



643

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

BUENOS AIRES,

12 DIC 2003

VISTO el Expediente N° S01:0102859/2003 del Registro 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 de vid 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 que realice y del material que pretenda analizar.

Que la presente norma complementa la Resolución N° 742 de fecha 5 de octubre de 2001 del Registro de la ex-SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTACION, aprobatoria de las Normas para la Producción, Comercialización e Introducción de Plantas de Vivero de Vid y/o sus Partes.

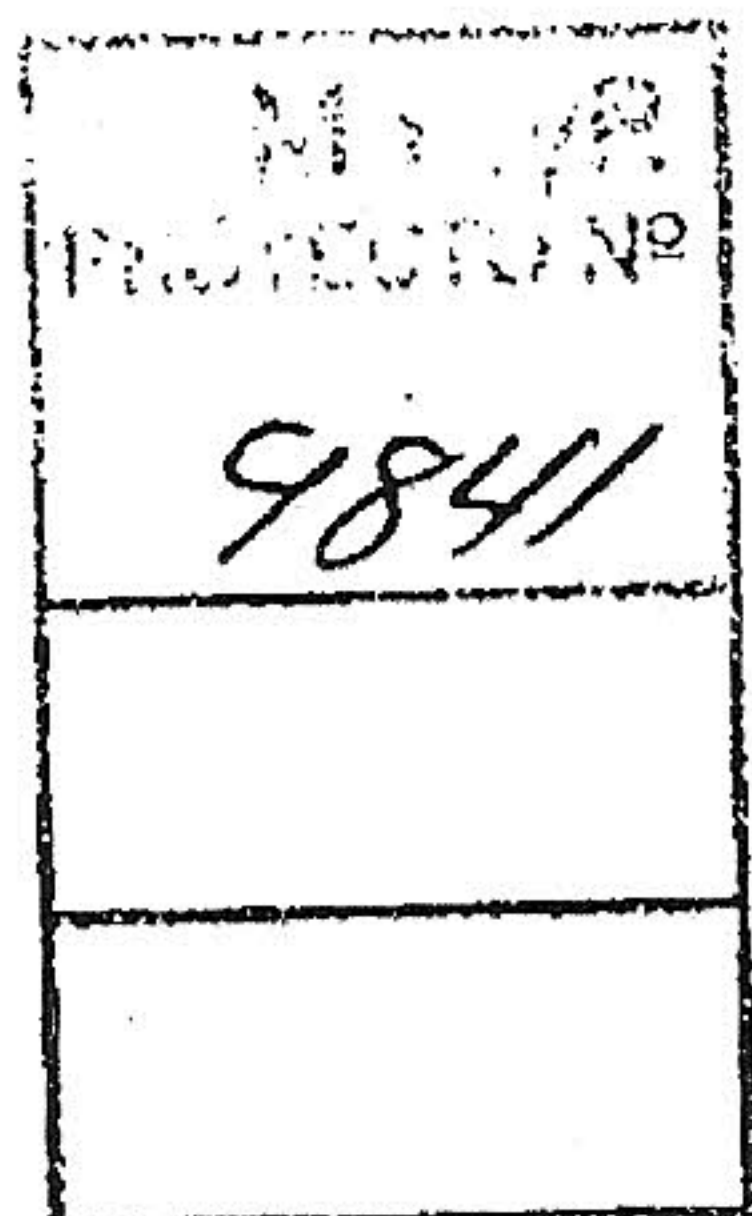
Que en virtud de lo establecido por el Artículo 13 de la Ley N° 20.247, los laboratorios de análisis deben estar inscriptos en el Registro Nacional del Comercio y Fiscalización de Semillas.

Que por los Artículos 1°, 2° y 3° de la Resolución N° 42 de fecha 6 de abril de 2000 del Registro de la ex-SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTACION se crean las categorías que contemplan a dichos laboratorios.

Que el Anexo I de la Resolución 42/2000, establece que los laboratorios deberán cumplir previamente a su inscripción, con normas establecidas en la materia.

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° 305 de fecha 12 de agosto de 2003.

Que la Dirección de Legales del Area de AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS, dependiente de la Dirección General de Asuntos Jurídicos del MINISTERIO



MC



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

DE ECONOMIA Y PRODUCCION ha tomado la intervención que le compete.

Que el suscripto es competente para dictar el presente acto en virtud de lo establecido en el Decreto N° 25 del 27 de mayo de 2003.

Por ello,

EL SECRETARIO DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS

RESUELVE:

ARTICULO 1°.- Apruébanse las NORMAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES PARA PLANTAS DE VIVERO DE VID Y/O SUS PARTES, que como Anexos I, II, III, IV, V, VI y VII forman parte integrante de la presente resolución.

ARTICULO 2°.- Los interesados deberán presentar la solicitud, que como ANEXO I forma parte integrante de la presente, ante el Laboratorio Central de Análisis de Semillas, de la Dirección de Calidad del ex-**INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS** dependiente de esta Secretaría, en la que se consignarán datos del propietario, dirección del laboratorio, profesionales responsables, instalaciones, equipos e instrumental y demás aspectos que se fijan en la presente norma.

ARTICULO 3°.- La habilitación de laboratorios, que estará a cargo de la Dirección de Calidad, queda supeditada a la verificación de la capacidad técnica, instrumental y operativa del solicitante para la realización de los análisis. La Dirección de Calidad deberá solicitar la intervención del **LABORATORIO DE SANIDAD VEGETAL (L.S.V.)** dependiente del **SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA**, para evaluar los aspectos de su competencia.

ARTICULO 4°.- Los diagnósticos de enfermedades que podrán realizar los laboratorios estarán condicionados por la idoneidad técnica del responsable y la disponibilidad de instrumental y equipo mencionados en los ANEXOS II y III que forman parte integrante de la presente norma.

ARTICULO 5°.- Una vez obtenida la habilitación el interesado deberá proceder a su inscripción ante el Registro Nacional del Comercio y Fiscalización de Semillas cumplimentando la reglamentación pertinente.

ARTICULO 6°.- Queda prohibida en el ámbito nacional la actuación de cualquier laboratorio que no cumplimente los requisitos establecidos en la presente resolución.

