

# ***PROGRAMA NACIONAL DE INSPECCIÓN FITOSANITARIA***

## ***PROGRAMA PARA LA APLICACIÓN DE LA NORMATIVA FITOSANITARIA DE LA PATATA***

***Manual de Procedimiento para la aplicación de la  
Normativa Fitosanitaria de la patata***

**Diciembre 2010**



## ÍNDICE

### MANUAL DE PROCEDIMIENTO QUE REGULA LA APLICACIÓN DE LA NORMATIVA FITOSANITARIA DE LA PATATA

Pág.

#### I. PROCEDIMIENTO GENERAL

1.- INTRODUCCIÓN .....	1
2.- ANTECEDENTES .....	2
3.- OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DEL MANUAL.....	5
4.- CASOS VEGETALES RECOGIDOS EN LA LEGISLACIÓN .....	6
5.- ORGANISMOS NOCIVOS REGULADOS.....	9

#### ANEXOS DEL PROCEDIMIENTO GENERAL

*Anexo nº 1: Legislación de referencia*

*Anexo nº 2: Laboratorios oficiales de diagnóstico de las distintas  
Comunidades Autónomas*

*Anexo nº 3: Ficha para el envío de muestras al Laboratorio de  
diagnóstico*

*Anexo nº 4: Requisitos especiales recogidos en la legislación de los  
organismos de cuarentena asociados a la patata*

*Anexo nº 5: Método de muestreo de los organismos de cuarentena  
asociados a la patata*

*Anexo nº 6: Calendario de muestreo de los organismos de  
cuarentena asociados a la patata*

**II. FICHAS DESCRIPTIVAS DE ORGANISMOS NOCIVOS**

- *Helicoverpa* (= *Heliothis*) *armigera*
- *Leptinotarsa decemlineata*
- *Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus*
- *Ralstonia* (= *Pseudomonas*) *solanacearum*
- *Synchytrium endobioticum*
- *Ditylenchus destructor*
- *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*
- *Meloidogyne chitwoodi* y *Meloidogyne fallax*
- *Potato stolbur phytoplasma*
- *Beet necrotic yellow vein virus*
- *Tomato spotted wilt virus*
- *Andean potato latent virus*, *Andean potato mottle virus*, *Arracacha virus B*, *Potato spindle tuber viroide*, *Potato black ringspot virus*, *Potato leaf roll virus*, *Potato virus T*, *Variedades A, M, S, V, X e Y*

## BLOQUE I. MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA EL CONTROL DE *Clavibacter michiganensis* ssp *sepedonicus* Y *Ralstonia solanacearum*

Pág.

### I. PROCEDIMIENTO GENERAL

- 1.- INTRODUCCIÓN.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 2.- ANTECEDENTES .....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 3.- ESTRUCTURA DEL MANUAL.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 4.- ÁMBITO DE APLICACIÓN Y VIGENCIA DEL PROGRAMA ..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 5.- DEFINICIONES DE INTERÉS .....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 6.- EXÁMENES OFICIALES SISTEMÁTICOS¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 7.- OBLIGACIÓN DE NOTIFICACIÓN ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 8.- PLAN DE CONTINGENCIA.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 9.- PROHIBICIONES.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 10.- EXCEPCIONES CON FINES CIENTÍFICOS¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 11.- MEDIDAS ADICIONALES .....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 12.- INDEMNIZACIONES .....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

### II. DOCUMENTACIÓN ADICIONAL

- Plan de contingencia de *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus*
- Plan de contingencia de *Ralstonia* (=Pseudomonas) *solanacearum*

### ANEXOS DEL PROCEDIMIENTO GENERAL

*Anexo nº 1.a: Método de diagnóstico, detección e identificación de Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*

*Anexo nº 1.b: Método de diagnóstico, detección e identificación de Ralstonia solanacearum*

*Anexo nº 2: Estimación del número mínimo de muestras por Comunidad Autónoma*

*Anexos nº 3.a, 3.b y 3.c: Actas de Inspección Fitosanitaria en campo, en almacén y en instalaciones industriales respectivamente*

*Anexo nº 4: Notificación de los exámenes oficiales (Modelo para la presentación de los resultados)*

*Anexo nº 5: Proceso secuencial de las medidas a adoptar en el marco del Plan de contingencia*

**Anexo n° 6: Aviso de medidas provisionales para prevenir la enfermedad**

**Anexo n° 7: Conservación de las pruebas analíticas en caso de aparición de un brote sospechoso**

**Anexo n° 8: Elementos de investigación para determinar la extensión y origen de la contaminación**

**Anexo n° 9.a: Elementos a tener en cuenta para la determinación del alcance de la contaminación probable por *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum***

**Anexo n° 9.b: Elementos a tener en cuenta para la determinación de la posible propagación de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum***

**Anexo n° 9.c: Notificación de la contaminación**

**Anexo n° 10.a: Proyecto de boletín de prensa (Podredumbre anular de la patata)**

**Anexo n° 10.b: Proyecto de boletín de prensa (Podredumbre parda de la patata)**

**Anexo n° 11.a: Medidas de aplicación sobre el material contaminado**

**Anexo n° 11.b: Medidas de aplicación sobre el material probablemente contaminado**

**Anexo n° 11.c: Medidas de aplicación en las zonas delimitadas debido a la contaminación por *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus***

**Anexo n° 11.d: Medidas de aplicación en las zonas delimitadas debido a la contaminación por *Ralstonia solanacearum***

**Anexo n° 12: Aviso de medidas para prevenir la enfermedad**

**Anexo n° 13: Medidas de aplicación en las plantas de transformación del "material vegetal indicado" declarado contaminado**

**Anexo n° 14: Caso Práctico n°1**

**Anexo n° 15: Caso Práctico n°2**

**Anexo n° 16: Caso Práctico n°3**

## BLOQUE II. MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA EL CONTROL DE *Globodera pallida* Y *Globodera rostochiensis*

**Pág.**

### I. PROCEDIMIENTO GENERAL

- 1.- INTRODUCCIÓN.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 2.- ANTECEDENTES .....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 3.- CONTENIDO DE LA DIRECTIVA 2007/33/CE¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 4.- PARCELAS OBJETO DEL PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LOS NEMATODOS DEL QUISTE DE LA PATATA¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 5.- MUESTREO .....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 6.- ENVÍO DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 7.- REGISTROS OFICIALES.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 8.- DECLARACIÓN DE CONTAMINACIÓN¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 9.- MEDIDAS DE CONTROL .....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 10.- LEVANTAMIENTO DE RESTRICCIONES¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 11.- EXCEPCIONES CON FINES CIENTÍFICOS¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- 12.- MEDIDAS ADICIONALES .....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

### II. DOCUMENTACIÓN ADICIONAL

- Plan de contingencia de *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*

### ANEXOS DEL PROCEDIMIENTO GENERAL

- |             |  |
|-------------|--|
| Anexo nº 1: | Definiciones   |
| Anexo nº 2: | Relación de vegetales y productos vegetales objeto de los exámenes oficiales   |
| Anexo nº 3: | Exenciones examen oficial  |
| Anexo nº 4: | Ejemplo de procedimiento de selección de parcelas en los estudios oficiales y establecimiento de criterios de riesgo |
| Anexo nº 5: | Procedimiento de muestreo en los exámenes y estudios oficiales   |

- 
- Anexo n° 6: Actas de Inspección Fitosanitaria**
- Anexos n° 7: Ficha para el envío de muestras al Laboratorio de diagnóstico**
- Anexos n° 8: Notificación de los resultados de los estudios oficiales (Modelo para la presentación de los resultados)**
- Anexo n° 9: Declaración de contaminación**
- Anexo n° 10: Grados de resistencia a nematodos del quiste de la patata**
- Anexo n° 11: Protocolo para el ensayo de resistencia a nematodos del quiste de la patata**
- Anexo n° 12: Notificación del listado de variedades resistentes**
- Anexo n° 13: Notificación modificación de la resistencia**
- Anexo n° 14: Guía para la elaboración de un Programa de Control Oficial**
- Anexo n° 15: Acta de levantamiento de las restricciones**
- Anexo n° 16: Caso práctico 1**
- Anexo n° 17: Caso práctico 2**
- Anexo n° 18: Caso práctico 3**

# **I. PROCEDIMIENTO GENERAL**



## 1.- INTRODUCCIÓN

España es uno de los países de la Unión Europea con mayor riesgo para la introducción de nuevos organismos nocivos. En este hecho confluyen, entre otros factores, la variabilidad climatológica, que permite el asentamiento de organismos adaptados a distintos tipos de clima, y las técnicas intensivas seguidas en la agricultura actual, que requieren frecuentes importaciones de material de reproducción de muy diversas procedencias.

En caso de detectarse la presencia de un organismo de cuarentena o de un nuevo organismo nocivo, que suponga un riesgo para los cultivos, se deben aplicar inmediatamente medidas fitosanitarias de salvaguardia para su control y erradicación. Cuando estas medidas, inicialmente adoptadas, no son suficientes para contener la propagación del organismo nocivo y, de manera especial, cuando se ven afectadas varias Comunidades Autónomas, se hace necesario coordinar y armonizar las actuaciones a través de un programa nacional de erradicación o control, que establezca los planes de contingencia a seguir en cada caso.

En la última década, uno de los cultivos que se ha visto afectado por la aparición de nuevos organismos nocivos en España, es el de la patata. Éste se lleva a cabo en casi todas las regiones de España, al no haber limitaciones climáticas excluyentes para su cultivo. La variabilidad en las condiciones de producción de unas zonas a otras, hace posible la obtención de patata en cualquier época del año. Todos estos factores hacen que el cultivo de la patata se convierta en una fuente receptora idónea para nuevos organismos nocivos.

En el presente *Manual de Procedimiento* se pretende recoger las medidas que deben adoptarse contra los organismos nocivos de cuarentena regulados y que afectan a la patata, con el fin de impedir su aparición, y en

caso de que aparezcan, determinar su distribución y combatirlos con el fin de erradicarlos.

Con todo ello, se pretende facilitar la tarea a los inspectores fitosanitarios, fijando unos criterios de actuación para cada una de las tareas que deben llevarse a cabo. El presente *Manual de Procedimiento* está dirigido a los inspectores pertenecientes a las Comunidades Autónomas, responsables de los campos de producción y del comercio de patata dentro del territorio de sus respectivas Comunidades Autónomas.

## 2.- ANTECEDENTES

La Directiva 2000/29/CEE, del Consejo de 8 de mayo, regula las medidas de protección contra la introducción en la Unión Europea de organismos nocivos para los vegetales y productos vegetales, y contra su propagación en el interior de la misma. Esta Directiva contempla un gran y diverso número de organismos de cuarentena asociados al cultivo de la patata: dos artrópodos: *Helicoverpa* (= *Heliothis*) *armigera* (oruga de la mazorca) y *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la patata); dos bacteriosis: *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* (necrosis bacteriana o podredumbre anular) y *Ralstonia solanacearum* (marchitamiento bacteriano o podredumbre parda); un hongo: *Synchytrium endobioticum* (sarna verrugosa de la patata), tres géneros de nematodos: *Ditylenchus destructor* (anguilulosis de la patata), *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis* (nematodos del quiste de la patata) y *Meloidogyne chitwoodi* y *Meloidogyne fallax* (nematodos del nódulo de la raíz); y varios virus y viroides: Potato stolbur phytoplasma (Escoba de bruja), Beet necrotic yellow vein virus (Virus de la rizomanía), Tomato spotted wilt virus (Virus del bronceado), Potato spindle tuber viroide (Virus del ahusado de la patata) entre los más significativos. En la legislación española, dicha Directiva quedó transpuesta mediante el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero.

Como consecuencia de la aparición de focos en zonas de la Comunidad de algunos de estos organismos se han ido estableciendo diferentes programas de erradicación y control así como otras medidas de emergencia para evitar la introducción y propagación de estos organismos nocivos.

En España, debido a la problemática señalada anteriormente, el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, ha propiciado la realización de programas únicos de erradicación y control para las dos bacteriosis de cuarentena en la patata (*Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum*) y para los nematodos del quiste de la patata (*Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis*); que han sido aceptados por todas las Comunidades Autónomas implicadas, en base al artículo 15.2 de la Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de Sanidad Vegetal y al Real Decreto 1190/1998 que regula los programas nacionales de erradicación o control de organismos nocivos para los vegetales.

Por otro lado, el resto de organismos asociados al cultivo de la patata, siguen regulados al amparo de lo establecido en el Real Decreto 58/2005, en el que se deben cumplir medidas específicas para evitar su aparición y propagación, así como la necesidad de utilizar pasaporte fitosanitario, en las especies vegetales asociadas a los mismos, para poder circular libremente por todo el territorio europeo.

La inspección Comunitaria sobre la aplicación en España de la normativa fitosanitaria referente al cultivo de la patata, que se llevó a cabo en el año 2004, puso de manifiesto la necesidad de que los agentes implicados en el sector tuviesen mayor conocimiento, tanto de esta normativa como de su forma de aplicación. Por ello, en el año 2005, se realizó un Manual de Procedimiento sobre la aplicación de la normativa fitosanitaria de la patata, que recogía toda la normativa aplicable (en cuanto a programas de erradicación y control se refiere), y explicaba la forma en

que ésta debe desarrollarse desde el punto de vista práctico, detallándose cada paso necesario.

Posteriormente, como consecuencia de la Misión de Inspección Fitosanitaria efectuada por la Comisión Europea en noviembre de 2005, se puso en evidencia la necesidad de profundizar en algunos aspectos del mismo con el fin de facilitar su comprensión e implementación por parte de las Comunidades Autónomas, por lo que se realizó una nueva versión del Manual que fue aprobada por el Comité Fitosanitario Nacional y posteriormente adoptada por las diferentes Comunidades Autónomas, de acuerdo con el compromiso existente con los inspectores comunitarios.

En los últimos años, se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de las bacteriosis y nematodos del quiste de la patata, y en los métodos de detección e identificación, así como en la experiencia adquirida en el seguimiento y lucha contra estos organismos nocivos. A raíz de estos cambios, se ha modificado la legislación de referencia existente ya para estos organismos, así como para la creación de nuevos programas de control (en el caso de las *Globoderas*).

Como consecuencia de todo ello, se considera necesario actualizar el presente manual para reflejar en él las modificaciones anteriormente expuestas. Además se ha decidido integrar en un solo Manual de Procedimiento todos los organismos objeto de regulación, ya sea tanto por la Directiva 2000/29- Real Decreto 58/2005, como por las Directivas de Control. En especial, en este Manual se ha incluir de manera independiente todo el Protocolo a seguir tanto con las bacteriosis, como con los nematodos del quiste de la patata. De esta forma, al inspector fitosanitario se le aporta una visión mucho más clara y conjunta de todas las obligaciones, en materia de normativa fitosanitaria, para el cultivo de la patata.

### 3.- OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DEL MANUAL

En el presente *Manual de seguimiento* se pretende establecer un único programa, para el seguimiento de los organismos nocivos de cuarentena que afectan al cultivo de la patata, de acuerdo con la legislación vigente. Los objetivos más importantes a la hora de realizar este Manual son:

- Dar a conocer a los inspectores los procedimientos establecidos para cumplir con la legislación vigente
- Aportar la información necesaria para poder realizar inspecciones y muestreos de los organismos nocivos asociados a la patata
- Aunar reglas, normas y criterios en un protocolo común válido a nivel nacional

Para este fin, y en aras de una mayor comprensión, el presente Manual se ha dividido en los siguientes partes:

- Una primera parte que establece el procedimiento general de actuación de manera unificada, y que recoge toda aquella información necesaria para la correcta aplicación de la normativa fitosanitaria de la patata. En esta parte se incluyen las fichas descriptivas de los organismos regulados así como una serie de anexos, que tienen por objetivo el facilitar la labor del inspector fitosanitario. De esta parte confluyen dos bloques, correspondientes a los organismos regulados por Directivas de Control.
  - El primer bloque recoge el Manual de Procedimiento para el control de las bacteriosis de la patata (*Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum*), de los que existe Directivas de Control. Este Manual era el que ya existía anteriormente y se ha renovado con las últimas actualizaciones existentes por cambios en la legislación. También se incluyen los planes de contingencia de los

respectivos organismos nocivos así como una serie de anexos del procedimiento.

- El segundo bloque recoge el Manual de Procedimiento para el control de los nematodos del quiste de la patata (*Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis*). Este manual recoge las disposiciones de la Directiva de Control que se publicó en el 2007 y que exigía a los países miembros aplicarla en el 2010. La estructura de este manual es muy similar al anterior, entre lo que destaca un plan de contingencia y algunos anexos de carácter administrativo. Es necesario resaltar, que en algunos de los anexos se muestran modelos administrativos orientativos, en los que se explicita la mínima información requerida para cada uno de ellos, dejando abierta la posibilidad de añadir toda aquella información que cada Organismo competente considere necesaria.

#### 4.- CASOS VEGETALES RECOGIDOS EN LA LEGISLACIÓN

De cara a la inspección, lo primero que necesitamos saber es qué tipo de material vegetal se va a controlar. En el caso de la patata, la Directiva 2000/29/CE recoge tres casos vegetales, cada uno de ellos requiere un control sobre unos organismos nocivos asociados a ese material, y unos requisitos fitosanitarios específicos:

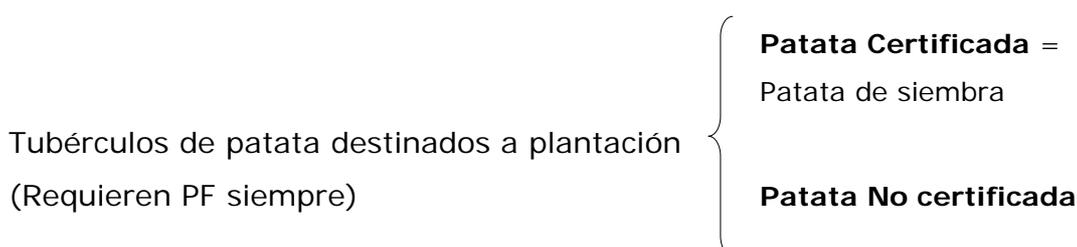
- Tubérculos de *Solanum tuberosum* destinados a plantación
- Tubérculos de *S. tuberosum* no destinados a plantación
- Vegetales de *S. tuberosum* destinados a plantación.

##### **A. Tubérculos de *Solanum tuberosum* destinados a la plantación.**

Este material vegetal tiene un riesgo muy alto de introducción y propagación de organismos nocivos, y es por lo que en estos tubérculos se realiza un riguroso control en origen, que además se complementa con controles en el destino.

En los tubérculos de patata destinadas a plantación, nos podemos encontrar dos tipos de material vegetal: por un lado la patata de

siembra, que siempre es certificada y controlada por los Servicios Oficiales de Semillas y Plantas de Vivero; y por otro lado podemos encontrarnos con tubérculos de patata destinadas a plantación que no son certificados, y por lo tanto tal y como establece el Reglamento Técnico de Control y Certificación de Patata de Siembra, no se pueden denominar patata de siembra.



