



NAPPO

North American Plant Protection Organization

Organización Norteamericana de Protección a las Plantas

MEXICO - USA - CANADA

Norma Regional de la NAPPO sobre Medidas Fitosanitarias (NRMF)

NRMF 3

Movilización de papas hacia un país miembro de la NAPPO

Secretaría de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO)

1730 Varsity Drive, Suite 145

Raleigh, Carolina del Norte 27606

Estados Unidos de América

17 de octubre de 2011

Índice

Revisión	3
Aprobación	3
Implementación	3
Registro de enmiendas	3
Distribución	3
Introducción.....	4
Ámbito	4
Referencias	4
Definiciones	4
Perfil de los requisitos	5
Requisitos	5
1. Plagas reglamentadas	5
2. Medidas fitosanitarias generales.....	5
2.1 Ausencia de plagas	5
2.2 Enfoque de sistemas.....	5
2.3 Verificación en origen (precertificación)	6
2.4 Prohibición	6
3. Productos de papa característicos.....	6
3.1 Germoplasma.....	6
3.2. Minitubérculos y microplántulas	7
3.3. Semillas de papa.....	7
3.4. Papas de mesa y para procesamiento	7
4. Documentación y notificación de casos de incumplimiento	7
4.1 Requisitos fitosanitarios	7
4.2 Certificación fitosanitaria	7
4.3 Requisitos sobre identidad e integridad	7
4.4 Notificación.....	8
5. Identificación y detección de plagas.....	8
Anexo 1: Establecimiento, mantenimiento y reconocimiento de áreas de producción libres de nematodos enquistadores de papa (<i>Globodera rostochiensis</i> y <i>G. pallida</i>) en los países miembros de la NAPPO.....	9
Anexo 2: Criterios para la certificación de semilla de papa.....	15
Anexo 3: Introducción de germoplasma de papa	19
Anexo 4: Requisitos para microplántulas y minitubérculos	24
Anexo 5: Medidas fitosanitarias aplicables a papa de mesa y para procesamiento ..	26
Anexo 6: Detección e identificación de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	28
Anexo 7: Directrices para la identificación de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> , <i>Globodera</i> <i>rostochiensis</i> , <i>G. pallida</i> , <i>Ditylenchus destructor</i> y <i>D. dipsaci</i>	32
Anexo 8: Detección e identificación de <i>Ralstonia solanacearum</i> filotipo II, secuevar 1 (raza 3 biovar 2).....	36
Apéndice 1: Situación de las plagas de papa en los países de la NAPPO	43

Revisión

Las Normas Regionales de la NAPPO sobre Medidas Fitosanitarias están sujetas a revisiones y enmiendas periódicas. La presente norma se revisó por última vez en el 2011. La fecha de la próxima revisión de esta norma de la NAPPO es en el año 2016. De solicitarlo un país miembro de la NAPPO, se pueden llevar a cabo revisiones de cualquier norma de la NAPPO en cualquier momento.

Aprobación

La presente norma fue aprobada por el Comité Ejecutivo (CE) de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO) el 17 de octubre de 2011.

Aprobada por:

Greg Wolff
Miembro del Comité Ejecutivo
Canadá

Osama El-Lissy
Miembro del Comité Ejecutivo
Estados Unidos

Francisco Javier Trujillo Arriaga
Miembro del Comité Ejecutivo
México

Implementación

Para conocer la fecha de implementación en cada país de la NAPPO, consulte los Planes de implementación adjuntos.

Registro de enmiendas

Las enmiendas a esta norma serán fechadas y archivadas en la Secretaría de la NAPPO.

Distribución

La Secretaría de la NAPPO distribuye esta norma al Grupo Consultivo de la Industria (GCI) y los Miembros Asociados (MA), la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) y otras Organizaciones Regionales de Protección Fitosanitaria (ORPF).

Introducción

Ámbito

La presente norma brinda orientación con el fin de disminuir los riesgos fitosanitarios relacionados con la movilización de papa hacia los países miembros de la NAPPO. Esta norma se aplica al material propagativo de papa y las papas para consumo como vías para la dispersión e introducción de plagas reglamentadas. La calidad y calificación del tubérculo permanecerán fuera del ámbito de esta norma.

Referencias

NIMF 2. 2016. *Marco para el análisis de riesgo de plagas*. Roma, CIPF, FAO.

NIMF 4. 2017. *Requisitos para el establecimiento de áreas libres de plagas*. Roma, CIPF, FAO.

NIMF 5. (actualizada anualmente). *Glosario de términos fitosanitarios*. Roma, CIPF, FAO.

NIMF 8. 2017. *Determinación de la situación de una plaga en un área*. Roma, CIPF, FAO.

NIMF 10. 2016. *Requisitos para el establecimiento de lugares de producción libres de plagas y sitios de producción libres de plagas*. Roma, CIPF, FAO.

NIMF 11. 2017. *Análisis del riesgo de plagas para plagas cuarentenarias*. Roma, CIPF, FAO.

NIMF 12. 2017. *Certificados fitosanitarios*. Roma, CIPF, FAO.

NIMF 13. 2016. *Directrices para la notificación de incumplimiento y acción de emergencia*. Roma, CIPF, FAO.

NIMF 33. 2016. *Material micropropagativo y minitubérculos de papa (Solanum spp.) libres de plagas para el comercio internacional*. Roma, CIPF, FAO.

NRMF 2. 2008. *Directrices para los programas de verificación en origen*. Ottawa, NAPPO.

NRMF 5. (actualizada anualmente). *Glosario de términos fitosanitarios de la NAPPO*. Ottawa, NAPPO.

Definiciones

Las definiciones de los términos fitosanitarios que se utilizan en la presente norma figuran en la NRMF 5 de la NAPPO y la NIMF 5.

Perfil de los requisitos

Esta norma identifica:

- Las plagas reglamentadas que afectan a la papa, basándose en la lista de plagas reglamentadas y los programas oficiales de certificación de semilla de papa del país miembro de la NAPPO.
- Las medidas fitosanitarias generales y específicas para productos con el fin de prevenir la introducción de plagas hacia un país miembro de la NAPPO.
- La documentación y notificación de los procedimientos de incumplimiento para los países miembros de la NAPPO.
- Los anexos sobre certificación de semilla de papa, áreas de producción libres de plagas y protocolos de detección e identificación de plagas.

Requisitos

1. Plagas reglamentadas

Las plagas de papas que están reglamentadas por uno o más de los países miembros de la NAPPO figuran en el Apéndice 1.

2. Medidas fitosanitarias generales

Las medidas fitosanitarias para la movilización de papa deberían fundamentarse en análisis de riesgo de plagas realizados en conformidad con la NIMF 2: 2016 y la NIMF 11: 2017. El riesgo fitosanitario y las medidas aplicables variarán según la condición de la plaga en el lugar de producción, el producto (a saber, semilla legítima, plántulas, minitubérculos, semillas de papa cultivadas en campo, papa de mesa y papa para elaboración) y el uso final.

2.1 Ausencia de plagas

2.1.1. Las NIMF 4: 2017, NIMF 8: 2017, NIMF 10: 2016 y NIMF 33: 2016 deberían servir de guía para la aplicación de las áreas libres de plagas, los lugares de producción libres de plagas y los sitios de producción libres de plagas como medidas fitosanitarias. Salvo por la certificación en origen, no deberían exigirse medidas adicionales relacionadas con la plaga en cuestión para las papas que se movilen de un área reconocida oficialmente como libre de plagas.

2.1.2. Los requisitos para el establecimiento, reconocimiento y mantenimiento de áreas de producción libres de nematodos enquistadores de papa se especifican en el Anexo 1.

2.2 Enfoque de sistemas

Para reunir las condiciones de un enfoque de sistemas, al menos dos de las medidas diferentes de manejo del riesgo de plagas deberían integrarse, pero actuar independientemente para lograr el nivel apropiado de protección fitosanitaria.

2.2.1. Programas de certificación

La presente norma reconoce los programas oficiales de certificación de semilla de papa como un enfoque de sistemas para disminuir el riesgo de dispersión de plagas relacionado con el material propagativo. La certificación de semilla de papa podrá comprender producción *in vitro*, propagación en un entorno protegido y producción en campo según un programa oficial. El material propagativo producido *in vitro* y en entornos protegidos tiene un riesgo de plaga relacionado menor que el material cultivado en campo. Véanse los Anexos 2 y 4.

2.2.2. Mejores prácticas de producción

Las mejores prácticas de producción tales como la selección de tierra, siembra de semilla certificada, inspección, tratamiento, control de plagas, prueba para detectar la presencia de plagas y métodos de eliminación eficaces pueden incluirse en un enfoque de sistemas con el fin de disminuir el riesgo de plagas. Las restricciones sobre el uso final y el destino también deberían disminuir el riesgo de dispersión de plagas.

2.2.3. Medidas poscosecha

Las medidas poscosecha, tales como lavado de tubérculos, cepillado, inhibición de brotes, fumigación, tratamiento químico y físico, eliminación eficaz, embalaje y el uso final pueden integrarse en un enfoque de sistemas con el fin de mitigar el riesgo fitosanitario.

2.3 Verificación en origen (precertificación)

La precertificación (en conformidad con la NRMF 2: 2016) también es una opción aceptada para la movilización internacional de papas.

2.4 Prohibición

Si no se pueden encontrar medidas satisfactorias para disminuir el riesgo a un nivel aceptable, la última opción podría ser la prohibición de la importación de los productos pertinentes (NIMF 11: 2017). Las prohibiciones podrán ser provisionales y aplicarse como medidas de emergencia, durante el tiempo necesario para evaluar el riesgo de plagas y determinar la disponibilidad de medidas adecuadas para su manejo. Sin embargo, a discreción de la ONPF del país importador, podrá permitirse la entrada de las papas prohibidas conforme a condiciones específicas.

3. Productos de papa característicos

3.1 Germoplasma

3.1.1. En el Anexo 3 se describen las medidas fitosanitarias para el manejo del riesgo de plagas relacionadas con la movilización de germoplasma de especies de *Solanum* de la familia de la papa hacia la región de la NAPPO. Los envíos de germoplasma de papa importados son unidades de propagación de papa que generalmente se obtienen para fines de mejoramiento e investigación. El germoplasma podrá derivarse de plantas silvestres, nativas o cultivadas en el campo y puede constar de tubérculos, estacas del tallo, plántulas micropropagadas, semilla botánica o polen.

3.1.2. El germoplasma puede representar un riesgo alto, puesto que la fuente puede desconocerse o no estar aprobada.

3.2. Minitubérculos y microplántulas

Las microplántulas y los minitubérculos pueden negociarse en cantidades comerciales. Las microplántulas y los minitubérculos se producen a partir de material al que se le han realizado pruebas y multiplicado en entornos asépticos y/o protegidos, respectivamente, y no se exponen al ambiente del campo. Estos productos no se exponen a inóculos de plagas transmitidos en el campo y por ende representan un riesgo de plaga bajo. La producción de microplántulas y minitubérculos debería cumplir con los requisitos que se indican en el Anexo 4.

3.3. Semillas de papa

Los componentes básicos del programa de certificación de semilla de papa y la situación de las plagas reglamentadas de interés para la región de la NAPPO figuran en el Apéndice 1 y los Anexos 2 y 4. La ONPF tiene la obligación de establecer los reglamentos para la producción, prueba y certificación de semillas de papa para apoyar las necesidades de su industria nacional productora de papa. Un programa nacional de certificación de semilla de papa también podrá servir como la base para la certificación fitosanitaria para la movilización de semillas de papa.

3.4. Papas de mesa y para procesamiento

La papa de mesa y para procesamiento puede moverse y utilizarse en forma segura siempre que se apliquen las medidas apropiadas de mitigación del riesgo de plagas. Las medidas seleccionadas deberían fundamentarse en la biología y distribución de la plaga, las opciones de tratamiento, el uso previsto y en las medidas que se apliquen en el país importador. Las medidas de mitigación del riesgo de plagas generalmente aceptadas incluyen, entre otras, la inspección, la prueba, el tratamiento, el destino y los acuerdos de cumplimiento tal como se indica en el Anexo 5.

4. Documentación y notificación de casos de incumplimiento

4.1 Requisitos fitosanitarios

La ONPF del país importador debería especificar los requisitos fitosanitarios en su legislación, reglamentos o en algún otro sitio (por ejemplo, permisos de importación, planes de trabajo bilaterales) (NIMF 12: 2017).

4.2 Certificación fitosanitaria

De solicitarlo el país importador, la ONPF del país exportador expedirá un Certificado fitosanitario para asegurar el cumplimiento del envío con los requisitos fitosanitarios de importación especificados.

4.3 Requisitos sobre identidad e integridad

Los certificados, sellos, números de lotes de semillas y la identificación de los envíos pueden utilizarse para asegurar la integridad de los envíos y facilitar su rastreabilidad.