2

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y ALIMENTOS
9841

MC

3



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

La falta de inscripción en el Registro Nacional del Comercio y Fiscalización de Semillas, hará pasible a los mismos de las sanciones previstas en el Artículo 41 de la Ley N° 20.247. La falta de cumplimiento de cualquiera de las exigencias establecidas en la presente resolución facultará a la SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS a cancelar la habilitación del laboratorio, lo que dará lugar a la caducidad de la inscripción en el Registro Nacional del Comercio y Fiscalización de Semillas.

ARTICULO 7°.- Los certificados emitidos por los laboratorios habilitados tendrán validez en el orden nacional y deberán ser confeccionados en el tipo de formulario autorizado que se detalla en el ANEXO VII de la presente resolución.

A petición de un laboratorio habilitado el Laboratorio Central de Análisis de Semillas ensayará por sí mismo o por terceros las muestras cuestionadas emitiendo su veredicto al respecto.

ARTICULO 8°.- El Laboratorio Central de Análisis de Semillas, la Dirección de Calidad del ex- INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS, actuando en forma conjunta con el Laboratorio de Sanidad Vegetal dependiente del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROLIMENTARIA, organismo descentralizado dependiente de la SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS en los temas de su competencia, llevarán a cabo la auditoría y la supervisión de los laboratorios inscriptos, debiendo éstos cumplimentar las directivas que se emitan sobre criterios de interpretación de resultados, procedimientos analíticos y ejecución de los ensayos de verificación.

ARTICULO 9°.- Toda modificación en la situación del laboratorio en cuanto a propietario, domicilio, instalaciones y/o profesionales responsables, deberá comunicarse en forma fehaciente al Laboratorio Central de Análisis de Semillas dentro de los TREINTA (30) días corridos de producida.

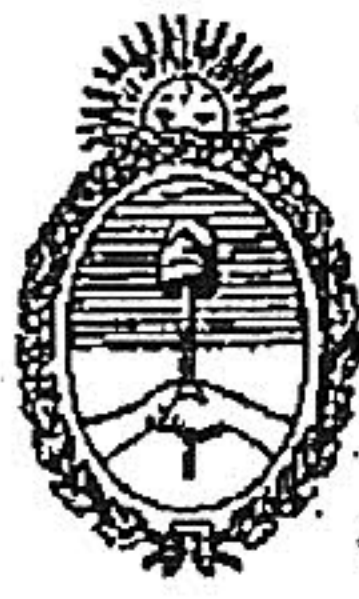
MG

ARTICULO 10.- Comuníquese, publíquese, dese a la Dirección Nacional del Registro Oficial y archívese.

RESOLUCION N° 643

Ing. Agr. MIGUEL SANTIAGO CAMPOS
Secretario de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

4
4



643

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO I

SOLICITUD DE HABILITACION DE LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES
PARA PLANTAS DE VIVERO DE VID Y/O SUS PARTES.

PROPIETARIO:

Nombre y Apellido o razón social:.....
Domicilio.....CP.....Localidad.....Provincia.....
.....Teléfono/Fax/Correo electrónico.....

M.E.yP. PROYECTO Nº 9841

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

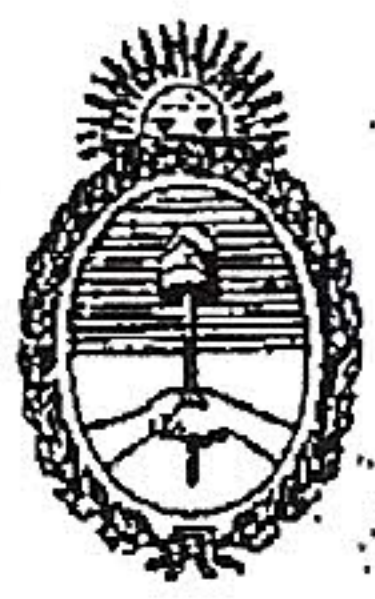
Nombre y Apellido LE/LC/DNI N°
DomicilioCP.....LocalidadProvincia
Título expedido porMatr. Prof. N°

INSTALACIONES:

Agregar plano o croquis.

MC

55



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO I

INSTRUMENTAL Y EQUIPOS

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

M.E.y.P. PROYECTO Nº
9841

.....

Firma del propietario o representante

.....

Firma del profesional responsable

.....

Firma del reemplazante autorizado

MC



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO II

NORMAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES PARA PLANTAS DE VIVERO DE VID Y/O SUS PARTES

1-DISPOSICIONES GENERALES:

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

- a) Plantas cabeza de clon, original y de reserva
- b) Material de fundación.
- c) Plantel de premultiplicación.
- d) Plantas madres de certificadas.
- e) Plantas certificadas.

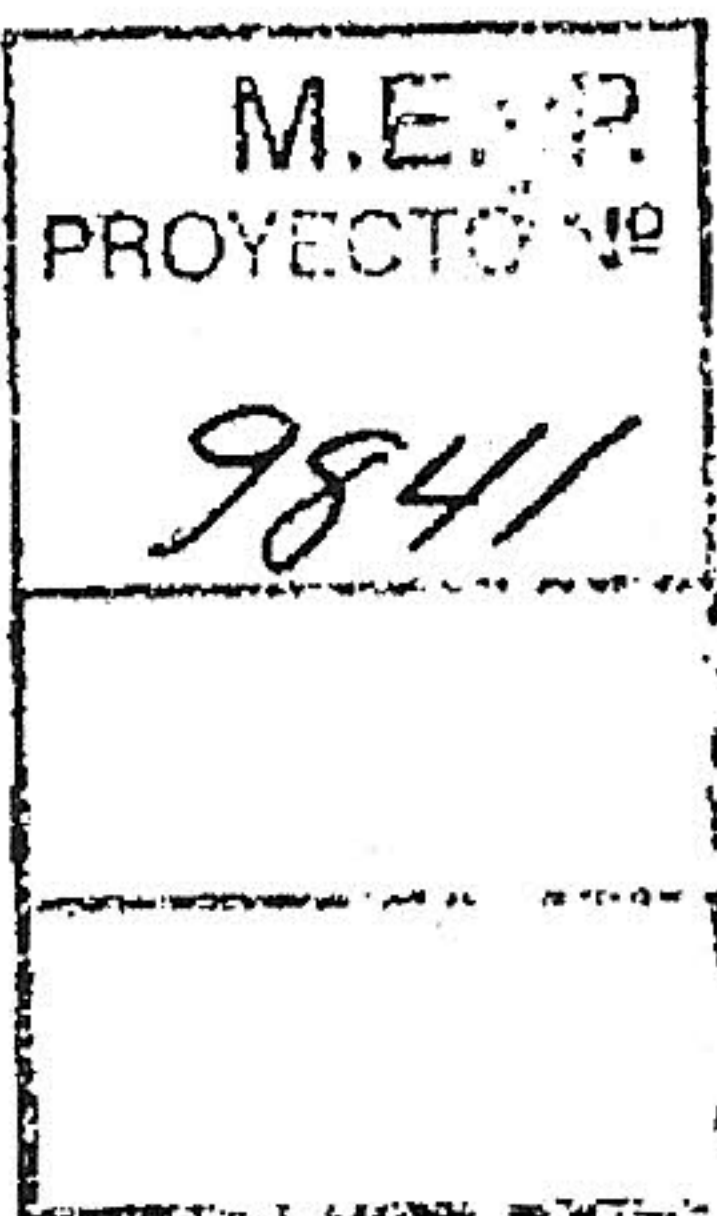
La duración de los diagnósticos (meses-horas) y su repetición se harán según el Anexo II de la Resolución N° 742 de fecha 5 de octubre de 2001 de la ex-SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTACION.

