contenido.



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

- 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).



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

- 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.



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

- 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.*; *Meloidogyne spp.*; *Pratylenchus spp.*; *Xiphinema*

 spp.



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

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

PROCEDIMIENTOS: Cada laboratorio y el / los invernáculos deberán contar con una carpeta donde consten todos los procedimientos operativos e instrucciones de trabajo



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

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,



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

categoría, número de lote, fecha y número de certificado de análisis y todos aquellos datos que se consideren 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 4°C, 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.



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

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, N° 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, nematocidas, 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. _

[Handwritten signature]



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 (campo)	leñosas	Plantas de semilla GF305 or Elberta (3/-/2 años)* (moteado verde oscuro hundido en hojas).
------------------------	---------	--

Indicadoras (invernadero)	leñosas	GF305 plantas de semilla (5/20/12 semanas) (moteado verde oscuro hundido en hojas).
------------------------------	---------	---

Indicadoras herbáceas		<i>Chenopodium quinoa</i> , <i>Chenopodium amaranticolor</i> (2-3 semanas).
-----------------------	--	---

Pruebas serológicas moleculares	o	DAS-ELISA (48 horas); RT-PCR (24 horas)
------------------------------------	---	---

Transmisión natural		Desconocida.
---------------------	--	--------------

***Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) (*Illavirus*)**

		Bing (3/-/2 años) (puntos y anillos cloróticos en las hojas; enaciones en forma de hoja, cerca del margen de las hojas, entre las nervaduras)
--	--	---

Indicadoras (campo)	leñosas	Shirofugen (5/-/6-52 semanas) (tejidos necróticos y gomosis alrededor de la yema injertada en ramas de un año).
------------------------	---------	---

		Plantas de semilla GF305 (3/-/2 años) (áreas necróticas irregulares en las hojas infectadas; necrosis de brotes).
--	--	---



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

Indicadoras (invernadero)	leñosas	Plantas de semilla GF305 (5/20/12 semanas) (hojas de tamaños reducidos. Detención del crecimiento en las plantas y acortamiento de entrenudos).
Indicadoras herbáceas		<i>Chenopodium quinoa</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Cucurbita máxima</i> (2-3 semanas). En <i>Cucurbita máxima</i> produce clorosis leves, deformación de brotes axilares y las razas severas, muerte.
Pruebas moleculares	serológicas o	DAS-ELISA (48 horas); PCR anidado (48 horas).
Transmisión natural		Polen, semillas.
<i>Prune dwarf virus</i> (PDV) (<i>Ilarvirus</i>)		
Indicadoras (campo)	leñosas	Bing (3/-/2 años) (en hojas puntos y anillos cloróticos) Shirofugen (5/-/6-52 semanas) (tejidos necróticos y gomosis alrededor de la yema injertada en ramas de un año).
Indicadoras (invernadero)	leñosas	Plantas de semilla GF305 (5/20/12 semanas) (hojas de tamaño reducido. Detención del crecimiento en las plantas y acortamiento de entrenudos).
Indicadoras herbáceas		<i>Cucumis sativus</i> , <i>Cucurbita máxima</i> (2-3 semanas). En esta última indicadora produce clorosis sistémica intensa.
Pruebas moleculares	serológicas o	DAS-ELISA (48 horas); PCR anidado (48 horas).
Transmisión natural		Polen, semillas.

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



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

* 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.

A handwritten signature in black ink, consisting of several stylized, overlapping loops and lines.



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 BIOLÓGICAS (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.

- Puede injertarse tejidos de la planta sospechada de estar infectada en una *planta indicadora* (planta susceptible al patógeno en la induce síntomas característicos),
- o pueden injertarse yemas de la *planta indicadora* en la planta sospechada de estar infectada y observar los síntomas en la ramilla generada.

Conducidas en el campo:

1. Injertar al menos dos (2) yemas (una puede malograrse) de la planta sospechada de estar infectada, en la planta indicadora. Puede realizarse injerto de púa, escudete, brotes lignificados, sectores de corteza, de sectores de raíces, de aproximación, etc.).
2. Usar de 2-3 plantas indicadoras por cada planta en estudio. Una puede morir.
3. Observar en los brotes nuevos de la planta indicadora o los frutos la presencia de síntomas. Los síntomas son normalmente específicos y de elevado valor como diagnóstico para muchas enfermedades.



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

4. Controlar riegos, malezas, plagas (aplicar fungicidas, insecticidas, etc), y demás tareas de manejo, hasta la aparición de síntomas.
5. Las indicadores mantenidas en el campo deberán observarse 2 años o más, y para algunas enfermedades por lo menos 2 periodos de fructificación (4-5 años).

Conducidas en invernadero:

Las plantas indicadores leñosas conducidas en invernadero deben

1. Crecer en suelo estéril, y en contenedores individuales.
2. Para la mejor expresión de síntomas, la temperatura debe variar entre 18-25°C, la humedad relativa entre 60-80 % y el fotoperíodo de 16 h, 3000 lux (48.000 $\mu\text{M S}^{-1} \text{m}^{-2}$). Completar con luz artificial si fuese necesario.
3. Los materiales adecuados para injertar, el número de injertos, plantas indicadores requeridas se indican al tratar "Indicadoras leñosas conducidas en el campo".
4. Deben controlarse los riegos, plagas (aplicar fungicidas, insecticidas, etc), y demás tareas de manejo, durante el tiempo requerido hasta la aparición de síntomas.

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 37°C, no se podrán emplear las manos para inocular, y el inóculo deberá estar en hielo con un antioxidante.



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

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 homogeneizado 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.
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.



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

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 piceta o colocando las hojas bajo agua corriente.
11. Mantener las plantas inoculadas en invernadero bajo condiciones controladas (en general: temperatura 20 - 26°C, 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

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)



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

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 μ l 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 200 μ l) (optativo).

Peachimetro rango de pH de 0 a 14, resolución 0,01, error +/- 0,1 rango de temperatura de 0,5 a 100 $^{\circ}$ C, 1 $^{\circ}$ C de resolución, +/- 1 $^{\circ}$ C de error.

Estufa de cultivo de temperatura regulable (rango temperatura ambiente a 50 $^{\circ}$ C).

Material de vidrio o plástico necesarios.

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

Heladera y freezer (-20 $^{\circ}$ C).

Lector de microplaca (espectrofotómetro 405nm).

Testigos positivos.

Testigos sanos.

PROTOCOLO

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



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

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 distantes 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).
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



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

a 37°C.

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 aquellas 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.



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

BUFFERS PARA DAS-ELISA

<u>PBS (buffer fosfato salino)</u>	<u>Buffer de extracción</u>
<u>(en g/l) pH 7,4</u>	<u>PBS</u>
CINa 8	Tween-20 0,5 ml/l
KH ₂ PO ₄ 0,2	PVP 20 g/l.
Na ₂ HPO ₄ 1,15	Agregar en el momento de usar
KCl 0,2	2% de leche.
NaN ₃ 0,2	<u>Buffer de conjugado (tampón enzima)</u>
	<u>PBS</u>
<u>Buffer de lavado (PBS + Tween-20)</u>	Tween-20 0,5 ml/l
<u>PBS</u>	PVP 20 g/l
<u>Tween-20 0,5 ml / litro.</u>	Ovoalbúmina 2 g/l.
	Agregar en el momento de usar
<u>Buffer de sensibilización</u>	2% de leche.
<u>(tampón coating) (en g/l) pH 9,6</u>	<u>Buffer de sustrato pH 9,8</u>
Na ₂ CO ₃ 1,59	Dietanolamina 97 ml/l
NaHCO ₃ 2,93	H ₂ O 800 ml/l
NaN ₃ 0,2	NaN ₃ 0,2 g/l

II.B) NC-ELISA (ELISA en membrana de nitrocelulosa)

Drogas y equipo mínimo requerido

Drogas para preparar los tampones , sustrato y TBS.