Esta diferencia en cuanto a si la patata está certificada o no, es fundamental porque el propio sistema de certificación de la patata de siembra garantiza: que la parcela de producción está exenta de los nematodos del quiste de la patata y que el cultivo está libre de *Synchytrium endobioticum*, *Ralstonia solanacearum* y *Clavibacter michiganensis ssp. Sepedonicus*. Por lo tanto,

En cualquiera de los dos tipos de material, estos tubérculos, siempre necesitan estar acompañados de Pasaporte Fitosanitario (RD 58/2005 Anexo VAI 1.3). Además, deben ir acompañados de Pasaporte Fitosanitario tipo ZP cuando el destino del material sea alguna de las Zonas Protegidas de:

- *Leptinotarsa decemlineata*
- *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis*
- Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)
- Tomato spotted wilt virus (TSWV)

#### **B. Tubérculos de *Solanum tuberosum* no destinados a la plantación.**

Este material vegetal se corresponde con patatas destinadas al consumo, ya sea directamente. Estos pueden ser:

- a. Patata de Consumo
- b. Patata para transformación industrial

Los puntos en los que hace referencia en la legislación son:

- Anexo IV 18.5-AII.- Tubérculos de *Solanum tuberosum* L., no recogidos en los puntos 18.1, 18.2, 18.3 o 18.4 de la sección II de la parte A del anexo IV
- Anexo IV 20.2–B.- Tubérculos de *Solanum tuberosum* L., excepto los mencionados en el punto 20.1 de la parte B del anexo IV
- Anexo IV 20.3 –B.- Tubérculos de *Solanum tuberosum* L

**C. Vegetales de *Solanum tuberosum* destinados a la plantación.**

Estos pueden ser:

- a. Vegetales de *Solanum tuberosum*
- b. Vegetales que forman estolones o tubérculos de especies de *Solanum* L

Los puntos en los que hace referencia en la legislación son:

- Anexo IV 18.3-AII.- Vegetales que forman estolones o tubérculos de especies de *Solanum* L. o sus híbridos, destinados a la plantación, distintos de los tubérculos de *Solanum tuberosum* L. que se especifican en los puntos 18.1 o 18.2 de la sección II de la parte A del anexo IV y del material de mantenimiento de cultivos almacenado en bancos genéticos o colecciones genéticas
- Anexo IV 18.6–AII.- Vegetales de las especies de *Solanaceae*, destinados a la plantación, excepto las semillas y demás vegetales mencionados en los puntos 18.4 o 18.5 de la sección II de la parte A del anexo IV

- Anexo II A-II-d.15.- Vegetales de *Solanum tuberosum* L. destinados a plantación

## 5.- ORGANISMOS NOCIVOS REGULADOS

### ORGANISMOS REGULADOS SOLO POR LA DIRECTIVA 2000/29

#### ANEXO I y II

##### *Helicoverpa armigera*

- Organismo nocivo presente en la UE cuya introducción y propagación está prohibida si se presenta en determinados vegetales: **Anexo I AII a6.2**
- Hospedantes: Vegetales de *Dendrathema*, *Dianthus*, *Pelargonium* y familia *Solanaceae* destinados a plantación
- Ampliamente distribuido en España

##### *Leptinotarsa decemlineata*.

- Organismo cuya introducción y propagación está prohibida en determinadas zonas protegidas: **Anexo IB a3**
- **Zonas protegidas:** E (Ibiza y Menorca), IRL, CY, M, P (Azores y Madeira), UK, S (Blekinge, Gotland, Halland, Kalmar, Skåne), FI (los distritos de Åland, Turku, Uusimaa, Kymi, Häme, Pirkanmaa, Satakunta)

##### **Tomato spotted wilt virus (TSWV)**

- Organismo cuya introducción y propagación está prohibida en determinadas zonas protegidas: **Anexo IB b2**
- Organismo nocivo presente en la UE cuya introducción y propagación está prohibida si se presenta en determinados vegetales: **Anexo IIAII d15**

- Hospedantes: Vegetales destinados a plantación de *Apium graveolens*, *Capsicum annum*, *Cucumis melo*, *Dendranthema*, híbridos de Nueva Guinea, *Impatiens*, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Nicotiana tabacum* (sólo profesionales), *Solanum melongena* y *Solanum tuberosum*
- **ZP:** S, FIN
- Presente en España, limitada distribución

### ***Ditylenchus destructor***

- Organismo nocivo presente en la UE cuya introducción y propagación está prohibida si se presenta en determinados vegetales: **Anexo II AII a3**
- Hospedantes: Tubérculos de *Solanum tuberosum* destinados a plantación, bulbos destinados a plantación de flores y bulbos de *Crocus*, cultivados en miniatura y sus híbridos del género *Gladiolus*, *Hyacinthus*, *Iris*, *Trigridia*, *Tulipa*.
- No presente en España

## **ANEXO IV**

### **Potato Stolbur mycoplasm**

- Organismo nocivo presente en la UE cuya introducción y propagación está prohibida si se presenta en determinados vegetales: **Anexo II AII d8**
- Requisito especial: **Anexo IV AII 18.6**
  - a) los vegetales son originarios de zonas exentas de dicho organismo

b) o no se han observado síntomas de dicho organismo en los vegetales de la parcela de producción desde el principio del último ciclo completo de vegetación.

- Hospedantes: Vegetales de *Solanaceae* destinados a plantación
- Presente en España, limitada distribución

### ***Meloidogyne fallax* y *Meloidogyne chitwoodi***

- Organismo nocivo presente en la UE cuya introducción y propagación está prohibida: **Anexo I AII a6.1., a6.2.**
- Requisito especial para la patata de siembra **Anexo IV AII 18.1 apartado e):**

Declaración oficial de que:

Los tubérculos son originarios de zonas que se sabe están exentas de *Meloidogyne chitwoodi* y de *M. fallax* o en zonas en las que se tiene constancia de *Meloidogyne chitwoodi*, y de *M. fallax*

-los tubérculos son originarios de una parcela de producción que se ha comprobado que está exenta de *Meloidogyne chitwoodi* (todas las poblaciones), y de *Meloidogyne fallax* gracias a una investigación anual de los cultivos huéspedes mediante inspección visual de los vegetales huéspedes en momentos adecuados de inspección visual, tanto externa como cortando los tubérculos, tras la recolección de patatas cultivadas en la parcela de producción o bien

-los tubérculos han sido sometidos a un muestreo aleatorio tras la recolección y una inspección para detectar la presencia de síntomas tras un método adecuado para inducirlos a pruebas de laboratorios, así como a una inspección visual externa y cortando tubérculos, en momentos adecuados y, en todos los casos, en el momento de cerrar los embalajes o contenedores antes de la comercialización con arreglo a las disposiciones sobre cerrado de la Directiva 66/403/CEE, no habiéndose detectado síntomas de *Meloidogyne chitwoodi* (todas las poblaciones) ni de *Meloidogyne fallax*

- No presente en España

### **Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV)**

- Organismo cuya introducción y propagación está prohibida en determinadas zonas protegidas: **Anexo IB b1**
- **ZP:** F (Bretaña), FI, IRL, P (Azores), UK (Irlanda del Norte)
- Requisito especial cuando el destino sea una ZP:

**Anexo IVB 20.1.** Patata de siembra: Declaración oficial de que:

- a) se han cultivado en una zona en la que se sabe está exenta de BNYVV, o bien
- b) se han cultivado en terrenos o en medios de cultivo consistentes en tierra de la que se sabe está exenta de BNYVV, o bien han sido analizados con métodos adecuados, comprobándose que están exentos de BNYVV, o bien
- c) han sido lavados para quitarles la tierra

**Anexo IVB 20.1** Tubérculos de patata no destinados a plantación (Patata de consumo):

- a) el envío o lote no contendrá más de un 1% en peso de tierra, o
  - b) los tubérculos se destinan a su transformación en locales con instalaciones en eliminación de residuos oficialmente autorizadas que garanticen la ausencia de todo riesgo de propagación de BNYVV
- Presente en España, limitada distribución

### **Virus y organismos afines de la patata**

- Organismo no presente en la UE cuya introducción está prohibida **Anexo IAI d.2.**
- Requisito especial para los vegetales que formen estolones o tubérculos destinados a plantación, distintos de los tubérculos y del material de mantenimiento de cultivos almacenado en bancos genéticos o colecciones genéticas **Anexo IVAII 18.3 bc):**

Los vegetales deben mantenerse en condiciones de cuarentena y resultar exentos de cualquier organismo nocivo en las pruebas de cuarentena que deben ser realizadas en cada unidad de material

- mediante examen visual a intervalos regulares durante todo un ciclo vegetativo, como mínimo teniendo en cuenta el tipo de material y su fase de desarrollo durante el programa de pruebas, para detectar los síntomas causados por cualquier organismo nocivo.

- mediante pruebas, con los métodos adecuados, aprobados por procedimientos comunitarios.

- para todo el material de patata, detección como mínimo de:

+ Andean potato latent virus (APLV).

+ Arracacha virus B, oca strain (AVB-O).

+ Potato black ringspot virus (PBRSV).

+ Potato spindle tuber viroid (PSTVd).

+ Potato virus T (PVT).

+ Andean potato mottle virus (APMoV).

+ Virus de la patata A, M, S, V, X e Y (incluidas Y<sup>a</sup>, Y<sub>n</sub>, Y<sub>c</sub>) y Potato leaf roll virus.

## ORGANISMOS REGULADOS POR DIRECTIVAS DE CONTROL

### *Synchytrium endobioticum*

- **Directiva 2000/29/CE**

Organismo nocivo presente en la UE cuya introducción y propagación está prohibida : **Anexo I AII c2**

- Requisitos para la importación **Anexo IVAI**
- Requisito patata de siembra **Anexo IVAII 18.1.:** ajustarse a las disposiciones comunitarias de lucha contra *Synchytrium endobioticum*
- Requisito patata de consumo **Anexo IVAII 18.5:** deben llevar un número de registro que indiquen que las patatas han sido cultivadas

por un productor oficialmente registrado, o que son originarias de centro de almacenamiento o envío colectivos oficialmente registrados y situados en la zona de producción, y que se deben ajustarse a las disposiciones comunitarias de lucha contra *Synchytrium endobioticum*

- **Directiva de control ; Directiva 69/464/CEE** del Consejo, de 8 de diciembre de 1969, relativa a la lucha contra la sarna verrugosa
  - Establece las medidas mínimas a adoptar en los Estados Miembros para combatir la sarna verrugosa y evitar su propagación
  - Cuando se detecta su presencia, el Estado Miembro debe delimitar la parcela contaminada y una zona de seguridad que garantice la protección de las zonas colindantes
  - Los tubérculos y las hojas de patata procedentes de parcelas contaminadas deben ser destruidos
  - En las parcelas contaminadas:
    - No se pueden cultivar patatas
    - No se pueden cultivar, plantar, ni almacenar plantas destinadas a replantación
  - En la zona de seguridad:
    - Sólo variedades resistentes a las razas encontradas
  - Los Estados Miembros pueden retirar las medidas adoptadas cuando ya no se observe la presencia
  - Se debe comunicar a la Comisión, antes del 1 de enero de cada año el listado de variedades de patata resistentes y la raza a la que son resistentes. Comprobación de la resistencia mediante examen oficial
  
- **Orden de 28 de febrero de 1986** relativa a la lucha contra la sarna verrugosa de las patatas, en aplicación de la Directiva 69/464/CEE del Consejo; Aplicación obligatoria de las medidas en todo el territorio nacional

### ***Ralstonia solanacearum***

- **Directiva 2000/29/CE**
- Organismo nocivo presente en la UE cuya introducción y propagación está prohibida : **Anexo I AII b1, b2**
- Requisitos para la importación **Anexo IVAI**
- Requisito patata de siembra **Anexo IVAII 18.1.:** procedentes de zona exenta de los organismos o ajustarse a procedimientos comunitarios de lucha contra ellos
- Requisito vegetales de *Solanum tuberosum* **Anexo IVAII 18.3.**
- Requisito patata de consumo **Anexo IVAII 18.5.:** exentos y ajustarse a disposiciones comunitarias
- **Directiva de control; Directiva 98/57/CE** del Consejo, de 20 de julio de 1998, sobre el control de *Ralstonia solanacearum*  
Modificada por **Directiva 2006/63/CE** de la Comisión, de 14 de julio de 2006
- **Real Decreto 1644/1999, de 22 de octubre,** sobre el control del organismo nocivo denominado *Ralstonia solanacearum*
- **Orden APA/719/2007,** de 15 de marzo, por la que se modifican los anexos II a VII del Real Decreto 1644/1999, de 22 de octubre, sobre el control del organismo nocivo denominado *Ralstonia solanacearum*

### ***Clavibacter michiganensis***

- **Directiva 2000/29/CE**
- Organismo nocivo presente en la UE cuya introducción y propagación está prohibida : **Anexo I AII b1, b2**
- Requisitos para la importación **Anexo IVAI**
- Requisito patata de siembra **Anexo IVAII 18.1.:** procedentes de zona exenta de los organismos o ajustarse a procedimientos comunitarios de lucha contra ellos
- Requisito vegetales de *Solanum tuberosum* **Anexo IVAII 18.3.**
- Requisito patata de consumo **Anexo IVAII 18.5.:** exentos y ajustarse a disposiciones comunitarias

- **Directiva de control; Directiva 93/85/CE** del Consejo, de 4 de octubre de 1993, relativa a la lucha contra la necrosis bacteriana de la patata  
Modificada por **Directiva 2006/56/CE** de la Comisión, de 12 de junio de 2006
- **Orden de 22 de marzo de 1994** relativa a la lucha contra la necrosis bacteriana de la patata, en aplicación de la Directiva 98/57/CE del Consejo
- **Orden APA/718/2007**, de 15 de marzo, por la que se modifican los anexos de la Orden de 22 de marzo de 1994, relativa a la lucha contra la necrosis bacteriana de la patata, en aplicación de la Directiva 93/85 del Consejo

#### ***Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis***

- **Directiva 2000/29/CE**
- Organismos nocivos presentes en la UE cuya introducción y propagación está prohibida: **Anexo I AII a1, a2**
- *Globodera pallida*: Organismo cuya introducción y propagación está prohibida en determinadas zonas protegidas: **Anexo IB a2**
- **ZP: LV, SI, SK, FI. Requisitos Anexo IVB 20.3**
  
- Requisitos para la importación **Anexo IVAI**
- Requisito patata de siembra **Anexo IVAII 18.1.:** procedentes de campo exento
- **Directiva de control; Directiva 2007/33/CE** del Consejo, de 11 de junio de 2007, relativa al control de los nematodos del quiste de la patata y por la que se deroga la Directiva 69/465/CE
- **Real Decreto 920/2010**, de 16 de julio, por el que se establece el programa nacional de control de los nematodos del quiste de la patata

# **ANEXOS DEL PROCEDIMIENTO GENERAL**

## **INDICE**

- Anexo n° 1:** *Legislación de referencia*
- Anexo n° 2:** *Laboratorios oficiales de diagnóstico de las distintas Comunidades Autónomas*
- Anexo n° 3:** *Ficha para el envío de muestras al Laboratorio de diagnóstico*
- Anexo n° 4:** *Requisitos especiales recogidos en la legislación de los organismos de cuarentena asociados a la patata*
- Anexo n° 5:** *Método de muestreo de los organismos de cuarentena asociados a la patata*
- Anexo n° 6:** *Calendario de muestreo de los organismos de cuarentena asociados a la patata*

Última actualización: mayo de 2010

## Anexo nº 1: Legislación de referencia (\*)

### I. LEGISLACIÓN COMUNITARIA

#### **GENERAL**

**DIRECTIVA 2000/29/CE DEL CONSEJO, de 8 de mayo de 2000, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (deroga la Directiva 77/93/CEE del Consejo, de 21 de diciembre de 1976, y sus posteriores modificaciones) (DO L169 de 10.07.2000).**

- Corrección de errores de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, de 8 de mayo de 2000, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (DO L169 de 10.07.2000).
- DIRECTIVA 2001/33/CE DE LA COMISIÓN, de 8 de mayo de 2001, por la que se modifican determinados anexos de la Directiva 2000/29/CE del Consejo relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (DO L127 de 09.05.2001).
- DIRECTIVA 2002/28/CE DE LA COMISIÓN, de 19 de marzo de 2002, por la que se modifica determinados anexos de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (DO L77 de 20.03.2002).
- DIRECTIVA 2002/36/CE DE LA COMISIÓN, de 29 de abril de 2002, por la que se modifican algunos anexos de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o los productos

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella

vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L116 de 03.05.2002*).

- DIRECTIVA 2002/89/CE DEL CONSEJO, de 28 de noviembre de 2002, por la que se modifica la Directiva 2000/29/CE relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L355 de 30.12.2002*).
- DIRECTIVA 2003/22/CE DE LA COMISIÓN, de 24 de marzo de 2003, por la que se modifican algunos anexos de la Directiva 2000/29/CE del Consejo relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L78 de 25.03.2003*).
- DIRECTIVA 2003/47/CE DE LA COMISIÓN, de 4 de junio de 2003, por la que se modifican los anexos II, IV y V de la Directiva 2000/29/CE del Consejo relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L138 de 05.06.2003*).
- DIRECTIVA 2003/116/CE DE LA COMISIÓN, de 4 de diciembre de 2003, por la que se modifican los anexos II, III, IV y V de la Directiva 2000/29/CE del Consejo en lo que se refiere al organismo nocivo *Erwinia amylovora* (Burr.) Winsl. et al. (*DO L321 de 06.12.2003*).
- DIRECTIVA 2004/31/CE DE LA COMISIÓN, de 17 de marzo de 2004, por la que se modifican los anexos I, II, III, IV y V de la Directiva 2000/29/CE del Consejo relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L85 de 23.03.2004*).
- DIRECTIVA 2004/70/CE DEL CONSEJO, de 28 de abril de 2004, por la que se modifica la Directiva 2000/29/CE relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella

- nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L127 de 29.04.2004*).
- DIRECTIVA 2004/102/CE DE LA COMISIÓN, de 5 de octubre de 2004, por la que se modifican los anexos II, III, IV y V de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L309 de 06.10.2004*).
  - DIRECTIVA 2004/103/CE de la Comisión, de 7 de octubre de 2004, relativa a los controles de identidad y fitosanitarios de vegetales, productos vegetales u otros objetos enumerados en la parte B del anexo V de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, que pueden llevarse a cabo en un lugar distinto del punto de entrada en la Comunidad o en un lugar cercano y por la que se determinan las condiciones relacionadas con dichos controles (*DO L313 de 12.10.2004*).
  - DIRECTIVA 2004/105/CE DE LA COMISIÓN, de 15 de octubre de 2004, por la que se fijan los modelos oficiales de certificados fitosanitarios o certificados fitosanitarios de reexportación que deben acompañar a los vegetales, productos vegetales y otros objetos procedentes de terceros países y enumerados en la Directiva 2000/29/CE del Consejo (*DO L319 de 20.10.2004*).
  - DIRECTIVA 2005/15/CE DEL CONSEJO, de 28 de febrero de 2005, que modifica el anexo IV de la Directiva 2000/29/CE, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L56 de 02.03.2005*).
  - DIRECTIVA 2005/16/CE DE LA COMISIÓN, de 2 de marzo de 2005, por la que se modifican los anexos I a V de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L57 de 03.03.2005*).

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella

- DIRECTIVA 2005/77/CE DE LA COMISIÓN, de 11 de noviembre de 2005, por la que se modifica el anexo V de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L296 de 12.11.2005*).
- DIRECTIVA 2006/14/CE DE LA COMISIÓN de 6 de febrero de 2006 por la que se modifica el anexo IV de la Directiva 2000/29/CE del Consejo relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad. (*DO L34 de 7.2.2006*).
- DIRECTIVA 2006/35/CE DE LA COMISIÓN de 24 de marzo de 2006 por la que se modifican los anexos I a IV de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad. (*DO L88 de 25.3.2006*).
- DIRECTIVA 2007/41/CE DE LA COMISIÓN, de 28 de junio de 2007 , por la que se modifican algunos anexos de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad. (*DO L169 de 29.6.2007*).
- DIRECTIVA 2008/64/CE DE LA COMISIÓN, de 27 de junio de 2008, por la que se modifican los anexos I a IV de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L158 de 28.06.2008*).
- DIRECTIVA 2008/109/CE DE LA COMISIÓN, de 28 de noviembre de 2008, por la que se modifica el anexo IV de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en

---

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella

la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L319 de 29.11.2008*).

- DIRECTIVA 2009/7/CE DE LA COMISIÓN, de 10 de febrero de 2009, por la que se modifican los anexos I, II, IV y V de la Directiva 2000/29/CE del Consejo relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L40 de 11.02.2009*).
- Corrección de errores de la Directiva 2008/109/CE de la Comisión, de 28 de noviembre de 2008 , por la que se modifica el anexo IV de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad ( *DO L 319 de 29.11.2008* )
- DIRECTIVA 2009/118/CE DE LA COMISIÓN, de 9 de septiembre de 2009 , por la que se modifican los anexos II a V de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L 239 de 10.9.2009*)
- DIRECTIVA 2010/1/UE DE LA COMISIÓN, de 8 de enero de 2010 , por la que se modifican los anexos II, III y IV de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad (*DO L 7 de 12.1.2010*)

### **FINES CIENTÍFICOS**

**DIRECTIVA 95/44/CE DE LA COMISIÓN, de 26 de julio de 1995, por la que se establecen las condiciones en las que determinados organismos nocivos, vegetales, productos vegetales y otros objetos enumerados en los Anexos I a V de la Directiva 77/93/CEE del**

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella

**Consejo, pueden ser introducidos o transportados dentro de la Comunidad o de determinadas zonas protegidas de la misma con fines de ensayo o científicos y para actividades de selección de variedades (DO L184 de 03.08.1995).**

- **DIRECTIVA 97/46/CE DE LA COMISIÓN, de 25 de julio de 1997, por la que se modifica la Directiva 95/44/CE por la que establecen las condiciones en las que determinados organismos nocivos, vegetales, productos vegetales y otros objetos enumerados en los Anexos I a V de la Directiva 77/93/CEE del Consejo pueden ser introducidos o transportados dentro de la Comunidad o de determinadas zonas protegidas de la misma con fines de ensayo o científicos y para actividades de selección de variedades (DO L204 de 31.07.1997).**

**DIRECTIVA 2008/61/CE DE LA COMISIÓN, de 17 de junio de 2008, por la que se establecen las condiciones en las que determinados organismos nocivos, vegetales, productos vegetales y otros objetos enumerados en los anexos I a V de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, pueden ser introducidos o transportados dentro de la Comunidad o de determinadas zonas protegidas de la misma con fines de ensayo o científicos y para actividades de selección de variedades (DO L158 de 16.06.2008).**

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella

**MEDIDAS DE CONTROL ESPECÍFICAS*****Clavibacter michiganensis***

**DIRECTIVA 93/85/CEE DEL CONSEJO, de 4 de octubre de 1993, relativa a la lucha contra la necrosis bacteriana de la patata (DO L259 de 18.10.1993).**

- DIRECTIVA 2006/56/CE DE LA COMISIÓN de 12 de junio de 2006 por la que se modifican los anexos de la Directiva 93/85/CEE del Consejo relativa a la lucha contra la necrosis bacteriana de la patata (DO L182 de 4.78.2006).