4.4 Notificación

La ONPF del país importador debería notificar con prontitud a la ONPF del país exportador los casos de incumplimiento de los requisitos fitosanitarios, conforme lo estipula la NIMF 13: 2016.

5. **Identificación y detección de plagas**

Algunas plagas son de importancia particular para el comercio de papa. Los riesgos que representan estas plagas pueden mitigarse mediante la aplicación de métodos precisos y novedosos para su identificación y/o detección. Las directrices para la identificación y/o detección de algunas plagas a las cuales se les presta consideración especial pueden encontrarse en los Anexos 6, 7 y 8.

Anexo 1: Establecimiento, mantenimiento y reconocimiento de áreas de producción libres de nematodos enquistadores de papa (*Globodera rostochiensis* y *G. pallida*) en los países miembros de la NAPPO.

Introducción

Antecedentes y propósito

La aplicación de áreas libres de plagas (ALP) es una medida fitosanitaria que se utiliza para facilitar el comercio de plantas, productos vegetales y otros artículos reglamentados, sin la necesidad de aplicar medidas fitosanitarias adicionales. Para obtener información adicional sobre ausencia de plagas véase el apartado 2.1 de la presente norma. Se hace referencia a las ALP como una estrategia para manejar el riesgo fitosanitario que representan los nematodos y para facilitar el comercio de papas.

Este documento describe los requisitos para establecer, mantener y reconocer las áreas de producción (áreas libres de plagas, lugares de producción libres de plagas y sitios de producción libres de plagas) libres de *Globodera rostochiensis* y *G. pallida* (nematodos enquistadores de papa, NEP). Incluye procedimientos fitosanitarios para la vigilancia, el muestreo, las pruebas y la movilización de artículos reglamentados.

El NEP por lo general se considera una plaga cuarentenaria y puede disminuir la producción de papa y otros cultivos agrícolas. La presencia del NEP tiene un efecto considerable en el comercio de artículos reglamentados entre los países de la NAPPO. El comercio se ha prohibido o interrumpido debido a la presencia/detecciones del NEP en los países miembros de la NAPPO.

Requisitos

Todos los países miembros de la NAPPO han establecido restricciones en cuanto a la movilización de papas y otros artículos reglamentados provenientes de áreas infestadas con el NEP. La autoridad normativa para México reside en la NOM FITO 025, 040 y 041 y la legislación estatal; en Estados Unidos en la 7 CFR 319.37 y en la legislación estatal; y en Canadá en la Ley y reglamentos de Protección de Plantas, la Ley y reglamentos de Semillas (<http://www.inspection.gc.ca/english/reg/rege.shtml>) y la legislación provincial.

1. Establecimiento de áreas de producción libres de NEP

1.1. Delimitación y características del área

La ONPF documentará los siguientes datos geográficos, métodos de comunicación, producción de cultivos y condiciones climáticas:

- Descripción y características de las áreas de producción libres del NEP, y definición de sus límites geográficos, ya sean barreras naturales o artificiales.
- Los mapas que muestren los límites, autopistas, puertos marítimos, aeropuertos y puntos de inspección por tierra existentes.

- El historial y la ubicación de la producción de cultivos en las áreas de producción libres del NEP, incluida la rotación de cultivos.
- La extensión de la producción comercial, no comercial (de patio) y producción de semilla de papa, otros cultivos susceptibles, así como la presencia de hospedantes silvestres.
- La distancia a campos infestados por el NEP y campos relacionados que se encuentren más cercanos.

1.2 Características de la plaga

El quiste del NEP es la piel endurecida de la hembra muerta. Es de color blanco o café, de forma esférica y según la especie y madurez, tiene una pared gruesa que protege a los huevecillos y juveniles que se encuentran adentro. Un quiste puede contener hasta 500 huevecillos y juveniles. Los huevecillos dentro del quiste pueden permanecer viables por más de 30 años según las condiciones ambientales y las especies, lo cual dificulta su erradicación. Posterior a la introducción del NEP en el suelo, el NEP solo podrá detectarse después de que hayan crecido cultivos hospedantes susceptibles durante varios años. El NEP se mantiene o aumenta en cultivos y malezas susceptibles (plantas solanáceas) y se dispersa principalmente con la movilización del suelo.

1.3 Encuestas y vigilancia general

La ONPF utilizará y documentará la vigilancia general y las encuestas específicas para establecer un área de producción libre del NEP de acuerdo con los siguientes criterios.

1.3.1. En áreas agrícolas en las cuales el NEP nunca se ha detectado.

1.3.1.1. En áreas en las cuales los hospedantes susceptibles se han cultivado, una encuesta de detección oficial debe realizarse de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 1.5.1, para los campos plantados con hospedantes susceptibles.

1.3.1.2. La vigilancia general (NIMF 6: 2016) que muestra que un hospedante susceptible nunca se plantó en el área podrá ser suficiente para establecer un área de producción libre de NEP.

1.3.2. En áreas agrícolas en las cuales el NEP está presente y reglamentado.

Una encuesta de detección oficial debe realizarse de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 1.5.1.

1.4. Movilización de artículos reglamentados

La ONPF dispondrá lo siguiente:

- Identificación de la lista de artículos reglamentados (plantas, sus productos y subproductos, vehículos, maquinaria, herramientas, etc.)
- Requisitos en relación con la importación y movilización nacional de artículos reglamentados dirigidos a evitar la entrada del NEP al ALP.
- Control de artículos reglamentados que se movilizan al ALP.

- Delimitación de áreas protegidas, incluida las ALP así como las zonas tampón (c1.2.2 NIMF 4: 2017).

1.5. Especificaciones de la encuesta

1.5.1. Parámetros de la encuesta

Para establecer la ausencia del NEP, se realizará un muestreo sistemático a las áreas de producción con hospedantes susceptibles. Para los campos individuales, se muestreará todo el campo con un patrón uniforme en cuadrante a una tasa mínima de 400 puntos de muestra por hectárea. La encuesta debería realizarse posteriormente, dentro de un período de 12 meses, a un cultivo hospedante. Deberían tomarse muestras de suelo en los 30 cm. de la parte superior del suelo. El suelo mínimo que se recolecte de estos puntos es de 5,000 cc por hectárea. El suelo mínimo analizado por hectárea es de 5,000 cc. Las encuestas sucesivas del mismo campo aumentarán la probabilidad de detectar al NEP. El nivel de detección para el reconocimiento de ausencia de plagas podrá establecerse entre los países importador y exportador.

1.5.2 Áreas en las cuales no se ha detectado al NEP

Todos los campos con historial de haberse plantado con cultivos hospedantes susceptibles dentro de un ALP propuesta deberían muestrearse en forma sistemática tres veces durante un período mínimo de tres años o tres ciclos de cultivo, adhiriéndose a los parámetros establecidos en el apartado 1.5.1 y que se encuentren libres del NEP. El número de veces que un campo debe encuestarse para el reconocimiento de la ausencia del NEP podrá establecerse entre los países importador y exportador.

1.5.3. Áreas en las cuales se ha detectado al NEP

Todos los campos con historial de haberse plantado con cultivos hospedantes susceptibles dentro del ALP deberían muestrearse en forma sistemática siguiendo por lo menos tres ciclos de cultivos hospedantes susceptibles, adhiriéndose a los parámetros que figuran en el apartado 1.5.1 y que se han encontrado libres de NEP. Cuando un área está libre de hospedantes susceptibles como mínimo durante 30 años, las muestras de suelo deberían estar sujetas a un bioensayo si hay presencia de quistes de NEP para determinar su viabilidad y capacidad de reproducción.

1.6. Procesamiento de la muestra y metodología de identificación

1.6.1. Procedimiento para procesar la muestra

El suelo muestreado debería procesarse en un laboratorio aprobado por la ONPF utilizando procedimientos aceptados en forma científica y protocolos de laboratorio aprobados por la ONPF.

1.6.2. Metodología de identificación

La ONPF debería utilizar las pruebas descritas en el Anexo 8 de la NRMF 3: 2011.

1.7. Zona tampón

La zona tampón entre el área libre del NEP y las áreas adyacentes que producen hospedantes susceptibles comprenderá por lo menos 15 metros de tierra que no se utilice para la producción agrícola y todos los campos agrícolas que se encuentren inmediatamente adyacentes, sin separación de por lo menos 15 metros del área libre del NEP. Las restricciones sobre la movilización de artículos reglamentados hacia la zona tampón y desde ella se aplicarán tal como se especifica en el apartado 1.4.

2. Mantenimiento del ALP

La ONPF documentará las encuestas de detección, establecerá un proceso para prevenir la introducción del NEP al ALP e informará a los productores sobre las mejores prácticas de manejo con el fin de mitigar la introducción del NEP.

2.1. Movilización de artículos

La movilización de artículos hacia el ALP podrá prohibirse o restringirse para prevenir la introducción del NEP. La ONPF debe mantener registros que demuestren la aplicación de los requisitos para controlar la entrada de artículos, nacionales o importados, que presentan un riesgo de introducción del NEP al ALP.

2.2. Encuestas de detección

La ONPF realizará encuestas anualmente, muestreando un mínimo del 5 por ciento de los campos plantados con un cultivo hospedante y mantendrá registros que demuestren que el NEP no se ha detectado en el ALP. Las encuestas se realizarán tal como se especifican en el apartado 1.5.1. Los campos a los que se les realizarán encuestas se seleccionarán de tal forma que maximicen la probabilidad de detectar NEP.

2.3. Mejores prácticas de manejo

2.3.1. Los productores de cultivos hospedantes de NEP en el ALP deberían utilizar las mejores prácticas de manejo para evitar la introducción de suelo infestado y semillas de papa, incluido el mantenimiento de registros de cosecha. La ONPF monitoreará la aplicación de estas mejores prácticas de manejo.

2.3.2. La ONPF es responsable de dar a conocer las mejores prácticas de manejo concernientes al ALP.

3. Reconocimiento del ALP

3.1. Reconocimiento nacional

La Organización Nacional de Protección Fitosanitaria (ONPF) verificará y reconocerá de manera formal la situación libre de plaga dentro de su propio país y dará a conocer esta información a los productores, otras partes interesadas y al público. La ONPF debería poner esta información a

disposición de aquellos países con los cuales mantiene relaciones comerciales, según corresponda.

3.2. Reconocimiento de los países con los cuales mantiene relaciones comerciales

3.2.1. La ONPF del país exportador solicitará el reconocimiento del ALP por parte de la ONPF del país importador. Un procedimiento que se recomienda para el reconocimiento por parte del país importador se proporciona en la NIMF 29: 2017.

3.2.2. El país importador debería notificar oficialmente al país exportador si acepta o no reconoce la situación de ALP.

4. Suspensión de la situación de ALP

4.1. La situación de ALP se suspenderá inmediatamente al detectarse el NEP, ya sea a través de encuestas de detección u otros métodos validados por la ONPF (investigaciones/informes de investigación, intercepciones).

También podrá haber suspensión a raíz de procedimientos incorrectos o incumplimiento de las medidas fitosanitarias prescritos en la norma (por ejemplo, encuestas, control de movilización, etc.).

5. Acciones correctivas

5.1 Detección del NEP

5.1.1. La ONPF establecerá una cuarentena en un área apropiada que podrá incluir hasta un radio de 1 km alrededor del campo en donde se detectó el NEP y todos los campos relacionados. La ONPF y los colaboradores harán cumplir las medidas fitosanitarias especificadas en el plan de acciones correctivas/de contingencia para prevenir la dispersión y, de ser apropiado, erradicar la plaga para reestablecer la situación del ALP. El ALP podrá redefinirse cuando se haya detectado la plaga objetivo en un área limitada que pueda identificarse y aislarse.

5.1.2. La cuarentena incluirá restricción de movilización de artículos reglamentados fuera de la zona bajo cuarentena hasta que se haya comprobado la erradicación de la plaga.

5.2. Procedimientos erróneos que comprometen al ALP

La ONPF corregirá los procedimientos erróneos y demostrará que el error no ha permitido el establecimiento de la plaga. Si se puede aislar el área comprometida, las acciones correctivas pueden aplicarse solamente a esa área.

6. Reestablecimiento y redefinición de la situación del ALP

- 6.1. Detección de una plaga objetivo. El reestablecimiento del ALP ocurrirá solamente cuando se haya determinado que la plaga ha sido erradicada.
- 6.2. Procedimientos erróneos. El reestablecimiento del ALP ocurrirá solamente cuando se hayan tomado las acciones correctivas apropiadas y se haya determinado que el NEP no se ha establecido en el área.
- 6.3. Redefinición del ALP. Si se detecta el NEP en un área limitada que pueda identificarse y aislarse, entonces el ALP podrá redefinirse para excluir el área infestada. Si se ha establecido el NEP (tal como se ha demostrado con la encuesta de detección y delimitación), entonces el ALP debería cancelarse.