Los laboratorios de diagnóstico de enfermedades para plantas de vivero de vid y/o sus partes, deberán comprometerse a cumplir las normas que la presente establece 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.

Tanto el director técnico como el reemplazante autorizado deberán cumplimentar y acreditar su capacidad e idoneidad técnica en la detección mediante métodos biológicos, bioquímicos y moleculares de enfermedades de plantas de vivero de vid y/o sus partes, para las cuales solicite habilitación. Los mismos avalarán con su firma los certificados que expidan haciéndose responsables de su contenido.

Los analistas (o técnicos) deberán poseer entrenamiento e idoneidad en el diagnóstico de





Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO II

enfermedades transmisibles por injerto de plantas de vivero de vid y/o 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 de vid y sus partes, toda entidad dedicada a esta actividad, deberá contar con una sección de laboratorio y, en caso de dedicarse a efectuar métodos biológicos, una sección de invernáculo, cámaras de forzadura, cámaras frigoríficas, viveros a campo con protecciones, plantel de plantas indicadoras libres de virus, y un parque de introducción, todos adecuadamente equipados.

El ingreso de personas ajenas a estas instalaciones debe limitarse al mínimo necesario para disminuir los riesgos de contaminación.

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

a) LABORATORIO:

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. Incumbe al laboratorio cumplir con las exigencias vigentes en materia de salud y seguridad.

El laboratorio deberá disponer de los siguientes sectores:

- Sector para lavado de material.
- Sector para almacenamiento de productos químicos.
- Sector para almacenamiento de material de vidrio y plástico.

M.E.P. PROYECTO Nº 9841

MC



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO II

- Sector para el desarrollo de técnicas bioquímicas y/o moleculares (DAS-ELISA, RT – PCR, etc.).
- Sector de oficinas.

b) INVERNACULOS:

b.1) Invernáculo de Vidrio:

Con un habitáculo anexo para recepción y registro de muestras. A prueba de insectos, con calefacción y refrigeración, control automático de temperatura entre 17° y 30° C y alta luminosidad (mayor a 3.000 lux) adecuado para desarrollar las siguientes tareas:

Vegetación de plantas indicadoras libres de virus para injertos herbáceos.

Vegetación de material indexado por injerto en verde para una adecuada expresión de los síntomas.

Multiplicación de plantas de vid.

Enraizamiento de estacas.

Semanalmente se realizará el monitoreo de todo el invernáculo para el control de insectos.

Los invernáculos deberán contar con algún sistema de riego interno por goteo o de riego manual.

b.2) Invernáculo de plástico:

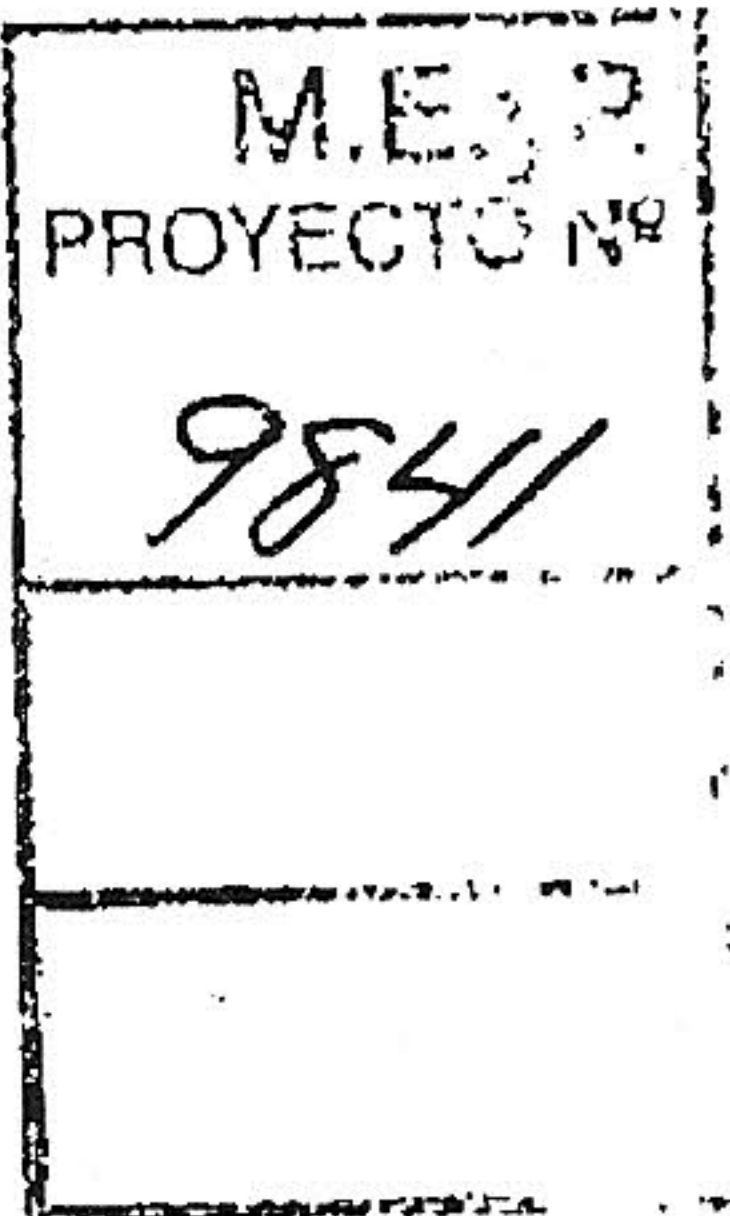
Para cultivar en el suelo con riego por goteo plantas indexadas por el método omega de invierno, para la detección del síndrome de madera rugosa (incompatibilidad de injerto).