***Globodera pallida y Globodera rostochiensis***

**DIRECTIVA 2007/33/CE DEL CONSEJO de 11 de junio de 2007 relativa al control de los nematodos del quiste de la patata y por la que se deroga la Directiva 69/465/CEE (DO L156 de 16.06.2007).**

***Ralstonia solanacearum***

**DIRECTIVA 98/57/CE DEL CONSEJO, de 20 de julio de 1998, sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al (DO L235 de 21.08.1998).**

- RECTIFICACIÓN A LA DIRECTIVA 98/57/CE DEL CONSEJO, de 20 de julio de 1998, sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (DO L218 de 18.08.1999).
- DIRECTIVA 2006/63/CE DE LA COMISIÓN de 14 de julio de 2006 por la que se modifican los anexos II a VII de la Directiva 98/57/CE del Consejo sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (DO L206 de 27.07.2006).

***Synchytrium endobioticum***

**DIRECTIVA 69/464/CEE DEL CONSEJO, de 8 de diciembre de 1969, relativa a la lucha contra la sarna verrugosa (DO L323 de 24.12.1969).**

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella

## II. LEGISLACIÓN ESPAÑOLA

### **GENERAL**

**LEY 43/2002, de 20 de noviembre, de Sanidad Vegetal (BOE de 21 de noviembre de 2002)**

**REAL DECRETO 1190/1998, de 12 de junio, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación o control de organismos nocivos de los vegetales aún no establecidos en el territorio nacional (BOE de 13 de junio de 1998).**

**REAL DECRETO 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros (BOE de 22 de enero de 2005) (deroga el R.D. 2071/1993, de 26 de noviembre, y sus posteriores modificaciones).**

- **ORDEN APA/431/2005, de 18 de febrero, por la que se modifican los anexos del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros (BOE de 26 de febrero de 2005).**
- **ORDEN APA/660/2005, 16 de marzo, por la que se modifica el anexo IV del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros (BOE de 18 de marzo de 2005).**
- **ORDEN APA/1440/2005, de 17 de mayo, por la que se modifican determinados anexos del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la**

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella

- exportación y tránsito hacia países terceros (*BOE de 23 de mayo de 2005*).
- **CORRECCIÓN** de errores de la ORDEN APA/1440/2005, de 17 de mayo, por la que se modifican determinados anexos del Real decreto 58/2005 de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros (*BOE de 16 de junio de 2005*).
  - ORDEN APA/4139/2005, de 23 de diciembre, por la que se modifica el Anexo V del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros (*BOE de 3 de enero de 2006*).
  - ORDEN APA/725/2006, de 10 de marzo, por la que se modifica el anexo IV del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros (*BOE de 16 de marzo de 2006*).
  - **REAL DECRETO 471/2006**, de 21 de abril, por el que se modifica el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros (*BOE de 11 de mayo de 2006*).
  - ORDEN APA/1242/2006, de 26 de abril, por la que se modifican determinados anexos del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la

---

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella

- exportación y tránsito hacia países terceros (*BOE de 28 de abril de 2006*).
- ORDEN APA/2802/2007, de 24 de septiembre, por la que se modifican determinados anexos del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros (*BOE de 1 de octubre de 2007*).
  - ORDEN ARM/2505/2008, de 28 de agosto, por la que se modifican los anexos I, II, III y IV del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de Organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros (*BOE de 30 de agosto de 2008*).
  - ORDEN ARM/183/2009, de 4 de febrero, por la que se modifica el anexo IV del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de Organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros (*BOE de 7 de febrero de 2009*).
  - ORDEN ARM/1671/2009, de 16 de junio, por la que se modifican los anexos I, II, IV y V del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la comunidad europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros. (*BOE de 24 de junio de 2009*)
  - ORDEN ARM/3196/2009, de 26 de noviembre, por la que se modifican los anexos II a V del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la comunidad europea de organismos nocivos para

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella

los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros (*BOE de 28 de noviembre de 2009*)

- ORDEN ARM/462/2010, de 23 de febrero, por la que se modifican los anexos II, III y IV del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la comunidad europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros (*BOE de 2 de marzo de 2010*)

### **FINES CIENTÍFICOS**

**REAL DECRETO 401/1996, de 1 de marzo, por el que se establecen las condiciones para la introducción en el territorio nacional de determinados organismos nocivos, vegetales, productos vegetales y otros objetos por una zona protegida y para la circulación de tales vegetales, productos vegetales y otros objetos con fines de ensayo, científicos y para la actividad de selección de variedades (BOE de 19 de marzo de 1996).**

- REAL DECRETO 39/1998, de 16 de enero, por el que se modifica el Real Decreto 401/1996 de 1 de marzo (BOE de 17 de enero de 1998).

### **MEDIDAS DE CONTROL ESPECÍFICAS**

#### ***Clavibacter michiganensis***

**ORDEN de 22 de marzo de 1994, relativa a la lucha contra la necrosis bacteriana de la patata, en aplicación de la Directiva 93/85/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas (BOE de 5 de abril de 1994).**

- ORDEN APA/718/2007, de 15 de marzo, por la que se modifican los anexos de la Orden de 22 de marzo de 1994, relativa a la lucha contra la necrosis bacteriana de la patata, en aplicación de la Directiva 93/85/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas (*BOE de 27 de marzo de 2007*).

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella

***Globodera pallida y Globodera rostochiensis***

ORDEN de 28 de febrero de 1986, relativa a la prevención y lucha contra el nematodo del quiste de la patata, en aplicación de la Directiva 69/465/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas (BOE de 1 de marzo de 1986) (derogada)

REAL DECRETO 920/2010, de 16 de julio, por el que se establece el programa nacional de control de los nematodos del quiste de la patata (BOE de 23 de julio de 2010).

***Ralstonia solanacearum***

REAL DECRETO 1644/1999, de 22 de octubre, sobre el control del organismo nocivo denominado *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabouchi et al. (BOE de 5 de noviembre de 1999).

- ORDEN APA/719/2007, de 15 de marzo, por la que se modifican los anexos II a VII del Real Decreto 1644/1999, de 22 de octubre, sobre el control del organismo nocivo denominado *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (BOE de 27 de marzo de 2007).

***Synchytrium endobioticum***

ORDEN de 28 de febrero de 1986, relativa a la lucha contra la sarna verrugosa de las patatas, en aplicación de la Directiva 69/464/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas (BOE de 1 de marzo de 1986).

### III. CUADRO RESUMEN DE CORRESPONDENCIA ENTRE LAS LEGISLACIONES COMUNITARIA Y ESPAÑOLA

<b>LEGISLACIÓN COMUNITARIA</b>	<b>LEGISLACIÓN ESPAÑOLA</b>
<b>GENERAL</b>	
	LEY 43/2002, de 20 de noviembre, de Sanidad Vegetal (BOE de 20 de noviembre de 2002)

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella

	<b>REAL DECRETO 1190/1998, de 12 de junio (BOE de 13 de junio de 1998)</b>
<b>DIRECTIVA 2000/29/CE DEL CONSEJO, de 8 de mayo de 2000)</b>	<b>REAL DECRETO 58/2005, de 21 de enero (BOE de 22 de enero de 2005)</b>
<b>FINES CIENTÍFICOS</b>	
<b>DIRECTIVA 95/44/CE DE LA COMISIÓN, de 26 de julio de 1995</b>	<b>REAL DECRETO 401/1996, de 1 de marzo (BOE de 19 de marzo de 1996)</b>
➤ <b>DIRECTIVA 97/46/CE DE LA COMISIÓN, de 25 de julio de 1997</b>	➤ <b>REAL DECRETO 39/1998, de 16 de enero (BOE de 17 de enero de 1998)</b>
<b>DIRECTIVA 2008/61/CE DE LA COMISIÓN, de 17 de junio de 2008</b>	
<b>MEDIDAS DE CONTROL ESPECÍFICAS</b>	
<b>DIRECTIVA 69/464/CEE DEL CONSEJO, de 8 de diciembre de 1969</b>	<b>ORDEN de 28 de febrero de 1986 (BOE de 1 de marzo de 1986)</b>
<b>DIRECTIVA 69/465/CEE DEL CONSEJO, de 8 de diciembre de 1969</b>	<b>ORDEN de 28 de febrero de 1986 (BOE de 1 de marzo de 1986)</b>
➤ <b>DIRECTIVA 2007/33/CE DEL CONSEJO de 11 de junio de 2007 (DO L156 de 16.06.2007)</b>	➤ <b>Real Decreto 920/2010 (BOE de 23 de julio de 2010)</b>
<b>DIRECTIVA 93/85/CEE DEL CONSEJO, de 4 de octubre de 1993</b>	<b>ORDEN de 22 de marzo de 1994 (BOE de 5 de abril de 1994)</b>
➤ <b>DIRECTIVA 2006/56/CE DE LA COMISIÓN de 12 de junio de 2006 (DO L182 de 4.78.2006).</b>	➤ <b>ORDEN APA/718/2007, de 15 de marzo, por la que se modifican los anexos de la Orden de 22 de marzo de 1994 (BOE de 27 de marzo de 2007)</b>
<b>DIRECTIVA 98/57/CEE DEL CONSEJO, de 8 de julio de 1998</b>	<b>REAL DECRETO 1644/1999, de 22 de octubre (BOE de 5 de noviembre de 1999)</b>
➤ <b>RECTIFICACIÓN A LA DIRECTIVA 98/57/CE DEL CONSEJO, de 20 de julio de 1998</b>	
<b>DIRECTIVA 2006/63/CE DE LA COMISIÓN de 14 de julio de 2006 por la que se modifican los anexos II a VII de la Directiva 98/57/CE</b>	➤ <b>ORDEN APA/719/2007, de 15 de marzo, por la que se modifican los anexos II a VII del Real Decreto 1644/1999, de 22 de octubre. (BOE de 27 de marzo de 2007)</b>

(\*) En negrita se muestra la legislación base o matriz de la que deriva la legislación relacionada con ella



Última actualización: mayo de 2010

## Anexo nº 2: Laboratorios oficiales de diagnóstico de las distintas Comunidades Autónomas

COMUNIDAD AUTÓNOMA	LABORATORIOS
<p style="text-align: center;"><b>ANDALUCÍA</b></p> <p>Dirección General de la Producción Agraria Servicio de Sanidad Vegetal c/ Tabladilla, s/n. 41013-SEVILLA</p> <p>Información sobre Sanidad Vegetal: <a href="http://intranet.cap.junta-andalucia.es/intranet/export/inicio.html">http://intranet.cap.junta-andalucia.es/intranet/export/inicio.html</a></p>	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Ctra. El Portil - El Rompido, s/n. Complejo Aguas del Pino. 21459-CARTAYA (HUELVA) Tlfn.- 959 02 47 00 /20 /21 Fax.- 959 02 47 14 e_mail: <a href="mailto:juan.bascon.ext@juntadeandalucia.es">juan.bascon.ext@juntadeandalucia.es</a></p>
	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Ctra. de Córdoba, s/n. 23005- CERRO DE LOS LIRIOS (JAÉN) Tlfn.- 953 34 00 22 Fax.- 953 243994 e_mail: <a href="mailto:alfonso.montiel@juntadeandalucia.es">alfonso.montiel@juntadeandalucia.es</a></p>
	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Autovía del Mediterráneo, Salida 420 (Paraje San Nicolás) 04745- LA MOJONERA (ALMERÍA) Tlfn.- 950 55 80 10 /17 FAX.- 950 55 80 50 e_mail: <a href="mailto:mariar.brotons@juntadeandalucia.es">mariar.brotons@juntadeandalucia.es</a></p>
	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Ctra. de Utrera, 9 41013- MONTEQUINTO (SEVILLA) [Con Apto. 121; 41089 MONTEQUINTO (SEVILLA)] Tlfn.- 95 500 94 10 Fax.- 95 500 94 15 e_mail: <a href="mailto:direccion.lsvse.cap@juntadeandalucia.es">direccion.lsvse.cap@juntadeandalucia.es</a></p>
	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Camino del Jau s/n, 18320 -SANTA FÉ (GRANADA) [Con Apto. 79; 18320 -SANTA FÉ (GRANADA)] Tlfn.- 958 02 54 00 Fax.- 958 02 54 03 e_mail: <a href="mailto:Javier.prados.ext@juntadeandalucia.es">Javier.prados.ext@juntadeandalucia.es</a></p>
	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Camino Viejo de Velez, nº8. 29738-Torre de Benagalbón. RINCÓN DE LA VICTORIA (MÁLAGA) Tlfn.- 951 92 04 82 (centralita)/951 92 04 91 Fax.- 952 40 81 47 e_mail: <a href="mailto:carmen.rodriguez.salido.ext@juntadeandalucia.es">carmen.rodriguez.salido.ext@juntadeandalucia.es</a></p>
<p style="text-align: center;"><b>ARAGÓN</b></p> <p>Consejería de Agricultura y Alimentación Dirección General de Alimentación Centro de Protección Vegetal Avda. Montañana, 930 50059-ZARAGOZA [Apto. 727- 50080-ZARAGOZA]</p> <p>Información sobre Sanidad Vegetal: <a href="http://www.aragob.es">www.aragob.es</a></p>	<p>Laboratorio de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitarias Avda. Montañana, 930 50059-ZARAGOZA Tlfn.- 976 71 63 77 Fax.- 976 71 63 78 e_mail: <a href="mailto:mcambra@aragon.es">mcambra@aragon.es</a></p>
<p style="text-align: center;"><b>ASTURIAS</b></p> <p>Consejería de Medio Rural y Pesca Dirección General de Agroalimentación Servicio de Modernización y Fomento Asociativo Sección de Sanidad Vegetal c/ Coronel Aranda, 2 33005-OVIEDO (ASTURIAS)</p> <p>Información sobre Sanidad Vegetal: <a href="http://tematico.princast.es/sanidadvegetal/index.html">http://tematico.princast.es/sanidadvegetal/index.html</a></p>	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal C/ Lucas Rodríguez, 4 – Bajo LA CARISA 33011-OVIEDO (ASTURIAS) Tlfn.- 985 28 49 67 Fax.- 985 11 69 09 e_mail: <a href="mailto:maximoba@princast.es">maximoba@princast.es</a></p>

<p><b>ISLAS BALEARES</b>          Conselleria d'Agricultura i Pesca          Direcció General d'Agricultura          Secció de Sanidad Vegetal          c/ dels Foners, 10          07006-PALMA DE MALLORCA          Información sobre Sanidad Vegetal: <a href="http://www.caib.es">www.caib.es</a></p>	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal          c/ dels Foners, 10          07006- PALMA DE MALLORCA          Tlfno.- 971 17 61 00          Fax.- 971 17 61 56          e_mail: dolmo@dgagric.caib.es</p>
<p><b>CANTABRIA</b>          Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca          Dirección General de Agricultura          Servicio de Desarrollo Rural          c/ Gutiérrez Solana, s/n.          39011-SANTANDER</p>	<p>No tiene laboratorio (En trámite de instalación)</p>
<p><b>CASTILLA Y LEÓN</b>          Consejería de Agricultura y Ganadería          Dirección General de Producción Agropecuaria          Servicio de Sanidad y Ordenación Agrícola          c/ Rigoberto Cortejoso, 14 -2ª Planta          47014-VALLADOLID          Información sobre Sanidad Vegetal: <a href="http://www.jcyl.es">www.jcyl.es</a></p>	<p>Centro de Control de Patata de Siembra          c/ Río Cobia, s/n.          09239- ALBILLOS (BURGOS)          Tlfno.- 947 40 52 92          Fax.- 947 40 52 92          e_mail: mardiapa@jcyl.es</p> <p>Centro Regional de Diagnóstico          Ctra. de Aldealengua a Babilafuente, km. 6          37340- ALDEARRUBIA (SALAMANCA)          Tlfno.- 923 36 31 50 /80          Fax.- 923 36 31 49          e_mail: pgb@gugu.usal.es</p>
<p><b>CASTILLA-LA MANCHA</b>          Consejería de Agricultura          Dirección General de la Producción Agropecuaria          Servicio Agrícola          c/ Pintor Matías Moreno, 4          45002-TOLEDO          Información sobre Sanidad Vegetal:  <a href="http://www.jccm.es/agricul/agricultura_ganaderia/sanidad_vegetal/">www.jccm.es/agricul/agricultura_ganaderia/sanidad_vegetal/</a></p>	<p>Laboratorio Agrario Regional          Polígono Campollano, Avda. II Nº 42, 02006 Finca          Experimental Las Tiesas          020006- ALBACETE          Tlfno.- 967 21 91 13          FAX.- 967 52 11 07          e_mail: cbalguerias@jccm.es</p>
<p><b>CATALUÑA</b>          Conselleria d'Agricultura, Ramaderia i Pesca          Direcció General de la Producció Agraria i Innovació Rural          Servei de Sanitat Vegetal          Gran Via de les Corts Catalanes, 612-614          08007-BARCELONA          Información sobre Sanidad Vegetal:  <a href="http://www.gencat.net/darp/campsani.htm">http://www.gencat.net/darp/campsani.htm</a>  <a href="http://www.ruralcat.net">www.ruralcat.net</a></p>	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal          Vía de Circunvalación Norte, Tramo 6          Esquina calle 3 (Zona Franca)          08040- BARCELONA          Tlfno.- 932 23 40 51 /46          Fax.- 932 23 42 15          e_mail: cmonton@gencat.net</p>
<p><b>EXTREMADURA</b>          Consejería de Agricultura y Medio Ambiente          Dirección General de Explotaciones Agrarias          Servicio de Sanidad Vegetal          Avda. de Portugal, s/n.          06800-MÉRIDA (BADAJOZ)          Información sobre Sanidad Vegetal: <a href="http://agraria.juntaex.es">http://agraria.juntaex.es</a></p>	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal de Badajoz          Ctra. de San Vicente, 3          06071- BADAJOZ          Tlfno.- 924 01 10 90          Fax.- 924 01 11 04          e_mail: remedios.santiago@aym.juntaex.es</p> <p>Laboratorio de Sanidad Vegetal de Cáceres          Ctra. Depuradora de Aguas, s/n.          Apto. de Correos 435          10080- CÁCERES          Tlfno.- 927/00 40 69          FAX.- 927/00 40 68          e_mail: francisco.calderon@aym.juntaex.es</p>
<p><b>GALICIA</b>          Consejería de Política Agroalimentaria y Desarrollo Rural          Dirección General de Producción y Sanidad Agropecuaria          Servicio de Sanidad y Producción Agrícola          Edifº Admvo. San Cayetano, s/n. -2ª Planta</p>	<p>Laboratorio Agrario y Fitopatológico          Ctra. Betanzos-Santiago, Km. 8          15318- MABEGONDO (A CORUÑA)          Tlfno.- 981 67 35 00 /75          Fax.- 981 66 94 01          e_mail: jesus.collar.urquijo@xunta.es</p>