7. Funciones y responsabilidades

7.1. Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria (ONPF)

- 7.1.1. La ONPF es responsable de confirmar el cumplimiento de los requisitos para establecer y mantener el ALP.
- 7.1.2. La ONPF es responsable de proporcionar a los interesados y países con los cuales mantiene relaciones comerciales información sobre la vigilancia, incluidas las encuestas, inspecciones y otro tipo de información en cuanto al establecimiento y mantenimiento apropiado del ALP.
- 7.1.3. El país exportador tiene la obligación de notificar al país importador de cualquier cambio relacionado con la situación del ALP.
- 7.1.4. El país importador debería notificar al país exportador los casos de incumplimiento que podrán afectar el reconocimiento del ALP (NIMF 13: 2016).

Referencias

NIMF 4. 2017. *Requisitos para el establecimiento de áreas libres de plagas*. Roma, CIPF, FAO.

NIMF 6. 2016. *Directrices para la vigilancia*. Roma, CIPF, FAO.

NIMF 13. 2016. *Directrices para la notificación de incumplimiento y acción de emergencia*. Roma, CIPF, FAO.

NIMF 29. 2017. *Reconocimiento de áreas libres de plagas y de áreas de baja prevalencia de plagas*. Roma, CIPF, FAO.

Anexo 2: Criterios para la certificación de semilla de papa

1. Introducción

Este anexo describe los componentes básicos de los programas de certificación de semilla de papa reconocidos por la ONPF. La certificación de semilla de papa utiliza un enfoque de sistemas para controlar plagas reglamentadas que se encuentran en el material vegetal para producción de papa. Las plagas controladas a través de la certificación de semilla de papa son plagas no cuarentenarias reglamentadas. A la ONPF le compete el establecimiento o reconocimiento de los reglamentos para la producción, el análisis y la certificación de semillas de papa para respaldar la necesidad de contar con semilla de alta calidad en su industria nacional productora de papa.

Un programa reconocido de certificación de semilla de papa nacional o estatal también podrá servir de base para la certificación fitosanitaria, necesaria para la movilización internacional de semillas de papa.

2. Autoridad

La organización responsable de la certificación de semilla de papa debe estar constituida legalmente según la ley federal, estatal o provincial. Esta podría ser la ONPF o una entidad autorizada por ella.

3. Programas de certificación

En un programa de certificación de semilla de papa, la producción de semilla de papa debería originarse de plántulas *in vitro*, a las que se les ha realizado pruebas y que deberían reconocerse como una clase de semilla (Anexo 4). Los minitubérculos, microtubérculos o las plántulas producidas en un entorno protegido deberían utilizarse para producir la primera generación de campo. El número de generaciones de campo (Tabla 2.1) está limitado mediante reglamentación y es un componente esencial de un programa de certificación de semilla de papa con el fin de mantener el nivel elevado de calidad de la semilla.

Tabla 2.1: Clases¹ de semillas de papa en los países de la NAPPO en relación con la propagación en campo

País	Propagación en campo y clase de semilla						
	1	2	3	4	5	6	7
México	B	R1	R2	R3	C	~ ~ ~	~ ~ ~
Canadá	PE	E1	E2	E3	E4	F	C
Estados Unidos ²	G1	G2	G3	G4	G5	~ ~ ~	~ ~ ~

¹ B=básica, C=certificada, E=elite, F=fundación, G=generación, N=nuclear, PE=pre-elite, R=registrada

En EE. UU., algunos estados certifican las generaciones adicionales y utilizan diferentes nomenclaturas

3.1. Elementos de la certificación

3.1.1 Solicitud de certificación

El proceso de solicitud permite a la entidad certificadora a) determinar la elegibilidad del material propagativo que se introduce para la certificación, b) localizar y aprobar cada campo que entra al proceso de certificación, c) trazar el linaje de los lotes de semilla a su origen y d) completar el papeleo adicional necesario para documentar la inspección, prueba requerida y otros requisitos de la certificación.

3.1.2. Definiciones

Todos los términos utilizados en un programa de certificación deberían definirse en los reglamentos de la entidad certificadora que gobierna la certificación de semillas de papa.

3.1.3. Diagnóstico

La ONPF debería autorizar o reconocer los laboratorios que realizan pruebas para el programa de certificación (NRMF 9: 2009). Las pruebas de diagnóstico incluyen, entre otras a) el procesamiento de muestras para la recuperación o el aislamiento y la identificación de patógenos, b) la identificación de plagas utilizando caracteres morfológicos, c) la identificación de patógenos utilizando plantas indicadoras y d) las pruebas serológicas y basadas en el ácido nucléico. La selección del diagnóstico necesario para la certificación de la semilla se deja a discreción de la ONPF.

3.1.4. Elegibilidad

Cada clase de semilla que se ha de certificar debería contar con los requisitos prescritos que debe cumplir el material propagativo. Estos deberían incluir ausencia de plagas y enfermedades o requisitos sobre tolerancia que deben cumplirse al momento de la inspección y la prueba poscosecha necesaria como una condición de la elegibilidad para la certificación durante la próxima temporada de crecimiento. Además, para poder participar en un programa de certificación, toda la producción de papa dentro de una granja debe plantarse con semilla certificada.

- 3.1.5. Saneamiento
La entidad certificadora de semilla debería establecer requisitos de saneamiento para la producción y el almacenamiento de semillas de papas certificadas. El cumplimiento de los requisitos de saneamiento prescritos corresponde al productor de semilla de papa y debería verificarse y documentarse.
- 3.1.6. Aislamiento
El aislamiento físico para la producción de plántulas, microtubérculos y minitubérculos se logra produciéndolos en un entorno protegido tal como se describe en el Anexo 4. Deberían prescribirse las distancias entre los cultivos de semillas de papa y otros cultivos de papa o cultivos que son hospedantes de plagas de papa.
- 3.1.7. Mantenimiento
La entidad certificadora de semilla podrá establecer requisitos de producción para el control de plagas y para facilitar su detección durante la temporada de crecimiento.
- 3.1.8. Inspección
Deberían realizarse un mínimo de dos inspecciones visuales del cultivo durante la temporada de crecimiento. Podrán realizarse inspecciones de tubérculos durante la cosecha, mientras los tubérculos estén almacenados o al momento de la calificación y el embarque.
- 3.1.9. Requisitos previos a la plantación
Pueden requerirse pruebas de una muestra de un lote de semillas de papa como una condición para determinar la elegibilidad para la producción de semilla de papa certificada.
- 3.1.10. Pruebas poscosecha
Pueden requerirse pruebas poscosecha de un lote de semillas para confirmar su elegibilidad para plantar, la certificación o recertificación.
- 3.1.11. Tolerancias
Las tolerancias a plagas y enfermedades y la pureza de la variedad para cada clase de semilla debe especificarlos la entidad que realiza la certificación de semilla de papa.
- 3.1.12. Calificación/normas de los tubérculos
La calificación y normas especifican las tolerancias del tubérculo en cuanto a lesiones, pudrición y que esté libre de plagas transmitidas por tubérculos, además de especificar su tamaño y forma.
- 3.1.13. Rechazo o inelegibilidad.
La entidad que realiza la certificación debe especificar las razones de rechazo o inelegibilidad para la certificación.

3.1.14. Identificación

La documentación debería identificar, por lo menos, a la entidad certificadora, el productor, el lote de semilla, la categoría, la calificación, además de la variedad de la semilla en el envío. La documentación podrá incluir etiquetas, los sellos y los certificados en grandes cantidades expedidos por la entidad certificadora.

3.1.15. Mantenimiento de registros

Las entidades certificadoras deberían recolectar y mantener todos los datos pertinentes que estén relacionados con su programa de certificación. Esto debería incluir la información que permita rastrear los lotes de semillas certificados.

Referencia

NRMF 9: 2009. *Autorización de laboratorios para realizar pruebas fitosanitarias*. Ottawa, NAPPO.

Anexo 3: Introducción de germoplasma de papa

1. Introducción

El riesgo de plaga relacionado con la importación de germoplasma de papa podrá disminuirse a un nivel aceptable ya sea (i) con la implementación de un programa de cuarentena posentrada de papa, o (ii) asegurando el cumplimiento estricto de los requisitos de preentrada para papas.

2. Requisitos fitosanitarios

2.1 Consideraciones fitosanitarias fundamentales

Deben realizarse pruebas al germoplasma de papa y encontrarse libre de plagas cuarentenarias antes de importarse a un país miembro de la NAPPO o antes de liberarlo de un programa de cuarentena posentrada. También es necesario establecer un requisito adicional para detectar la ausencia de toda plaga no cuarentenaria reglamentada debido a que la presencia de plagas cuarentenarias puede enmascarse con la presencia de otras plagas de papa.

Las acciones fitosanitarias especificadas toman en cuenta el hecho de que varias plagas se excluyen de la semilla botánica y el polen o pueden eliminarse mediante la micropropagación aséptica. Muchas plagas endófitas y/u obligadas pueden eliminarse mediante métodos terapéuticos antes de la micropropagación.

La ausencia de plagas puede determinarse mediante la observación visual de señales y síntomas de enfermedad en plantas, mediante bioensayo en las plantas indicadoras apropiadas y con la aplicación de procedimientos de detección específicos para plagas en laboratorio.

El germoplasma que se importe basándose en los requisitos de preentrada debe haberse sometido a prueba en conformidad con los requisitos establecidos por el país importador según la autoridad de la ONPF del país exportador y acorde con la NIMF 33: 2016. Los resultados negativos que se obtengan de todas las pruebas realizadas deben apoyarse con los registros apropiados que mantiene el laboratorio que realiza la prueba y estar disponibles para su examen minucioso por parte del país importador. Una vez que se reciba, el germoplasma debe inspeccionarse para detectar la presencia de cualquier señal o síntoma que indique la presencia de plagas.

2.1.1. Acciones fitosanitarias específicas

El germoplasma de origen silvestre, nativo y de campo debe colocarse en cultivo *in vitro* para excluir plagas no endófitas relacionadas. Las microplántulas establecidas deben estar libres de microorganismos contaminantes y propagarse utilizando técnicas y prácticas asépticas de laboratorio que estén estandarizadas. A las microplántulas establecidas deben realizárseles pruebas mediante bioensayo en las plantas indicadoras apropiadas para determinar la ausencia de plagas

transmitidas en forma mecánica (por ejemplo, virus), someterse a pruebas de laboratorio para detectar plagas endofitas específicas (a saber, viroides, virus, bacterias, fitoplasmas), y cultivarse hasta su madurez en un entorno protegido para realizar pruebas contra la ausencia de plagas transmitidas en forma no mecánica (a saber, algunos virus). La Tabla 3.1 lista las plagas de papa que pueden no excluirse mediante el cultivo *in vitro* y que permanecen relacionadas con las plántulas micropropagadas.

2.1.2. Bioensayo en plantas indicadoras

El bioensayo comprende la inoculación de savia extraída de las plantas de prueba en una solución amortiguadora estabilizadora apropiada, en hojas de una serie de plantas indicadoras generalmente despolvadas, preinoculadas con un abrasivo suave (*por ejemplo*, carborundo). La serie de plantas indicadoras deberían incluir, entre otras, *Capsicum annuum*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana benthamiana*, *N. bigelovii*, *N. clevelandii*, *N. debneyi* y *N. tabacum* cv. Samson y White Burley. Las plantas indicadoras deben encontrarse en óptimo estado de crecimiento cuando se inoculan, y cultivarse en condiciones ambientales propicias para el desarrollo de síntomas de enfermedades. Posterior a la inoculación, las plantas deben cultivarse el tiempo suficiente para el desarrollo de síntomas de enfermedades. Las plantas indicadoras se observan visualmente para detectar síntomas de enfermedad bajo condiciones óptimas de iluminación tomando en cuenta las manchas, las lesiones locales, necrosis de hojas y peciolo, amarillamiento u otros trastornos de la planta en comparación con las plantas control inoculadas con soluciones amortiguadoras.

2.1.3. Prueba de laboratorio

Existen varios métodos de laboratorio para detectar patógenos específicos de plantas. Aunque varios métodos de detección de patógenos se fundamentan en la serología, a saber, la reacción de un anticuerpo específico con un antígeno expresado mediante la plaga de papa objetivo o un enfoque molecular, *a saber*, una prueba que tenga como objetivo una secuencia específica de ácido nucleico de plaga de papa; otros métodos también podrán tener validez. Todos los protocolos de laboratorio deberían realizarse conforme a un procedimiento operativo estandarizado en un sistema de aseguramiento de la calidad (NRMF 9: 2009) aprobado por la ONPF.

