

Un sector de gran tradición en Aragón

Control de calidad de plantas de vivero de frutales en Aragón

J. L. Palomero Domínguez *

Barea Pascual **

T. Sanz Sanz ***



La producción de plantas de vivero de frutales en Aragón está controlada oficialmente por el Centro de Semillas y Plantas de Vivero. Su labor abarca desde la autorización preceptiva de concesión del Título de Productor al control de las declaraciones anuales y las inspecciones oficiales, en todas las fases de producción y comercialización.

En el mercado de plantas de vivero de frutales, coexisten dos categorías de plantas, ambas contempladas en la Reglamentación oficial, la Planta Certificada (C) y la planta CAC (conformitas agrarias communitatis) cuyas diferencias más importantes quedan reflejadas en el Cuadro 1.

El sector productor de plantas de vivero frutales, sin lugar a dudas, podemos considerarlo como un sector estratégico en el suministro de material vegetal de calidad en la moderna fruticultura. El suministro de nuevas variedades, tecnológicamente adaptadas y reuniendo las características varietales y sanitarias concretas, es un factor básico en el éxito económico de las nuevas plantaciones. Errores en el momento de la elección de la calidad del material a plantar pueden costar grandes pérdidas y en muchos casos pueden conducir al fracaso total de la plantación.

La producción y comercialización de plantas de vivero está regulada por el R.D. 929/1995 que aprueba el Reglamento Técnico de Control y Certificación de plantas de vivero, como consecuencia de la transposición de la Directiva Comunitaria 92/34 CEE que recoge las

normas sobre la producción, comercialización e importación de las plantas de vivero de frutales.

En Aragón, el sector productor tiene una gran tradición y está compuesto por 57 viveristas registrados, con una producción media de 2.500.000 plantas, entre portainjertos y variedades, de las especies de pepita (Manzano, Peral, Membrillero), hueso (Melocotón, Nectarina, Albaricoquero, Ciruelo, Cerezo, Almendro) y Olivo.



Vivero de Planta Madre de Base

Cuadro 1. Diferencias entre la planta C y la CAC

Planta certificada	Planta CAC
Origen clonal	Origen conocido (no clonal)
Proceso de multiplicación controlado (M.INICIAL, BASE, CERTIFICADA)	Libre por observaciones visuales de síntomas de enfermedades y plagas
Material libre de virus (VF), enfermedades y plagas	Variedades Registradas o en lista del proveedor
Material testado de virus (VT), enfermedades y plagas	Pureza varietal 99%
Variedades Registradas	Normativa Fitosanitaria (PFS)
Pureza varietal 99,99%	Etiqueta Proveedor amarilla.
Normativa Fitosanitaria (PFS)	
Etiqueta oficial azul (Precintado oficial)	

* Director Centro de Semillas y Plantas de Vivero

** Jefe Unidad Técnica de Plantas de Vivero

*** Ingeniero Técnico Agrícola

La planta Certificada, tiene unos controles rigurosos en todas sus fases productivas (MI, B, C), tanto varietales como sanitarias.

Durante todas las fases de producción se realizan muestreos exhaustivos, de acuerdo con la normativa para comprobar su estado sanitario, teniendo unos porcentajes de tolerancia rigurosos (Cuadro 2).

El control sanitario se realiza mediante test de laboratorio ELISA, test biológico de invernadero (GF-305) y test leñosos de campo (Indexaje), sobre plantas e indicadores aprobadas y más recientemente a través de técnicas de biología molecular por hibridación molecular y PCR (Polymerase Chain Reaction).



Test GF-305 en invernadero

Entre las ventajas de los test de laboratorio (Hibridación Molecular/ELISA) sobre los test biológicos.

- Rapidez de diagnóstico
- Ahorro de medios materiales y de personal
- Mayor fiabilidad de diagnóstico

Cuadro 2. Requisitos de sanidad para la planta madre de certificada

	Plantas a testar		% de tolerancia	
	Hueso	Pepita	Enfermedades graves	No graves
Pl. madres injertos	1/20	1/50	0	0,25
Pl. madres de semillas, estaquillas o acodos	1/100	1/400	0	0,25
Vivero patrones C	-	-	0	-
Vivero plantones	s.e.	s.e.	0	2 ¹

¹ Entre el 2 y 4% se pueden rebajar a categoría CAC
s.e.: sin especificar

Cuadro 3. Test sanitario en plantas de vivero frutales

	Nº de test anuales	Duración diagnóstico	Coste estimado en euro/unid
Hibridac. molecular	400	3 días	6
ELISA	7.000	3 días	6
GF-305	120	3 meses	30
Indexaje invernadero (pepita)	300	3 meses	30
Indexaje campo)	120	5 años	150