	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Diputación Provincial de Pontevedra Estación Fitopatológica "do Areeiro" Subida a la Robleda, s/n. 36153 LOURIZAN (PONTEVEDRA) Tlfno.- 986 84 14 91 Fax.- 986 86 42 91 e_mail: efa@efa-dip.org</p>
<p><b>LA RIOJA</b> Consejería de Agricultura y Desarrollo Económico Dirección General del Instituto de Calidad de La Rioja Sección de Producción Ctra. Mendavia - Logroño -Na. 134, Km. 88 26071-LOGROÑO (LA RIOJA) Información sobre Sanidad Vegetal: <a href="http://www.larioja.org">www.larioja.org</a></p>	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Laboratorio Regional Ctra. de Burgos, Km. 6 Finca "La Grajera" 26071 LOGROÑO (LA RIOJA) Tlfno.- 941 29 12 63 Fax.- 941 29 17 22 e_mail: biologia.vegetal@larioja.org</p>
<p><b>COMUNIDAD DE MADRID</b> Consejería de Economía e Innovación Tecnológica Dirección General de Agricultura Servicio de Agricultura y Programas Agroambientales Ronda de Atocha, 17 -2ª Planta- 28012-MADRID</p>	<p>Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos Universidad Politécnica de Madrid Av. Complutense s/n Ciudad Univesitaria 28040 – Madrid</p> <p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Diputación Provincial de Pontevedra Estación Fitopatológica "do Areeiro" Subida a la Robleda, s/n. 36153 LOURIZAN (PONTEVEDRA)</p>
<p><b>MURCIA</b> Consejería de Agricultura y Agua Dirección General de Modernización de Explotaciones y Capacitación Agraria Servicio de Sanidad Vegetal c/ Mayor, s/n. 30150-LA ALBERCA (MURCIA) Información sobre Sanidad Vegetal: <a href="http://www.carm.es">www.carm.es</a></p>	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Estación Sericícola. C/ Mayor s/n 30150 LA ALBERCA (MURCIA) Tlfno.- 968 36 67 86 (Centralita.- 968 84 57 11) Fax.- 968 84 00 49 e_mail: Carmen.Beltran@carm.es</p>
<p><b>NAVARRA</b> Departamento de Agricultura, Ganadería y Alimentación Dirección General de Agricultura y Ganadería Sección de Sanidad y Producción Vegetal c/ Tudela, 20 31003-PAMPLONA</p>	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Laboratorio de Biología Vegetal Avda. Serapio Huici, s/n. 31610- VILLAVA (NAVARRA) Tlfno.- 848 42 79 88 / 42 13 66 Fax.- 848 42 13 69 e_mail: mborrueo@cfnavarra.es</p>
<p><b>PAÍS VASCO</b> Departamento de Agricultura y Pesca Dirección de Agricultura y Ganadería Servicio de Semillas y Plantas de Vivero CENTRO DE ARKAUTE Apto. 46 01080-VITORIA-GASTEIZ (ÁLAVA)</p>	<p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Sección de Hortofruticultura Centro de Protección Vegetal Granja de la Diputación Foral de Bizkaia -Derio- Ibaizabal Parque Tecnológico de Zamudio Edificio 600 48160- DERIO (BIZKAIA) Tlfno.- 944 54 10 09 Fax.- 944 54 10 09 e_mail: juan.ramonmuguruza@bizkaia.net</p> <p>Laboratorio de Sanidad Vegetal Departamento de Producción y Protección Vegetal (NEIKER) Centro de Arkaute Apto. de Correos 46 01080- VITORIA-GASTEIZ (ÁLAVA) Tlfno.- 945 12 13 64/65 Fax.- 945 28 14 22 e_mail: rmarquinez@neiker.net</p> <p>Laboratorio Agrario de Fraisoro Apto. 240 20159-ZIZURKIL (GUIPÚZCOA) Tlfno.- 943 69 40 89 Fax.- 943 69 33 04 e_mail: dberra@gipuzkoa.net</p>

<b>COMUNIDAD VALENCIANA</b> Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación Dirección General de Investigación e Innovación Agraria y Ganadería Área de Innovación Agraria C/ Amadeo de Saboya, 2 46010- VALENCIA Información sobre Sanidad Vegetal: <a href="http://www.gva.es/servicios">www.gva.es/servicios</a>	Laboratorio de Sanidad Vegetal Laboratorio de Diagnóstico del Área de Protección de los Cultivos Ctra. de Alicante-Valencia, Km. 276,5 Apto. de Correos 125 46460 SILLA (VALENCIA) Tlfno.- 96 387 47 00 Fax.- 96 121 05 38 e_mail: <a href="mailto:petit_vic@gva.es">petit_vic@gva.es</a>
---	--

## Anexo nº 3a: Envío de muestras al Laboratorio de referencia (artrópodos)

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID	
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos Unidad de Protección de Cultivos Ciudad Universitaria, s/n 28040-MADRID Tfno.-91/336 57 76 (Pedro del Estal)- FAX.- 91/336 58 66 E-MAIL: pdelsestal@pvb.etsia.upm.es	
<b>Procedencia:</b> Nacional <input type="radio"/> Importación <input type="radio"/>	
* Nº Registro .....	Fecha de toma de muestras .....
* Fecha entrada .....	* Fecha resultados .....
<b>RAZÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN</b> (marcar en el círculo lo que corresponda) <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Estudios sobre el control biológico,</li> <li><input type="radio"/> Daños a cultivos o forestales (especificar la planta):</li> <li><input type="radio"/> Plaga de productos almacenados,</li> <li><input type="radio"/> Cuarentena o inspección fitopatológica</li> <li><input type="radio"/> Sospecha de nueva plaga introducida en España o en la zona</li> <li><input type="radio"/> Relación de censo de artrópodos.</li> </ul> DATOS APORTADOS (identificación probable, cultivo o planta huésped, síntomas observados, posibles presas o huéspedes, importancia agrícola o forestal, etc.).	
<b>DATOS SOLICITADOS</b> ¿Desea conocer datos sobre el artrópodo identificado? En caso afirmativo: <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Daños y peligro potencial para alguna planta o cultivo,</li> <li><input type="radio"/> Posible importancia como parásito o depredador beneficioso,</li> <li><input type="radio"/> Importancia y originalidad de la identificación,</li> <li><input type="radio"/> Referencias bibliográficas sobre el artrópodo,</li> <li><input type="radio"/> Otros:</li> </ul>	
<b>DATOS SOLICITADOS</b> ¿Desea conocer datos sobre el artrópodo identificado? En caso afirmativo: <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Daños y peligro potencial para alguna planta o cultivo,</li> <li><input type="radio"/> Posible importancia como parásito o depredador beneficioso,</li> <li><input type="radio"/> Importancia y originalidad de la identificación,</li> <li><input type="radio"/> Referencias bibliográficas sobre el artrópodo,</li> <li><input type="radio"/> Otros:</li> </ul>	
<b>DATOS DEL REMITENTE</b> D. .... Tfno: ..... Domicilio: ..... Población: ..... Distrito Postal: ..... <div style="text-align: right;">Fecha: .....</div> <div style="text-align: right;">Fdo.: .....</div>	

\* A rellenar por la Universidad Politécnica de Madrid.

**NOTA:** Por favor, envíe siempre una fotocopia de esta hoja, con los datos solicitados, cada vez que haga un envío. Puede añadir información sobre cada muestra en la parte posterior, o en hojas suplementarias.

(Normas al dorso)

## ENVÍO DE MUESTRAS

Siempre que sea posible, las muestras se enviarán en fresco, envueltas en papel de filtro y en una bolsa de plástico. Para evitar que se estropeen, el envío se deberá realizar rápidamente desde la toma de la muestra. Si no, utilizar alcohol del 70 %.

## Anexo nº 3.b: Envío de muestras al Laboratorio de referencia (bacterias)

INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS (IVIA)	
Carretera de Moncada-Náquera, km. 4,5 46113-MONCADA (Valencia) Tfno.: 96/3424000 Fax 96/3424001 (Milagros López) E-MAIL: mlopez@ivia.es	
<b>Procedencia: Nacional ( ) Importación ( )</b>	
* Nº Registro .....	Fecha de toma de muestras .....
* Fecha llegada al laboratorio .....	* Fecha informe resultados .....
<b>SITUACIÓN DE LA FINCA</b>	
Nombre de la finca: .....	Paraje: .....
Termino municipal: .....	Provincia: .....
<b>DATOS DEL CULTIVO</b>	
Cultivo: .....	Variedad: .....
Superficie afectada: .....	
Fecha de siembra: .....	
Tipo de riego: .....	
Tratamientos fitosanitarios realizados antes (desinfecciones) o durante el cultivo. (Especificar productos, dosis y fechas). ..... .....	
Fenómenos meteorológicos a destacar ..... .....	
<b>LOCALIZACIÓN, DESCRIPCIÓN E IMPORTANCIA DE LOS SÍNTOMAS</b>	
. Fecha de aparición de los primeros síntomas: .....	
. Evaluación aproximada de los daños:	
% de plantas afectadas .....	% Pérdida de cosecha en las plantas afectadas .....
Forma de aparición de la enfermedad:	
Plantas aisladas .....	Formando corros .....
Generalizado.....	
Otros (especificar)..... .....	
Describir los síntomas observados: ..... ..... .....	
Observaciones complementarias: ..... .....	
<b>DATOS DEL REMITENTE</b>	
D. ....	Tfno: .....
Domicilio: .....	
Población: ..... D. P: .....	

\* A rellenar por el Laboratorio

**NOTA:** Se rellenarán tantas hojas protocolarias como muestras enviadas.

(Normas al dorso)

## NORMAS PARA LA RECOLECCIÓN DE PLANTAS ENFERMAS Y SU ENVÍO AL LABORATORIO

1. Se elegirán plantas cuyos síntomas sean representativos de la evolución de la enfermedad, haciendo especial hincapié en las que empiezan a mostrar dichos síntomas.
2. No enviar plantas con excesiva humedad o rocío sobre las hojas.
3. Junto a las plantas se enviará algo de tierra de la zona de raíces dentro de una bolsa de plástico cerrada.
4. Cada planta irá empaquetada por separado y envuelta en papel de periódico.
5. Se rellenarán tantas hojas protocolarias como muestras vegetales distintas se vayan a enviar.
6. Las muestras se enviarán al Laboratorio dentro de una caja de cartón por mensajería urgente, procurando no coincidir con el fin de semana.

## Anexo nº 3.c: Envío de muestras al Laboratorio de referencia (hongos)

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA	
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos Departamento de Ecosistemas Agroforestales-Patología vegetal Camino de Vera, s/n – 46022 VALENCIA Tfno.-96/3879254 (José García Jiménez)- FAX.- 96/3879269 E_MAIL: jgarciaj@upv.es	
<b>Procedencia: Nacional ( ) Importación ( )</b> * Nº Registro ..... <b>Fecha de toma de muestras</b> ..... * Fecha llegada al laboratorio ..... * Fecha informe resultados .....	
<b>SITUACIÓN DE LA FINCA</b> Nombre de la finca: ..... Paraje: ..... Termino municipal: ..... Provincia: .....	
<b>DATOS DEL CULTIVO</b> Cultivo: ..... Variedad: ..... Superficie afectada: ..... Fecha de siembra: ..... Tipo de riego: ..... Tratamientos fitosanitarios realizados antes (desinfecciones) o durante el cultivo. (Especificar productos, dosis y fechas).  Fenómenos meteorológicos a destacar  <b>LOCALIZACIÓN, DESCRIPCIÓN E IMPORTANCIA DE LOS SÍNTOMAS</b> . Fecha de aparición de los primeros síntomas: ..... . Evaluación aproximada de los daños: % de plantas afectadas ..... % Pérdida de cosecha en las plantas afectadas .....  Forma de aparición de la enfermedad: Plantas aisladas ..... Formando corros ..... Generalizado.....  Otros (especificar)  Describir los síntomas observados:  Observaciones complementarias:	
<b>DATOS DEL REMITENTE</b> D. .... Tfno: ..... Domicilio: ..... Población: ..... D. P: .....	

\* A rellenar por el Laboratorio

**NOTA:** Se rellenarán tantas hojas protocolarias como muestras enviadas.

(Normas al dorso)

## NORMAS PARA LA RECOLECCIÓN DE PLANTAS ENFERMAS Y SU ENVÍO AL LABORATORIO

1. Se elegirán plantas cuyos síntomas sean representativos de la evolución de la enfermedad, haciendo especial hincapié en las que empiezan a mostrar dichos síntomas.
2. No enviar plantas con excesiva humedad o rocío sobre las hojas
3. Junto a las plantas se enviará algo de tierra de la zona de las raíces dentro de una bolsa de plástico cerrada.
4. Cada planta irá empaquetada por separado y envuelta en papel de periódico.
5. Se rellenarán tantas hojas protocolarias como muestras vegetales distintas se vayan a enviar.
6. Las muestras se enviarán al Laboratorio dentro de una caja de cartón por mensajería urgente, procurando no coincidir con el fin de semana.

## Anexo nº 3d: Envío de muestras al Laboratorio de referencia (nematodos)

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS	
MUSEO NACIONAL DE CIENCIAS NATURALES Calle José Gutierrez Abascal 2 – 28006, MADRID Tfno 91/411 13 28 ext. 1250 (Alfonso Navas)- FAX.- 91/5645078	
<b>Procedencia: Nacional ( ) Importación ( )</b>	
* Nº Registro .....	Fecha de toma de muestras .....
* Fecha entrada .....	* Fecha resultados.....
Nombre y situación de la finca: Término Municipal: ..... Provincia: ..... Superficie: Otros datos de localización:	
<b><u>DATOS DEL CULTIVO</u></b>	
Cultivo: Fecha de siembra: ..... Variedad: .....	
- Riegos: Pie ..... Aspersión ..... Goteo .....	
- Tratamientos fitosanitarios realizados:	
Nematicidas: ..... Insecticidas..... Herbicidas ..... Otros .....	
- Presencia de malas hierbas en parcelas .....	
- Descripción de síntomas (desarrollo anormal, amarilleamiento, necrosis y nódulos en raíz, etc.)	
- Fecha de aparición de síntomas:	
- Evaluar la importancia de daños en porcentaje:	
- Tipo de repercusión en la parcela: Foco..... Corros ..... Plantas aisladas .....	
Generalizado ..... Raíz.....	
Otros datos de interés:	
<b>DATOS DEL REMITENTE</b>	
D. .... Tfno: .....	
Domicilio: .....	
Población: ..... Distrito Postal: .....	
Fecha: .....	
Fdo: .....	

\* A rellenar por el CSIC.

**NOTA:** Se rellenarán tantas hojas protocolarias como muestras enviadas.

(Normas al dorso)

## NORMAS PARA LA RECOLECCIÓN DE PLANTAS ENFERMAS Y SU ENVÍO AL LABORATORIO

1. Se elegirán plantas cuyos síntomas sean representativos de la evolución del nematodo, haciendo especial hincapié en las que empiezan a mostrar dichos síntomas.
2. No enviar plantas con excesiva humedad o rocío sobre las hojas
3. Junto a las plantas se enviará algo de tierra de la zona de las raíces secundarias (100 gramos) dentro de una bolsa de plástico cerrada.
4. Cada planta irá empaquetada por separado y envuelta en papel de periódico.
5. Se rellenarán tantas hojas protocolarias como muestras vegetales distintas se vayan a enviar.
6. Las muestras se enviarán al Laboratorio dentro de una caja de cartón por mensajería urgente, procurando no coincidir con el fin de semana.

## Anexo nº 29.e: Envío de muestras al Laboratorio de referencia (virus, viroides y fitoplasmas de especies no leñosas)

<b>UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA</b>												
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos Departamento de Ecosistemas Agroforestales- Patología vegetal Camino de Vera, 14 46020-VALENCIA Teléfono.- 96/387 92 55 (Concepción Jordá) Fax.- 96/387 92 69 E-MAIL: mjordag@eaf.upv.es												
* Nº de Registro:	* Fecha de toma de muestra  * Fecha de entrada:  * Fecha informe:	* Procedencia Nacional <input type="checkbox"/> Importación <input type="checkbox"/>										
Situación de la finca:  Nombre ..... Término Municipal .....Provincia ..... Otros datos de localización ..... Superficie.....Superficie afectada .....												
<b>DATOS DEL CULTIVO</b> Cultivo .....  Variedad.....												
Fecha de Siembra	<table border="1" style="width: 100%; height: 20px; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 12.5%;"></td> </tr> </table>											
Riegos: Pie <input type="checkbox"/> Aspersión <input type="checkbox"/> Goteo <input type="checkbox"/>												
- Tratamientos fitosanitarios realizados antes de aparición de síntomas: Insecticidas <input type="checkbox"/> Acaricidas <input type="checkbox"/> Herbicidas <input type="checkbox"/> Otros <input type="checkbox"/>												
Productos ..... ..... .....												
Fecha de Aplicación: .....												
- Presencia malas hierbas en parcelas <input type="checkbox"/> en lindes <input type="checkbox"/>												
- Ataques de insectos <input type="checkbox"/> (En caso afirmativo señalar los observados)												
- Fenómenos meteorológicos a destacar ..... ..... .....												
- Otros datos de interés ..... ..... .....												

\* A rellenar por el Laboratorio de la Universidad.

**VIRUS**

**LOCALIZACIÓN, DESCRIPCIÓN E IMPORTANCIA DE LOS SÍNTOMAS:**

- Situar la aparición de síntomas:

- Planta entera       Tallo       Brotes   
 Hojas       Flores       Frutos

- Fecha de aparición de síntomas 

--	--	--	--	--	--	--	--

- Estado Fenológico .....  
 .....  
 .....

- Evaluar la importancia de daños en porcentaje: .....

- Tipo de repartición en la parcela: Foco     corros

- Bordes hacia fuera       Bordes hacia dentro   
 Por filas   
 Plantas aisladas       generalizado

- Descripción de síntomas observados (abigarramiento, mosaico, filodia, amarillamiento, variegación, virescencia, desarrollo anormal de las yemas, etc.) .....  
 .....  
 .....  
 .....

- Observaciones complementarias: .....  
 .....  
 .....  
 .....