Anticuerpos antivirales



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

Destilador o agua destilada

Tubos tipo eppendorf

Centrífuga

Membrana de nitrocelulosa

Guantes, pinzas

Papel de filtro

Micropipeta

Aplicador de muestras con vacío (optativo)

Recipientes de vidrio

Agitador

PROTOCOLO:

Preparación de la muestra

1. Macerar el tejido vegetal con tampón extracción (generalmente se usa entre 1:2 y 1:10, p/v)
2. Colocar el jugo vegetal en un eppendorf, adicionar cloroformo (1:1) y agitar vigorosamente (vortex).
3. Centrifugar 5.000 g, 5 minutos o bien dejar los tubos en reposo a 4°C por dos horas.
Aplicación de la muestra sobre la membrana de nitrocelulosa
No debe tocarse la membrana de nitrocelulosa con las manos por que las enzimas presentes en la piel producen reacciones que pueden enmascarar los resultados. Usar guantes o una pinza para sostener la membrana.
4. Cortar un trozo de membrana de nitrocelulosa adecuado para la colocación del número de muestras que se esté procesando y sumergir la membrana en TBS.



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

5. Colocar la membrana sobre dos trozos de papel de filtro humedecido con TBS.
6. Pipetear 3 ul del sobrenadante de las muestras y aplicarlo en el área previamente determinada de la membrana.

Nota: Si cuenta con un aplicador de muestras con vacío, colocar el papel de filtro y la membrana sobre el aplicador, cubrir los espacios libres del aplicador y sembrar la muestra. En este caso se puede sembrar hasta 30 ul y aumentar así la sensibilidad de la prueba.

7. Colocar la membrana sobre papel de filtro seco y dejar secar a temperatura ambiente durante 2 horas. En este paso las membranas pueden ser almacenadas hasta el momento de continuar la prueba.

Revelado de la membrana:

8. Sumergir la membrana de nitrocelulosa en 15 ml de la solución de bloqueo (5% leche descremada - LD) en un recipiente de vidrio, propileno, u otro material que no absorba proteínas) y colocarla en agitación lenta (50 rpm) durante 1 hora. El objeto de este paso es evitar la adsorción inespecífica de anticuerpos a la membrana..
9. Enjuagar la membrana una vez con TBS, en agitación durante 10 minutos (+ ó - 100 rpm).
10. Ajustar el anticuerpo antiviral a la dilución óptima (determinada previamente) en 15 ml de tampón inmunoglobulina. Sumergir la membrana e incubar en agitación (50 rpm) a temperatura ambiente durante 3 horas. En este paso, la membrana puede permanecer toda la noche.
11. Lavar la membrana con tampón lavado en agitación a 100 rpm (3 veces durante 10 minutos cada vez).



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

12. Incubar durante 1 a 2 horas en agitación, con el anticuerpo conjugado a la enzima, diluido en buffer inmunoglobulina, a la dilución óptima. Es suficiente 10 ml para una membrana de 12 x 8 cm.
13. Lavar 3 veces con tampón lavado, 10 minutos cada vez y 1 vez con el tampón del sustrato.
14. Colocar la membrana en la solución del sustrato (preparado inmediatamente antes de usar). Las reacciones pueden ser visibles rápidamente, las muestras positivas (infectadas) tomarán color púrpura. Las membranas pueden exponerse al sustrato mientras no aparezca coloración de fondo que enmascara las reacciones positivas.
15. Lavar la membrana con agua destilada. Secarla a temperatura ambiente y almacenarla protegida de la luz directa.

Nota: Si la clarificación de las muestras no resultó adecuada, los restos de clorofila impedirán una buena observación de los resultados. En este caso, después del paso 14 lavar la membrana con 20 ml. de hipoclorito de sodio al 2% en agua bidestilada durante 10 minutos y enjuagar con agua bidestilada.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long vertical stroke at the end.



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

BUFFERS PARA NC-ELISA:

<p>TBS</p> <p>TRIS 0,02 M</p> <p>NaCl 0,15 M</p> <p>PH 7,5</p> <p>5X TBS (solución stock)</p> <p>TRIS base 12,1 g</p> <p>NaCl 43,8 g</p> <p>Disolver en 800 ml de agua bidestilada, ajustar a pH 7,5 con HCl 1M y completar el volumen a 1 litro con agua bidestilada.</p> <p>Solución de bloqueo</p> <p>TBS</p> <p>Blotto 20% (v/v)</p> <p>Blotto: 10 g de leche en polvo descremada y 0,02 g de NaN_3, diluidos a 100 ml en agua destilada.</p> <p>Tampón extracción</p> <p>TBS</p> <p>0,01% (p/v) DIECA</p> <p>0,01% (p/v) EDTA</p>	<p>Tampón inmunoglobulina (para diluir la Ig y el conjugado enzimático):</p> <p>TBS</p> <p>10% (v/v) de blotto</p> <p>0,05% (p/v) de albúmina de suero bovino</p> <p>ó TBS + 20% (v/v) de Blotto</p> <p>Tampón sustrato pH 9,5</p> <p>0,1M TRIS-HCl</p> <p>0,1M NaCl</p> <p>5 mM MgCl_2</p> <p>Sustrato</p> <p>NBT 30 mg/ml de dimetil formamida</p> <p>70% en agua bidestilada. Agitar vigorosamente.</p> <p>BCIP 15 mg/ml de dimetil formamida.</p> <p>Agitar vigorosamente.</p> <p>Ambos sustratos se pueden preparar como soluciones stock y almacenarlos a 4°C en frasco oscuro durante 3 meses.</p> <p>Mezclar, en el momento de usar, 1 ml de</p>
--	---





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

Tampón lavado TBS 0,05% (v/v) tween-20	cada sustrato por cada 100 ml de tampón.
--	--

PROTOCOLOS DE DETECCIÓN DE VIRUS LISTADOS EN ANEXO III

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

1.A) INSPECCIÓN VISUAL

Apple chlorotic leaf spot virus fue descrito inicialmente en manzano, luego fue encontrado en todos los frutales analizados. Es uno de los virus de los frutales más comunes en el mundo. Muchos cultivares infectados son asintomáticos. ACLSV induce síntomas muy variables, dependen de la raza del virus y la tolerancia del cultivar. En duraznero aparecen moteados verde oscuro, hundidos, en las hojas. En ciruelos y damascos puede inducir pequeños puntos rojo oscuro en los frutos. En cerezo produce distorsión de frutos en infecciones mixtas con PNRSV. Algunas razas producen rajaduras en la corteza de los ciruelos mientras otras causan incompatibilidad en damascos y durazneros.

1.B) DETECCIÓN DEL ACLSV POR RT-PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERAS POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA) (Camdresse, T. IAM Plant Biotech Unit. Plant Pathology Webpages).

Equipo mínimo requerido para RT - PCR Y PCR:

Centrífuga

Tubos para extracción y PCR (tipo eppendorf)



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

Autoclave

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

Equipo para obtener agua ultrapura

Incubador (hasta 60 °C)

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. Antisuecos: 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



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

3. Colocar 200 μ l del sobrenadante en un tubo Eppendorf + 20 μ l de SDS al 10 %. Incubar 15 minutos a 55 °C
4. Precipitar el SDS con 100 μ l de 3M acetato de potasio durante 5 minutos sobre hielo
5. Centrifugar 5 min a 13.000 g. Mezclar el sobrenadante con 700 μ l 6M NaI (preparado en 1. % Na_2SO_3) + 10 μ l de sílica pH 2 autoclavada, a 1,2 g /ml.
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 μ l de agua libre de nucleasa e incubar 5 min a 55 °C
9. Centrifugar 2 min a 13.000g y coleccionar el precipitado de sílica .
10. Coleccionar 300 μ l 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



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

250 μ M dNTPs

1 μ M de cada primer

0,5 U AMV transcriptasa reversa

1U Taq polimerasa adicionar en cada tubo

Volumen final de la mezcla: 45 μ l.