Es indispensable que se adecue a las condiciones que permitan un vigoroso crecimiento de las plantas de vid en su interior durante el periodo vegetativo.

Todo el área circundante a los invernáculos, debe estar limpio, libre de malezas que puedan albergar insectos vectores de plagas.

La zona de invernáculo/s debe estar separada del resto del establecimiento, y el ingreso a dicha zona debe contar con piletas de desinfección para la entrada peatonal y vehicular.

Al ingresar al invernáculo se deberá desinfectar el calzado pisando una bandeja que contiene una



HC

9
9



643

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO II

solución desinfectante, como por ejemplo yodo (I₂). Dicho desinfectante debe ser renovado periódicamente, dependiendo su frecuencia del movimiento de personas que ingrese al mismo.

c) PARQUE DE INTRODUCCIONES:

Cultivo en macetas de QUINCE (15) litros, en condiciones de campo, con riego por goteo con solución nutritiva. Sistema de conducción en contraespaldero con DOS (2) alambres. Es indispensable que cuente con protecciones antigranizo.

Cada introducción (material ingresado para su certificación) se cultiva en UNA (1) maceta, DOS (2) plantas provenientes de una misma estaca.

d) COLECCION DE INDICADORAS LIBRES DE VIRUS:

Cultivo conducido en contraespaldera con las especies de Vitis necesarias para la detección por indexing de virus en vid. Proporciona la madera (estacas) para los injertos de invierno.

e) CAMARA FRIGORIFICA:

Con la capacidad para almacenar las estacas de los materiales a injertar y de sus respectivos portainjertos.

f) SALA DE INJERTACION:

Debe permitir el manejo de grandes volúmenes de material, de forma ordenada, contando para ello con mesadas, cajoneras, etcétera, adjuntas al banco de injertación y la parafinadora.

g) CAMARA DE ESTRATIFICACION:

Con luz y temperaturas regulables, que permita un óptimo proceso de soldadura y enraizamiento de injertos leñosos y multiplicación de plantas de vid.

3 - EQUIPAMIENTO:

M.E.yP. PROYECTO Nº
9841

MC



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO II

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. Los procedimientos de calibración y mantenimiento deben estar documentados.

Se deberá llevar un registro de cada equipo y de todos los materiales de referencia que tengan influencia significativa sobre la calibración y en los resultados de los ensayos.

4 - INSTRUCCIONES PARA EL FUNCIONAMIENTO:**PROCEDIMIENTOS:**

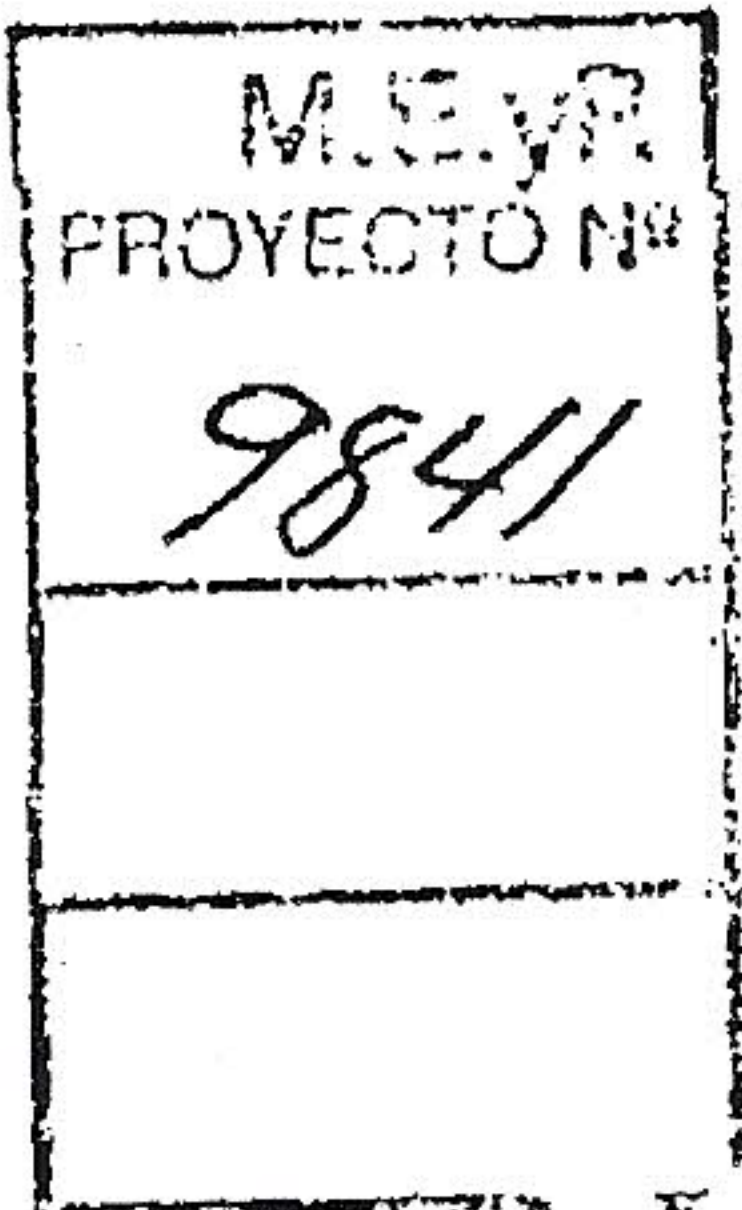
Cada laboratorio y el / los invernáculos deberán contar con UNA (1) carpeta donde consten todos los procedimientos operativos e instrucciones de trabajo actualizados conjuntamente con los otros registros que más adelante se detallan.