**DATOS DEL REMITENTE:**

D./D<sup>a</sup> ..... Tlfno.- .....  
 Domicilio .....  
 Población ..... Distrito Postal .....

de                      de 200

Fdo.-

**NOTA:** Se rellenarán tantas hojas protocolarias como muestras enviadas.

## Anexo 4: Requisitos especiales recogidos en la legislación de los organismos de cuarentena asociados a la patata

TUBÉRCULOS DE PATATA DESTINADOS A PLANTACIÓN					
Anexo IV	Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos de cuya presencia existe constancia en la UE según el Real Decreto 58/2005	Situación en España. Legislación y modific.	Zonas protegidas	Requisitos especiales
18.1-AII	Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L. destinados a plantación (patata de siembra)	<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	<i>Presente en España</i> RD 58/2005 I-A-II-b.1	-----	Declaración oficial de que: a) los tubérculos se ajustan a las disposiciones comunitarias de lucha contra el <i>Synchytrium endobioticum</i> (Directiva 69/464/CEE) y <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> (Directiva 2006/56/CE y APA/718/2007). b) los tubérculos son originarios de zonas de las que se sabe exentas de <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> (Directiva 2006/56/CE y APA/718/2007), <i>Globodera pallida</i> y <i>Globodera rostochiensis</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> (Directiva 2006/63/CE y APA/719/2007), <i>Meloidogyne chitwoodi</i> y <i>Meloidogyne fallax</i> , c) O en zonas de las que se tiene constancia de la existencia: - De <i>Ralstonia solanacearum</i> , los tubérculos son originarios de una parcela que se ha comprobado exenta o se considera exenta a raíz de un procedimiento adecuado para erradicar el mismo. - De <i>Meloidogyne chitwoodi</i> y <i>Meloidogyne fallax</i> , los tubérculos son originarios de una parcela que se ha comprobado exenta de los mismos por una inspección visual anual tanto externa como cortando los tubérculos, en momentos adecuados, tras la recolección. O los tubérculos han sido sometidos a un muestreo aleatorio tras la recolección y una inspección para detectar la presencia de síntomas tras un método adecuado para introducirlos a pruebas de laboratorios, así como a una inspección visual tanto externa como cortando los tubérculos, en momentos adecuados y, en todos los casos, en el momento de cerrar los embalajes o contenedores antes de la comercialización con arreglo a las disposiciones sobre cerrado de la Directiva 66/403/CEE, no habiéndose detectado síntomas de los organismos. (R.D. 58/2005 IV- A- II- 18.1)
18.2-AII	Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L., destinados a la plantación, excepto los tubérculos de las variedades oficialmente aceptadas en uno o más Estados Miembros con arreglo a la Directiva 70/457/CEE del consejo, referente al catálogo común de las variedades de las especies de plantas agrícolas				
20.1-B	Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L. destinados a plantación (patata de siembra)	<i>Ralstonia (=Pseudomonas) solanacearum</i>	<i>Presente en España</i> RD 58/2005 I-A-II-b.2	-----	
20.3-B	Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Synchytrium endobioticum</i>	<i>No presente en España</i> RD 58/2005 I-A-II-c.2	-----	
		<i>Globodera pallida</i>	<i>Presente en España</i> RD 58/2005 I-A-II-a.1.R.D 58/2005-I-B-a.2	FIN, LV, SI, SK	
		<i>Globodera rostochiensis</i>	<i>Presente en España</i> RD 58/2005 I-A-II-a.1	-----	

TUBÉRCULOS DE PATATA DESTINADOS A PLANTACIÓN					
Anexo IV	Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos de cuya presencia existe constancia en la UE según el Real Decreto 58/2005	Situación en España. Legislación y modific.	Zonas protegidas	Requisitos especiales
		<i>Meloidogyne chitwoodi</i>	No presente en España RD 58/2005 I-A-II-a.6.1	-----	<p>Además, para tubérculos de <i>S. tuberosum</i> destinados a la plantación, excepto los de las variedades oficialmente aceptadas en uno o más Estados miembros con arreglo a la Directiva 70/457/CEE, deben tener una declaración oficial de que:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- pertenecen a altas selecciones, lo cual debe indicarse del modo adecuado en los documentos adjuntos a los tubérculos correspondientes.</li> <li>- Han sido producidos en la Comunidad, y</li> <li>- proceden en línea directa de material mantenido en buenas condiciones y sometido a pruebas de cuarentena oficiales con los métodos adecuados, resultando estar exentos de organismos nocivos.</li> </ul> <p>(R.D. 58/2005 IV- A- II- 18.2)</p> <p><b>Zonas ZP</b>, declaración oficial de que los tubérculos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) se han cultivado en una zona de la que se sabe está exenta de Beet Necrotic Bellow Vein virus (BNYVV).</li> <li>b) O se han cultivado en terrenos o medios de cultivo con tierra de las que se sabe exenta o han sido analizados con métodos adecuados comprobándose exentos del citado organismo.</li> <li>c) Han sido lavados para quitarles la tierra.</li> </ul> <p>(R.D. 58/2005 IV- B- 20.1)</p> <p>Respecto a <i>Globodera spp.</i>, las patatas deberán llevar una declaración oficial de que se han cumplido con las disposiciones conformes a las establecidas en la Directiva 2007/33/CE del Consejo, relativa a la lucha contra el nematodo dorado.</p> <p>(R.D. 58/2005 IV- B- 20.3)</p>
		<i>Meloidogyne fallax</i>	No presente en España RD 58/2005 I-A-II-a.6.2	-----	
		Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)	Presente en España RD 58/2005 I-B-b.1	FR (Bretaña), FIN, IE, P (Azores), UK (Irl.Norte)	
Anexo II	Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos de cuya presencia existe constancia en la UE según el Real Decreto 58/2005	Situación en España. Legislación y modific.	Zonas protegidas	Requisitos especiales
II-A-II-a.3	Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L. destinados a plantación	<i>Ditylenchus destructor</i>	No presente en España RD 58/2005 II-A-II-a.3	-----	-----

TUBERCULOS DE PATATA NO DESTINADOS A PLANTACIÓN					
Anexo IV	Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos de cuya presencia existe constancia en la UE según el Real Decreto 58/2005	Situación en España. Legislación y modific.	Zonas protegidas	Requisitos especiales
18.5-AII	Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L., no recogidos en los puntos 18.1, 18.2, 18.3 o 18.4 de la sección II de la parte A del anexo IV	<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	Presente en España RD 58/2005 I-A-II-b.1	-----	En el embalaje se estampará un número de registro que indique que las patatas provienen de productor, almacén o envío colectivo registrado y que están exentas de <i>Ralstonia</i> (= <i>Pseudomonas</i> ) <i>solanacearum</i> (Directiva 2006/63/CE y APA/719/2007) y además se ajustan a las disposiciones comunitarias en materia de lucha contra <i>Synchytrium endobioticum</i> , y en su caso, contra <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> (Directiva 2006/56/CE y APA/718/2007). (R.D. 58/2005 IV- A- II- 18.5)
		<i>Ralstonia</i> (= <i>Pseudomonas</i> ) <i>solanacearum</i>	Presente en España RD 58/2005 I-A-II-b.2	-----	
20.2-B	Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L., excepto los mencionados en el punto 20.1 de la parte B del anexo IV	<i>Synchytrium endobioticum</i>	No presente en España RD 58/2005 I-A-II-c.2	-----	
		<i>Globodera pallida</i>	Presente en España RD 58/2005 I-A-II-a.1.R.D 58/2005-I-B-a.2	FIN, LV, SI, SK	
20.3 -B	Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Globodera rostochiensis</i>	Presente en España RD 58/2005 I-A-II-a.1	-----	
		Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)	Presente en España RD 58/2005 I-B-b.1	FR (Bretaña), FIN, IE, P (Azores), UK (Irl.Norte)	

**Zonas ZP.** Los requisitos implican que:  
a) el envío o lote de vegetales no contendrá más de un 1 % en peso de tierra  
b) o los vegetales se destinan a su transformación en locales con instalaciones de eliminación de residuos oficialmente autorizadas que garanticen la ausencia de todo riesgo de propagación del virus causante de la rizomanía de la remolacha (BNYVV).  
(R.D. 58/2005 IV- B- 20.2)

Respecto a *Globodera* spp., las patatas deberán llevar una declaración oficial de que se han cumplido con las disposiciones conformes a las establecidas en la Directiva 2007/33/CE, relativa a la lucha contra el nematodo dorado.  
(R.D. 58/2005 IV- B- 20.3)

VEGETALES DE PATATA DESTINADOS A PLANTACIÓN					
Anexo IV	Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos de cuya presencia existe constancia en la UE según el Real Decreto 58/2005	Situación en España. Legislación y modific.	Zonas protegidas	Requisitos especiales
18.3-AII	Vegetales que forman estolones o tubérculos de especies de <i>Solanum</i> L. o sus híbridos, destinados a la plantación, distintos de los tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L. que se especifican en los puntos 18.1 o 18.2 de la sección II de la parte A del anexo IV y del material de mantenimiento de cultivos almacenado en bancos genéticos o colecciones Genéticas	<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	Presente en España RD 58/2005 I-A-II-b.1	-----	a) Los vegetales deben mantenerse en condiciones de cuarentena y resultar exentos de cualquier organismo nocivo en las pruebas de cuarentena. b) las pruebas de cuarentena mencionadas en la letra a) deben ser: ba) supervisadas por la organización oficial de protección de vegetales y realizadas por personal científicamente formado por esa organización o de cualquier corporación oficialmente autorizada. bb) realizadas en un lugar que disponga de instalaciones adecuadas en número suficiente para contener los organismos nocivos y mantener el material, incluidos los indicadores, de modo que se elimine cualquier riesgo de propagación de organismos nocivos. bc) realizadas en cada unidad de material. - mediante examen visual a intervalos regulares durante todo un ciclo vegetativo, como mínimo teniendo en cuenta el tipo de material y su fase de desarrollo durante el programa de pruebas, para detectar los síntomas causados por cualquier organismo nocivo. - mediante pruebas, con los métodos adecuados, aprobados por procedimientos comunitarios. - para todo el material de patata, detección como mínimo de: + Andean potato latent virus (APLV). + Arracacha virus B, oca strain (AVB-O). + Potato black ringspot virus (PBRSV). + Potato spindle tuber viroid (PSTVd). + Potato virus T (PVT). + Andean potato mottle virus (APMoV). + Virus de la patata A, M, S, V, X e Y (incluidas Y <sup>a</sup> , Y <sub>n</sub> , Y <sub>c</sub> ) y Potato leaf roll virus. + <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. (Directiva 2006/56/CE y APA/718/2007) + <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al. (Directiva 2006/63/CE y APA/719/2007) bd) mediante las pruebas adecuadas de cualquier otro síntoma observado en el examen visual, con objeto de identificar los organismos nocivos causantes de tales síntomas. c) Todo material que no haya resultado exento de los organismos nocivos que se especifican en la letra b), según las pruebas mencionadas en dicha letra, debe ser de
		<i>Ralstonia (=Pseudomonas) solanacearum</i>	Presente en España RD 58/2005 I-A-II-b.2	-----	
		Andean potato latent virus Andean potato mottle virus Arracacha virus B Potato black ringspot virus Potato leaf roll virus Potato spindle tuber viroid Potato virus T Variedades A, M, S, V, X e Y	No presente en España No presente en UE RD 58/2005 IV-A-II-18.3	-----	

VEGETALES DE PATATA DESTINADOS A PLANTACIÓN					
Anexo IV	Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos de cuya presencia existe constancia en la UE según el Real Decreto 58/2005	Situación en España. Legislación y modifíc.	Zonas protegidas	Requisitos especiales
					inmediato destruido o sometido a procedimientos que eliminen dichos organismos. d) Cada organización o centro de investigación que posea dicho material debe informar al servicio oficial de protección vegetal del Estado miembro sobre el material del que disponga. (R.D. 58/2005 IV-parte A- II- 18.3)
18.6-AII	Vegetales de las especies de Solanaceae, destinados a la plantación, excepto las semillas y demás vegetales mencionados en los puntos 18.4 o 18.5 de la sección II de la parte A del anexo IV	Potato stolbur phytoplasma	Presente en España RD 58/2005 II-A-II-d.8	-----	Respecto a Potato stolbur phytoplasma, declaración oficial de que: a) los vegetales son originarios de zonas exentas de dichos organismos b) o no se han observado síntomas de dichos organismos en los vegetales de la parcela de producción desde el principio del último ciclo completo de vegetación. (R.D. 58/2005 IV- A- II-18.6)
Anexo II	Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos de cuya presencia existe constancia	Situación en España. Legislación y modifíc.	Zonas protegidas	Requisitos especiales
II-A-II-d.15	Vegetales de <i>Solanum tuberosum</i> L. destinados a plantación	<i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i> ( <i>Frankliniella occidentalis</i> es el insecto vector no legislado)	Presente en España RD 58/2005 II-A-II-d.15	SE, FI	-----
Anexo I	Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos de cuya presencia existe constancia	Situación en España. Legislación y modifíc.	Zonas protegidas	Requisitos especiales
I-A-II-a.6.2	Todos los vegetales	<i>Helicoverpa (=Heliothis) armigera</i>	Presente en España RD 58/2005 I-A-II-a.6.2	-----	-----
I-B-a.3	Todos los vegetales	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Presente en España RD 58/2005 I-B-a.3	IE, ES (Ibiza y Menorca), CY, MT, PT(Azores y Madeira), FI (distritos de Åland, Håme, Kymi, Pirkanmaa, Satakunta, Turku, Uusimaa), SE (condados de Blekinge, Gotland,), UK	-----



## Anexo 5: Método de muestreo de los organismos de cuarentena asociados a la patata

TUBÉRCULOS DE PATATA DESTINADOS A PLANTACIÓN						
Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos objeto de muestreo	Presente en España	Tipo de muestra	Lugar a observar en la planta o material vegetal requerido para la muestra	Dimensiones y forma de las muestras a recoger	Condiciones de conservación y transporte de la muestra
-Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L. destinados a plantación (patata de siembra)	<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	X <sup>(1)</sup>	Sintomática	Síntomas en hojas, tallos y tubérculos	Tomar muestras de planta entera y de 200 tubérculos	La muestra se mantiene refrigerada en nevera
	<i>Ralstonia (=Pseudomonas) solanacearum</i>	X <sup>(2)</sup>	Sintomática	Síntomas en tubérculos y plantas enteras	Tomar muestras de planta entera y de 200 tubérculos	
-Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L., destinados a la plantación, excepto los tubérculos de las variedades oficialmente aceptadas en uno o más Estados Miembros con arreglo a la Directiva 70/457/CEE del consejo, referente al catálogo común de las variedades de las especies de plantas agrícolas	<i>Synchytrium endobioticum</i>		Sintomática	Ataques en tallos, estolones y tubérculos	50kg de patatas (1saco) por tonelada	
	<i>Globodera pallida</i>	X	Sintomática	Síntomas en raíces (quistes), principalmente	Tomar 500 g de tierra y muestras de planta entera	
	<i>Globodera rostochiensis</i>	X	Sintomática			
	<i>Meloidogyne chitwoodi</i>		Sintomática	Síntomas en tubérculos (agallas) principalmente	Tomar muestras de planta entera y tierra que rodea	
-Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Meloidogyne fallax</i>		Sintomática			
	Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)	X	Asintomática	Daños en hojas (color pálido) y en raíces (raicillas)	Tomar 1 planta por cada 1000 al azar	
	<i>Ditylenchus destructor</i>		Sintomática	Síntomas en bulbos y planta entera	Tomar 500 g de tierra y muestras de planta entera	

(1) Focos en patata y tomate erradicados o en proceso de erradicación

(2) Focos en patata y tomate erradicados o en proceso de erradicación. Aislado en algunos ríos

TUBÉRCULOS DE PATATA NO DESTINADOS A PLANTACIÓN						
Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos objeto de muestreo	Presente en España	Tipo de muestra	Lugar a observar en la planta o material vegetal requerido para la muestra	Dimensiones y forma de las muestras a recoger	Condiciones de conservación y transporte de la muestra
-Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L., no recogidos en los puntos 18.1, 18.2, 18.3 o 18.4 de la sección II de la parte A del anexo IV	<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	X <sup>(1)</sup>	Sintomática	Síntomas en hojas, tallos y tubérculos	Tomar muestras de planta entera y de 200 tubérculos	La muestra se mantiene refrigerada en nevera
-Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L., excepto los mencionados en el punto 20.1 de la parte B del anexo IV	<i>Ralstonia (=Pseudomonas) solanacearum</i>	X <sup>(2)</sup>	Sintomática	Síntomas en tubérculos y plantas enteras	Tomar muestras de planta entera y de 200 tubérculos	
	<i>Synchytrium endobioticum</i>		Sintomática	Ataques en tallos, estolones y tubérculos	50kg de patatas (1saco) por tonelada	
-Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Globodera pallida</i>	X	Sintomática	Síntomas en raíces (quistes), principalmente	Tomar 500 g de tierra y muestras de planta entera	
	<i>Globodera rostochiensis</i>	X	Sintomática			
	Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)	X	Asintomática	Daños en hojas (color pálido) y en raíces (raicillas)	Tomar 1 planta por cada 1000 al azar	

(1) Focos en patata y tomate erradicados o en proceso de erradicación

(2) Focos en patata y tomate erradicados o en proceso de erradicación. Aislado en algunos ríos

VEGETALES DE PATATA DESTINADOS A PLANTACIÓN						
Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos objeto de muestreo	Presente en España	Tipo de muestra	Lugar a observar en la planta o material vegetal requerido para la muestra	Dimensiones y forma de las muestras a recoger	Condiciones de conservación y transporte de la muestra
-Vegetales que forman estolones o tubérculos de especies de <i>Solanum</i> L. o sus híbridos, destinados a la plantación, distintos de los tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L. que se especifican en los puntos 18.1 o 18.2 de la sección II de la parte A del anexo IV y del material de mantenimiento de cultivos almacenado en bancos genéticos o colecciones Genéticas	<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	X <sup>(1)</sup>	Sintomática	Síntomas en hojas, tallos y tubérculos	Tomar muestras de planta entera y de 200 tubérculos	La muestra se mantiene refrigerada en nevera
	<i>Ralstonia</i> (= <i>Pseudomonas</i> ) <i>solanacearum</i>	X <sup>(2)</sup>	Sintomática	Síntomas en tubérculos y plantas enteras	Tomar muestras de planta entera y de 200 tubérculos	
	Andean potato latent virus Andean potato mottle virus Arracacha virus B Potato black ringspot virus Potato leaf roll virus Potato spindle tuber viroid Potato virus T Variedades A, M, S, V, X e Y		Asintomática	Diferentes daños en hojas y brotes principalmente	Muestra asintomática de planta entera	
-Vegetales de las especies de Solanaceae, destinados a la plantación, excepto las semillas y demás vegetales mencionados en los puntos 18.4 o 18.5 de la sección II de la parte A del anexo IV	Potato stolbur phytoplasma	X	Asintomática	Daños en hojas (enrollado), y brotes (con cabelleras)	Tomar 1 planta por cada 1000 al azar	
-Vegetales de <i>Solanum tuberosum</i> L. destinados a plantación	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	X	Asintomática	Tallos y brotes con manchas necróticas, hojas deformadas	Tomar 1 planta por cada 1000 al azar	
-Todos los vegetales	<i>Helicoverpa</i> (= <i>Heliothis</i> ) <i>armigera</i>	X	Sintomática	Daños en hojas, capullos, flores y frutos	Observar 1 planta de 100 al azar y recoger organismo	En seco con papel, algodón o corcho y en bolsa de plástico
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	X	Sintomática	Defoliación de hojas	Localizar adultos o larvas	

(1) Focos en patata y tomate erradicados o en proceso de erradicación

(2) Focos en patata y tomate erradicados o en proceso de erradicación. Aislado en algunos ríos



## Anexo 6: Calendario de muestreo de los organismos de cuarentena asociados a la patata

TUBÉRCULOS DE PATATA DESTINADOS A PLANTACIÓN															
Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos objeto de muestreo	Presente en España	Inspecciones al año	Época recomendada para realizar la toma de muestras											
				ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
-Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L. destinados a plantación (patata de siembra)	<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	X <sup>(1)</sup>	1												
-Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L., destinados a la plantación, excepto los tubérculos de las variedades oficialmente aceptadas en uno o más Estados Miembros con arreglo a la Directiva 70/457/CEE del consejo, referente al catálogo común de las variedades de las especies de plantas agrícolas	<i>Ralstonia (=Pseudomonas) solanacearum</i>	X <sup>(2)</sup>	1												
	<i>Synchytrium endobioticum</i>		1												
	<i>Globodera pallida</i>	X	1												
	<i>Globodera rostochiensis</i>	X	1												
	<i>Meloidogyne chitwoodi</i>		1												
	<i>Meloidogyne fallax</i>		1												
-Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L.	Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)	X	1												
	<i>Ditylenchus destructor</i>		1												

(1) Focos en patata y tomate erradicados o en proceso de erradicación

(2) Focos en patata y tomate erradicados o en proceso de erradicación. Aislado en algunos ríos

TUBÉRCULOS DE PATATA NO DESTINADOS A PLANTACIÓN															
Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos objeto de muestreo	Presente en España	Inspecciones al año	Época recomendada para realizar la toma de muestras											
				ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
-Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L., no recogidos en los puntos 18.1, 18.2, 18.3 o 18.4 de la sección II de la parte A del anexo IV	<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	X <sup>(1)</sup>	1												
-Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L., excepto los mencionados en el punto 20.1 de la parte B del anexo IV	<i>Ralstonia (=Pseudomonas) solanacearum</i>	X <sup>(2)</sup>	1												
	<i>Synchytrium endobioticum</i>		1												
-Tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L	<i>Globodera pallida</i>	X	1												
	<i>Globodera rostochiensis</i>	X	1												
	Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)	X	1												

(1) Focos en patata y tomate erradicados o en proceso de erradicación

(2) Focos en patata y tomate erradicados o en proceso de erradicación. Aislado en algunos ríos

VEGETALES DE PATATA DESTINADOS A PLANTACIÓN																
Vegetales, Productos vegetales y otros objetos	Organismos nocivos objeto de muestreo	Presente en España	Inspecciones al año	Época recomendada para realizar la toma de muestras												
				ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	
-Vegetales que forman estolones o tubérculos de especies de <i>Solanum</i> L. o sus híbridos, destinados a la plantación, distintos de los tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L. que se especifican en los puntos 18.1 o 18.2 de la sección II de la parte A del anexo IV y del material de mantenimiento de cultivos almacenado en bancos genéticos o colecciones Genéticas	<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	X <sup>(1)</sup>	1													
	<i>Ralstonia (=Pseudomonas) solanacearum</i>	X <sup>(2)</sup>	1													
	Andean potato latent virus Andean potato mottle virus Arracacha virus B Potato black ringspot virus Potato leaf roll virus Potato spindle tuber viroid Potato virus T Variedades A, M, S, V, X e Y			1												
-Vegetales de las especies de Solanaceae, destinados a la plantación, excepto las semillas y demás vegetales mencionados en los puntos 18.4 o 18.5 de la sección II de la parte A del anexo IV	Potato stolbur phytoplasma	X	1													
-Vegetales de <i>Solanum tuberosum</i> L. destinados a plantación	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	X	1													
-Todos los vegetales	<i>Helicoverpa (=Heliothis) armigera</i>	X	1													
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	X	1													