Agregar a esta mezcla, 5 μ l 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

1.C) 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:



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

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.
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) durazneros libres del virus analizado), tres controles positivos (tejidos de durazneros 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

2) *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)

2.A) INSPECCIÓN VISUAL

PNRSV diferencia numerosas razas. Algunas variantes no inducen síntomas. Según la raza, PNRSV reduce el vigor de las plantas sistemáticamente infectadas, induce marchitez de ramillas que se extiende de ápice hacia abajo (dieback), la corteza se torna rugosa. Induce muerte de yemas aéreas y radicales que redundan en menor producción sin que los frutos alteren su tamaño, sabor, textura o color. El síntoma quizás más orientativo, lo constituyan



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

pequeñas manchas necróticas que aparecen algunas las hojas dispersas en la copa, durante el primer año de la infección, que se desprenden dejando pequeños orificios. En los años subsiguientes este síntomas puede aparecen en escasas o ninguna hoja. Otras razas pueden producir manchas cloróticas en las hojas, deformación de frutos en cerezos, líneas cloróticas y mosaico en hojas de ciruelos, etc.

2.B) PNRSV MEDIANTE DAS-ELISA: seguir lo indicado en 1.C

2.C) PNRSV por INMUNOCAPTURA RT-PCR combinada con PCR ANIDADO (2001. Helguera et al. Journal of Virological Methods (95): 93-100)

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.

Preparación de la muestra

1. Homogenizar las muestras en buffer extracción PBS-T: NaCl (140 mM), KH₂PO₄ (2mM), Na₂HPO₄ (8 mM) y KCl (2 mM), Tween 20 (0.5 ml/l) + 20 g/l polivinil-pirrolidone (PVP) 40 000; pH 7.4), 1:10 (w/v).
2. Adicionar leche descremada (2% w/v), sulfito de sodio (1.3 g/l) y ácido diethyl-ditio carbámico (DETC) (1.713 g/l).
3. Mantener el extracto a 4°C (hasta 9 días).



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

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. Analizar las muestras por triplicado
3. Incorporar por placa cuatro (4) controles negativos (tejidos provenientes de cuatro (4) durazneros libres del virus analizado), tres controles positivos (tejidos de durazneros infectados con el virus analizado) y un control blanco (buffer).
4. Leer las reacciones en un lector de ELISA tres (3) horas después de agregado el sustrato.
5. Considerar DAS- ELISA positivas las lecturas de absorbancia (A_{405}) superiores a la media de los testigos sanos, más tres veces el desvío estándar.

IC-RT-PCR-PCR anidado

Immunocaptura

1. Sensibilizar placas de ELISA siguiendo la técnica señalada.
2. Lavar las placas de ELISA con PBS-T tres veces durante 3 minutos.
3. Adicionar la muestra e incubar toda la noche a 4°C.
4. Lavar las placas cinco (5) veces con PBS.

Transcripción reversa

1. Colocar 50 μ l de la mezcla de reacción RT-PCR en las celdillas de las placas de ELISA

Mezcla:

5 μ l (2.5 mM) primer 1 (cggatccagggcccATGGTTTGCCGAATTTGAATC)

5 μ l (2.5 mM) primer 2 (gcgaattctcgagctCTAGATCTCAAG)

10 μ l buffer reacción (5x) ('Access RT- PCR system' kit de Promega usado según las



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

indicaciones del fabricante)

1 µl AMV-RT DNA polimerasa (avian myeloblastosis virus reverse transcriptase) (5 U/µl)

1 µl *Tfl* (*Thermus flavus*) DNA polimerasa (5 U/µl)

1 µl de la mezcla de dNTP (40 mM)

2 µl mg SO₄ (25 mM)

Agua destilada libre de nucleasa hasta volumen final 50 µl

2. Incubar a 47°C, 50 min. (síntesis del cDNA)

3. Tranferir la mezcla de reacción de la placa de ELISA a los tubos de microcentrífuga donde se realiza la PCR

PCR

Amplificación: 3 min, 92°C; luego 35 ciclos a 92°C, 30 seg; 58°C, 30 seg; 68°C, 60 seg y extension final, 10 min, 68°C.

Electroforesis En gel de agarosa al 1%, buffer TAE, teñir con bromuro de etidio. Leer bajo luz UV RT-PCR. Amplifica un segmento de 675 pb

PCR ANIDADO

Usar 1µl de la mezcla de IC-RT-PCR que adiciona DNA.

Mezcla de reacción:

1,2 µl (2.5 mM) de la mezcla de dNTP

1.2 µl MgCl₂ (25 mM)

1.2 (2.5mM) primer 3 (AGAGGTGAGGACGACAGAGG)

1.2 µl (2.5 mM) primer 4 (CTAAATCGGAGGGAGGTTCCG)

1.2 µl buffer de la mezcla (10 x)

0.2 µlTaq-DNA polimerasa (5 U/µl)



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

Agua destilada libre de nucleasa hasta volumen final 12 µl.

Amplificación: 3 min a 92°C; luego 40 ciclos de 92°C, 20 seg; 60°C, 20 seg; 72°C, 20 seg; y incubación final 10 min a 68°C.

Electroforesis. En gel de agarosa 1.5%, buffer TAE. Teñir con bromuro de etidio y leer bajo luz UV. Amplifica un fragmento interno de 260 pb.

3) *Prune dwarf virus (PDV)*

3.A) INSPECCIÓN VISUAL

Los síntomas inducidos por PDV varían con la raza presente y la especie de *Prunus*. En guindos y cerezos generalmente aparecen anillos o moteados amarillos en las hojas durante la estación de la infección, que devienen en necróticos y caen. Esta síntoma puede no aparecer el año siguiente y 2 o 3 años después aparecen manchas moteados amarillos y verdes oscuros y caen. En plantas con infecciones crónicas se produce reducción de frutos por muerte de yemas. En cerezos las hojas aparecen estrechas y rugosas.

Los ciruelos infectados desarrollan hojas estrechas y gruesa, se producen rosetas (entrenudos cortos).

En durazneros parece producir solo detención del crecimiento. En infecciones mixtas con PNRSV en crecimiento es severamente retardado y la producción reducida. Estas plantas no presentan síntomas foliares.

3.B) PDV por INMUNOCAPTURA RT-PCR combinada con PCR ANIDADO (2001.

Helguera *et al.*, J. Phytopathology (149):1:3)

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



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

de la copa) en el momento que se recogen, ubicándolas en una conservadora. Mantenerlas enfriadas hasta su procesamiento dentro de las 48 h de recogidas . El mismo extracto de planta se emplea en PCR anidado y DAS-ELISA.

Preparación de la muestra:

1. Homogeneizar el tejido en 1:10 v/v en buffer fosfato salino \pm 0,05 % Tween-20 (PBS-T); NaCl (140 mM); KH₂PO₄ (2 mM); Na₂HPO₄ (8 mM) y KCl (2 mM); Tween 20 (0.5 ml/l) + 20 g/l polivinilpirrolidone; pH 7.4; leche en polvo descremada (2% w/v), sulfito de sodio (1.3 g/l) y acido dietilditiocarbamico (1.713 g/l).