Las pruebas serológicas comunes son el ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), la inmunofluorescencia (IMF) y los estuches de diagnóstico disponibles comercialmente (por ejemplo, tiras inmunológicas). Los protocolos serológicos deben demostrar que tienen la sensibilidad adecuada para la detección de plagas objetivo y deben utilizar anticuerpos con la especificidad adecuada con el fin de detectar todos los géneros de la plaga objetivo. Las pruebas serológicas deben incluir controles negativos y positivos para verificar los procedimientos

apropiadas para las pruebas.

Las pruebas moleculares incluyen hibridación puntual (DBH, por su sigla en inglés) y una de las muchas variantes del ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR convencional, PCR en tiempo real y retrotranscriptasa-PCR. Aunque las pruebas moleculares, debido a su propia naturaleza, tienden a tener una sensibilidad elevada, dicha sensibilidad debe validarse; además, las sondas y los cebadores que se utilizan para los ensayos deben demostrar que tienen especificidad para todos los géneros de la plaga objetivo. Se recomienda la verificación de la identidad del amplicón mediante la secuenciación, la hibridación con sonda, el análisis de la curva de fusión o el poliformismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por su sigla en inglés). Las pruebas de PCR deben incluir controles que demuestren la ausencia de inhibidores en la muestra, que no hubo contaminación cruzada y que todos los componentes de la prueba estaban funcionando perfectamente.

La electroforesis en gel de poliacrilamida inversa (rPAGE) es una prueba de laboratorio aceptable para confirmar la ausencia de viroides en muestras de tejido de papa. El microscopio electrónico de transmisión (MET) que utiliza procedimientos estandarizados de inmersión de hoja y tinción negativa puede utilizarse para realizar pruebas con el fin de detectar la presencia de partículas de virus, pero los resultados negativos del MET por sí solo resultan insuficientes para llegar a la conclusión de que hay ausencia de todos los virus de papa.

2.1.4. Prueba de crecimiento

Los virus que no se transmiten en forma mecánica, para los cuales no existen pruebas de laboratorio específicas, así como las plagas de papa no descritas (desconocidas) pueden detectarse observando la salud de las plantas que se obtienen de las plántulas micropropagadas en un entorno protegido. Las plantas deberían cultivarse en un medio de crecimiento pasteurizado con luz, temperatura y nutrientes adecuados para el crecimiento apropiado de la planta. Las plantas cultivadas deben crecer hasta su madurez (normalmente entre 80 y 120 días) y observarse cuidadosamente con intervalos regulares para detectar síntomas. Los síntomas de moteado, mosaico, necrosis, enanismo, epinastia y marchitez, entre otros, son pruebas de la presencia de plagas de plantas. Los trastornos fisiológicos debido a condiciones inapropiadas de crecimiento y las anomalías genéticas en el germoplasma de papa pueden ocultar la presencia de plagas de papa y salvo si se deba obviamente a los efectos no patogénicos, el germoplasma debe rechazarse.

2.1.5. Polen y semilla botánica

El germoplasma de papa en forma de polen y semilla botánica debería recolectarse solamente de las plantas con apariencia saludable. Se deben realizar pruebas a una muestra representativa para detectar plagas de polen y plagas transmitidas por semilla (Tabla 3.1).

Referencias

NRMF 9. 2009. *Autorización de laboratorios para realizar pruebas fitosanitarias*. Ottawa, NAPPO.

NIMF 33. 2016. *Material micropropagativo y minitubérculos de papa (Solanum spp.) libres de plagas para el comercio internacional*. Roma, CIPF, FAO .

Tabla 3.1: Plagas de papa no excluidas de la micropropagación

Viroide

*Potato spindle tuber viroid***

Virus

Andean potato latent virus**

Andean potato mottle virus

Arracacha virus B – cepa oca **

*Beet curly top virus**

Potato black ringspot virus

Potato deforming mosaic virus*

Potato latent virus

Potato leaf roll virus

Potato mop-top virus

Potato virus A

Potato virus M

Potato virus S

*Potato virus T***

Potato virus U

Potato virus V

Potato virus X

Potato virus cepas Y (Y^O, Y^C, Y^N, Y^{Wilga} e Y^{NTN})

Potato yellow vein virus*

Potato yellowing virus**

Tobacco necrosis virus

Tobacco rattle virus

Tobacco ringspot virus – cepa calico

Tomato black ring virus

Bacteria

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*

Dickeya spp.

Pectobacterium atrosepticum

Ralstonia solanacearum raza 3, biovar 2

Fitoplasma

Potato purple top*

Potato witches' broom*

*No se han transmitido en forma mecánica.

**Transmitido por el polen y semilla.

Anexo 4: Requisitos para microplántulas y minitubérculos

1. Introducción

Las microplántulas se propagan *in vitro* en un medio nutritivo a partir de los esquejes nodales derivados de las microplántulas madre *in vitro*. Los minitubérculos se propagan de las microplántulas o de una generación anterior de minitubérculos. Los minitubérculos se cultivan en suelo pasteurizado o un medio de crecimiento sin suelo en un entorno protegido tal como un invernadero o invernadero con malla. El riesgo bajo de plagas se logra mediante la propagación de material madre que esté libre de plagas y evitando la exposición de microplántulas y minitubérculos a inóculos de plagas durante la propagación, el almacenaje y la distribución. Se puede encontrar información adicional en la NIMF 33: 2016.

2. Requisitos fitosanitarios

2.1. Consideraciones fitosanitarias fundamentales

Las microplántulas y los minitubérculos se derivan de germoplasma parental *in vitro* que deben estar libres de todas las plagas de papa (véase el Anexo 3). Muchas plagas de papa se excluyen mediante la micropropagación bajo condiciones asépticas, y las plagas endófitas no excluidas (a saber, viroides, virus, bacterias) pueden eliminarse mediante métodos terapéuticos antes de la micropropagación. Debe demostrarse que el germoplasma de parental del cual se vuelven a propagar las microplántulas y minitubérculos esté libre de plagas de papa endófitas que son endémicas a través de pruebas anuales de laboratorio.

Las microplántulas y los minitubérculos se propagan y mantienen libres de plagas de papa asegurando su aislamiento de los inóculos de plaga de papa. La propagación y las pruebas de laboratorio deben realizarse dentro de un programa de aseguramiento de la calidad realizado por la ONPF o bajo su supervisión o a quien ella designe, en instalaciones que cumplan con los criterios de un laboratorio autorizado (NRMF 9: 2009; NIMF 33: 2016).

2.2. Acciones fitosanitarias específicas

2.2.1. Microplántulas

Las microplántulas deben propagarse, cultivarse y mantenerse bajo condiciones asépticas. Deben inspeccionarse visualmente para asegurar la ausencia de contaminación microbial y el mantenimiento de las condiciones asépticas. Las microplántulas libres de plagas deben mantenerse bien separadas del material vegetal que no esté libre de plagas y de vectores de plagas, todo el tiempo durante la propagación, el mantenimiento y el envío. Cada envío de microplántulas debe poder rastrearse hasta su origen parental.

2.2.2. Producción de minitubérculos

Los minitubérculos deben propagarse a partir de microplántulas certificadas libres de plagas. Las instalaciones de producción deben cumplir los requisitos de un sitio de producción libre de plagas y deben cumplir con los siguientes criterios:

- contar con una instalación construida para impedir la entrada de plagas y permitir la descontaminación, de ser necesario;
- utilizar solamente medio de crecimiento sin suelo o suelo sometido a tratamiento con calor;
- utilizar agua sin plagas (por ejemplo, de pozo profundo) y fertilizante inorgánico;
- mantener el sitio de producción libre de malezas y residuos de cultivos;
- evitar el ingreso de plagas mediante la restricción de su entrada y utilizando pediluvios, ropa exclusiva para exterior y fomentando el lavado de manos.

2.2.3. Inspección y auditoría de minitubérculos

Los minitubérculos deben estar certificados según los términos de un programa de certificación de semilla de papa de la ONPF. La inspección visual del cultivo por parte de la ONPF debería realizarse durante la etapa vegetativa de producción de minitubérculos para asegurar la ausencia de plagas y las normas de calidad deben cumplirse en la instalación, así como en los procesos operativos. Para cada envío se deberían realizar pruebas de auditoría poscosecha a los minitubérculos para detectar una o más plagas, las cuales funcionen como plagas centinelas de la situación de ausencia de plagas.

Referencias

NIMF 33. 2016. *Material micropropagativo y minitubérculos de papa (Solanum spp.) libres de plagas para el comercio internacional*. Roma, CIPF, FAO.

NRMF 9: 2009. *Autorización de laboratorios para realizar pruebas fitosanitarias*. Ottawa, NAPPO.

Anexo 5: Medidas fitosanitarias aplicables a papa de mesa y para procesamiento

1. Introducción

El uso previsto podrá afectar el riesgo de plagas de un producto debido a que algunos usos previstos podrán permitir el establecimiento o la dispersión de plagas reglamentadas mientras que otros usos representan un riesgo menor de establecimiento de plagas. Algunos usos previstos de las papas (por ejemplo, para plantar) están relacionados con una probabilidad mayor de establecimiento de plagas reglamentadas que otros (por ejemplo, para procesamiento o papa de mesa). Esto podría resultar en la aplicación de medidas fitosanitarias distintas para las papas según el uso previsto. Cualquier medida fitosanitaria que se aplique debería ser proporcional al riesgo de plaga identificado (NIMF 32: 2016 apartado 1.2).

Algunas medidas de mitigación del riesgo generalmente son las mismas para papa de mesa y de procesamiento que para semillas de papa, pero se podrán aplicar en forma distinta. Otras medidas específicas para papa de mesa y procesamiento podrán incluir lavado de tubérculos, pelado, inhibición del brote, acuerdos de cumplimiento, embalaje específico y etiquetado.

2. Medidas fitosanitarias

2.1 Tratamientos

2.1.1 Eliminación de suelo

El suelo adherido a las papas o cualquier medio de transporte que participa en la movilización de papas constituye una vía de alto riesgo para la dispersión, entrada y el establecimiento de plagas transmitidas por el suelo (NAPPO, 2003). La movilización de plagas a través de esta vía se mitiga mediante la eliminación del suelo de los tubérculos y medios de transporte. El suelo puede eliminarse lavando, cepillando y/o pelando los tubérculos de papa.

2.1.2 Inhibición del brote

Se podrán aplicar tratamientos de inhibición de brotes para impedir el establecimiento de plagas transmitidas por tubérculos a través de la plantación no aprobada de tubérculos previstos para uso final de mesa o procesamiento. Los químicos aprobados para inhibición de brotes podrán aplicarse al cultivo en el campo o a tubérculos después de la cosecha. El pelado de tubérculos también constituye una medida de inhibición del brote.

2.2 Acuerdos de cumplimiento

La dispersión y el establecimiento de plagas podrán mitigarse restringiendo las importaciones de papa a instalaciones específicas de procesamiento y embalaje que implementan medidas preaprobadas para la eliminación segura del suelo, papas descartadas, desechos del procesamiento y el agua del lavado. El cumplimiento por parte de dichas instalaciones debería establecerse y monitorearse por la ONPF con acuerdos firmados, inspecciones periódicas y auditorías.

2.3 Mercado restringido

El riesgo de plagas relacionado con papas de mesa podrá mitigarse restringiendo el mercado a cierta época del año, o en centros urbanos grandes y regiones geográficas en las cuales es poco probable que ocurra la dispersión y el establecimiento de plagas de papa transmitidas por tubérculos. El embalaje (por ejemplo, en pequeñas unidades) y el etiquetado deberían ser apropiados para los mercados de uso final que se tienen como objetivo.

Referencias

NIMF 32. 2016. *Categorización de productos según su riesgo de plagas*. Roma, CIPF, FAO.

NAPPO. 2003. Posición de la NAPPO sobre movilización de suelo.
<http://www.nappo.org/Standards/Other-Docs/Soil-e03.pdf>

Anexo 6: Detección e identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

1. Introducción

Se dispone de pruebas de laboratorio para detectar y confirmar la identidad de la bacteria (De Boer *et al.*, 2005) con el fin de mitigar la diseminación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms), el agente causal de la pudrición anular bacteriana de la papa, a través de semilla-tubérculo de papa certificada con infección latente. Este anexo ofrece un resumen de los métodos convenidos por los países miembros de la NAPPO para realizar pruebas a los lotes de semilla y a los tubérculos individuales de papa. No aborda la inspección de campo ni las pruebas a las plantas provenientes del campo, las cuales son elementos fundamentales de la certificación de semilla de papa y del control de la pudrición anular bacteriana. En el contexto de este anexo, el indexado se refiere al proceso de preselección del lote de semilla de papa para detectar Cms, la confirmación alude a los requisitos de la prueba para confirmar un resultado positivo en una prueba de indexado y la verificación hace referencia a las pruebas adicionales para corroborar una prueba con resultados positivos.