(1) Focos en patata y tomate erradicados o en proceso de erradicación

(2) Focos en patata y tomate erradicados o en proceso de erradicación. Aislado en algunos ríos



## **II. FICHAS DESCRIPTIVAS DE LOS ORGANISMOS NOCIVOS**

## ÍNDICE

### Artrópodos:

- Helicoverpa armigera*
- Leptinotarsa decemlineata*

### Bacterias:

- Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*
- Ralstonia (=Pseudomonas) solanacearum*

### Nematodos:

- Ditylenchus destructor*
- Globodera pallida y Globodera rostochiensis*
- Meloidogyne chitwoodi y Meloidogyne fallax*

### Hongos:

- Synchytrium endobioticum*

### Virus:

- Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)
- Potato stolbur phytoplasma
- Tomato spotted wilt virus (TSWV)
- Andean potato latent virus, Andean potato mottle virus, Arracacha virus B, Potato spindle tuber viroide, Potato black ringspot virus, Potato leaf roll virus, Potato virus T, Variedades A, M, S, V, X e Y

## *Helicoverpa armigera* Hübner

(Oruga de la mazorca)

Fuente: OEPP/EPPPO 1996



Foto n° 1: Larvas de *Helicoverpa armigera*

Fuente: OEPP/EPPPO 1996



Foto n° 2: Daños provocados por larva de *Helicoverpa armigera* en claveles

Fuente: OEPP/EPPPO 1996



Foto n° 3: Adulto *Helicoverpa armigera*

**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

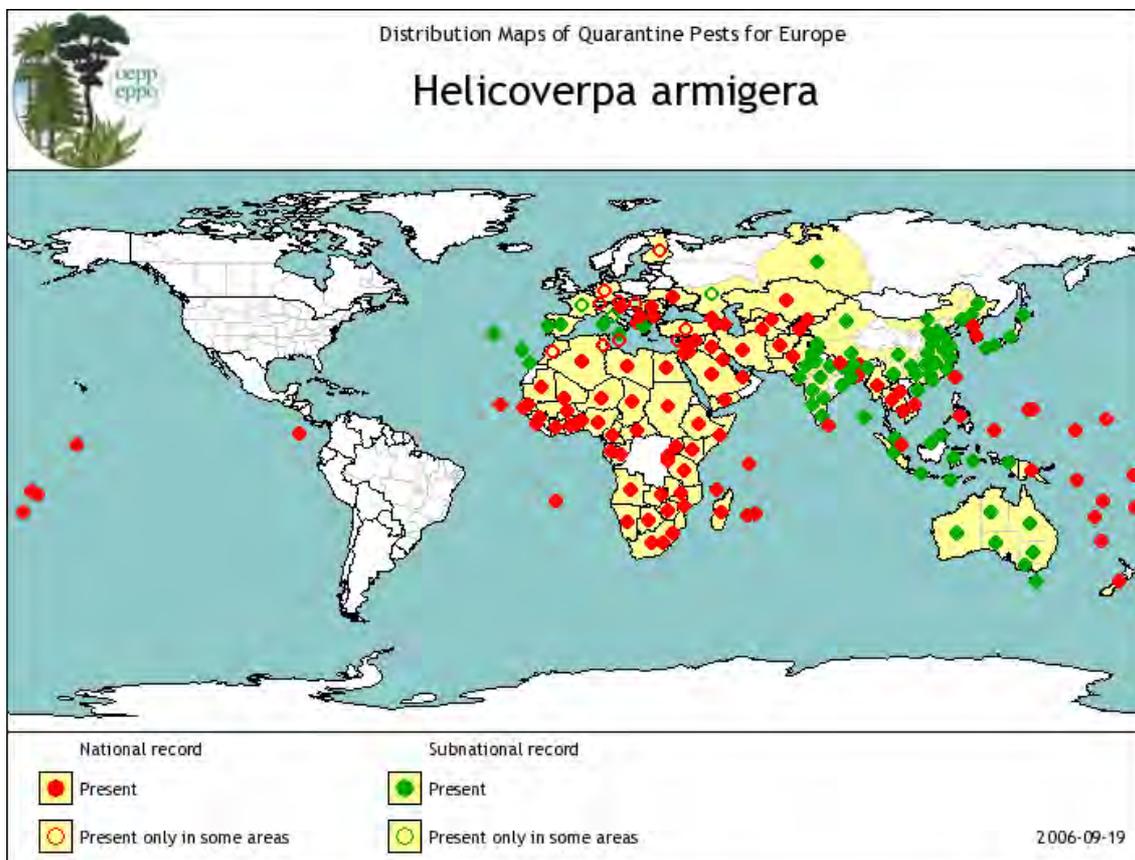
Clase: Insecta  
 Orden: Lepidoptera  
 Familia: Noctuidae

**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:**

Vegetales de *Dendratherisma*, *Dianthus*, *Pelargonium* y de la familia *Solanaceae* destinados a plantación.

**SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

- Mundial (excepto UE): Albania, Armenia, Azerbaijan, Georgia, Macedonia, Rusia, Suiza, Turquía, Ucrania y Yugoslavia; presente en numerosos países de Asia, África y Oceanía.
- Unión Europea: Chipre, Finlandia (alguna cita), Francia, Grecia, Hungría, Italia, Malta, Rumania, Bulgaria, Portugal, Eslovenia y España.
- España: ampliamente distribuido.

**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):**

No existen.

**SÍNTOMAS:**

Los daños son causados por las orugas que son altamente polífagas. Se alimentan de hojas, capullos, flores y frutos, introduciéndose parcialmente en el interior de capullos y frutos si su tamaño se lo permite. Producen gran cantidad de excrementos, los cuales, a diferencia de los de otros noctuidos, son muy húmedos.

**MÉTODO DE MUESTREO:**

- **Lugar a observar en la planta o material vegetal requerido para la muestra:**  
Realizar inspección visual de plantas al azar (1 por 1000) de los 4 puntos de orientación de la parcela de producción (NW, NE, SW, SE), ya sea al aire libre o en invernadero, prestando una atención especial a los puntos críticos (esquinas, ventilación, pasillos, etc). En cada planta se observarán los diferentes niveles buscando orugas o incluso presencia de huevos en hojas, capullos, flores o frutos.
- **Dimensiones y forma de las muestras a recoger:**  
Recogida de adultos y orugas.
- **Condiciones de conservación y transporte de la muestra:**  
Conservar la muestra en seco envolviéndola en papel de filtro, algodón o corcho. Transportar en bolsa de plástico lo más refrigerada posible.

**CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:**

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

**TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:**

Para la identificación de esta especie puede ser interesante realizar una cría de las orugas recogidas (aproximadamente un 20% de las orugas recogidas) hasta obtener adultos, y posteriormente identificarlos mediante análisis de la genitalia.

En cualquier caso, debe ser el Laboratorio de diagnóstico el que determine las técnicas a seguir para la identificación del insecto sospechoso.



## *Leptinotarsa decemlineata* (Say)

(Escarabajo de la patata)

Fuente: <http://www.nuzban.scholaris.pl>



Foto n° 1: Vista dorsal de *Leptinotarsa decemlineata*

Fuente: <http://www.biobio.es/plagas/insectos/>



Foto n° 2: Diferentes estadios de *Leptinotarsa decemlineata*

Fuente: <http://insects.tamu.edu/images/insects/common/images/b-txt/bimg192.html>



Foto n° 3: Daños por larvas de *Leptinotarsa decemlineata*

Fuente: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Leptinotarsa-decemlineata-eggs.jpg>



Foto n° 4: Puesta de huevos en el envés de la hoja

**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

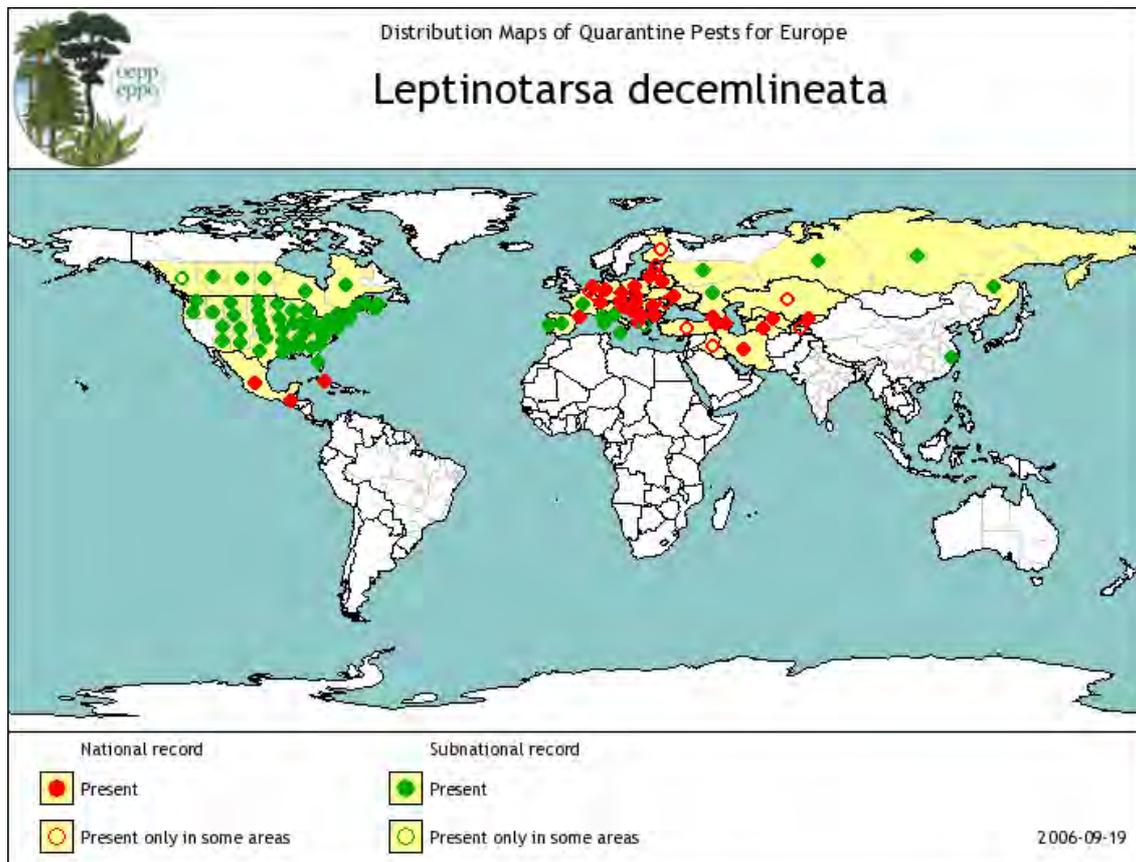
Clase: Insecta  
 Orden: Coleoptera  
 Familia: Chrysomelidae

**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:**

Especies del género *Solanum*, en concreto *Solanum tuberosum*, y del género *Lactuca*.

**SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

- Mundial: presente en numerosos países de Asia, América del Norte, Bielorrusia, Moldavia, Suiza.
- Unión Europea: Austria, Bélgica, Bulgaria, República Checa, Francia, Estonia, Alemania, Portugal, Eslovaquia, Rumanía, Lituania, Luxemburgo, Italia, Holanda, Polonia, Letonia, Grecia.
- España: Ampliamente distribuido.

**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):** (R.D. 58/2005, Anexo IX, apartado a-13, Pág. 2665)

España (Ibiza y Menorca), Irlanda, Chipre, Malta, Portugal (Azores y Madeira), Reino Unido, Suecia  
 Finlandia.

**SÍNTOMAS:**

Los adultos comen y ponen los huevos en el envés de las hojas.

Las larvas al nacer devoran con mucha avidez las hojas. El daño (defoliación) lo hacen tanto larvas como adultos.

**MÉTODO DE MUESTREO:****- Lugar a observar en la planta o material vegetal requerido para la muestra:**

El lugar más adecuado para observar el organismo es en las hojas. Para saber si hay presencia del organismo o no, realizar inspección visual para comprobar si hay defoliación en las hojas de las especies susceptibles de ser enviadas a zonas protegidas (Foto 3).

**- Dimensiones y forma de las muestras a recoger:**

La muestra a enviar será el propio insecto (adultos o larvas).

- **Condiciones de conservación y transporte de la muestra:**

Conservar la muestra en seco envolviéndola en papel de filtro, algodón o corcho. Transportar en bolsa de plástico lo más refrigerada posible.

**CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:**

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

**TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:**

Técnicas según correspondiente Laboratorio de diagnóstico





## SÍNTOMATOLOGÍA

Los síntomas de esta enfermedad no se suelen manifestar en las plantas hasta el final del ciclo de cultivo aunque éstas pueden estar infectadas sin presentar sintomatología alguna. A continuación se describen los síntomas en función de los órganos afectados:

### - HOJAS Y TALLOS:

Los síntomas empiezan con marchitamiento de hojas y tallos. Generalmente son las hojas inferiores las primeras en marchitarse, enrollándose hacia arriba ligeramente en los márgenes y adquiriendo un color verde pálido. Después aparecen una manchas amarillentas en los espacios internervales. A menudo sólo uno o dos tallos de la planta manifiestan los síntomas, continuando el resto con una apariencia normal. Al cortar transversalmente un tallo afectado, se observa que los tejidos de la zona vascular son de color marrón, pudiendo aparecer un exudado blanco lechoso si se comprime.

Esta muerte que se produce al final del ciclo de cultivo, más que a la obstrucción de los vasos, se suele deber al deterioro de las raíces, que no son capaces de alimentar a la planta.

La observación de los síntomas en plantas es difícil, tanto por su variabilidad como por su manifestación tardía, pudiendo quedar enmascarados o ser confundidos con síntomas de pie negro (*Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*), mildiu (*Phytophthora infestans*), verticilosis (*Verticillium albo-atrum*), rizoctonia (*Rhizoctonia solani*) o, incluso, de sequía.



Fuente: OEPP/EPP 1996

Foto nº 1: Planta de patata infectada por *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Estado avanzado de la infección que produce decaimiento, enrollamiento de los márgenes de las hojas, necrosis, etc.

### - TUBÉRCULOS:

La infección de los tubérculos se produce a través de los estolones, comenzando por el ombligo y avanzando por el tejido vascular. De esta forma, la podredumbre afecta en un principio a la zona que está inmediatamente debajo de la piel, dando lugar a lo que se conoce como “podredumbre anular”, y que presenta forma de anillo. Este tejido se puede desmenuzar fácilmente.

En los tubérculos, la enfermedad se manifiesta por una coloración amarillo pálido o vítrea de los tejidos que rodean el anillo vascular (especialmente cerca del ombligo), y un oscurecimiento del propio anillo vascular, lo

que se observa al realizar un corte transversal. También se pueden observar oquedades entre el anillo vascular y los tejidos colindantes. Cuando se comprime el tubérculo afectado abierto por la mitad, expele un exudado

bacteriano inodoro, cremoso, dejando definida la separación entre los tejidos adyacentes y el anillo vascular. En el exterior, los tubérculos, presentan deformaciones, fisuras y decoloración castaño-rojiza.

En el caso de los tubérculos, los síntomas pueden ser confundidos con los producidos por *Ralstonia solanacearum*, pero en el caso de *Clavibacter michiganensis*, es típica la aparición de hinchamientos, hendiduras y fisuras en la zona de los “ojos”.

Fuente: OEPP/EPP0 1996

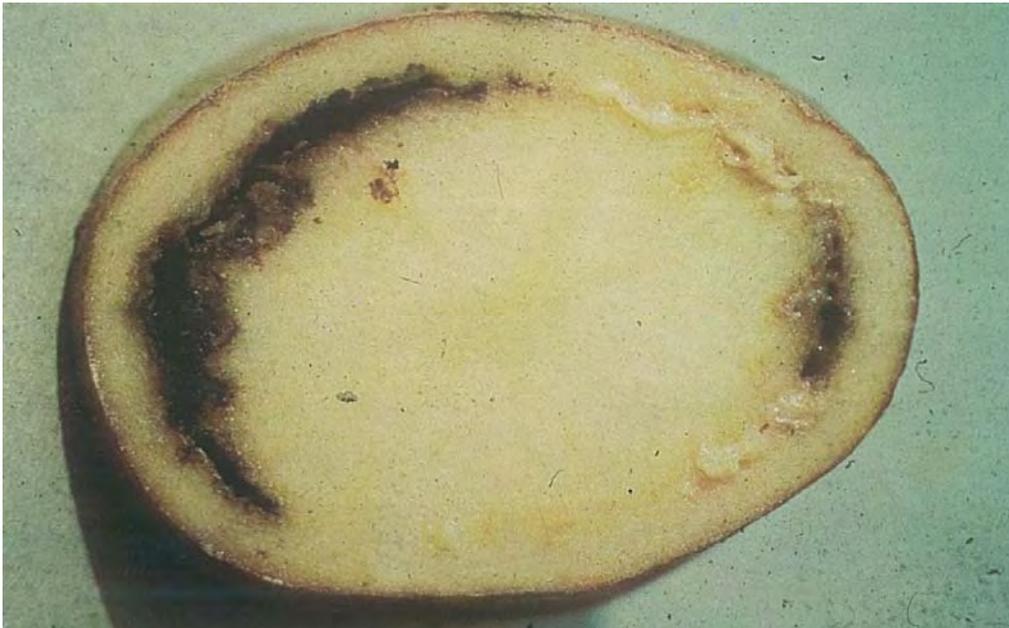


Foto nº 2: Sección transversal de patata infectada por *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, donde se aprecia el oscurecimiento del anillo vascular y los tejidos que lo rodean

Fuente: Grupo de Trabajo de Laboratorios de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitarias (folleto publicado por el MAPA)



Foto nº 3: Fisuras y hendiduras debidas a *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. La tierra no suele quedarse adherida a los tubérculos a pesar de la salida de las bacterias.

## FORMAS DE DISPERSIÓN

El organismo sobrevive de una campaña a otra en tubérculos infectados, ya sea de almacén o en los que han quedado en el campo después de la recolección (bortas o bordas). La infección se produce a través de heridas en los tubérculos provocadas por la maquinaria de recolección y siembra, o por los cuchillos o máquinas que se usan para partir la semilla.

La principal vía de dispersión de la enfermedad es la utilización de tubérculos enfermos al efectuar la siembra.

La dispersión en campo es prácticamente nula, aunque existen evidencias experimentales de que algunos insectos, como el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) y algunos áfidos, pueden transmitir la enfermedad.

## MÉTODOS DE PREVENCIÓN Y CONTROL

La capacidad de infección a partir de tubérculos infectados disminuye a medida que las temperaturas son más elevadas.

El único medio de control es la utilización de semilla libre de bacteria, acompañado de fuertes medidas sanitarias tales como:

- Utilizar patata de siembra controlada oficialmente
- Sembrar tubérculos enteros, sin trocear
- Eliminar la vegetación espontánea de los bordes de parcelas y caminos
- Eliminar las “bortas” (rebotes de patatas del año anterior) de las fincas, evitando dejar plantas o tubérculos aislados después de la recolección.
- Establecer rotaciones amplias en las que la patata tarde en volver a cultivarse en la misma finca
- Limpieza y desinfección de aperos, almacenes y maquinaria de cualquier tipo utilizados en la siembra, cultivo, recolección y almacenaje de patata en los que se sospeche que hay restos de tubérculos afectados, utilizando productos químicos adecuados (amidas, alcoholes, lejía, etc.).
- En caso de aparición de la enfermedad, aplicar, tanto a los tubérculos como a las fincas donde se han producido, las medidas de cuarentena que establece la legislación.