Cuadro 4. Organismos nocivos más significativos que afectan la calidad de las plantas de vivero

	Denominación	Detección
VIRUS:		Análisis laboratorio (ELISA, PCR)
POTYVIRUS	Plum pox.	Testados biológicos (Individuales o por muestreo)
CLOSTEROVIRUS	Apple chlorotic leafspot.	y Observaciones visuales
ILAR	Apple mosaic. Prune dwarf. Prunus necrotic ring spot.	
FITOPLASMAS	Rubbery wood. Apple proliferations. Apricot chorotit leafroll. Pear decline.	
NEPOVIRUS	Strawberry latent ringspot. Tomato black ring. Raspberry ringspot. Myrobolan latent ringspot.	
VIROIDES	Peach latent mosaic.	
TIPO VIRUS	Apple stem-grooving. Chat fruit. Green crinkle. Ring spot. Russet wart. Stem pitting. Peach asteroid spot. Arabis mosaic.	
BACTERIAS	Agrobacterium tumefaciens. Pseudomonas syringae pv. syringae. Pseudomonas syringae pv. mors prunorum	Observaciones Visuales y Análisis laboratorio
HONGOS	Armillariella mellea. Chondrostereum purpureum. Nectria galligena. Phytophthora spp. Rosellinia necatrix. Verticillium spp. Venturia spp.	Observaciones Visuales y Análisis laboratorio

- Mejor distribución de los tiempos de trabajo
- Mayor rapidez en la eliminación de plantas madres enfermas, en el proceso de producción

El objetivo del nuevo laboratorio de PCR del CSPV, es dotar de una herramienta para la identificación varietal y el diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas, rápida, segura y económica, frente a los sistemas tradicionales, normalmente más costosos y más lentos (hasta varios años).

Medios materiales del nuevo laboratorio de PCR

El nuevo laboratorio instalado, ocupa una superficie de unos 100m² compartimentado en tres zonas, a efectos de evitar cualquier tipo de contaminación.

- Zona de extracción, cuantificación e hibridación del ADN
- Zona de amplificación del ADN
- Zona de detección (Electroforesis, visualización e informatización de resultados).

Extracción, Cuantificación e Hibridación del ADN y ARN

El equipamiento consta de los siguientes elementos

- 1- Baño María
- 2 - Balanza
- 3 - Cámara extracción de gases
- 4 - Microcentrifuga
- 5 - Congelador (-20) y (-80)
- 6 - Horno de hibridación
- 7 - Cuantificador de ADN



Extracción y cuantificación del ADN



Hibridación Molecular

Zona de amplificación del ADN por PCR (Polymerase Chain Reaction)

- 1 - Cámara de flujo laminar
- 2 - Termociclador
- 3 - Vorte



Amplificación del ADN

Zona de detección de ADN

- 1 - Cubeta de electroforesis
- 2 - Fuente de alimentación
- 3 - Agitador orbital
- 4 - Transiluminador UV con cámara fotográfica
- 5 - Ordenador con software de análisis de resultados.



Detección de ADN

Aplicaciones

En el laboratorio de biología molecular se ha procedido, en primer lugar a la identificación molecular mediante marcadores tipo microsátelites de variedades de híbrido (melocotonero X almendro), cerezo y melocotonero y posteriormente a la detección del Viroide Peach Latent Mosaic (PLMVd) en la especie melocotonero por hibridación molecular.

Identificación molecular de variedades de frutales

Identificación de variedades de híbridos (melocotonero X almendro)

Para la identificación de los híbridos (melocotonero X almendro) se ha extraído y purificado ADN de material vegetal de todos los Productores Seleccionadores de Aragón, con un total de 81 muestras de los viveros, PROSEPLAN S.L., J. VERON Y CIA, PLAVISE SAT. Nº 4920 y M. SORIA.

Con la técnica de PCR se amplificaron fragmentos del ADN, utilizando dos pares de "primers" o cebadores y los marcadores

empleados fueron del tipo microsátelites, la detección del ADN amplificado se realizó por electroforesis en géles de agarosa de alta definición y la visualización se realizó mediante tinción con Bromuro de Etidio e iluminación con luz UV, todo de acuerdo con el procedimiento descrito por el Dr.J.I.Hormaza (Estación Experimental la Mayora-CSIC. MÁLAGA).

Con los resultados obtenidos se confirmó que las muestras coincidían con la variedad indicada.

La rapidez del proceso así como el estado precoz de desarrollo del árbol en que se puede realizar la identificación, demuestra la ventaja de la técnica para el análisis varietal en comparación con el sistema tradicional.