Documentación:

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

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.



u
77



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO II

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, ensayos de referencia, muestras de fiscalización y otras), con número correlativo que corresponderá al número de diagnóstico de la misma. Se deberán detallar los datos mínimos obligatorios que hacen a la identificación de las muestras como: número de diagnóstico o test, fecha de recepción, remitente, procedencia u origen, especie, cultivar, categoría, número de lote, fecha y número de certificado de análisis y todos aquellos datos que se consideren necesarios par la identificación de la muestra. Las muestras deberán registrarse en secuencia numérica en orden cronológico de recepción.

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

El modo en que las muestras serán archivadas y conservadas se detalla en el Anexo II de la presente norma y es específico de cada patología.

M.E.y.P. PROYECTO Nº
9841

Boletín interno de análisis:

Se emitirá un boletín interno por cada muestra. Este boletín deberá estar identificado con el mismo número de recepción que posee la muestra en el libro de registro de muestras.

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

Aquí se registrarán los resultados obtenidos de los diagnósticos o test, 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 el período de CINCO (5) años y estarán a disposición de los inspectores de la SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS o de sus organismos descentralizados en sus áreas de competencia, cuando ellos lo soliciten.

AC

12
12



643

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO II

Muestras:

M.E.yP. PROYECTO Nº
9841

Las muestras deberán ser empaquetadas en bolsas plásticas de polietileno junto con UNA (1) etiqueta resistente. La bolsa deberá ser envuelta firmemente alrededor del material para evitar espacios de aire excesivos y deberá ser colocada en una segunda bolsa. Esta bolsa deberá ser sellada o cerrada fuertemente con UN (1) cordel o UNA (1) banda elástica y ser rotulada nuevamente con la firma del responsable de la extracción y del Director Técnico o Representante de la empresa. Si se trata de muestras vegetales (estacas, hojas, brotes) la temperatura de conservación es de CUATRO-OCHO (4-8) grados centígrados (heladera, sector de verduras).

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

El modo en que las muestras serán archivadas y conservadas se detalla posteriormente y es específico de cada patología.

MC



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO III

TECNICAS DE LABORATORIO

1. DETECCION DE VIRUS POR ELISA

El uso de la técnica de ELISA es recomendado para *Grapevine Fanleaf Virus (GFLV)*, *Grapevine Fleck Virus (GFkV)*, *Grapevine Leafroll associated Virus 1 (GLRaV 1)*, *Grapevine Leafroll associated Virus 3 (GLRaV 3)*, y aquellos para los cuales se dispongan de antisueros de calidad. Los materiales a utilizar y la época de realización, dependerán de cada virosis. El uso de ELISA es en primera instancia, siendo los materiales positivos descartados del proceso de certificación y los negativos sometidos a indexing leñoso y herbáceo.

Epoca de realización: GFLV, y otros *Nepovirus*, y GFkV, se analizarán entre los meses de octubre y noviembre. GLRaV 1, GLRaV 3 y otros *Closterovirus*, se analizarán entre los meses de marzo y abril.

Muestreo: En todos los casos se tomará hojas de las plantas mantenidas en el parque de introducciones. Para GFLV y otros *Nepovirus*, y GFkV se tomarán CINCO (5) hojas jóvenes por planta. Para GLRaV 1, GLRaV 3 y otros *Closterovirus* se tomarán CINCO (5) hojas basales por planta.

Almacenamiento de las muestras: La muestra se puede guardar en UNA (1) bolsa plástica en heladera como máximo durante DOS (2) semanas.

Preparación de las muestras: Para GFLV y otros *Nepovirus*, y GFkV, las láminas foliares se muelen en presencia de Tampón de extracción, en una relación de 1 a 10 peso a volumen. Para GLRaV 1, GLRaV 3 y otros *Closterovirus*, se muelen la base de nervaduras y parte de pecíolos, en presencia de Tampón de extracción, en una relación de 1 a 5 peso a volumen.

Drogas y Equipo mínimo requerido:

- Kits completos (inmunoglobulinas, inmunoglobulina marcada con fosfatasa alcalina) para la determinación de GFLV, GFkV, GLRaV1 y GLRaV3 .
- Sustrato para revelado: p-nitrofenil fosfato de sodio.
- Drogas para preparar las soluciones tampón, en las diferentes etapas.
- Agitador magnético.
- Agua destilada.

13
73

M.E.yP. PROYECTO Nº 9841

nc

14
14



643

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO III

- Inmunoplasmas de microtitulación certificadas, de 96 pocillos de poliestireno con fondo plano y de una capacidad de 350 µl por pocillo de excelente calidad.
- Pizetas de plástico de volúmenes variables.
- Micropipetas de volúmenes variables o varias de volúmenes fijos.
- Tips adaptables a las micropipetas.
- Peachímetro rango de pH de 0 a 14, resolución 0,01, rango de temperatura de 0,5 a 100 °C, 1 °C de resolución.
- Estufa de cultivo de temperatura regulable (rango temperatura ambiente a 50 °C).
- Material de vidrio o plástico necesarios.
- Balanza analítica, capacidad 120gr, resolución 0,01gr
- Heladera y freezer (-20 °C).
- Lector de microplaca (espectrofotómetro 405nm).
- Testigos positivos.
- Testigos sanos.

M.E.yP. PROYECTO Nº
9841

2 - TECNICA DE PROTOCOLO DAS-ELISA

Tapizado:

Añadir 200ul por pocillo de inmunoglobulinas (IgG) específicas en la concentración indicada en el envase, en tampón de cobertura.

Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 2 horas o toda la noche a 4°C.

Vaciar los pocillos y lavar la placa con tampón de lavado (PBST).

Repetir 5 veces.

Preparación de las muestras

Para GFLV y GFKV, homogeneizar el limbo foliar en proporción 1:10 peso:volumen en buffer de extracción para virus de vid. Para GLRaV1 y GLRaV3, homogeneizar base nervaduras y peciolo en proporción 1:10 peso:volumen en buffer de extracción para virus de vid.