## *Ralstonia* (=Pseudomonas) *solanacearum* Yabuuchi et al.

### (Marchitamiento bacteriano o podredumbre parda)

#### CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:

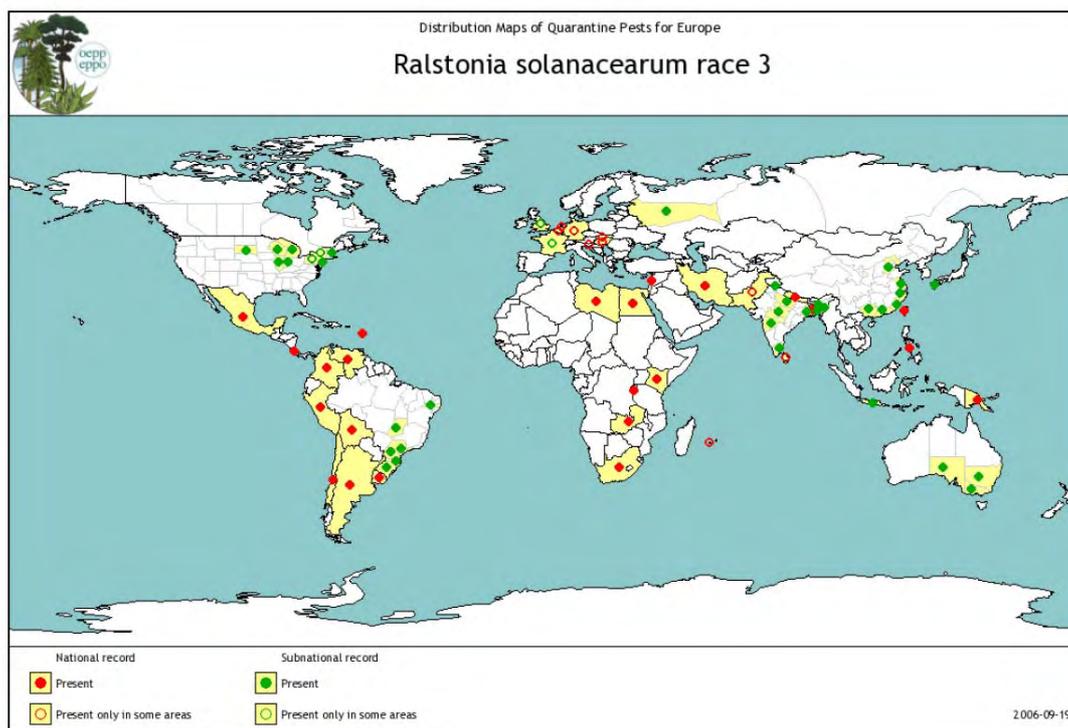
Reino:	Bacteria
División:	Gracilicutes
Familia:	Pseudomonadaceae
Especie:	<i>Ralstonia</i> (=Pseudomonas) <i>solanacearum</i>
Razas:	Aunque la clasificación de las diferentes razas o variedades de esta bacteria ha sido un tema bastante controvertido, la EPPO menciona tres razas (razas 1, 2 y 3), de las cuales, la raza 3 es la que se encuentra presente y tiene potencial de dispersión en la UE.

#### HOSPEDANTES (raza 3):

Afecta principalmente a patata (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Lycopersicon lycopersicum*), pero también, aunque con menor virulencia, a otros cultivos de la familia Solanaceae, como la berenjena (*Solanum melongena*), el pimiento (*Capsicum annum*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*). Otros posibles hospedantes son las plantas espontáneas de la familia Solanaceae, como *Solanum dulcamara*, *Solanum nigrum*, la ornamental *Pelargonium hortorum*, etc. Hay que destacar por su importancia a la especie *Solanum dulcamara*, especie presente en las inmediaciones de canales y cauces fluviales, y que puede actuar como reservorio de bacterias en zonas donde el agua ha resultado contaminada.

#### DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA (raza 3):

- Mundial (excepto UE): Rusia, México, Estados Unidos, Costa Rica, Guadalupe, Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Perú, Uruguay, Venezuela, así como numerosos países de Asia, Oceanía y África
- Unión Europea: Bélgica (alguna cita), Francia (alguna cita), Alemania (alguna cita), Eslovenia (alguna cita), Eslovaquia, Hungría (alguna cita), Holanda y Reino Unido (alguna cita).
- España: Se han detectado algunos focos en Castilla y León y Extremadura, que están en proceso de erradicación. Detectado y probablemente presente en Canarias.

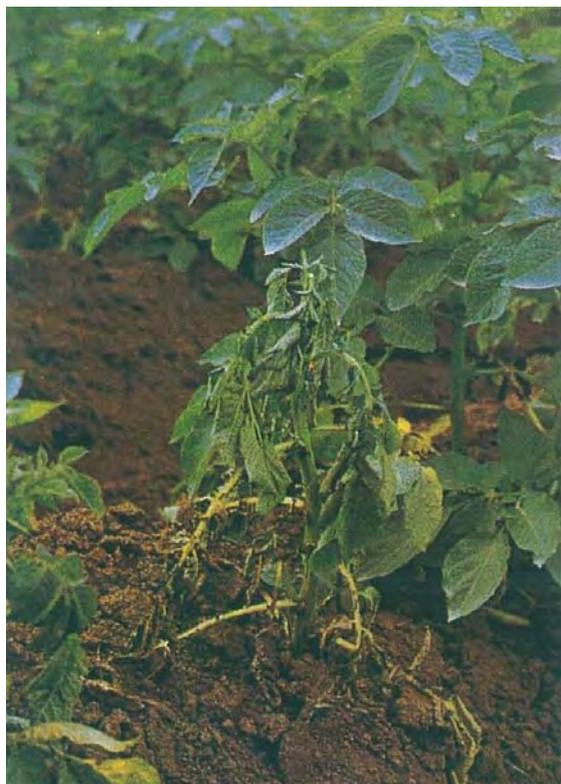


**SINTOMATOLOGÍA:**

Las infecciones sobre patata en la UE parecen estar asociadas a la raza 3 de *Ralstonia solanacearum*. El proceso infeccioso que se produce en la planta comienza con la llegada del inóculo a la raíz. La bacteria penetra desde el parénquima cortical hasta el cilindro central de la raíz, multiplicándose abundantemente. Posteriormente migra hacia el tallo, y comienza a producir abundante mucus en los vasos del xilema. La presencia de productos de degradación impide el paso de savia bruta, lo que motiva que la planta no se alimente adecuadamente. Esto provoca el marchitamiento de la planta, que puede llegar a ser irreversible, acabando con la muerte de la misma.

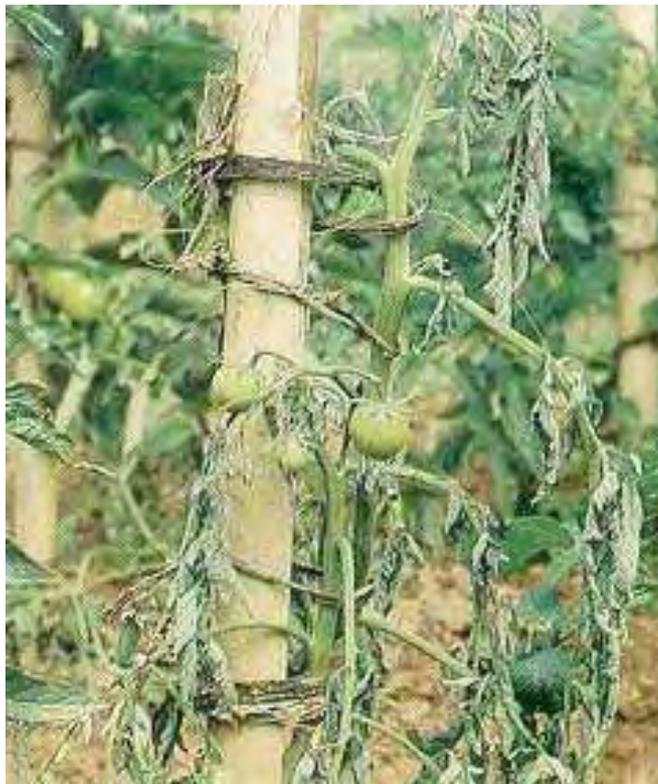
Las plantas afectadas muestran síntomas parecidos a los del stress hídrico. Las hojas superiores, de una o varias ramas, languidecen durante las horas de más calor, y al principio del ataque, vuelven a enderezarse por la noche. Además pueden aparecer estrías pardas en el tallo, que se extienden a partir del cuello. Si se hace un corte transversal, de los haces vasculares se libera un exudado bacteriano blanco y pegajoso. Otros síntomas en vegetación son el bronceado de las hojas, el oscurecimiento del interior de los tallos, y finalmente, la necrosis de tallos y hojas, con muerte total de la planta.

En tomate, se produce un amarilleo más o menos rápido de la planta. En el tallo se desarrollan numerosas raíces adventicias, el tejido vascular presenta decoloraciones pardas, y al cortarlo transversalmente, libera un exudado bacteriano blanco o amarillento.



Fuente: OEPP/EPP0 1996

Foto n° 1: Aspecto general de una planta de *Solanum tuberosum* (patata) infectada por *R. solanacearum*. Puede observarse el aspecto de estar afectada por stress hídrico severo.



Fuente: www.ufv.br

Foto n° 2: Planta adulta de *Lycopersicon lycopersicum* (tomate) afectada por *R. solanacearum*



Fuente: www.bitkisagligi.net

Foto n° 3: Típica coloración parda del tejido vascular en planta de *Lycopersicon lycopersicum* (tomate) afectada por *R. solanacearum*.



Fuente: www.gobiernodecanarias.org

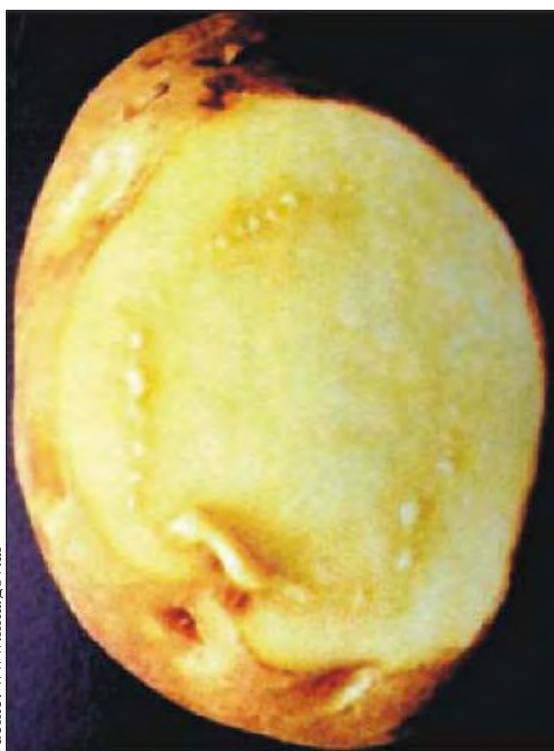
Foto n° 4: Tubérculo de patata afectado por *Ralstonia solanacearum*.

El tubérculo de patata exuda de los “ojos” un mucus blanquecino cremoso, y al cortarlo transversalmente, se observa una zona parda o necrótica en el anillo vascular. Es típico que el exudado bacteriano se mezcle con la tierra y se seque, quedando adherida la mezcla a la superficie del tubérculo. La analogía de síntomas podría generar confusión con la pudrición anular originada por *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*. No obstante, un síntoma distintivo de *Clavibacter* es la aparición de hinchamientos, cráteres y/o grietas cerca de los “ojos” del tubérculo.



Fuente: OEPP/EPPPO 1996

Foto n° 5: Típica coloración marrón del anillo vascular provocada por *R. solanacearum*. Además, se observa en la superficie del tubérculo la mezcla de tierra con exudación bacteriana.



Fuente: www.inta.gov.ar

Foto n° 6: Exudación bacteriana originada en los tejidos del anillo vascular por *R. solanacearum*.

Los tubérculos que se forman en plantas enfermas pueden o no estar infectados. Los tubérculos infectados, a su vez, pueden o no presentar síntomas externos, dependiendo del estado de desarrollo de la enfermedad en el momento del arranque de los tubérculos.

### **FORMAS DE DISPERSIÓN:**

Las vías más importantes de transmisión de la enfermedad son los tubérculos infectados leve o latentemente, así como el agua de riego contaminada; la bacteria puede permanecer en campo sobre malas hierbas (sobre todo *Solanum dulcamara*, que aparece asociada a los cauces de agua), y probablemente en lesiones de raíces de plantas no huéspedes. Otros medios de transmisión de menor importancia pueden ser la maquinaria, aperos, calzado, animales, insectos o nematodos.

### **PREVENCIÓN Y LUCHA:**

La enfermedad es favorecida por las temperaturas elevadas, así como por los suelos deficientes en nitrógeno o en potasio, y con excesiva humedad.

Para prevenir la enfermedad se recomienda:

- Usar semilla libre de *Ralstonia*, y a ser posible, sembrar tubérculos enteros; en caso de usar semilla troceada, desinfectar los utensilios de corte.
- Hacer rotación de cultivos lo más amplia posible, no poniendo otras solanáceas en la alternativa y eliminando las malas hierbas que pueden servir de hospedantes.
- Eliminar la vegetación espontánea y malas hierbas de los bordes de parcelas y caminos.
- Eliminar las “bortas” (rebotes de patatas del año anterior) de las fincas, evitando dejar plantas o tubérculos aislados después de la recolección.
- Limpiar y desinfectar aperos, maquinaria y almacenes con lejía, amonio cuaternario, con una solución al 10% de formaldehído o con otros bactericidas específicos.
- En caso de aparición de la enfermedad, aplicar, tanto a los tubérculos como a las fincas donde se han producido, las medidas de cuarentena que establece la legislación.

## *Synchytrium endobioticum* (Schilbersky)Percival

(Sarna verrugosa de la patata)

### CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:

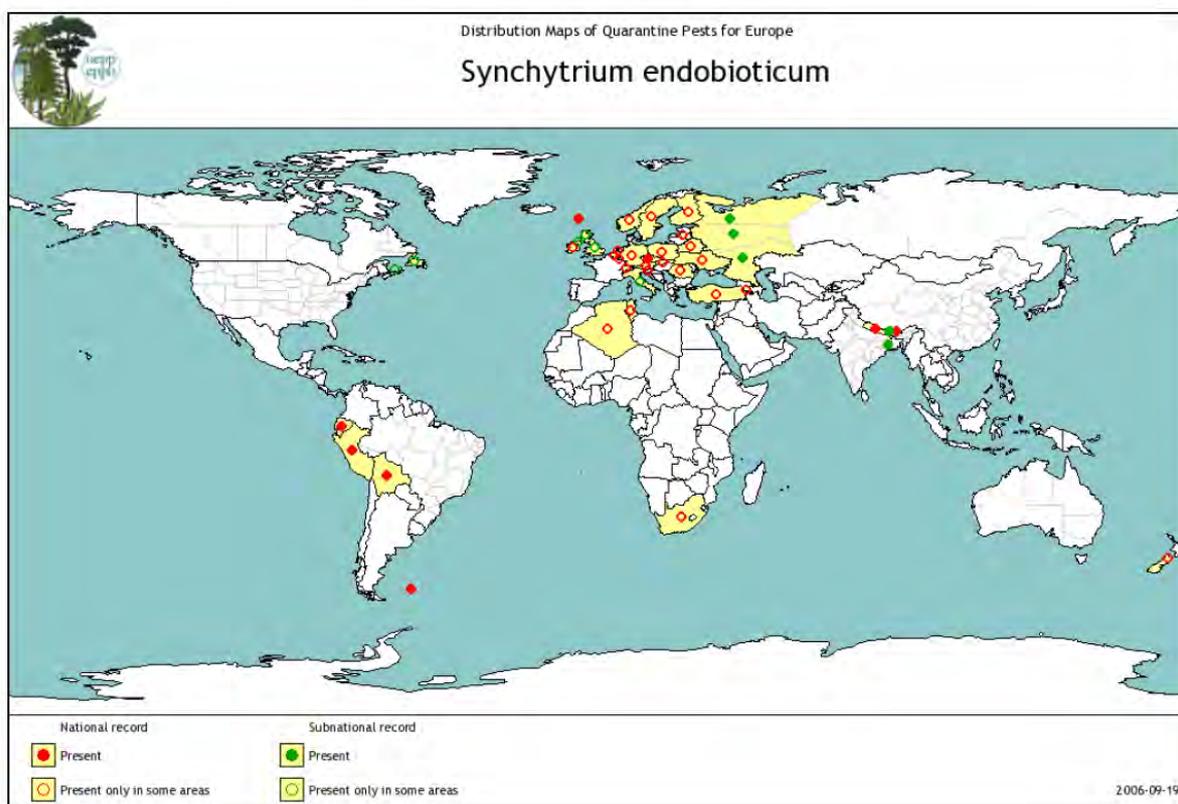
Reino:	Fungi
Clase:	Chytridiomycetes
Orden:	Chytridiales
Especie:	<i>Synchytrium endobioticum</i>

### HOSPEDANTES:

El único hospedante cultivado es la patata (*Solanum tuberosum*). No obstante, de forma artificial pueden ser inoculadas otras especies de solanáceas, entre ellas el tomate (*Lycopersicon lycopersicum*).

### DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA:

- Mundial (excepto UE): Armenia (alguna cita), Bielorrusia, Noruega, Rusia, Suiza (alguna cita), Ucrania, Turquía, Bután, India, Nepal, Argelia, Túnez (alguna cita), Sudáfrica, Bolivia, Canadá. Ecuador, Perú, Islas Malvinas y Nueva Zelanda.
- Unión Europea: Austria, Bélgica, República Checa, Dinamarca (Islas Faroe), Estonia, Finlandia, Alemania, Irlanda, Italia, Letonia, Luxemburgo, Holanda, Polonia (alguna cita), Rumania, Eslovaquia, Eslovenia, Suecia y Reino Unido.
- España: no existe constancia de su presencia.



### SINTOMATOLOGÍA:

Los síntomas en la parte aérea por lo general no son claros. No obstante, puede llegar a observarse reducción en el vigor de la planta. Se pueden formar verrugas de color verde - amarillento en las yemas aéreas de la base del tallo. También ocasionalmente, se pueden presentar en las hojas y en las flores.

Síntomas subterráneos: los ataques del hongo tienen lugar sobre los tallos, estolones y tubérculos. Las raíces no se ven afectadas. Los síntomas típicos son tumores o excrescencias verrugosas con forma de coliflor, blandas, esponjosas y más o menos esféricas, de tamaño variable, que pueden llegar a formar grandes masas que cubren totalmente el tubérculo. Las verrugas, cuando son jóvenes, tienen un color blanco marfil a rosáceo, y a medida que van envejeciendo, se oscurecen hasta volverse negras, empiezan a pudrirse y al final liberan esporas en el suelo. Estas esporas pueden sobrevivir en el suelo durante más de 30 años. También es posible que tubérculos aparentemente sanos desarrollen verrugas en el almacén.

En la práctica, los síntomas de la sarna verrugosa no se detectan hasta la cosecha o el almacenamiento, debido a que puede no haber habido síntomas aéreos durante el cultivo, por lo que la inspección se debe hacer preferentemente en almacén.

### FORMAS DE DISPERSIÓN:

La principal causa de dispersión de la enfermedad es la patata de siembra contaminada, aunque también las esporas durmientes en el suelo, que pueden ser llevadas de una parcela infectada a otra sana por medio de la tierra adherida a la maquinaria, calzado, herramientas, etc.



Fuente: R.Zachmann (www.idaho.edu)

Foto n° 1: Patatas afectadas por *Synchytrium endobioticum*. Pueden observarse las verrugas que invaden los tubérculos y la parte basal del tallo.

**PREVENCIÓN Y LUCHA:**

Para prevenir la enfermedad se recomienda:

- Usar semilla libre de *Synchytrium endobioticum*.
- Limpiar y desinfectar aperos, maquinaria y almacenes.
- En caso de aparición de la enfermedad, aplicar, tanto a los tubérculos como a las fincas donde se han producido, las medidas de cuarentena que establece la legislación.