Identificación de variedades de la especie cerezo

Para la comprobación de la autenticidad varietal de cerezo, se procedió a la extracción de ADN, de muestras de las variedades del Productor Seleccionador PROSEPLAN, SL. que estaban en proceso de identificación por el procedimiento de observación de los caracteres morfológicos, correspondientes a tres variedades, DURONI-3, S. H. GIANT Y MARU (siete muestras de cada variedad).

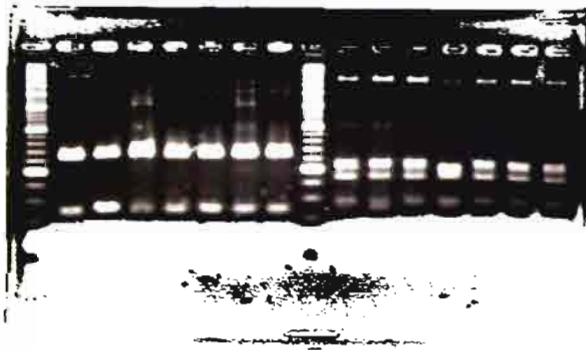
Aplicación de nuevas técnicas de biología molecular

- Control varietal
- Control sanitario



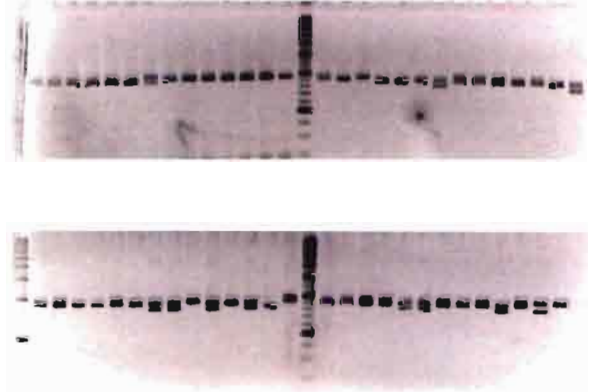
Visualización de ADN, con los dos cebadores utilizados para la identificación de siete muestras de tres variedades de Híbrido (mel X alm). 1.Mayor, 2-Felinem, 3.-Monegro,4.-Monegro, 5. Monegro, 6.Garnem, 7.Garnem

1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7



Visualización de resultados, Amplificaciones, con dos cebadores utilizados para la caracterización de tres variedades de Cerezo

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Visualización de ADN, con cuatro cebadores utilizados para la caracterización de 14 variedades de Melocotonero

Las amplificaciones del ADN se realizaron por PCR y para la identificación de estas variedades se realizaron amplificaciones con cuatro pares de cebadores en la variedad S.H. Giant, en la variedad MARU se utilizaron cinco pares de cebadores y en la variedad DURONI-3 se utilizaron tres pares de cebadores, que fueron suficientes en cada caso para caracterizar la variedad. Todo el procedimiento utilizado así como los cebadores elegidos se han realizado siguiendo la metodología pue-

ta a punto por la Dra. A. Wünsch para la identificación de variedades de cerezo.

La detección del ADN amplificado, se realizó siguiendo el procedimiento descrito para los híbridos (melocotonero X almendro).

Identificación de variedades de la especie melocotonero

En la actualidad están en proceso los trabajos de identificación de 42 variedades de melocotonero.

Las muestras se tomaron en parcela de colecciones de referencia de variedades ya identificadas por el método tradicional.

La extracción y purificación se realizó de acuerdo con los protocolos descritos por el Dr. J.I. Hormaza para la identificación de híbridos (mel. X alm.).

La amplificación del DNA, se ha realizado por PCR. Hasta el momento actual se han hecho cuatro amplificaciones con distintos cebadores, con los que se han

Agri-Pocket : la informática en el campo

Visítenos en Fima.
Pabellón 4, Stand A-3



REMITIR A:
ISAGRI - C/ESPINOSA, 8 - 410
46008 VALENCIA
E-mail : isagri@isagri.es
Internet : www.isagri.es

Deseo recibir información sobre las soluciones isagri de :

Cultivos

Ganadería

Pasaré a informarme por su stand de Fima el día

Empresa :

Nombre :

Dirección :

.....

C.P. :

Localidad :

Tfno :

Móvil :

- > Recogida de datos directamente en el campo
- > Seguimiento de la trazabilidad de su producción
- > Seguimiento de los costes de producción
- > Consulta de las labores realizadas
- > Medición de parcelas con GPS

Cuadro 5. Resumen de resultados obtenidos por hibridación molecular

Productor	Nº Muestras	Positivas	Negativas	Nulas
Post-control	180	74	104	2
Proseplan	162	84	77	1
Plavise	70	28	39	3



podido caracterizar 16 de las 42 variedades que se están estudiando.

Próximamente está pendiente de realizarse la amplificación con ocho pares de cebadores con los que se espera poder identificar, ampliamente, el resto de variedades estudiadas.