MC

15
15



643

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO III

Adición de la muestra:

Añadir 200ul por pocillo de muestra procesada.

Colocar 2 controles negativos, 2 controles positivos y 1 blanco (Tampón de Extracción) en cada placa.

Incubar toda la noche a 4°C.

El lavado se realiza como se describió anteriormente.

Adición del conjugado:

Añadir 200ul por pocillo de una dilución en tampón conjugado de IgG conjugada en la concentración indicada en el envase.

Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 2 horas.

El lavado se realiza como se describió anteriormente.

Revelado de la reacción y lectura:

Añadir 200ul por pocillo de sustrato (1mg de p-nitrofenil fosfato de sodio por cada mililitro de tampón sustrato)

Incubar 60 minutos a temperatura ambiente.

Realizar lectura colorimétrica a 405nm. La intensidad del color será proporcional al contenido en antígenos de la muestra. Comparar los resultados con el de los controles negativos.

Interpretación de los resultados:

Se considerará positiva la muestra que arroje un resultado del doble de la Densidad Óptica (O.D.) de los controles sanos. Otros criterios podrán aplicarse de acuerdo a las características de las inmunoglobulinas usadas.

M.E.yP. PROYECTO Nº
9841

MC

16
16



643

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO IV

DIAGNOSTICO MEDIANTE PLANTAS INDICADORAS

COLECCION DE PLANTAS INDICADORAS

Las plantas indicadoras pertenecen al género *Vitis*. La identificación de enfermedades virales se basa en la reacción diferencial de estas indicadoras cuando están infectadas. Las plantas indicadoras se infectan con la técnica de injertación. A fin de obtener las estacas necesarias para los injertos, se debe contar con una colección de plantas indicadoras libres de virus, establecida en el campo, con la cantidad de plantas necesarias para el abastecimiento de los injertos que se requieren. La colección se establecerá en un terreno libre de cultivos de vid por DOCE (12) años y no haber sido utilizados para vivero de vid en los últimos TRES (3) años. En caso de realizarse desinfección antes de la plantación estos períodos se reducirán a SEIS (6) y UN (1) años respectivamente. Además deberán someterse a análisis para determinar la ausencia de nemátodos del género *Xiphinema*. La colección estará integrada mínimamente por:

Vitis rupestris cv. St. George

Vitis vinifera cv. Cabernet Franc, Pinot Noir, Merlot, Barbera o Mission

Kober 5 BB (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*)

Baco 22 A

Vitis riparia cv. Gloire de Montpellier

110 R (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*)

RECOLECCION Y ALMACENAMIENTO DE ESTACAS PARA INJERTAR

En invierno se recolectan estacas de las plantas madres de indicadoras. Se seleccionan por el diámetro que no debe ser inferior a 0,6-0,8 cm ni superior a 1,2-1,4 cm. La longitud de los sarmientos será de 40 – 50 cm con cuatro a seis nudos, dependiendo de la variedad. Se agrupan en atados de 100 y se atan añadiendo un precinto con la identificación. Cada atado se sumerge en una solución fungicida y se recubre con papel húmedo, y se envuelven en polietileno de color negro que se asegura con cinta adhesiva que sostiene una segunda etiqueta identificatoria. Los paquetes así

M.E.yP. PROYECTO Nº
9841

re

IX
77



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO IV

aconicionados se llevan a la cámara frigorífica a 4 °C hasta el momento de su empleo.

La madera de las plantas "candidato" se extrae del parque de introducciones en la misma época y se acondicionan de igual manera.

INJERTOS DE INVIERNO

Se sacan las estacas de la cámara frigorífica no más de 24 horas antes de su empleo, se hidratan durante 24 horas en agua corriente y se acondicionan de acuerdo con los requerimientos del tipo de injerto.

Pueden emplearse varios métodos de injertación: yema, escudete, corte en V. Se recomienda hacerlo con máquinas especiales en bancos de injertación. Las estacas injertadas se protegen con un baño de cera. Esto se realiza mediante la rápida inmersión (1 ó 2 segundos) del extremo injertado de la estaca en un baño de cera fundida. La cera debe ser de la mejor calidad, con bajo punto de fusión (54 – 56 °C) y mantenerse líquida en un baño termostatzado mientras dure el proceso de injertación. Las estacas injertadas se acondicionan en bandejas con un sustrato inerte (aserrín, turba, perlita) húmedo y se pasan a la cámara de estratificación a temperatura constante (28–30 °C), para la formación de callo alrededor de la zona de injertación y la emisión de raíces en la base de la estaca.

Al terminarse este proceso las bandejas pasan a invernáculos con buena iluminación donde se mantienen durante 15 a 20 días y luego a una media sombra por tres a cuatro semanas para su rusticación, antes de proceder a su plantación definitiva. Se requieren CINCO (5) repeticiones de cada combinación (candidato/indicadora) enraizadas y con completa formación de callo a nivel de injerto.

INJERTOS EN VERDE

Las plantas madres de indicadoras se cultivan en invernáculo, partiendo de estacas uninodales provenientes de la colección de plantas madres de indicadoras. Puede emplearse un sustrato inerte regado con solución nutritiva según requerimientos. Debe asegurarse un crecimiento

M.E.y.P. PROYECTO Nº 9841

MC

18
78



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO IV

vigoroso, las condiciones necesarias para la vegetación de la vid son 14 horas de luz con una intensidad de 3.000 lux y temperatura media de 20-25 °C, puede llegarse a una mínima de 17°C sólo por pocas horas. Las plantas se conducen con un sostén adecuado hasta dos metros de altura y periódicamente se recepan a tres yemas, utilizando la vegetación para extraer estacas de 25-35 cm de largo para ser injertadas.

Las púas se sacan de las plantas candidato del parque de introducciones, son estacas uninodales con 1 hoja que se recorta para evitar deshidratación. Estas púas se insertan con los respectivos cortes de hendidura en el extremo apical de las estacas herbáceas de las plantas indicadoras, manteniendo el injerto en posición con la ayuda de un clip o una tira de Parafilm®. Las estacas injertadas se tratan con hormonas enraizantes (IBA 500 ppm) en los 5 cm basales durante 15 segundos, se plantan en macetas con un sustrato húmedo. Se mantiene la humedad de las plantas injertadas al 100 % HR mediante una bolsa de polietileno y se llevan a cámara con iluminación (3.000 lux) y 28 °C por 21 – 26 días, donde los injertos enraízan, sueldan y comienza la brotación. Se trasladan posteriormente a otra cámara con menor temperatura (26°C) y luz (2.000 lux). En esta cámara se retiran progresivamente de las condiciones de alta humedad (desgarrando la bolsa de polietileno) para después llevarlos a invernáculo donde se mantienen con activo crecimiento por 3 meses para la observación de síntomas. Los brotes de la púa (candidato) se eliminan, dejando vegetar los brotes de la indicadora.