2. Recolección y tamaño de la muestra

La muestra poscosecha debería consistir en un mínimo de 400 tubérculos recolectados al azar del lote de semilla en el momento de la cosecha o del lugar de almacenamiento. Sin embargo, este tamaño de muestra solo brinda un 0.9975 de probabilidad para detectar una incidencia de 1.5% de tubérculos infectados con Cms, en una población dada.

- La probabilidad de detectar Cms en un lote de semilla se ve limitada por el tamaño de la muestra, la incidencia del patógeno y la metodología del diagnóstico.
- Solo podrán recolectar muestras quienes estén designados oficialmente por la organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) del país exportador.
- Las muestras deben identificarse de tal forma que permita la rastreabilidad hasta el lote de semilla específico del cual se recolectó la muestra.
- Las muestras deben protegerse de condiciones que puedan interferir con la detección de Cms o con la integridad de las mismas durante la recolección, el transporte y el almacenamiento.

3. Metodologías para el diagnóstico

En principio, las ONPF del país importador y exportador deben convenir en las metodologías que han de utilizarse para el indexado, la confirmación y la verificación, y deberían cumplir las siguientes directrices:

- Las pruebas deben llevarse a cabo conforme a un protocolo oficial convenido por la ONPF.
- Las pruebas deben realizarse bajo la dirección de un fitopatólogo calificado o bajo un sistema de aseguramiento de la calidad aprobado por las ONPF del país importador y exportador.
- El diagnóstico positivo de Cms debe basarse en resultados positivos de por lo menos dos metodologías de diagnóstico.
- La Figura 6.1 muestra el esquema que se recomienda para indexar lotes de semilla de papa para detectar la presencia de Cms.
- Deben utilizarse controles positivos y negativos junto con todas las muestras de pruebas.

3.1 Ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA)

La prueba ELISA debería ser la metodología de prueba inicial del indexado. Tiene un alto nivel de sensibilidad para Cms, es rápida y adecuada para procesar grandes cantidades de muestras ya que puede aplicarse directamente al extracto de la muestra.

- Se debería utilizar un procedimiento ELISA de triple anticuerpo con anticuerpos que puedan adquirirse en el ámbito comercial. Se recomienda el anticuerpo monoclonal específico 1H3 o un equivalente que esté disponible comercialmente.
- Los valores umbral positivo y negativo deberían basarse en la absorbencia de las muestras positiva y negativa incluidas en cada placa (De Boer *et al.*, 1996).

3.2 Inmunofluorescencia indirecta (IMF)

Se recomienda la IMF como metodología de prueba para la confirmación de una prueba de indexado ELISA que haya dado resultados positivos.

- Para esta metodología se recomienda el anticuerpo monoclonal 9A1 o un equivalente que pueda adquirirse en el comercio.
- La detección sistemática de cinco o más células fluorescentes de bacterias corineformes típicas por campo de microscopio a 1000X se considera positiva para Cms.

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR ofrece el nivel más alto de sensibilidad y especificidad para detectar Cms y por lo tanto, debería mantenerse como metodología de confirmación de una prueba de indexado ELISA que haya dado resultados positivos.

- Los cebadores y las sondas específicos que son útiles para una PCR convencional y de tiempo real figuran en De Boer *et al* (2005); los datos de

la eficacia deben estar disponibles para otros cebadores y sondas que se utilicen para la detección de Cms.

- Los controles negativos deben ser claramente negativos para asegurar que no ocurra contaminación cruzada que es un riesgo especial de las tecnologías de PCR.
- Los amplicones de PCR convencional en muestras positivas deben caracterizarse mediante la hibridación, el análisis de restricción o la secuenciación de ADN.
- La temperatura de fusión de los amplicones de PCR en tiempo real en muestras positivas debe concordar con la temperatura de fusión de los amplicones de las muestras de control positivas.

3.4 Bioensayos

La opción o necesidad de efectuar un ensayo biológico para Cms para verificar una prueba de confirmación con resultado positivo se considerará sólo si los resultados de pruebas anteriores son contradictorios. La berenjena (*Solanum melongena*) cv. Black Beauty es el hospedante recomendado para el bioensayo, pero éste puede requerir hasta 40 días para completarse, prolongando mucho la prueba para la mayoría de las aplicaciones relacionadas con la certificación y el comercio.

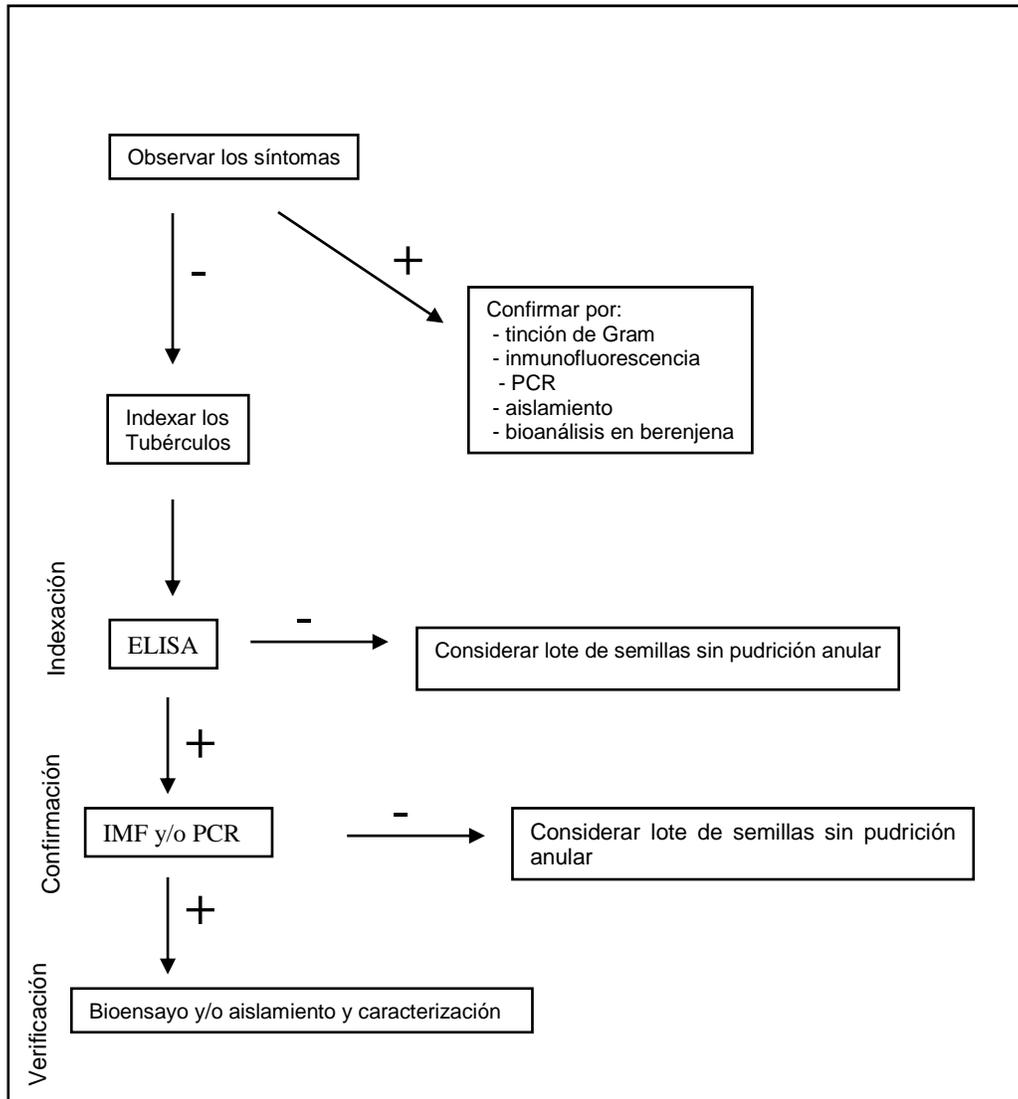
3.5 Aislamiento y caracterización

La verificación final de Cms, posterior a otras metodologías de diagnóstico con resultados positivos, puede lograrse mediante el aislamiento y la caracterización de la bacteria. Sin embargo, obtener un cultivo puro de Cms para la caracterización resulta problemático, toma tiempo y por lo general, requiere la inoculación de la berenjena para aumentar en forma selectiva la población de Cms antes de aislarlo en un medio nutritivo. La verificación de Cms a este nivel no es rutinaria para las aplicaciones relacionadas con la certificación o el comercio, sino que más bien se utiliza para realizar investigación y/o archivar los aislados.

Referencias

- De Boer, S.H., A. Boucher y T.L. DeHaan 1996. Validation of thresholds for serological tests that detect *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tuber tissue. Bull. OEPP/EPPO Bull. 26:391-398.
- De Boer, S.H., A. O. Charkowski, R. T. Zink, J. P. Martinez-Soriano y A. Flores-Olivas. 2005. Procedure for detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spiekermann and Kotthoff) Davis, Gillespie, Vidaver and Harris in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. Revista Mexicana de Fitopatología 23:329-334.

Figura 6.1 Esquema para indexar lotes de semilla de papa para detectar la presencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, el agente causal de la enfermedad de la pudrición anular bacteriana



Páginas 17-20 en North East Potato Technology Forum '02, 11 y 12 de marzo del 2002, Fredericton, Nueva Brunswick.

Anexo 7: Directrices para la identificación de *Meloidogyne chitwoodi*, *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *Ditylenchus destructor* y *D. dipsaci*

1. Introducción

Para mitigar la dispersión de *Meloidogyne chitwoodi*, *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *Ditylenchus destructor* y *D. dipsaci* a través de los tubérculos de papa, es primordial la identificación correcta de la especie. Para ello, se ha recopilado una serie de métodos eficaces de laboratorio (Carta *et al.*, 2006). Este anexo ofrece un resumen de los métodos convenidos por los países miembros de la NAPPO para la identificación apropiada de especies de nematodos reglamentados que son patógenos de la papa.

No se aborda aquí la inspección de campo, el diagnóstico de suelo proveniente del campo, ni los métodos de muestreo de los lotes de semilla de papa o los envíos comerciales de papa. En el contexto de este anexo, la confirmación se refiere a los requisitos de la prueba para comprobar el resultado positivo de una detección morfológica.

2. Recolección de la muestra

La muestra ideal debería representar tubérculos que presenten síntomas o signos de infección de nematodos. Cuando la muestra no presente síntomas ni signos, ésta puede obtenerse de tubérculos recolectados al azar al momento de la cosecha, del lugar de almacenamiento o de un envío.

- Las muestras deben identificarse de tal forma que permita la rastreabilidad hasta el lote de semilla específico del cual se obtuvo la muestra.
- Las muestras deben protegerse de condiciones que puedan interferir con la detección de nematodos o con la integridad de las mismas durante la recolección, el transporte y el almacenamiento; y deben enviarse al laboratorio de nematología lo antes posible para ser analizadas.

3. Metodologías para el diagnóstico

En principio, las ONPF del país importador y exportador deben convenir en las metodologías que han de utilizarse para la extracción, la identificación morfológica y la confirmación molecular; y deberán cumplir las siguientes directrices:

- Las pruebas deben llevarse a cabo conforme a un protocolo oficial convenido por la ONPF.
- Las pruebas deben realizarse bajo la dirección de un fitopatólogo calificado o dentro de un sistema de aseguramiento de la calidad aprobado por las ONPF del país importador y exportador.
- El esquema que se recomienda para la identificación de nematodos reglamentados hasta el nivel de la especie se encuentra en la Figura 7.1.
- Deben utilizarse controles positivos y negativos junto con las muestras de pruebas en las pruebas moleculares confirmatorias.

3.1 Morfología microscópica – prueba principal

Para las hembras y los quistes se requieren imágenes y medidas de las características importantes desde el punto de vista del diagnóstico para todos los estadios de vida disponibles, incluyendo la cabeza, el cuello y las regiones perineal o fenestral (patrones de incisuras o montaje de cono). Las fuentes para asistir con el diagnóstico morfológico se encuentran disponibles en Carta *et al.*, 2005 y en línea en las siguientes direcciones:

<http://nematode.unl.edu/melchit.htm> para *Meloidogyne chitwoodi*

http://www.aphis.usda.gov/ppq/manuals/domestic/pdf_files/GNPM.pdf para *Globodera*;

<http://nematode.unl.edu/didestr.htm> and <http://nematode.unl.edu/ditdips.htm> para *Ditylenchus destructor* y *D. dipsaci*; y

<http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm> para todas las especies.