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. Analizar las muestras por triplicado
3. Incorporar por placa cuatro (4) controles negativos (tejidos provenientes de cuatro (4) durazneros libres del virus analizado), tres controles positivos (tejidos de durazneros infectados con el virus analizado) y un control blanco (buffer).
4. Leer las reacciones en un lector de ELISA tres (3) horas después de agregado el sustrato.
5. Considerar DAS- ELISA positivas las lecturas de absorbancia (A_{405}) superiores la media de los testigos sanos, más tres veces el desvío estándar.

IC-RT-PCR-PCR anidado

Immunocaptura

1. Sensibilizar placas de ELISA siguiendo la técnica señalada



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

2. Lavar las placas de ELISA con PBS-T tres veces por 3 min..
3. Adicionar la muestra e incubar toda la noche a 4°C.
4. Lavar las placas cinco (5) veces con PBS

Transcripción reversa

Mezcla de reacción RT-PCR:

1 µM primer 1

1 µM primer 2

10 µM buffer de reaction (5X)

5 U AMV-RT DNA polimerasa

5 U Taq DNA polimerasa

800 µM dNTPs

1 mM MgSO₄

primer 1 (CGGGATCCAGGGCCCATGGGGAAAGCCATTAAATCTGG)

primer 2 (GCGAATTCTCGAGCTTCATCCACTGACTATTTTATCCATCG),

1. Incubar a 47° C, 50 min. (síntesis del cDNA)
2. Tranferir la mezcla de reacción de los a tubos de microcentrifuga de 500µl donde se realiza la PCR.

PCR

Se realiza en tubos de microcentrifuga de polipropileno de 500 µl

3 min a 92°C, (30 s at 92°C, 30 s at 58°C) 40 ciclos y 45 seg a 68°C..

PCR ANIDADO

Usar 1µl de la mezcla de IC-RT-PCR como molde de DNA.

Mezcla de reacción:



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

250 mM de la mezcla de reacción dNTP's

2,5 mM MgCl₂

250 μM primer 3

250 μM primer 4

50 mM KCl

10 mM Tris-Cl (pH 9)

1 unit Taq-DNA polimerasa

Volumen final 20 μl

primer 3 (GTCTGTTTCCGAGTGGATGC)

primer 4 (GGAATGTCGGGTTGAAAAGC)

Amplificación. 4 min a 92°C; (30 seg a 92°C; 30 seg a 55°C; 30 seg a 72°C) 40 ciclos y 10 min a 68°C.

Electroforesis. . En gel de agarosa 1.5%, buffer TAE. Teñir con bromuro de etidio y leer bajo luz UV. Amplifica un fragmento interno de 400 pb.

3.C) PDV MEDIANTE DAS -ELISA: seguir lo indicado en 1.C



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

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* y *Pseudomonas syringae pv.morsprunorum*

1.A) INSPECCIÓN VISUAL

Los síntomas son evidentes en primavera. Se producen manchas necróticas circulares y angulares en las hojas que pueden estar rodeadas de un halo amarillo. En ocasiones inducen su ruptura dejando las hojas desflecadas. Se forman canchros en hojas (ocasionalmente), ramas y troncos. Las hojas y ramas rodeadas por un canchro pueden marchitarse y morir en verano o comienzos de otoño, y caer con canchros con goma color ámbar. Las hojas y los frutos son atacados ocasionalmente pero el ataque puede ser económicamente importante en años con prolongada humedad y calor durante o después de la floración. Si son atacados, los frutos presentan lesiones de color marrón con margen húmedo. Se producen fallas de yemas florales y de madera (muerte de yemas), o pueden abrirse en primavera y morir en verano. Se presenta una fase de "olor ácido", fermentado, que puede ocurrir antes de que aparezcan los canchros, pero la madera se tiñe de castaño oscuro. Los canchros no observan por debajo del terreno.

El *pv syringae* produce canchros en todos los *Prunus*, mientras que el *pv.morsprunorum* los produce en cerezo, guindo y ciruelo.



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

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. Rudolph T.J. Burr, J. Mansfield, D. Stead, A Vivian, and J. Von Kietzell, eds. Vol 9:526-531).

	g/l
Proteasa pectona	20,00
K ₂ HPO ₄	1,50
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	1,50
Glicerol	15,00 ml
Agar	15,00

Preparar 900 ml de medio KB y agregar

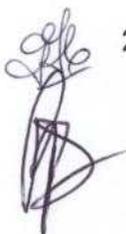
Ácido bórico autoclavado 1,5 % solución acuosa	100,0 ml
Cefalexina (solución stock 10 mg/ml en agua destilada)	8,0 ml
Cicloheximida (solución stock 10 mg/ml en agua destilada 75 % metanol)	2,0 ml

Los pigmentos fluorescentes 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*





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

2.A) INSPECCIÓN VISUAL

Luego de la infección algunas razas de *Agrobacterium* inducen una anormal proliferación celular que redundará en la formación de un tumor en el caso de *Agrobacterium tumefaciens* (agalla de corona) y de excesivas raíces adventicias en el caso de *A. rhizogenes* (raíces en cabellera). La agalla de corona induce detenimiento en el crecimiento de las plantas por el menor desarrollo de sistema radicular y disturbios en el flujo de nutrientes.

Las razas patógenas de *Agrobacterium* contienen un plásmido que es el responsable de inducir de tumor (Ti) o de raíces(Ri)

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 biovars 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 biovars 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 25°C.

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



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

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 25-28°C 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.

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 25°C 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.



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

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

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 - 25°C (nunca a 30°C porque no aparecen los síntomas buscados). Se deben emplear como testigos, dos plantas, una sin



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

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.

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 121°C, 20 minutos.

Autoclavar 20 min a 120°C



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

En este medio crecen los *Agrobacterium* de los tres biovars, 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 forma redondeada y contorno liso.

MEDIO AGAR NUTRITIVO

	g/l
Extracto de carne	3
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 ₃ Na	4,0
Cl ₂ Mg 6 H ₂ O	2,0
Propionato cálcico	1,2
SO ₄ Mg. 7H ₂ O	0,1
CO ₃ HNa	0,075
CO ₃ Mg	0,075
Agar	15,00



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

Agua destilada 1 l

Ajustar el pH a 7,1 con HCl 1 N. Autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Dejar enfriar hasta 50 - 55°C 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/l
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 ₃ Na	2,5
KH ₂ PO ₄	0,1
Cl ₂ Ca	0,2
ClNa	0,2



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

MgSO ₄ .7H ₂ O	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 121°C durante 20 minutos. Dejar enfriar a 50°C y añadir la segunda parte que consta de las siguientes soluciones de antibióticos esterilizados por filtración y conservadas a 4°C:

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 ₂ HPO ₄	0,9
KH ₂ PO ₄	0,7



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

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 121°C durante 15 minutos, enfriar a 50°C 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
Trimetoprim (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 25°C. Son de color blanco perla o rosadas con centro rojo.

3) Phytoplasmas

3.A) INSPECCION VISUAL

Los síntomas inducidos por los fitoplasmas incluyen: amarillamiento de las hojas (yellows) con o sin enrojecimiento en algunas áreas o puntos rojos, acortamiento de ramillas (entrenudos cortos). Estos síntomas también pueden ser causados por virus. Pero los fitoplasmas también inducen escobas de brujas (masa de finas ramillas producidas desde yemas axilares prematuramente desarrolladas), virescencia (flores que permanecen verdes) y filodia (flores transformadas en estructuras semejantes a hojas). Causan disminución de cosechas e importante muerte de plantas.