M.E.Y.P.
PROYECTO N
9841

DETECCIÓN DE GRAPEVINE FANLEAF VIRUS (GFLV) Y GRAPEVINE FLECK VIRUS (GFkV)

Método: Transmisión por injerto de invierno. Las púas de la planta candidato se injertan sobre el pie *Vitis rupestris* cv. St George. Las estacas injertadas se plantan a campo a una distancia de 0.05-0.10 metros entre plantas y 1.50 metros entre hileras. Se requieren CINCO (5) injertos enraizados por candidato. Se identifica claramente cada combinación con estacas numeradas. Igualmente se plantaran intercalados testigos sanos y enfermos a razón de dos controles sanos, DOS(2) infectados con GFLV y dos infectados con GFkV por cada 50 candidatos. Este vivero se mantiene protegido con tela antigranizo. Debe asegurarse un crecimiento vigoroso del pie mediante la fertilización con

MC



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO IV

solución nutritiva. Debe mantenerse libre de malezas y enfermedades fúngicas mediante los tratamientos adecuados. Se eliminan los brotes correspondientes a los candidatos dejando vegetar solamente las indicadoras, que serán podadas tanto en invierno como en verde a fin de mantener la individualidad de cada planta.

Observación de síntomas: Se realiza en primavera desde la brotación hasta mediados de diciembre. La aparición de síntomas se registra semanalmente durante este período. Se requieren tres años de observaciones. Los síntomas se presentan en las hojas.

Síntomas de GFLV: Manchas cloróticas, anillos y dibujos cloróticos. Mosaico. Coloración amarilla. Deformación, dientes aguzados, deformación del seno peciolar.

Síntomas de GFkV: Aclaramiento de las nervaduras secundarias y terciarias.

DETECCION DE GRAPEVINE LEAFROLL ASSOCIATED VIRUSES (GLRaV's)

Método: Transmisión por injerto de invierno. Las púas de la planta candidato se injertan sobre el pie *Vitis vinifera* cv. tintas (Cabernet Franc, Pinot Noir, Merlot, Barbera, Mission). Las estacas injertadas se llevan a vivero a campo: 0.05-0.10 metros entre plantas y 1.50 metros entre hileras. Se requieren 5 injertos enraizados por candidato. Se identifica claramente cada combinación con estacas numeradas. Igualmente se plantaran intercalados testigos sanos y enfermos a razón de 2 controles sanos y 2 infectados por cada 50 candidatos. Este vivero se mantiene protegido con tela antigranizo. Debe asegurarse un crecimiento vigoroso del pie mediante la fertilización con solución nutritiva. Debe mantenerse libre de malezas y enfermedades fúngicas mediante los tratamientos adecuados. Se eliminan los brotes correspondientes a los candidatos dejando vegetar solamente las indicadoras, que serán podadas tanto en invierno como en verde a fin de mantener la individualidad de cada planta.

Observación de síntomas: Se realiza en otoño, desde mediados de febrero hasta la caída de las hojas. La aparición de los síntomas se registra semanalmente durante este período. Se requieren TRES (3) años de observaciones. Los síntomas se presentan en las hojas.

79
79

M.E.V.P. PROYECTO Nº 9841

MC

20
20



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO IV

Síntomas de GLRaV: Borde de las hojas curvado hacia abajo, coloración rojiza – violáceo en las áreas internervales.

DETECCION DE INCOMPATIBILIDAD DE INJERTO SOBRE KOBER 5BB (GLRaV-2)

Método: Transmisión por injerto de invierno. Las púas de las plantas candidato se injertan sobre las indicadoras Kober 5BB. Se necesitan 5 injertos prendidos y enraizados por cada una de las indicadoras. Se plantan en invernáculo tipo capilla o túnel de polietileno o a campo, a una distancia de 0.05-0.10 metros entre plantas y 1.50 metros entre hileras. Se identifica claramente el portainjerto y cada candidato con estacas numeradas. Igualmente se plantaran intercalados testigos sanos y enfermos a razón de dos controles sanos y dos infectados GLRaV-2 por cada 50 candidatos. Debe asegurarse un crecimiento vigoroso del pie mediante la fertilización con solución nutritiva. Debe mantenerse libre de malezas y enfermedades fúngicas mediante los tratamientos adecuados. Debe permitirse el crecimiento vigoroso del brote del candidato, que se conduce en contraespaldera hasta DOS (2) metros de altura. Se eliminan los brotes correspondientes al pie (indicadora). En invierno el candidato se recepa a TRES (3) yemas.

Observación de síntomas de Incompatibilidad de Injerto: Muerte de las plantas injertadas sobre Kober 5 BB. Se produce en el primer año de vegetación.

DETECCION DE MOSAICO DE LAS NERVADURAS Y NECROSIS DE LAS NERVADURAS

Método: Transmisión por injerto en verde. Las púas de la planta candidato se injertan sobre las indicadoras Vitis riparia cv Gloire de Montpellier y Richter 110. Una vez enraizados y prendidos, se mantienen en invernáculo a una temperatura de entre 20 y 26°C, con una intensidad lumínica de 3.000 lux. Debe asegurarse un crecimiento vigoroso del pie mediante la fertilización con solución nutritiva durante un periodo no inferior a los TRES (3) meses.

Observación de síntomas de Mosaico de las nervaduras: Los síntomas se observan en las hojas. Manchas cloróticas, mosaico verde claro asociado a las nervaduras y deformación de hojas en la indicadora V. riparia.

M.E.P. PROYECTO Nº
9841

MC

21



643

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO IV

Observación de síntomas de Necrosis de las nervaduras: Los síntomas se observan en las hojas.