- Para la identificación con pruebas moleculares confirmatorias, basta tener un mínimo de dos especímenes juveniles o machos con caracteres bien definidos desde el punto de vista del diagnóstico; sin embargo, sería muy conveniente tener entre 4 y 10 especímenes.
- Para la identificación morfológica se requiere un mínimo de 4 patrones perineales de nematodos agalladores (*Meloidogyne*), montados con las secciones del cuello.
- Para identificar ambas especies, se deberían montar un mínimo de 4 patrones fenestrales de nematodos enquistadores de la papa (*Globodera rostochiensis* y *G. pallida*) con juveniles (J2).
- Para la identificación morfológica de nematodos del tallo y bulbo *Ditylenchus dipsaci* y nematodo del tubérculo de la papa *D. destructor*, se debería tomar un mínimo de 10 especímenes adultos con las medidas de características importantes desde el punto de vista del diagnóstico.
- Los especímenes físicos, preferiblemente en portaobjetos, deberían archivar en una colección nematológica reconocida en el ámbito internacional.

3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) – prueba confirmativa

La prueba de PCR proporciona el nivel más alto de sensibilidad y especificidad para la identificación de las especies y debería conservarse como metodología confirmatoria para una prueba morfológica con resultados positivos. La confirmación final debería realizarse mediante PCR en los casos en que la identificación de un espécimen al nivel de la especie podría prohibir la movilización de papas entre los países de la NAPPO.

Los iniciadores y sondas específicos que se recomiendan para PCR figuran en Carta *et al* (2006). Los datos de la eficacia deben estar disponibles para otros iniciadores y sondas utilizados para la confirmación de especies.

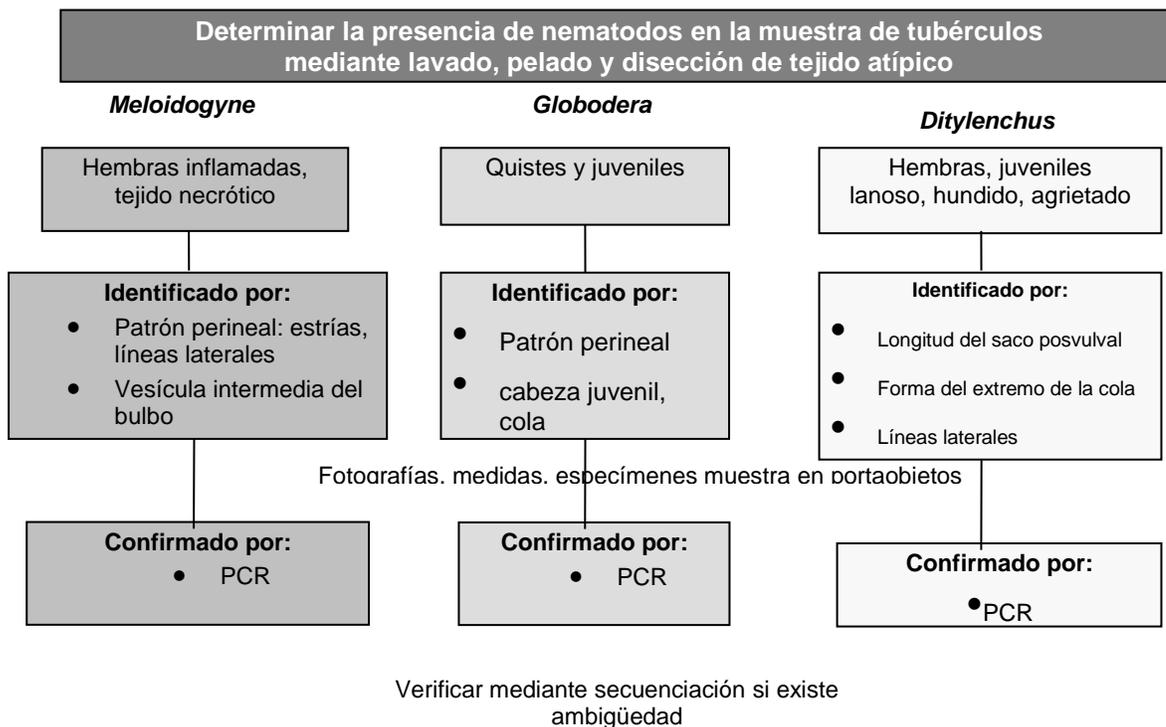
- Los controles negativos deben ser claramente negativos y los amplicones en muestras positivas deben caracterizarse mediante análisis de restricción o secuenciación de ADN. Debe utilizarse como mínimo una repetición para cada control positivo, negativo y muestras.
- Los especímenes muestra deberían mantenerse para la verificación molecular ya sea congelados a -80°, en alcohol (95 a 100% para conservarlos,

posteriormente diluido a 70% para su envío - Quicke *et al.*, 1999; O'Meally y Livingston, 2001), en sal (comentarios personales de Waeyenberge), papel de filtro (Owens y Szalanski, 2005) o como ADN amplificado (Skantar y Carta, 2005).

Referencias

- Carta, L.K., Z. A. Handoo, T. O. Powers, S. A. Miller, R. Pérez-Zubiri y A. Ramírez-Suárez. 2005. Guidelines for isolation and identification of some regulated nematodes of potato in North America. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:211-222.
- O'Meally, D., and S. Livingston. 2001. Opportunistic collection of tissue in the field. Evolutionary Biology Unit, Australian Museum, Sydney, NSW, Australia, 21 pp.
- Owens, C.B., and A.L. Szalanski. 2005. Filter Paper for Preservation, Storage, and Distribution of Insect and Pathogen DNA Samples. *Journal of Medical Entomology* 42:709--711.
- Quicke D.L.J., R. Belshaw y C. Lopez-Vaamonde. 1999. Preservation of hymenopteran specimens for subsequent molecular and morphological study. *Zoologica Scripta* 28:261 267.
- Skantar, A.M., and L.K. Carta. 2005. Multiple displacement amplification (MDA) of total genomic DNA from *Meloidogyne* spp. and comparison to crude DNA extracts in PCR of ITS1, 28S D2-D3 rDNA and Hsp90. *Nematology* 7:285-293.

Figura 7.1: Determinación de *Meloidogyne chitwoodi*, *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *Ditylenchus destructor* y *D. dipsaci* en tubérculos de papa



Anexo 8: Detección e identificación de *Ralstonia solanacearum* filotipo II, secuevar 1 (raza 3 biovar 2)

1. Introducción

Ralstonia solanacearum filotipo II secuevar 1 (RS filoll/sec1), identificada anteriormente como raza 3 biovar 2 (RS r3/b2), causa la pudrición café de la papa, marchitez bacteriana del geranio y otras especies de plantas. La dispersión del patógeno mediante semillas tubérculos de papa enfermas e infectadas en forma latente y/u otros materiales vegetales causa preocupación especial en el comercio internacional de plantas agrícolas y partes de plantas.

Con el fin de mitigar la dispersión de RS filoll/sec1 (r3/b2), se encuentran disponibles pruebas de laboratorio para detectar y verificar la identidad de la bacteria (Fegan y Prior 2005, Smith y De Boer 2009). Este anexo esboza los métodos convenidos por los países miembros de la NAPPO para realizar pruebas al material vegetal importado/exportado incluyendo los lotes de semilla de papa, tubérculos individuales, plántulas de geranio, plantas y otro material vegetal en los cuales RS filoll/sec (r3/b2) pueda estar presente. Este anexo no aborda la inspección de campo o las pruebas de plantas de los campos que son los componentes fundamentales de la certificación de semilla de papa o las certificaciones individuales de plantas.

En el contexto de este anexo, el indexado se refiere al proceso de preselección del material vegetal para detectar RS filoll/sec1 (r3/b2), la confirmación alude a la prueba necesaria para confirmar un resultado positivo en una prueba de indexado y la verificación hace referencia a las pruebas adicionales para corroborar una prueba con resultados positivos.

2. Antecedentes

Ralstonia solanacearum, causante de la marchitez bacteriana en más de 200 especies de plantas, se clasificó inicialmente en 5 razas y 5 biovares (Tabla 10.1) basándose en el rango de hospedante (Buddenhagen y Kelman, 1964) y la capacidad para oxidar varios disacáridos y hexosa (Hayward, 1964, He *et al.*, 1983). Sin embargo, las clasificaciones de raza y biovar no corresponden a cada una de ellas, excepto que la cepa de la raza 3 causante de la pudrición café de la papa generalmente equivale al biovar 2 y se conoce como cepa de la raza 3 biovar 2 (RS r3/b2). No existen pruebas de laboratorio estandarizadas para definir la "raza" de RS debido a que los rangos de hospedantes de la cepa RS son amplios y con frecuencia se superponen. Por ende, la caracterización entre las especies descritas en este anexo se basa en la clasificación nueva del filotipo/secuevar con la raza/biovar como referencia.

Se introdujo un esquema nuevo de clasificación intraespecífico basado en el análisis de la secuencia nucleotida de tres genes marcadores, región espaciadora intergénica del operón *rrn* (ITS, por su sigla en inglés), endoglucanasa (*egl*) y regulador transcripcional (*hrpB*) (Fegan y Prior 2005) para distinguir las cepas de RS en cuatro filotipos que

acomodan secuevares como subgrupos. El filotipo con la clasificación secuevar es bastante constante con la raza y el sistema de biovar, y en algunos casos, proporciona una indicación del origen geográfico o de la patogenicidad de las cepas (Tabla 8.1). En este sistema, RS r3/b2 equivale más o menos a RS filotipo II secuevar 1 (RS filoll/sec1).

Varias técnicas, por ejemplo métodos serológicos, basadas en anticuerpos monoclonales y los métodos moleculares/biotécnicos basados en PCR, se han utilizado para elaborar protocolos para la detección e identificación específica de las especies de RS en su totalidad.

Tabla 8.1: Clasificaciones interespecies e intraespecies del complejo de especies de *Ralstonia solanacearum*

Filotipo	Secuevar	Raza	Biovar	Rango de hospedante	Origen geográfico
I	12-18	1,4,5	3,4,5	Rango de hospedante amplio	Asia, Australia y Américas
IIa	1-2	3	2,2T	Papa, geranio y otras solanáceas	Sudamérica
	3-4	2	1	Banano y otras plantas musáceas	Caribe, Brasil y Filipinas
IIb	5-7	1-2	1	Rango de hospedante amplio	Américas
III	19-23	Indefinido	1,2T	Rango de hospedante amplio	África
IV	9-11	Indefinido	1,2,2T,BD B, RG	Clavo, papa o banano	Indonesia y Asia

* El filotipo II se ha dividido en subgrupos distintos según los autores (Fegan y Prior 2005, Denny 2006, Castillo y Greenberg 2007, Cellier y Prior, 2010).
Distribución mundial salvo para EE.UU. y Canadá
BDB: mancha rojiza del seudotallo del banano;
RG: *Ralstonia syzygii*.

3. Recolección y tamaño de la muestra

La muestra debería representar al material vegetal que presenta síntomas o signos de marchitez bacteriana. Cuando el material vegetal no manifiesta síntomas o signos, la muestra podrá ser una colección al azar del material vegetal que se ha tomado al momento de la cosecha o del almacenaje para que represente un envío.

- La probabilidad de detectar RS filll/sec1 (r3/b2) en un envío de plantas o partes de plantas está limitada por el tamaño de la muestra, la incidencia del patógeno y la metodología del diagnóstico.
- Solo deberían recolectar muestras personas designadas oficialmente por la organización nacional de protección fitosanitaria del país exportador.
- Las muestras deben identificarse de tal forma que permita rastrearlas al lote específico de semillas o envío de plantas del cual se recolectaron.
- Las muestras deben protegerse contra condiciones que puedan interferir con la detección de RS filll/sec1 (r3/b2) o la integridad de la muestra, durante su

recolección, transporte y almacenamiento y enviarse lo antes posible al laboratorio autorizado para su análisis.

Para la prueba poscosecha de papa u otros envíos de plantas en los países de la NAPPO, se determinará el tamaño de la muestra mediante negociaciones bilaterales según una directriz general (por ejemplo, para lograr un 0.9502 ó 0.9975 de probabilidad de detectar 1.5% de incidencia de RS filIII/sec1 (r3/b2) en una población determinada, es necesario realizar pruebas a una cantidad de 200 ó 400 unidades, respectivamente, recolectadas al azar de un envío durante la cosecha o del almacenamiento).

4. Metodología de diagnóstico

Las metodologías que se utilizan para el indexado, la confirmación y verificación deben convenirse, en principio, entre las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria del país importador y exportador y deberían adherirse a las siguientes directrices.

- Las pruebas deben realizarse conforme a protocolos estandarizados convenidos por la organización nacional de protección fitosanitaria.
- Las pruebas deben realizarse bajo los auspicios de un fitopatólogo calificado o bajo un sistema de aseguramiento de la calidad aprobado por la organización nacional de protección fitosanitaria del país importador y exportador.
- Un diagnóstico positivo para RS filIII/sec1 (r3/b2) debe basarse en resultados positivos de dos metodologías de diagnóstico como mínimo y debe incluir confirmación con aislamiento e identificación.
- El esquema que se recomienda para el indexado de envíos de plantas para detectar la presencia de RS filIII/sec1 (r3/b2) aparece en la Figura 8.1. El material vegetal se indexa utilizando protocolos seleccionados tales como ELISA o dispositivo serológico de flujo lateral y PCR o PCR en tiempo real, teniendo como objetivo RS filIII/sec 1 (r3/b2) y confirmado con tecnología similar en un objetivo alternativo, seguido de una confirmación final del aislamiento y la identificación.
- Deben utilizarse controles positivos y negativos juntos con todas las muestras de pruebas.