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

3.B) DETECCIÓN DE PHYTOPLASMAS POR NC-ELISA

Debido a la presencia en los fitoplasmas, de variados determinantes antigénicos comunes, los sistemas de detección serológicos carecen de especificidad para identificar a un fitoplasma en particular. Para su detección específica se debe recurrir a métodos alternativos como la hibridación con sondas de DNA o la amplificación por PCR de regiones variables del genoma.

Materiales:

La distribución de los fitoplasma en sus hospedantes no es homogénea. Los brotes con síntomas evidentes resultan tejidos adecuado para realizar el muestreo. Muestreos realizados en épocas de temperaturas cercanas a 40 °C mantenidas durante 15 días o más, evidencian disminución en el nivel de reacción.

Desarrollo de la prueba:

Obtención de extractos

1. Homogeneizar 1 gr de pecíolos y/o nervaduras principales de hojas sintomáticas y de hojas sanas, en tampón TBS; 2- mercaptoetanol 0,1 % 1/1, p/v.
2. Realizar diluciones seriadas del homogenato en el mismo tampón
3. Bloquear la membrana durante 2 horas, a temperatura ambiente, con una solución de TBS; 5% LD (leche descremada); 0,2% Tritón X-100.
4. Incubar la membrana, en caja de Petri, durante toda la noche en 10 ml de TBS; LD 2%; 1/5000 de suero anti-fitoplasma.

Seguir el protocolo desarrollado en NC-ELISA (del presente anexo)

3.C) FITOPLASMAS por MICROSCOPIA ELECTRONICA

Los *Phytoplasmas* colonizan el floema y la búsqueda debe realizarse en esta tejido



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

Materiales:

Tejidos que contengan floema

Procedimiento

1. Cortar trozos de material vegetal de ~ 2 x 3 mm que incluya vasos de conducción.
2. Fijarlos sumergiéndolos en 2% gluteraldehido/ 2,5% paraformaldehido en tampón cacodilato de Na 0,1M pH 7,3. Dejar como mínimo, 2h a temperatura ambiente.
3. Lavar con tampón cacodilato de Na 0,05M, pH 7,3 durante 10 min, dos veces.
4. Posfijar en O₄Os 1% en tampón cacodilato de Na 0,05M, pH 7,3 durante 2 h.
5. Lavar en agua destilada 5 min, dos veces.
6. Contrastar con solución acuosa de acetato de uranilo 0,5 %. Dejar en esta solución durante toda la noche, como mínimo.
7. Enjuagar en agua destilada 1 min, dos veces.
8. Deshidratar en serie de acetona 30, 50, 70, 90% durante 10 min en cada concentración, y 2 veces 15 min en acetona 100%.
9. Preincluir en mezcla de resina (SPURR low viscosity)/ acetona 100% 1/1 de 2 - 4 h a temperatura ambiente.
10. Dejar durante una noche en resina pura.
11. Colocar el tejido en moldes con resina pura en estufa a 50 -70°C durante 24 - 48 horas.
12. Realizar cortes ultrafinos de ~80nm (dorados-plateados) en ultramicrotomo, con cuchilla de vidrio o diamante.
13. Recoger los cortes en rejillas de 100-200 mallas (mesh) cubiertas con película de Formvar.
14. Contrastar los cortes con solución de citrato de plomo 2% (Reynolds), pH12 durante 10-15 min, en cajas de Petri, tapadas, que contengan perlas de hidróxido de Na o K (para adsorber el CO₂).
15. Enjuagar con ~30 gotas de agua destilada (hervida durante 5 min y dejar enfriar tapada).



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

16. Posar las rejillas sobre gotas de uranilo 2% durante 10-15 min dejando el espécimen en contacto con la solución.

17. Secar y observar. Buscar en el xilema la presencia de células bacterianas con las características de *Phytoplasmas*

4) *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa Wells et al (1987) es una bacteria con característica de pared celular ondulada, confinada al xilema, y distribución irregular en los hospedantes. Es responsable de la disminución de la calidad y cantidad de fruta producida, y de la decrepitud y muerte de las plantas infectadas.

4.A) INSPECCION VISUAL

La escaldadura del borde de las hojas del almendro puede identificarse por su característica necrosis en los bordes de las hojas, síntoma cuya expresión se intensifica a fines de verano. El síntoma expresado débilmente en primavera y comienzos de verano, puede confundirse con alteraciones nutricionales.

4.B) AISLAMIENTO de *Xylella fastidiosa* a PARTIR de ALMENDROS

CULTIVO *in vitro*

Materiales:

Recoger las muestras desde mediado hasta fines de verano (febrero-marzo). Se emplean:

1. Pecíolos de hojas sintomáticas recién muestreadas.
2. Varillas del año con hojas sintomáticas (0,8 -1 cm de diámetro x 14-16 cm largo) recién muestreadas.

Desarrollo de la prueba:

Desinfección superficial



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

- Pecíolos: sumergir en alcohol 70 %, 1 min; luego en ClONa 1 %, 1-2 min, y lavar 3 veces en agua destilada estéril.
- Ramas: proceder de igual manera o sumergirlas en alcohol 70 % y flamearlas sobre el mechero.

Extracción de la bacteria

Debido a la dificultad que plantea su aislamiento se han propuesto distintos procedimientos para extraerla del tejido infectado.

1. Trabajar en cámara de flujo laminar. Presionar trozos (3-5 mm) de pecíolos con una pinza hasta la formación de una gota en su extremo inferior. Posar el pecíolo sobre el medio de cultivo agarizado de manera de depositar la gota extraída.
2. Macerar pecíolos en mortero estéril con medio de cultivo sin agarizar (guardar una alícuota del extracto y analizar por DAS-ELISA para confirmar la presencia de la bacteria). Rastrillar el extracto bacteriano obtenido, sobre el mismo medio de cultivo agarizado;
3. Por arrastre de las bacterias presentes en el xilema. Sellar (plastilina u otro elemento) el extremo inferior de la ramilla a un tubo estéril dentro de un kitasato. Saturar el extremo superior con el medio de cultivo sin agarizar. Forzar su paso por el xilema de las ramillas mediante vacío. (guardar una alícuota del extracto y analizar por DAS-ELISA para establecer la presencia de la bacteria). Rastrillar el extracto obtenido con una varilla sobre el mismo medio de cultivo agarizado.
4. Incubar a 27-28°C en oscuridad.

Nota. Las colonias de *X. fastidiosa* se comienzan a evidenciar bajo la lupa (60x) a los 7-15 días de la siembra. Son circulares, de bordes lisos, blanquecinas, de 0,8-1,0 mm en su máximo desarrollo. Analizar por DAS-ELISA, suspensiones de las colonias que se desarrollen con lentitud



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

Medio de cultivo semiselectivo: PW (Davis 1981. Curr. Microbiol. 6:309-314)

	g/l
Soytona	2,00
Tryptone	4,00
Citrato trisodio	1,00
Succinato disódico	1,00
Cloruro de hemino	10,00
Almidón soluble	2,0
KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	1,5
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,4
Agar.	15,00

4.C) *Xylella fastidiosa* por DAS-ELISA (desde almendros)

Materiales:

1. Recoger hojas sintomáticas.
2. Colocarlas en una bolsa de polietileno, identificar la bolsa y enfriarlas (4 °C) en el campo.

Mantenerlas en esas condiciones hasta su análisis dentro de las 48 h de recogidas.

Desarrollo de la prueba (Nome *et al.*, 1980. Phytopathology 70:746-749)

Obtención de extractos

1. Homogenizar (2 - 3 g) de pecíolos y nervadura central de las hojas con síntomas, en 20 ml tampón de extracción pH 7,4.
2. Filtrar el homogenizado por doble gasa.
3. Centrifugar el filtrado a 5.000g, 20 min.
4. Resuspender el precipitado en 2 ml de tampón extracción + ovoalbúmina 0,2 %.