Necrosis en las nervaduras secundarias y terciaria, enanismo, necrosis en los ápices vegetativos y deformación de hojas inducida por la necrosis en la indicadora Richter 110.

M.E.yP. PROYECTO Nº
9841

RC

22
22



643

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO V

TABLA DE DROGAS Y SOLUCIONES

DAS-ELISA PARA GFLV, GFKV, GLRaV-1 y GLRaV-3

Drogas o Soluciones	Composición	Observaciones
Tampón Carbonado	. 1,59 gr. Na ₂ CO ₃ 2,93g gr. NaHCO ₃ 0,20 gr. NaN ₃ Llevar con agua destilada a 1 litro de solución.	pH 9,6
Tampón de lavado	. 8 gr. NaCl 0,2 gr. KH ₂ PO ₄ 1,45 gr. Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 0,2 gr. KCl 0,2 gr. NaN ₃ 0,5 ml. Tween 20 Levar con agua destilada a 1 litro de solución.	pH 7,4
Tampón conjugado	. 2,40 gr. Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (TRIS) 8,00 gr. CINA 20,00 gr. Plovinylpirrolidone MW 24K 0,5 ml. Tween 20 0,20 gr. Cl ₂ Mg 6H ₂ O 2 gr. BSA (albúmina de suero bovino) 0,2 gr. NaN ₃ Llevar con agua destilada a 1 litro de solución.	pH 7,4
Tampón extracción	. 32,00 gr. Tris-(hydroxymethyl) hydroxymethyl (TRIS) 37,20 gr. Tris-(hydroxymethyl) hydroxymethyl hydrchloride (TRIS-CIH)	pH 8.2

M.E.yP.
 PROYECTO Nº
 9841

HC

23
33



643

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

M.E.yP. PROYECTO Nº
9841

	8,0 gr. ClNa 20,00 gr. Plovinypirrolidone MW 24K 10,00 gr. Polyethylene glycol (PEG) MW 6.000 20 ml. Tween 20 0,2 gr. NaN ₃ Llevar con agua destilada a 1 litro de solución.	
Tampón sustrato	. 97 ml. Dietanolamina 0,2 gr. NaN ₃ Llevar con agua destilada a 1 litro de solución.	pH 9,8

HC

24
24



643

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO V

INJERTOS LEÑOSOS DE INVIERNO

Nombre	Composición	Observaciones
Parafina de injertación	Adicionada de fungicidas y hormonas	Ej. Rebwachs W.F.
Parafina protectora	Mezcla de ceras y parafinas	Ej. Ciragref 80
Solución de hormonas enraizantes	IBA (ácido indol-butírico) xx ppm	

INJERTOS HERBACEOS

Nombre	Composición	Observaciones
Solución de lavado	ClONa 1 ‰	
Solución de hormonas enraizantes	IBA (ácido indol-butírico) 500 ppm	
Solución Funguicida	Benomil 50% PM 1.5 g/l+captan 80% PM 2 g/l	Pueden reemplazarse por un botriticida y un fungicida de amplio espectro
Solución nutritiva para riego	Debe asegurar que se cubran los requerimientos nutricionales de la vid	Por Ej.: 800 g NO ₃ K 300 g SO ₄ Mg 200 g PO ₄ H(NH ₄) ₂ 50 ml SO ₄ H ₂ 17 ml PO ₄ H ₃ 1.5 g SO ₄ Mn H ₂ O 1.5 g BO ₃ H ₃ 1.5 g SO ₄ Zn 7H ₂ O 0.5 g SO ₄ Cu 05 g Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ 4H ₂ O

9841

HC

25



643

Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

M.E.yP
PROYECTO Nº
9841

Nombre	Composición	Observaciones
		15 g Hierro en forma de quelato Disolver en 1.000 litros de agua y ajustar pH a 6.0


MC

26
26



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO VI

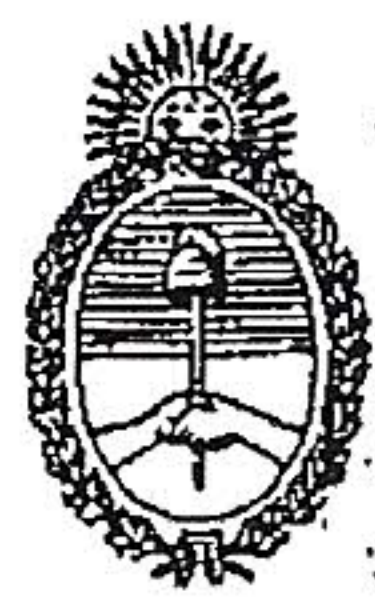
Para lograr trazabilidad del ensayo se deberá llevar registro de :

- Reactivos utilizados
- Fecha de compra
- Marca
- N° de artículo
- Fecha de vencimiento
- N° de muestras
- Fecha de inicio del ensayo
- Fecha de finalización
- Registro de resultados verificables por copia o en forma informática.

M.E.yP. PROYECTO Nº
9841

NC

27
27



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO VII

CERTIFICADO DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES DE PLANTAS DE VIVERO DE VID Y SUS PARTES

NUMERO DE MUESTRA: CODIGO DE LA MUESTRA:
CATEGORIA DE PLANTA: FECHA DE INGRESO.

Declaración del Responsable del Laboratorio:

M.E.yP. PROYECTO Nº
9841

Certifico que el diagnóstico de enfermedades de plantas de vivero cítricas se ha realizado aplicando la metodología de análisis aprobada y se ha efectuado en el Laboratorio habilitado por la SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS o sus organismos descentralizados en el área de sus competencias, bajo el número de RNCFS:.....

ANALISIS SOLICITADOS:

- Grapevine fanleaf virus (GFLV).....
- Grapevine fleck virus (GFkV).....
- Grapevine leafroll associated virus 1 (GLRaV 1).....
- Grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV 3).....
- GLRaV-2 (incompatibilidad sobre Kober 5BB).....
- Vein mosaic.....
- Vein necrosis.....

OBSERVACIONES:

Firma del responsable

Fecha de análisis

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

Handwritten signature and initials

28
98



Ministerio de Economía y Producción
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

ANEXO VII

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 salvadas.

En Observaciones se colocará la metodología de análisis efectuada.

~~Handwritten signature~~
MC

M.E.V.P. PROYECTO Nº
9841