4.1 Ensayos serológicos

El ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) es la técnica serológica principal para la detección de todas las especies de RS, además de ser rápido y adecuado para realizar pruebas a un número grande de muestras con un alto nivel de sensibilidad para detectar a estas especies en general, pero no puede distinguir subtaxones distintos. Por ende, las técnicas son solo adecuadas para una preselección inicial con el fin de detectar la presencia de cualquier cepa de RS, salvo si se pone a disposición un anticuerpo monoclonal que tenga como objetivo RS filIII/sec1 (r3/b2).

- Se debería utilizar un procedimiento ELISA de triple anticuerpo con anticuerpos que puedan adquirirse en el comercio (por ejemplo, anticuerpo policlonal para atrapar el antígeno y un anticuerpo monoclonal específico para epítomos de patógenos).
- Los valores umbral positivo y negativo deberían basarse en la absorbencia de las muestras positiva y negativa incluidas en cada placa de ELISA.
- Se recomienda para la metodología anticuerpos monoclonales que estén disponibles en el comercio.

- Una serie de compañías de diagnóstico han creado dispositivos de flujo lateral basados en la serología para la detección rápida y específica de todas las especies de RS con un alto nivel de sensibilidad. Una vez más, la técnica solo resulta adecuada para una preselección inicial para detectar la presencia de cualquier cepa de RS hasta que esté disponible una metodología específica para RS filll/sec1 (r3/b2).
- Cada grupo de los estuches de prueba debería evaluarse antes de iniciar la prueba.
- Siempre deberían incluirse los controles positivo y negativo en cada prueba.

4.2 PCR y PCR en tiempo real

La PCR y PCR en tiempo real, que tiene como objetivo secuencias nucleotidas específicas, ofrecen un alto nivel de sensibilidad y especificidad para RS filll/sec1 (r3/b2) y por ende, debería considerarse una metodología de prueba inicial para indexado, así como para la confirmación en la metodología complementaria.

- Los cebadores y las sondas específicos que resultan útiles (Weller *et al.*, 2000) para PCR convencional y de tiempo real, con un control interno eficaz, figuran en Pastrik *et al.* (2002), Smith y De Boer (2009); los datos de la eficacia deben verificarse cuando se utilizan otros cebadores y sondas cuyo objetivo sean diferentes regiones del genoma o genes para detección específica de RS filll/sec1 (r3/b2).
- Los controles negativos deben ser claramente negativos para asegurar que no ocurra contaminación cruzada que es un riesgo particular con las tecnologías de PCR.
- Los amplicones de PCR convencional en muestras positivas deben caracterizarse aún más mediante la secuenciación del ADN, la hibridación del ADN o el análisis de la temperatura de fusión.

4.3 Aislamiento y caracterización

En todos los casos, el aislamiento y la caracterización de RS son necesarios para confirmar la presencia de RS filll/sec1 (r3/b2). El aislamiento del RS filll/sec1 (r3/b2) del material vegetal sintomático se puede lograr con facilidad utilizando medios semiselectivos tal como el medio SMSA modificado (Denny y Hayward, 2001). Y los aislados sospechosos de RS filll/sec1 (r3/b2) pueden caracterizarse basándose en la oxidación de varios disacáridos y hexosa (Tabla 8.2) o PCR convencional y de tiempo real.

Tabla 8.2: Diferenciación de biovares de *R. solanacearum* (Hayward, 1964, He et al., 1984)

Utilización u oxidización de:	Biovares					
	1	2	2T	3	4	5
Dextrosa	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	-	+	+	-
Trehalosa	+	-	+	+	+	+
Lactosa	-	+	+	+	-	+
Maltosa	-	+	+	+	-	+
D-(+)-Celobiosa	-	+	+	+	-	+
Nitrito del nitrato	+	+	+	+	+	+
Gas del nitrato	-	-	-	+	+	+

4.4 Asignación del filotipo y secuevar utilizando PCR multiplex combinado con análisis filogenético

El PCR multiplex que utiliza una serie de cebadores multiplex, que tiene como objetivo la región espaciadora intergénica (ITS, por su sigla en inglés) del operón *rrn* (Fegan y Prior, 2005), brinda un medio para la caracterización adicional de aislados de RS r3/b2 en el filotipo II, mientras que el análisis filogenético en secuencias parciales de gene de endoglucanasa (*egl*) permite la subagrupación adicional en el secuevar 1. La determinación filotipo/secuevar ofrece una clasificación exacta para RS filoll/sec1 (r3/b2) y es una metodología confirmativa después del aislamiento exitoso y la identificación inicial. Los controles positivo y negativo siempre deberían incluirse en cada prueba y los controles negativos deben ser claramente negativos para asegurar que no ocurra contaminación cruzada, un riesgo particular de las tecnologías relacionadas con PCR.

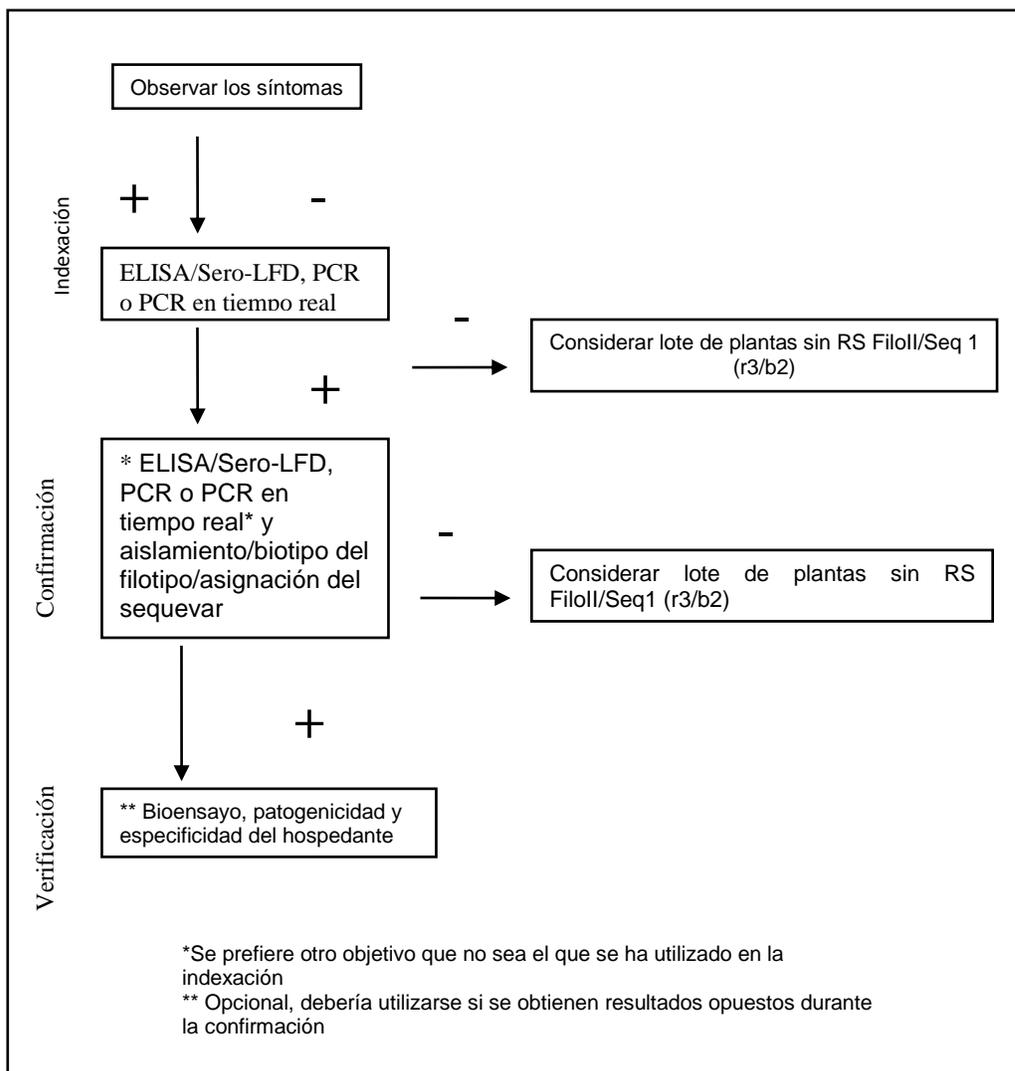
4.5 Bioensayo

La verificación de la identidad de RS, posterior a otras metodologías de diagnóstico con resultados positivos, se obtiene mediante el bioensayo confirmando la patogenicidad del aislado. Un ensayo biológico para RS filoll/sec1 (r3/b2) en tomate (*Solanum esculentum*) con el fin de verificar una prueba confirmativa con resultados positivos se considera opcional o necesaria solamente si han habido pruebas previas con resultados contradictorios. Sin embargo, el bioensayo podrá requerir hasta 30 días para completarse, lo cual hace que la prueba sea muy prolongada para la mayoría de las aplicaciones de certificación y las relacionadas con el comercio.

Referencias

- Buddenhagen, I. y A. Kelman. 1964 Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 2:203-230
- Castillo, J.A. y J.T. Greenberg. 2007 Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. Appl. Environ. Microbiol. 73:1225-1238
- Cellier, G. y P. Prior. 2010 Deciphering phynotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. Phytopathology 100:1250-1261.
- Denny, T.P. y A.C. Hayward. 2001 *Ralstonia*. En N.M. Schaad, J.B. Jones y W. Chun (Eds), Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd Ed. (pp. 165-189). St. Paul, MN: APS Press.
- Denny, T.P. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. Page 573-644 in Plant-Associated Bacteria. Gnamamanickam, S.S. ed. Springer, Netherlands.
- Fegan, M. y Prior, P. 2005. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex" Páginas 449-462 en Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior y C. Hayward, eds. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN.
- Hayward, A.C. 1964 Characterization of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol. 27: 265-277
- He, L.Y., Sequeira, L. y A. Kelman. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Dis. 67: 1357-1361
- Pastrik, K.H., J.G. Elphinstone y R. Pukall. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. Eur. J. Plant Pathol. 108:831-842.
- Smith, D. S. y S.H. De Boer. 2009 Implementation of an artificial reaction control in a TaqMan method for PCR detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. European Journal of Plant Pathology 124: 405-412.
- Weller, S.A., J.G., Elphinstone N.C. Smith, N. Boonham y D.E. Stead. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2853-2858.

Figura 8.1 Esquema para la detección e identificación de *Ralstonia solanacearum* filotipo II secuevar 1 (raza 3 biovar 2)



El presente apéndice fue adoptado por el Comité Ejecutivo de la NAPPO el octubre 17 de 2011 y actualizado por el Panel de Papas de la NAPPO el 11 de julio de 2013.
Este apéndice es para fines de referencia solamente y no es una parte prescriptiva de la norma.

Apéndice 1: Situación de las plagas de papa en los países de la NAPPO

Plagas reglamentadas de papa en los países de la NAPPO

Las plagas que se incluyen en este anexo están reglamentadas en por lo menos uno de los países miembros de la NAPPO.

La presencia o ausencia, salvo que se indique lo contrario, cumple con las categorías que figuran en la NIMF 8: 2017. Cada país designa sus propias categorías de presencia/ausencia. Dichas categorías no se utilizan en los reglamentos de los países miembros de la NAPPO. Para facilitar la referencia se han agregado en el presente documento clasificaciones alfanuméricas.

Ab1: Ausente: no existen registros de plagas

Ab2: Ausente: plaga erradicada

Ab3: Ausente: plaga ya no está presente

Ab4: Ausente: registros de plagas no válidos

Ab5: Ausente: registros de plagas no confiables

Ab6: Ausente: solamente interceptada

Ab7: Ausente: confirmada por medio de encuesta

Ab8: Ausente: área libre de plagas declarada

P1: Presente: en todas las partes del área

P2: Presente: sólo en algunas áreas

P3: Presente: salvo en áreas libres de plagas especificadas

P4: Presente: en toda el área sembrada con cultivos de papa

P5: Presente: sólo en algunas áreas sembradas con cultivos de papa

P6: Presente: sólo en cultivos protegidos

P7: Presente: estacionalmente

P8: Presente: pero manejada (mediante certificación de semilla)

P9 Presente: sujeta a control oficial

P10: Presente: en curso de erradicación

P11: Presente: en escasa prevalencia.