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

5. Los extractos que no se analicen inmediatamente, puede conservarse a -20°C.

Inmunoanálisis (DAS-ELISA)

1. 1 Emplear como controles negativos, extractos de pecíolos de seis almendros libres de la bacteria (DAS-ELISA negativos).
2. Como control positivo una dilución 1/100 en tampón extracción, de una suspensión $A_{600} = 0,25 (10^7-10^8 \text{ ufc/ml})$ de *X. fastidiosa*.

Seguir el protocolo descrito en DAS-ELISA (Anexo III, Capítulo II, 2a) teniendo en cuenta las siguientes indicaciones

3. Leer las reacciones cada media hora en un lector de ELISA. Considerar DAS-ELISA positivas las lecturas de absorbancias (A_{405}) superiores a la media de los testigos sanos, más tres veces el desvío estandar.

Tampón extracción pH 7,4

PBS ... 1X

PVP 2 %

4.D) *Xylella fastidiosa* EN ESPECIES SILVESTRES SINTOMATICAS O NO, por DAS -ELISA

La modalidad de multiplicación de *Xylella fastidiosa* varía en distintas especies asintomáticas: la falta de evidencia de su multiplicación; multiplicación sin movimiento sistémico; o multiplicación con movimiento sistémico. Debido al comportamiento señalado y la distribución irregular de la bacteria en sus hospedantes, se analiza parte aérea y radicular de cada hospedante.

Materiales:

1. Recoger plantas completas.
2. Separar raíces, tallos, hojas, flores si las hubiere.



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

3. Lavar cuidadosamente las raíces.

Desarrollo de la prueba:

Obtención de extractos

Seguir el protocolo señalado para el análisis de los almendros.

Inmunoanálisis (DAS-ELISA)

Seguir el protocolo desarrollado en DAS-ELISA, descrito en el presente anexo.

4.E) DETECCIÓN DE *Xylella fastidiosa* POR PCR

Materiales:

Tallos de 7-8 cm de largo x 1-1,5 cm de diámetro.

Desarrollo de la prueba:

Extracción de la bacteria

Extraer las células bacterias lavando el xilema de la muestra con tampón mediante el empleo de vacío.

1. Atravesar un tallo de ~ 7-8 x 1-1,5 cm en el centro de un tapón de goma. Adherir por debajo un tubo para receptor el tampón.
2. Ubicar en un kitasato conectado a la bomba de vacío, sellando con plastilina la parte superior e inferior del tapón.
3. Colocar en el extremo superior del tallo 2ml de buffer SCPAP con una micropipeta. Agregar al extracto obtenido (luego del pasaje del tampón) agregar PVPP acidificado 5%.

Extracción del DNA.

1. Tomar 400 µl del extracto y agregar 400 µl de tampón lisis más 1 mg de lysozima. Incubar a 37°C durante 20 minutos.
2. Agregar Proteinasa K 0,5 mg, e incubar durante 1h 30m a 37°C.



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

3. Adicionar 320 µl de CTAB (2%) + NaCl (4.1%); 190 ul de NaCl (5M); 65 ul de EDTA (0.5M, Ph 8)
4. Mantener en baño térmico a 65°C durante 15 a 20 min.
5. Agregar 1 volumen de cloroformo/ alcohol isoamílico (24/1). Agitar vigorosamente.
6. Centrifugar a 10.000 rpm, 10 min. Retener la fase acuosa.
7. Realizar una segunda extracción con 1 volumen de fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico (25/24/1). Agitar vigorosamente.
8. Centrifugar a 10.000 rpm, 10 min. Retener la fase acuosa.
9. recipitar el DNA con 0,6 vol. de isopropanol. Mantener a temperatura ambiente 1h.
10. Centrifugar a 4°C a máxima velocidad en microcentrífuga (12.000 rpm) y resuspender el precipitado en 50 ul agua estéril.

PCR:

Mezcla de reactivos

Primers RST31 Y RST32 (Minsavage *et al.*, 1994. *Phytopathology* 84: 456- 461).

En un tubo eppendorf (0.5 ml) colocar por cada reacción:

5 µl de tampón PCR

5 µl de MgCl₂ (25mM)

5 µl de primer RST 31 (25 uM)

5 µl de primer RST 33 (25 uM)

5 µl de dNTPs (2.5 mM)

1U de TaqDNA polimerasa

20 µl de agua estéril

5 µl DNA muestra



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

Desnaturalización: 94°C, 30 seg (2 min el primer ciclo); hibridación: 50°C, 30 seg. síntesis: 74°C, 30 seg, 10 ciclos. 2a etapa: desnaturalización: 94°C, 30 seg; annealing 55°C, 30 seg; síntesis 74°C, 30 seg. 30° de ciclos

Electroforesis

En geles de agarosa 1%, correr con tampón TAE 1X durante 30 min a 100V. Teñir con una solución de bromuro de etidio (0.5 ug/ml) durante 10 a 15 min y observar en transiluminador. Se debe visualizar una banda de aproximadamente 740 pares de bases.

Buffer SCPAP

Succinato disódico 1g/l
citrato trisódico 1 g/l
fosfato monosódico de K 1g/l
ascorbalato de sodio 0,02M.

4.F) *Xylella fastidiosa* POR DIBA (DOT IMMUNO BILDING ASSAY)

Materiales:

Pecíolos y nervaduras de hojas de *Prunus spp.* sintomáticos

Inmunoanálisis

1. Cortar pecíolos y nervaduras de 5 o más hojas, colocarlos en ependorff y cubrirlos con tampón extracción 4TB.
2. Dejarlos toda la noche a temperatura ambiente.
3. Colocar los ependorff a baño María a 100 °C durante 5 minutos.
4. Colocar 2,5 ul de muestra sobre membrana de nitrocelulosa (incluir testigos sanos y enfermos).
5. Dejar secar la membrana durante 30 minutos a temperatura ambiente. En este punto se puede guardar la membrana por varios días o proseguir con la prueba



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

6. Lavar rápidamente con TTBS hasta que el colorante sea retirado.
7. Colocar la membrana sumergida en TTBS durante 1 minuto en microondas.
8. Eliminar el TTBS y colocar la membrana en solución de bloqueo durante 1 ó 2 horas en agitación.
9. Lavar la membrana con agua destilada durante 15 min, 2 veces.
10. Lavar la membrana con TTBS durante 15 min, 2 veces.
11. Colocar el anticuerpo anti- *Xylella* diluido en buffer IgG, dejar en agitación toda la noche a temperatura ambiente.
12. Lavar la membrana con agua destilada durante 15 min 2 veces y luego con TTBS durante 15 min, 2 veces
13. Colocar el conjugado GAR (goat anti-rabbit con fosfatasa alcalina) en tampón IgG. Incubar en tampón agitación a temperatura ambiente, durante 4 horas.
14. Lavar la membrana con agua destilada durante 15 min 2 veces y luego con TTBS durante 15 min, 2 veces.
15. Disolver 1 pastilla de sustrato (NBT y BCIP) en 10 ml de agua destilada en oscuridad y agregarlo a la membrana. Identificar los controles positivos y negativos.
16. Detener la reacción lavando con agua corriente.

Tampón 4TB (pH 6,8)	TTBS 10X (pH 7,5)	Solución de bloqueo
Tris HC 2,5M	Tris HCl 0,5 M	TTBS + % 5 leche descrema
SDS 8 %	CINa 0,2 M	
Mercaptoetanol 4%	Tween 20 0,5	
Glicerina 40 %		
Azul de bromotimol 0,1		



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

4.G) *Xylella fastidiosa* por TINCIÓN de MADERA AFECTADA (Hutchins *et al.*, 1951. USDA HANDBOOK 10).