La detección se realizó con el procedimiento descrito.

Detección del viroide PLMVd por hibridación molecular

Aplicando la técnica de detección por hibridación molecular del Dr. V. Pallas, se ha procedido a la detección del viroide Peach latent mosaic (PLMVd) que afecta a la especie melocotonero, enfermedad que debe estar ausente en las plantas de vivero de categoría certificada de acuerdo con el Reglamento de Control y Certificación de Plantas de Vivero de Frutales y con el agravante de ser fácilmente transmisible por vectores aéreos. Se ha extraído

ADN de 162 de plantas madres del productor seleccionador PROSEPLAN, 70 del productor seleccionador PLAVISE y 180 del Ensayo Comunitario E1 D (2003) 511233 (A-13549) de Prunus persica.

Sobre las membranas se cargaron los ácidos nucleicos extraídos de las muestras y se fijaron con luz UV introduciéndolas en el transiluminador.



Visualización de resultados de los testados por hibridación molecular

Después de los tratamientos de prebloqueo y prehibridación para evitar uniones inespecíficas, se procedió a la hibridación con la sonda en horno de hibridación y en agitación constante a 68°C durante toda la noche.

Para la detección de muestras enfermas se procedió, una vez realizados los lavados posthibridación, a añadir el agente bloqueante + anti-digosigenina-AP a las membranas hibridadas.

Para la reacción de la fosfatasa, posteriormente se sumergieron en el sustrato quimioluminiscente (CSPD) durante diez minutos.

La película se expuso sobre las membranas en un cassette de rayos X durante 20 minutos y con el posterior revelado de la película se obtuvieron los resultados de las muestras.

Este nuevo método de diagnóstico aplicado en nuestro laboratorio, va a permitir la detección de esta grave enfermedad que permitirá eliminar del proceso productivo, la planta enferma.

Agradecimientos

Agradecimiento a la Dra. A. Wunsch del CITA del Gobierno de Aragón, a la Dra A. Casas del C.S.I.C. de Aula Dei, Zaragoza y al Dr. V. Pallás del Instituto de Biología Molecular y Celular del C.S.I.C. de Valencia.

Bibliografía

- Serrano B, Gómez-Aprisi J, Hormaza JI. 2002 Molecular fingerprinting of Prunus rootstocks using SSRs. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 77:368-372.
- Wünsch Blanco A. 2004 Caracterización molecular en cerezo (*Prunus avium* L.) Identificación varietal, relaciones de similitud e incompatibilidad polen-pistilo. Tesis Doctoral
- Pallás V. Sánchez-Navarro J., Más P., Cañizares MC., Aparicio F., Marcos JF. Molecular diagnostic Techniques and Their potential role in stone fruit certification schemes. *Options Méditerranéennes, Série B/nº19* pp.191-208.

New Holland CS



AGRI/ lubrificantes



CS540

CS640

CS660



Medalla de plata en la Serie CS por el sistema de cóncavo variable Opti-Tresh™



Novedad técnica sobresaliente
Cóncavo de longitud ajustable "Opti-Tresh-System".

Toda una línea de incomparable versatilidad.

Con cinco y seis sacudidores, desde 175 a 207 kW (238 a 281 CV) para cubrir una amplia gama de necesidades de agricultores y contratistas, los tres modelos de cosechadoras New Holland de la Serie CS, proporcionan una gran capacidad a la vez que preservan la calidad del grano y de la paja en cualquier tipo de condición. El diseño patentado del cóncavo Opti-Tresh™ y el inmejorable Separador Rotatorio New Holland con sistema Multi-Thresh, opcional en los modelos CS540 y CS640 y estándar en la CS660, le proporciona una gran versatilidad y una máxima optimización de las tareas de trilla y separación. El diseño de precriba consigue una alta eficiencia en la limpieza y su sistema autonivelante es ideal para terrenos inclinados. La moderna y silenciosa cabina Discovery Plus™ incrementa la productividad y el confort del operario. Si busca una cosechadora económica y de gran capacidad, las cosechadoras New Holland Serie CS son la solución más completa y versátil.

Nueva cosechadora New Holland Serie CS, con un servicio excelente y cualificado, asistencia total, todos los recambios originales y una financiación CNH Capital personalizada - sólo en su Concesionario New Holland.

www.newholland.com/es - Teléfono gratuito de Atención al Cliente: 900 948 998.



NEW HOLLAND

Especialistas en tu éxito



NEW HOLLAND ES UNA MARCA DE CNH.
CNH: UNO DE LOS LÍDERES MUNDIALES EN LA FABRICACIÓN DE TRACTORES, COSECHADORAS, EMPACADORAS Y VENDIMIADORAS AUTOPROPULSADAS.