P12: Presente: pero no está relacionada con cultivos de papa (categoría de la NAPPO)

Plaga	Enfermedad o designación común	Referencia ¹	Presencia/ausencia ²		
			Can.	EE.UU.	Méx.
VIROIDES					
<i>Potato spindle tuber viroid</i>	PSTVd	Stevenson <i>et al.</i> , 2001;	Ab2	Ab2	Ab1
VIRUS					
<i>Andean potato latent virus</i>	APLV	Jeffries, 1998	Ab1	Ab1	Ab1
<i>Andean potato mottle virus</i>	APMoV	Jeffries, 1998	Ab1	Ab1	Ab1
<i>Arracacha virus B – cepa oca</i>	AVB	Jeffries, 1998	Ab1	Ab1	Ab1*
<i>Beet curly top virus</i>	BCTV	Jeffries, 1998	Ab1	P11	Ab1
<i>Potato deforming mosaic virus</i>	PDMV	Jeffries, 1998	Ab1	Ab1	Ab1
<i>Potato latent virus</i>	PotLV	Jeffries, 1998	P8	P8	Ab1*
<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P8	P8
<i>Potato mop-top virus</i>	PMTV	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P8	Ab1*
<i>Potato virus A</i>	PVA	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P8	Ab1*
<i>Potato virus M</i>	PVM	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P8	Ab1*
<i>Potato virus S</i>	PVS	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P8	P8
<i>Potato virus T</i>	PVT	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	Ab1	Ab1	Ab1
<i>Potato virus U</i>	PVU	Jeffries, 1998	Ab1	Ab1	Ab1*
<i>Potato virus V</i>	PVV	Jeffries, 1998	Ab1	Ab1	Ab1*
<i>Potato virus X</i>	PVX	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P8	P8
<i>Potato virus Y, cepa Y^C</i>	PVY ^C	Ellis <i>et al.</i> , 1997	Ab1	Ab1	Ab1
<i>Potato virus Y, cepa Y^N</i>	PVY ^N	Crosslin <i>et al.</i> , 2006	P8	P8	Ab1
<i>Potato virus Y, cepa Y^{NTN}</i>	PVY ^{NTN}	Crosslin <i>et al.</i> , 2006	P8	P8	Ab1*
<i>Potato virus Y, cepa Y^O</i>	PVY ^O	Crosslin <i>et al.</i> , 2006	P8	P8	P8
<i>Potato virus Y, cepa Y^{Wilga}</i>	PVY ^{Wilga} PVY ^{N:O}	Crosslin <i>et al.</i> , 2006	P8	P8	Ab1*
<i>Potato yellow dwarf virus</i>	PYDV	Jeffries, 1998	Ab3*	P11/P12	Ab1
<i>Potato yellow vein virus</i>	PYVV	Jeffries, 1998	Ab1	Ab1	Ab1
<i>Potato yellowing virus</i>	PYV	Jeffries, 1998	Ab1	Ab1	Ab1*
<i>Tobacco necrosis virus</i>	TNV	Jeffries, 1998	P2*	P12	Ab1
<i>Tobacco rattle virus</i>	TRV	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P2	P2	Ab1*
<i>Tobacco black ringspot virus –</i>	Potato black	Fribourg, 1977	Ab1	Ab1	Ab1

Plaga	Enfermedad o designación común	Referencia ¹	Presencia/ausencia ²		
			Can.	EE.UU.	Méx.
cepa calico	ringspot (PBRNV)				
<i>Tobacco streak virus</i> , cepa de papa	TSV	Jeffries, 1998	Ab1*	Ab1*	Ab1
<i>Tomato black ring virus</i>	TBRV	Jeffries, 1998	Ab1	Ab1	Ab1
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV	Stevenson <i>et al.</i> , 2001;	P12*	P12*	P12
FITOPLASMA					
Potato purple top phytoplasma	Purple top	Jeffries, 1998	P8	P8	P8
Potato stolbur phytoplasma	Potato stolbur	Jeffries, 1998	Ab1	Ab1	Ab1
Potato marginal flavescence phytoplasma	Potato marginal flavescence	Jeffries, 1998	Ab1	Ab1	Ab1*
Potato witches' broom phytoplasma	Witches' broom	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P11	P11	Ab1*
BACTERIA					
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Ring rot	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P10	P8	Ab1
<i>Dickeya</i> spp. (anteriormente <i>Erwinia chrysanthemi</i>)	Blackleg, soft rot	Palacio-Bielsa, <i>et al.</i> , 2006	P8	P8	Ab1
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Blackleg	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P8	P8
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Soft rot	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P8	P8
<i>Ralstonia solanacearum</i> raza 3 Biovar 2	Brown rot, bacterial wilt	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	Ab1	Ab1	Ab1
<i>Streptomyces scabies</i>	Common scab	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P8	P8
HONGOS y CROMISTAS					
<i>Angiosorus (Thecaphora) solani</i>	Smut	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	Ab1	Ab1	Ab1
<i>Fusarium</i> spp.	Dry rot, wilt	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P1/P8	P1/P8	P8
<i>Helminthosporium solani</i>	Silver scurf	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P8	P12
<i>Oospora pustulans</i> (sin. <i>Polyscytalum pustulans</i>)	Skin spot	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P11	P11	Ab1
<i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>	Gangrene	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	Ab1	Ab1	Ab1
<i>Phytophthora infestans</i>	Late blight	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P5	P8
<i>Puccinia pittieriana</i>	Common rust	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	Ab1*	Ab1*	P12
<i>Rhizoctonia solani</i>	Black scurf, Rhizoctonia canker	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P1/8	P8
<i>Spongospora subterranea</i>	Powdery scab	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P2/8	P8
<i>Synchytrium endobioticum</i>	Wart	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P2/P9	Ab2	Ab1
<i>Verticillium albo-atrum</i>	Verticillium wilt	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P8	P8

Plaga	Enfermedad o designación común	Referencia ¹	Presencia/ausencia ²		
			Can.	EE.UU.	Méx.
<i>Verticillium dahliae</i>	Verticillium wilt	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P8	P8	P8
NEMATODOS					
<i>Ditylenchus destructor</i>	Potato rot nematode	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P9	P12	Ab1
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Stem and bulb nematode	Cotton <i>et al.</i> , 1992	P12	P12	P12
<i>Globodera pallida</i>	Pale cyst nematode	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P2/P9	P2/P9	Ab1
<i>Globodera rostochiensis</i>	Golden nematode	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	P2/P9	P2/P9	P2/P9
<i>Longidorus elongatus</i>	Needle nematodes	Brown and Sykes 1975 Brodie <i>et al.</i> 1993	P2/P12	P12	Ab1
<i>Meloidogyne chitwoodi</i>	Columbia root-knot nematode	Stevenson <i>et al.</i> , 2001	Ab1	P8	P2/P9
<i>Meloidogyne javanica</i>	Javanese root-knot nematode	Vovlas <i>et al.</i> 2005	Ab1*	P12*	Ab1
<i>Rotylenchulus parvus</i>	Reniform nematode	Robinson <i>et al.</i> 1997	Ab1*	P12*	Ab1
<i>Zygotylenchus guevarai</i>		Pourjam <i>et al.</i> , 2000	Ab1*	Ab1*	Ab1
INSECTOS					
<i>Cacoecimorpha pronubana</i>	Carnation tortrix	EPPO 20066	P2/P12	P2/P12	Ab1
<i>Epicaerus cognatus</i>	Potato weevil	Anónimo, 1989	Ab1*	Ab1*	P8
<i>Graphognathus leucoloma</i>	= <i>Naupactus leucoloma</i>	EPPO 2006	Ab1*	P2/P12*	Ab1
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Colorado potato beetle	Smith <i>et al.</i> , 1992	P2	P2	P12
<i>Naupactus leucoloma</i>	= <i>Graphognathus leucoloma</i>	EPPO 2006	Ab1*	P2/P12*	Ab1
<i>Phthorimaea operculella</i>	Potato tuber worm	Das and Raman, 1994	Ab1*	P5	P8
<i>Premnotrypes latithorax</i>	Andean root weevil	Smith <i>et al.</i> , 1992	Ab1*	Ab1*	Ab1
<i>Premnotrypes sanfordi</i>	Andean root weevil	Smith <i>et al.</i> , 1992	Ab1*	Ab1*	Ab1
<i>Premnotrypes solani</i>	Andean potato weevil	Smith <i>et al.</i> , 1992	Ab1*	Ab1*	Ab1
<i>Premnotrypes vorax</i>	Andean potato weevil	Angeles and Rodríguez, 1971	Ab1*	Ab1*	Ab1
<i>Rhigopsidius tucumanus</i>	Potato weevil	EPPO, 2006	Ab1*	Ab1*	Ab1
<i>Tipula paludosa</i>	Common crane fly	Blackshaw, 1991	P12*	P12*	Ab1

¹ La referencia confirma que el organismo es una plaga de papa; no presente/ausente o distribuida en los países miembros de la NAPPO.

² Las entradas con * indican que la plaga no está reglamentada.

Referencias

- Abbott, E.V. 1931. Further notes on plant diseases in Peru. *Phytopathology* 21: 1061-1071.
- Angeles, N.J. y D.R. Rodriguez.1971. New area of distribution of *Premnotrypes vorax* in the Andean region of Venezuela. *Agronomia Tropical* 31: 345-34.
- Anónimo. 1996. Principales enfermedades, nematodos e insectos de la papa. Ministerio de Agricultura. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Centro Internacional de la Papa. 108 pp.
- Baldwin, G.G. 1992. Evolution of cyst and noncyst-forming Heteroderinae. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 271-290.
- Blackshaw. R.P, 1991. Leatherjackets in grassland. Strategies for weed, disease & pest control in grassland: practical implications of recent developments and future trends. *Proc. British Grassland Soc. Feb. 27 1991 Gloucester.* 6.1-6.12.
- Brodie B.B., Evans K., y Franco J, 1993. Nematode parasites of potatoes. In: Evans K, Trudgill DL, Webster JM, eds. *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*. Wallingford, UK: CAB International, 87–132.
- Brown E. B. y Sykes G. B. 1975. Studies on the Relation between Density of *Longidorus elongatus* and Yield of Barley and Potatoes. *Plant Pathology Volume 24, Issue 4*, pages 221–223,
- Cotten, J., D.J. Hooper, M.F. Foley y M. Hancock.1992. Stem and bulb nematode, *Ditylenchus dipsaci*, associated with a dry rot of potato tubers. *Plant Pathol.* 41: 76-78.
- Crosslin, J.M., P.B. Hammn, D.C. Hane, J. Jaeger, C.R. Brown, , P.J. Shiel, P.H. Berger, y R.E. Thornton. 2006 The occurrence of PVY^O, PVY^N, and PVY^{N:O} strains of potato virus Y in certified potato seed lot trials in Washington and Oregon. *Plant Dis.* 90:1102-1105
- Das, G.P. y K.V. Raman. 1994. Alternate hosts of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller). *Crop Protection*, 13:83-86
- Ellis, P., Stace-Smith, R. y G. de Villiers. 1997. Identification and geographic distribution of serotypes of potato virus Y. *Plant Disease* 81: 481-484.
- EPPO, 2006. PQR database (version 4.5). Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. www.eppo.org.
- Fribourg, C.E. 1977. Andean potato calico strain of tobacco ringspot virus.

Phytopathology 67: 174-178.

Jeffries, C. 1998. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 19. Potato. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma / International Plant Genetic Resources Institute, Roma.

Klein, M., S. Zimmerman-Gries y B. Sneh. 1976. Association of bacteriallike organisms with a new potato disease. Phytopathology 66: 564-569.

Lee., I.-M., K.D. Bottner, G. Secor, y V. Rivera-Varas. 2006. 'Candidatus Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 1593-1597.

NIMF 8. 2017. *Determinación de la situación de una plaga en un área*. Roma, CIPF, FAO.

Palacio-Bielsa, A., M.A. Cambra y M.M. Lopez. 2006. Characterisation of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. Ann. Appl Biol. 148: 157-164.

Pourjam, E., Alizadeh, A. y E. Geraert,. 2000. Some pratylenchids from Iran (Nematoda: Tylenchina). Nematology 2: 855-869.

Robinson, A. F.; Inserra, R. N.; Caswell-Chen, E. P.; Vovlas, N.; Troccoli, A. 1997. Review: *Rotylenchulus* Species: Identification, Distribution, Host Ranges, and Crop Plant Resistance Nematropica. 127-180.

Smith, I. M., D. G. McNamara, P.R. Scott y K. M. Harris. 1992. Quarantine Pests for Europe. Data Sheets on quarantine pests for the European Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. CAB International-European and Mediterranean Plant Protection Organization. UK.1032 pp

Stevenson, W.R., Loria, G.D. Franc y D.P. Weingartner. 2001. Compendium of Potato Diseases. 2da Edición. APS Press.

Vovlas N., Misfud D., Landa B. B., y Castillo P. 2005. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. Plant Pathology 54, 657-664.