Procedimiento (este es un procedimiento orientativo, por lo que es NECESARIO confirmar en laboratorio con otros métodos citados en la Norma)

1. Extraer finas estrías de madera de ramas de 2-3 años.
2. Sumergirlas en una solución de 500 ml alcohol etílico absoluto más ácido clóridrico concentrado

Las zonas afectadas aparecen como puntos o estrías teñidas de rojo púrpura bien definido o rojo oscuro.

4.H) *Xylella fastidiosa* por MICROSCOPIA ELECTRONICA

La pared externa ondulada de *Xylella fastidiosa* le confiere una morfología característica cuya visualización en cortes ultrafinos del xilema apoya otros análisis para su diagnóstico.

Materiales:

Tejidos que contengan haces vasculares (xilema)

Procedimiento:

Seguir el protocolo descrito para la detección de *Phytoplasmas*

5) *Xanthomonas arboricola pv. pruni*

5.A) INSPECCIÓN VISUAL

En duraznero, la cara inferior de las hojas infectadas presentan áreas irregulares o circulares de color verde pálido o amarillo con el centro quemado. Estas manchas pronto se hacen evidentes en la cara superior y se oscurecen (púrpura, marrón o negras). El tejido adyacente se torna



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

amarillo. Las áreas enfermas se desprenden, y la hoja aparece agujereada. Pueden aparecer síntomas atípicos como manchas foliares grises en la cara superior o áreas translúcidas.

En los frutos, aparecen manchas circulares pequeñas de color marrón, las que luego toman aspecto de hundidas, con márgenes con apariencia húmeda (water - soaked). Los frutos aparecen con picaduras y rajaduras, las que sólo son visibles en infecciones severas.

En las ramas aparecen canchros (en primavera y verano) con áreas tipo "water soaked", con una longitud desde 1 hasta 10 cm. La corteza se presenta decolorada. Se observa dieback.

En ciruelo, el síntoma de hoja agujereada es más pronunciado que en duraznero.

En frutos, los síntomas varían, pudiendo ser grandes, lesiones negras hundidas, o pequeños hoyos, con gomosis.

Los canchros en ciruelo y damasco son perennes, (no así en duraznero).

En cerezo, los síntomas son similares que en duraznero. Pero, en infecciones tempranas, los frutos se distorsionan.

5.B) AISLAMIENTO

Materiales:

Yemas, canchros (de ramas) del verano (muestrearlos en otoño), o peciolo (muestrearlos en primavera - verano)

Procedimiento:

1. Esterilizar la superficie de las secciones enfermas sumergiendo los materiales en alcohol 95%, durante 30 segundos. Luego sumergir en hipoclorito de sodio al 1% 2 minutos.
2. Enjuagar varias veces en agua destilada estéril y dejar secar.
3. Colocar trocitos en cajas de Petri con el medio de cultivo selectivo.
4. Cultivar en oscuridad a 25°C.



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

Medio de cultivo "XPS". (Civerolo, E.L.; Sasser, C. Helke and d. Burbage. 1982. Selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni**. Plant Diseases 66:39 - 43)

*es el nombre anterior de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

	g/l
Acido algínico	2
8 - azaguanina	0,2
Acido nicotínico	2
Cisteína	3
KH ₂ PO ₄	0,8
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄	0,1
Agar	15

Luego de autoclavar, agregar:

Clorotalonil	80 mg
Kasugamicina	16 mg

5.C) DAS - ELISA

Seguir el protocolo indicado en el presente anexo

HONGOS

1) *Chondrostereum purpureum* (= *Stereum purpureum*)

1.A) INSPECCIÓN VISUAL



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

El nombre "hojas plateadas" se presenta en *Prunus* como consecuencia de espacios de aire entre la epidermis y las células en empalizada. Las nervaduras y los márgenes de las hojas plateadas se tornan castaño oscuro. Las fructificaciones del hongo son comunes en la madera muerta de árboles caídos o en pie o en los cortes de la poda. Son anuales, resupinados y se elevan desde el sustrato de 2-4 cm, de un grosor de 1 a 2,5 cm y se los encuentra agrupados. La superficie del esporóforo es blanco-grisacea a violácea, y la superficie del himeneo púrpura brillante cuando fresca y castaño violacea cuando vieja.

En estados incipientes del declinamiento de la planta, aparece en las zonas afectadas la madera teñida de castaño rojizo. En los estados finales la madera es seca, liviana, blanca con moteado amarillo pálido.

1.B) AISLAMIENTO

Materiales:

Trozos de madera infectada

Procedimiento:

1. Esterilizar la superficie de las secciones enfermas sumergiendo los materiales en alcohol 95% + 10 %de hipoclorito der sodio.
2. Separar estrías con un bisturí estéril en caja de Petri estéril.
3. Transferir las estrías al medio selectivo.
4. Cultivar en oscuridad a 22°C.

Medio selectivo

Beever, D.J. 1969. Nutrición of the silver leaf pathogen *Stereum purpureum* (Pers.) Fr. N.Z.

Sci. 12: 268-275.



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

	g/l
KH ₂ PO ₄	1
Peptona	1
Dextrosa	15
Agar	15
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Extracto de malta	5
Agua destilada	1 l

2) *Verticillium dahliae*

2.A) INSPECCION VISUAL

En damasco y almendros aparece un inesperado marchitamiento en las hojas de una o más ramas al comienzo del verano. Las hojas se tornan bronceadas y ajadas y permanecen adheridas a las ramas, semejando banderas. El síntoma se inicia en la base de las ramas y avanza hacia el ápice, hasta que toda la rama es afectada. Los árboles jóvenes pueden morir, pero las ramas marchitas de plantas adultas pueden volver a dar hojas al año siguiente si no sufren nuevos ataques. El hongo muere en la parte aérea de las plantas durante el verano, pero permanece viable en las raíces. Las infecciones recurrentes se deben a la reactivación del hongo desde las raíces o a nuevos ataques iniciadas desde los microesclerocios (órganos de resistencia) presentes en el suelo. En durazneros, puede causar severos daños en árboles jóvenes. En cerezos la marchitez aparece en las hojas de ramillas de un año. Las plantas



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

devienen decrepitas, enanizadas y los frutos pequeños. En todas las especies aparecen estrías de color marrón o negro en el xilema de las ramas afectadas que pueden involucrar toda la circunferencia de la rama. El color de este síntoma es más débil en cerezos.

2.B) AISLAMIENTO de *Verticillium dahliae*

Las temperaturas elevadas (sobre 30°C) mantenidas durante dos semanas inactivan el hongo en la parte aérea de las plantas

Materiales

Trozos de ramillas del año con hojas sintomáticas y pecíolos de hojas con síntomas, muestreadas desde inicio de brotación, hasta que la temperatura no exceda los 30°C, 15 días.

Aislamientos:

Desinfección de pecíolos

1. Sumergir los pecíolos alcohol 70 % (~20-30 seg).
2. Colocarlos en ClONa 1 %, (6% Cl activo), 1-2 min, y lavar 3 veces en agua destilada estéril.
3. Trozar los pecíolos (5 -6 mm) y sembrarlos en agar alcohol + estreptomicina.

Desinfección de ramas (1 a 2 cm de diámetro)

1. Mojar los trozos de ramas (~10 cm) en alcohol 70 %.
2. Flamear.
3. Separar la corteza de las ramas, retirar pequeñas virutas de madera y sembrar en agar alcohol + estreptomicina (50ppm), pH 7,0



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

Cultivo

1. Incubar a 25°C en oscuridad. Observar cada 4-5 días los aislamientos. Facilitar la visualización de las colonias microesclerociales de *V. dahliae*, iluminando las cajas de Petri tangencialmente a través del agar
2. Repicar las colonias de *V. dahliae* (microesclerociales) aisladas, a agar papa glucosado (APG), pH 7,0 y cultivarlas a 25°C. Si es necesario inducir la fructificación, incubar los cultivos bajo luz NUV a la misma temperatura.

MEDIOS DE CULTIVO:

AGAR ALCOHOL

200 ml agar agua

1,5 ml etanol

50 ppm estreptomicina

pH: 7

Aclaración: el etanol y la estreptomicina se incorporan luego del autoclavado. El primero por filtración (filtros de Millipore de 0,22 µm) y la segunda se incorpora al medio cuando éste alcanza una temperatura de 50°C.

AGAR PAPA GLUCOSADO

200 g papas cortadas

 20 g glucosa



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

11 g agar agar

pH:7

2.C) *Verticillium dahliae* MEDIANTE NC-ELISA

Materiales:

1. Trocitos de corteza de ramas del año verdes con hojas sintomáticas.
2. Controles negativos: los mismos materiales de plantas libres de infección.
3. Controles positivos: homogeneizados de micelio de la colonia del hongo que originó el As

Desarrollo de la técnica:

1. Homogeneizar moliendo con aire líquido 1 gr de peciolos de hojas con síntomas, o de corteza verde de ramas del año cuyas hojas presentan síntomas (1/5 p/v),
2. Centrifugar el extracto a 5.000 g, 5 min.
3. Seguir el protocolo descrito NC-ELISA del presente anexo, teniendo en cuenta:
4. Incubar la membrana en tampón bloqueo, durante toda la noche a temperatura ambiente.

3) *Phytophthora* sp.

3.A) INSPECCION VISUAL

Putridión de corona y raíces. Es una destructiva enfermedad en todo el mundo, causadas por varias especies de *Phytophthora*. Se la confunde comunmente con la asfixia de raíz, por exceso de humedad.

Aparece en suelos pesados y mal drenados que retiene agua por períodos extensos. En general se observan una reducción del vigor y el crecimiento de las plantas, y amarillamiento en las hojas. Las plantas infectadas pueden declinar lentamente o colapsar en una estación. Las plantas que declinen gradualmente, sus hojas se tornan rojizas en otoño.

Removiendo la corteza de las plantas sintomáticas, alrededor de la base del cuello algunos



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

centímetros bajo tierra, se observan áreas marrón bien rojizas separadas del tejido sano (blanco) por un borde neto. Síntomas similares se encuentran en la raíz. Este borde neto que separa tejido enfermo de sano distingue la pudrición causada por *Phytophthora* de otras alteraciones como asfixia, o daños por frío.

3.B) *Phytophthora sp.* POR AISLAMIENTO

Materiales:

1. Tomar un sector del tejido que contenga área enferma y sana, y desinfectar la superficie lavando prolongadamente bajo agua corriente.
2. Sumergir el material en hipoclorito de sodio 0,5% durante 30 segundos. Lavar tres veces en agua estéril.
3. Remover el tejido podrido y lavar tres veces en agua estéril.
4. Trozar el material y sembrar en medio adecuado.

Medio selectivo PARPH (Jeffers and Martin. 1986. Plant diseases 70: 1038- 1043)

Difco corn meal agar 17 g

Agua destilada 1 l

Autoclavar, enfriar a 45°C y agregar por cada litro:

Pimaricina 5 mg (20 mg al 50%)

Hymexasol 50 mg (99,4%)

PCNB 100 mg (134 mg al 75 %)

3.C) DETECCIÓN DE *Phytophthora sp.* POR MATERIALES TRAMPA (cebos)

Este patógeno puede aislarse del suelo mediante materiales susceptibles usados como "trampas" o cebos.



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

Materiales:

Frutos como paltos, manzanos o cítricos.

Procedimiento:

1. Colocar muestras de suelo en un contenedor con un nivel de agua mantenido varios centímetros sobre la superficie del suelo.
2. Emplear agua destilada o desionizada o agua libre de altas concentraciones de iones (cobre o cloro).
3. Enterrar parcialmente los frutos en el suelo - muestra cuidando que el agua no cubra los frutos.
4. Mantener en invernadero a temperatura entre 18 - 25°C hasta aparición de áreas de pudrición castañas.
5. Aislar *Phytophthora* tomando pequeños trozos de tejido en el margen de las lesiones y sembrar en medios apropiados.

Las trampas pueden emplearse como receptáculos de suelo - muestra, siendo el procedimiento el siguiente:

1. Colocar una muestra de suelo mojado dentro de un pequeño orificio hecho en frutas de tamaño grande como melones, manzana u otras.
2. Cubrir luego el orificio.
3. Incubar entre 20 y 28°C, alternando 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.
4. Esperar la aparición de áreas de pudrición castaña (entre 3 y 10 días).
5. Aislar según se ha indicado.

NEMATODES

A) DETECCIÓN DE NEMATODES EN SUELO



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

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.
2. Emplear un barreno semicilíndrico de 2,5 cm de diámetro. Barrenos-tornillos o herramientas con menor diámetro no deben ser empleadas por riesgo 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.

Extracción de los nematodos (Método descrito 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.



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

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 un 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 coleccionar alrededor de 25 ml del filtrado, en el tallo del embudo y observar con un aumento de 25 x.
9. La prueba permite constatar la presencia de nematodos en la muestra. La identificación de especies requiere un taxónomo y las observaciones se efectúan a mayor magnificación.

B) DETECCIÓN 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 nematodos adultos en buffer fosfato (pH 6,9).
2. Inocular la suspensión obtenida en hojas de *Chenopodium quinoa*.



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

3. Mantener las plantas inoculadas en invernadero a 18-25 °C en observación hasta aparición de síntomas (2-3 semanas).

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and strokes, located to the left of the text.



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 células meristemáticas, permitiendo que algunos ápices (no todos) se encuentren libres de el patógeno al finalizar el tratamiento.

Desarrollo del tratamiento:

1. Enraizar estacas de la planta seleccionada para el tratamiento en tierra estéril,
2. Colocar las plantas enraizadas en cámaras de donde reciben una corriente de aire caliente durante el día y la noche.
3. Temperatura: los *Prunus* tienen intolerancia a los tratamientos prolongados con calor, pero normalmente puede tolerar estos tratamientos prolongados si se utiliza calor moderado (34-38 °C).
4. Fotoperíodo: de 16 h luz, suministrado por fluorescentes (gro lux)
5. Intensidad lumínica: $48.000\mu\text{M S}^{-1}\text{m}^{-2}$ (3,5 – 4,0 klux).
6. Riego: diario.
7. Humedad relativa: entre 60 y 80 %.
8. Tiempo: generalmente requiere entre 3-4 semanas.

2) CULTIVO *IN VITRO*.

2.A) PRODUCCION DE PORTAINJERTOS DE *PRUNUS* POR MICROPROPAGACION

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

Materiales:



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

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



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

- 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 efectúe 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 incorporarse virucidas al medio de cultivo. Los virucidas son específicos, por ejemplo:

- ribavirin es efectivo para eliminar ACLSV en *Prunus*
- DHT sólo actúa sobre PNRSV.



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

ANEXO VI

PROCOLO DE EXTRACCION DE MUESTRAS.

1. No se podrá muestrear cuando la temperatura del aire sea igual o superior a 30°C o esté por debajo de los 4°C.
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.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a vertical stroke.



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

ANEXO VII

CERTIFICADO DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES DE FRUTALES DE HOJA CADUCA DE VIVERO O SUS PARTES PERTENECIENTES AL GENERO *PRUNUS*.

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

Prunus necrotic ringspot virus

Prune dwarf 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.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the bottom.