Fuente: OEPP/EPP0 1996

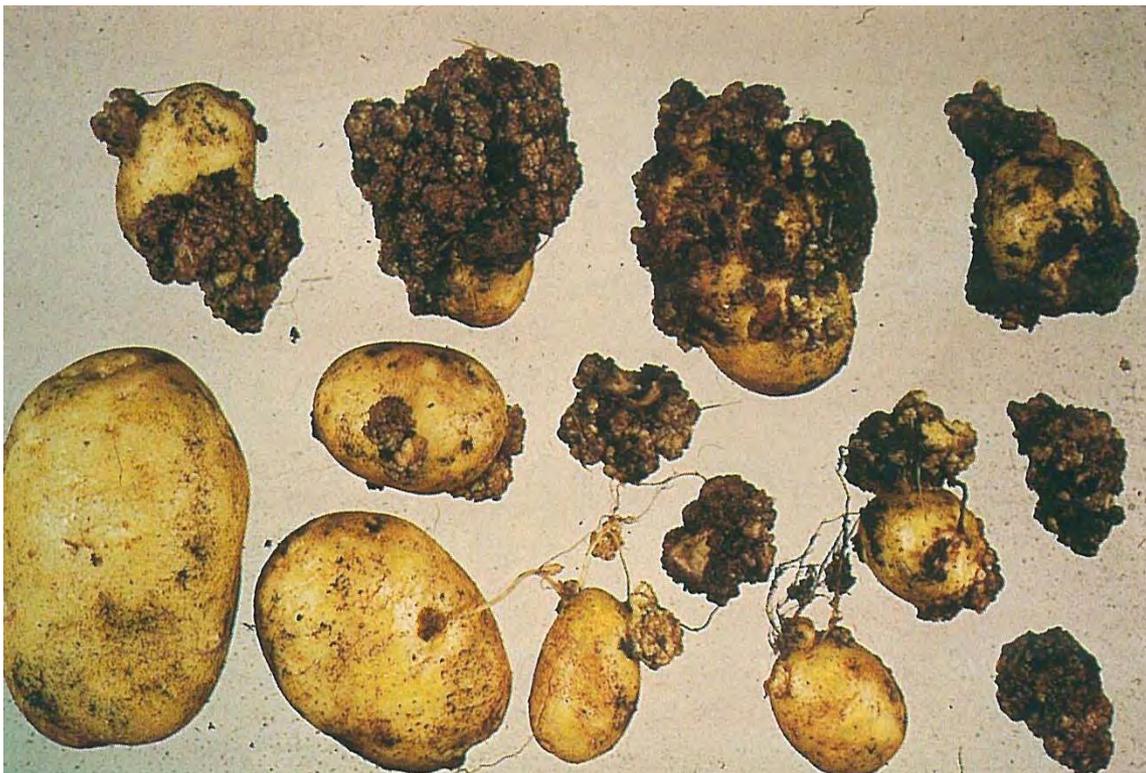


Foto n° 2: Patatas afectadas por *Synchytrium endobioticum*

Fuente: www.inspection.gc.ca



Foto n° 3: La parte basal del tallo presenta deformaciones, que cobran coloración verdosa, debido a la presencia de clorofila.

Fuente: www.apsnet.org



Foto n° 4: Daños de *Synchytrium endobioticum* en tubérculos de patata.



## *Ditylenchus destructor* Thorne

(Anguilulosis de la patata)

Fuente: OEPP/EPP0 1996



Foto nº 1: *Ditylenchus destructor*. Daño interno en un tubérculo de *Solanum tuberosum* (patata)

Fuente: Consellería de agricultura, Gandería e Política Agroalimentaria. Xunta de Galicia

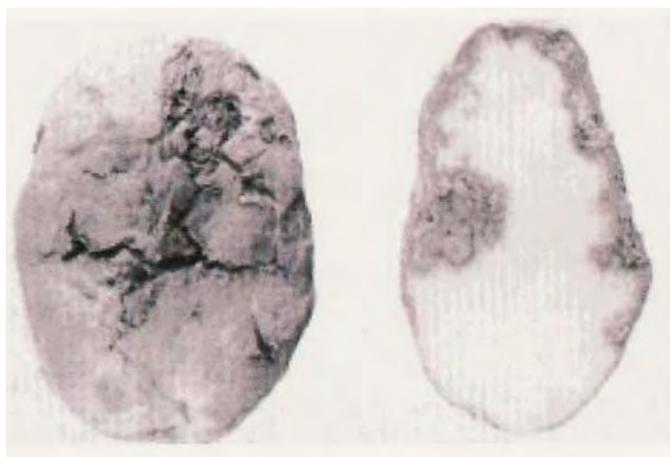


Foto nº 2: Daños externos e internos provocados por el ataque de *Ditylenchus destructor* sobre *Solanum tuberosum* (patata)

Fuente: OEPP/EPP0 1996



Foto nº 3: De izquierda a derecha, daños crecientes provocados por *Ditylenchus destructor* en *Iris sp.* (lirio)

**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

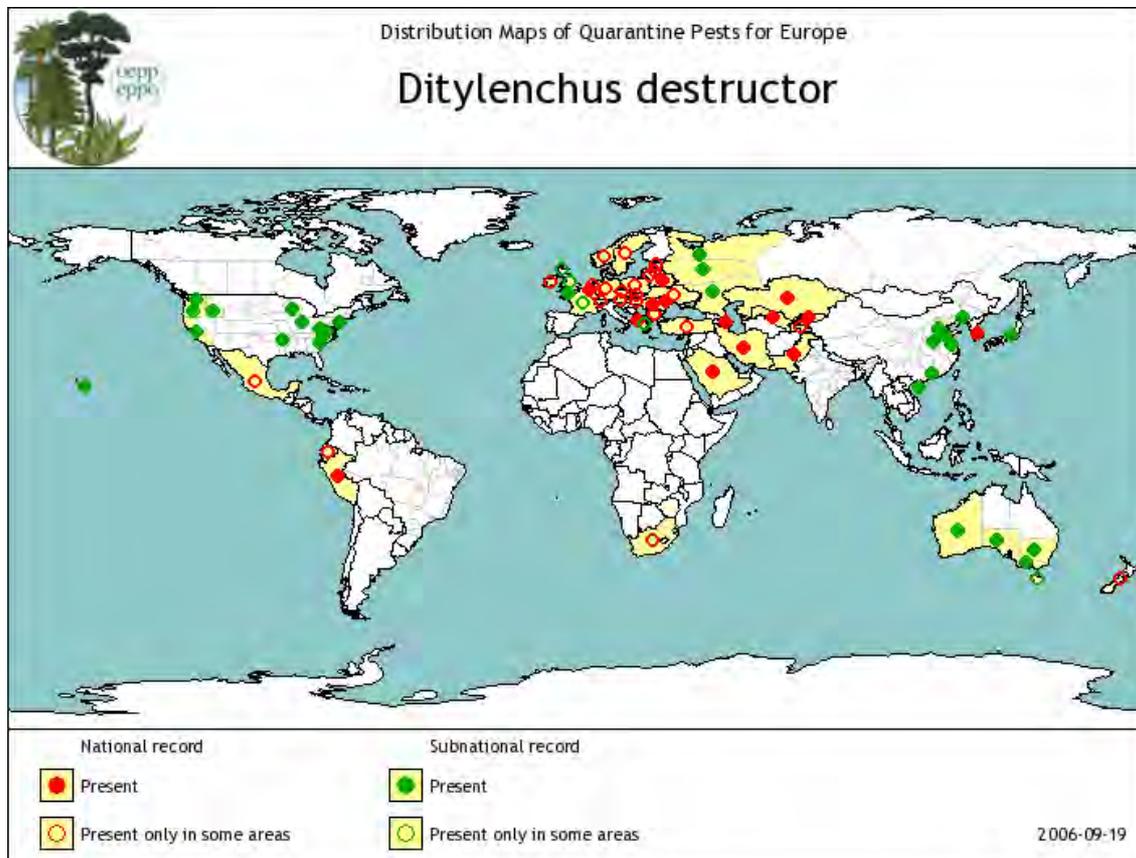
Reino: Animalia  
 Clase: Nematoda  
 Familia: Anguinidae

**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:**

*Solanum tuberosum*, *Crocus flavus*, *Gladiolus spp.*, *Hyacinthus spp.*, *Iris spp.*, *Tigridia spp.* y *Tulipa spp.*

**SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

- Mundial (excepto UE): Albania, Bielorrusia, Azerbaiyán, Moldavia, Noruega, , Rusia, Turquía, Ucrania, Oceanía, América del Norte, numerosos países de Asia y África, Ecuador, Perú, Méjico y USA.
- Unión Europea: Austria, Bulgaria, Rumania, Bélgica, República Checa (alguna cita), Estonia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda (alguna cita), Letonia, Lituania, Luxemburgo, Holanda (alguna cita), Polonia, Eslovaquia, Suecia (alguna cita) y Reino Unido (alguna cita).
- España: no existe constancia de su presencia.

**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):**

No existen.

**SÍNTOMAS:**

En patata de siembra, en la parte aérea de la planta no se observan síntomas específicos del ataque de este nematodo, salvo en caso de ataques muy severos, en los cuales se observa debilitamiento de las plantas. Los síntomas se observan sobre los tubérculos: la piel adquiere un color negro grisáceo, se arruga, se agrieta y aparece desgarrada por zonas y delgada como el papel, debido a que el tejido subepidérmico se seca y encoge. Al ser pelados los tubérculos, muestran debajo de la piel manchas de color blanco tiza o débilmente coloreadas, que progresivamente se ensanchan. El tejido afectado es de consistencia seca y granular y a medida que estas áreas se unen, el tejido se oscurece por la invasión de organismos secundarios como hongos, bacterias y nemátodos saprofitos. En condiciones favorables para el ataque, en el campo o en el almacén, los tubérculos pueden llegar a destruirse completamente como consecuencia de una podredumbre húmeda, emanando un olor desagradable. Los síntomas en el tubérculo presentan

muchas analogías con los del mildiu de la patata. También con otros organismos causantes de podredumbres húmedas o secas en el tubérculo.

En bulbosas ornamentales, la infección comienza por la base del bulbo, extendiéndose a la piel y causando lesiones negras o grises. Las hojas presentan un pobre desarrollo y pequeñas manchas amarillas.

#### **MÉTODO DE MUESTREO:**

- **Lugar a observar en la planta o material vegetal requerido para la muestra:**

Se realizará una inspección visual donde se recogerán muestras sintomáticas. Los síntomas se manifiestan en bulbos o tubérculos, dependiendo del vegetal objeto de inspección, y planta entera.

- **Dimensiones y forma de las muestras a recoger:**

En caso de observar síntomas que hagan sospechar de la presencia de nemátodos, deben tomarse muestras de tierra (500 g) y planta entera sintomática, intentando no tomar muestras de plantas muertas. La muestra vegetal consiste en la recogida de planta entera sintomática, teniendo especial cuidado a la hora de arrancar el vegetal de tomar el bulbo con el mayor número de raíces posible y algo de tierra adherida a las mismas.

- **Condiciones de conservación y transporte de la muestra:**

Para el envío al Laboratorio de diagnóstico del material vegetal evitar que la parte aérea esté en contacto con las raíces, envolviendo éstas de forma independiente. Conservar la muestra refrigerada en nevera y transportarla en bolsa de plástico etiquetada.

#### **CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:**

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

#### **TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:**

Técnicas de microscopía óptica según el correspondiente laboratorio de diagnóstico.



***Globodera pallida* (Stone) Behrens y  
*Globodera rostochiensis* (Wollembeber) Behrens**

**(Nematodos del quiste de la patata)**

**CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:**

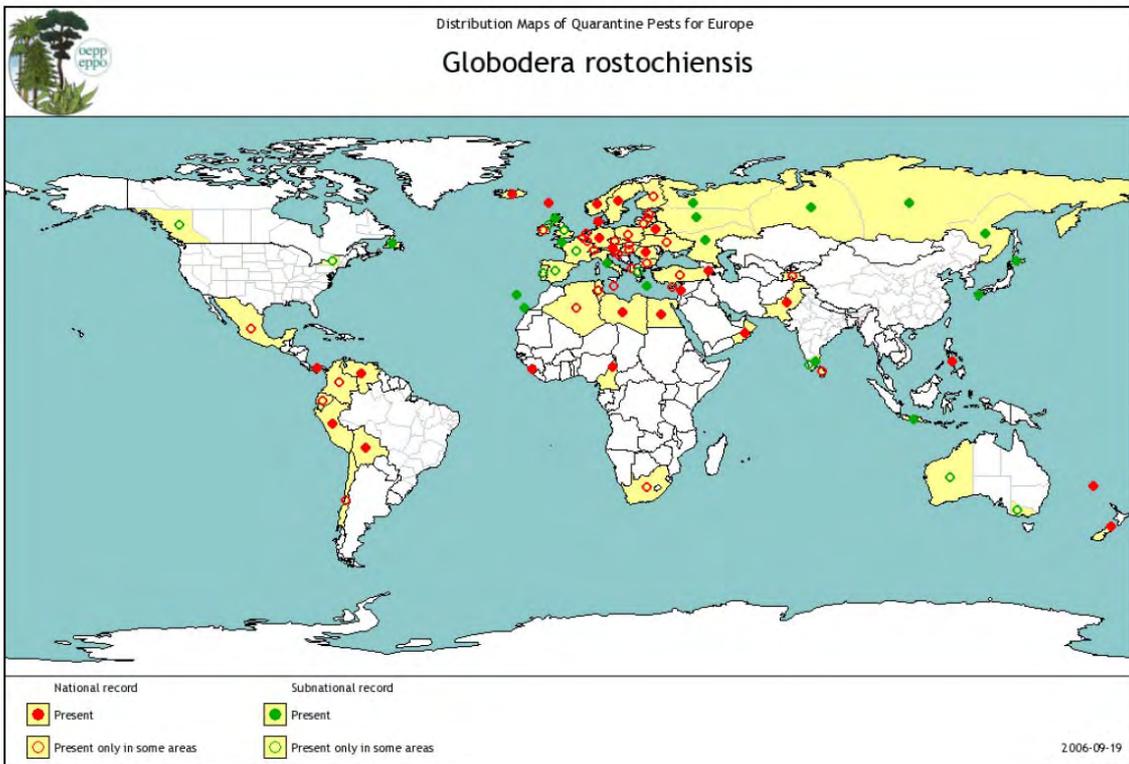
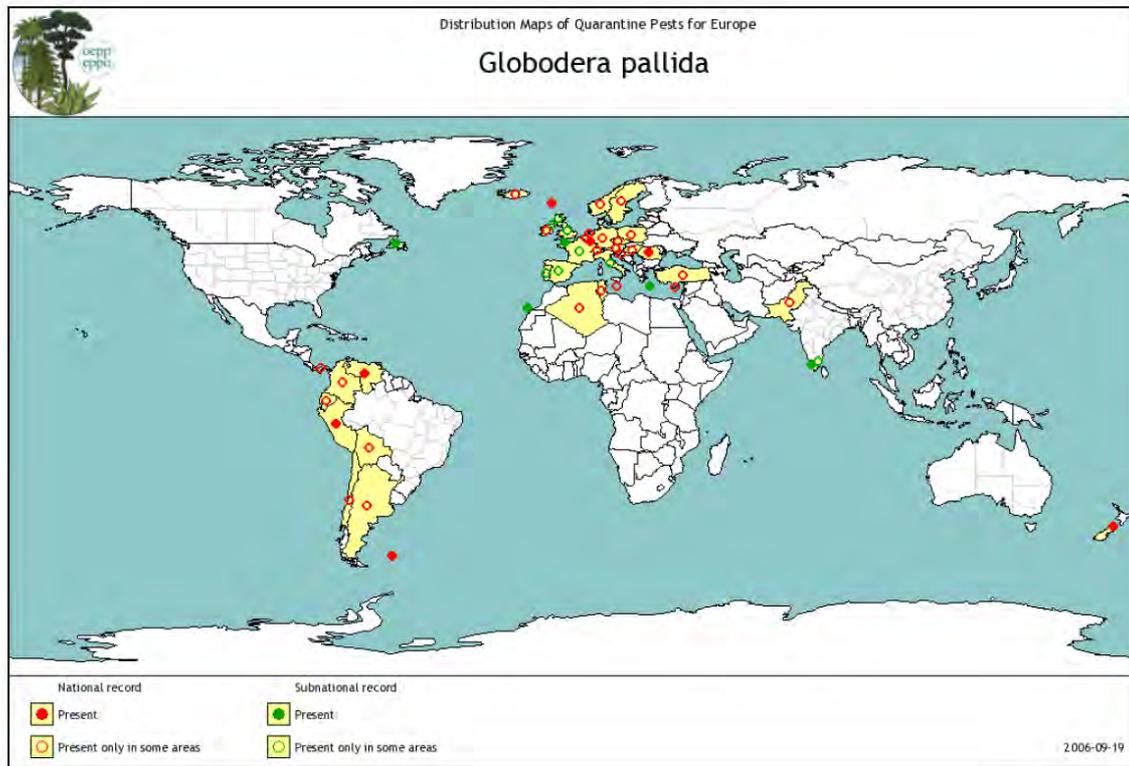
Reino: Animalia  
Clase: Nematoda  
Familia: Heteroderidae

**HOSPEDANTES:**

El principal hospedante de ambos nematodos es la patata (*Solanum tuberosum*), aunque de forma poco usual, el tomate (*Lycopersicon lycopersicum*) y la berenjena (*Solanum melongena*) también pueden resultar infectados. Otros posibles hospedantes son los vegetales de otras especies del género *Solanum*.

**DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA:**

	<b>Mundial (excepto UE)</b>	<b>Unión Europea</b>	<b>España</b>
<i>Globodera rostochiensis</i>	Albania, Armenia, Bielorrusia, Croacia (alguna cita), Noruega, Rusia, Ucrania, Islandia, Liechtenstein, Suiza, Turquía, así como numerosos países de Asia, norte de África, América y Oceanía.	Austria, Bélgica, Bulgaria, Chipre, República Checa, Dinamarca, Estonia, Islas Faroe, Francia, Alemania, Finlandia (limitada distribución), Grecia, Hungría, Irlanda, Italia, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Malta, Holanda, Polonia, Portugal, Rumania, Bulgaria, Eslovaquia, Eslovenia (alguna cita), España, Suecia y UK.	Presente, de limitada distribución.
<i>Globodera pallida</i>	Croacia (alguna cita), Islandia, Noruega, Suiza, Turquía (alguna cita), India, Pakistán, Argelia, Túnez, Canadá, Panamá, Nueva Zelanda, y numerosos países de Sudamérica.	Austria, Bélgica, Chipre, República Checa (alguna cita), Islas Faroe, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Italia (alguna cita), Luxemburgo, Malta, Holanda, Polonia (alguna cita), Portugal (alguna cita), Rumania, España, Suecia (alguna cita) y UK.	Presente, de limitada distribución.



## SÍNTOMATOLOGÍA:

En campo se observan rodales más o menos extensos con plantas que muestran marchitamiento, enanismo, amarilleo, e incluso muerte prematura. Las raíces tienen aspecto fibroso. Aunque el sistema radicular está menos desarrollado que en los ejemplares sanos, se produce una proliferación de raicillas, que al examinarlas pueden dejar ver (a simple vista o con un microscopio de mano de x10 ó x20) los quistes de las hembras, prendidos fuera de la raíz, del tamaño de un grano de arena de forma globular. Los quistes son los cuerpos de las hembras, repletos de huevos, que al morir se convierten en cubierta protectora de los mismos. Estos huevos pueden conservar durante años su capacidad reproductiva. El color del quiste variará de acuerdo con la fase de desarrollo y la especie. Cuando las condiciones del medio son adecuadas, las secreciones de las raíces estimulan los quistes, y las larvas nacen dentro de los mismos, de donde salen para atacar de nuevo las raíces, penetrando en ellas (endoparásitos), fijándose en el cilindro central, y comenzando su desarrollo. Posteriormente, tras concluir el cuarto estado larvario, las hembras salen al exterior, quedando unidas por el cuello a la raíz de la planta. Los machos también salen al exterior después de la cuarta muda, para buscar por el suelo a las hembras. Las hembras ya fertilizadas se desprenden de las raíces, mueren y se convierten en la cubierta protectora antes citada. Un solo quiste puede contener de 100 a 500 huevos. Los huevos pueden quedarse en estado latente durante años si no hay huésped cercano. Los nematodos completan el ciclo de vida en unas 5 a 7 semanas, dependiendo de las condiciones de humedad y temperatura del terreno.

Los síntomas pueden ser confundidos con deficiencia de agua o de elementos minerales, así como con el marchitamiento provocado por *Verticillium spp.* o por *Pseudomonas solanacearum*.

El efecto sobre el rendimiento del cultivo depende de la densidad de nematodos presentes en el suelo, llegando en los casos más graves, a ser la causa de que ciertas zonas o fincas no produzcan absolutamente nada. Se estima que estos nematodos pueden reducir de forma directa las cosechas de patata hasta en un 85%. De forma indirecta, también causa prejuicios porque puede transmitir virosis y bacteriosis, como la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*).

Fuente: www.averyseeds.nl



Foto nº 1: Quistes de *Globodera rostochiensis* observables a simple vista sobre raíces de patata

Fuente: www.larioja.org



Foto nº 2: Rodal afectado por *Globodera sp.*

## FORMAS DE DISPERSIÓN:

La principal forma de dispersión de estos nematodos es a través del propio suelo. Suele aparecer en forma de rodales o zonas más o menos circulares..

Aunque los nematodos no se expanden por el terreno tan rápidamente como los hongos o bacterias patógenos de la patata, una vez que se encuentran en una zona de cultivo, son muy difíciles de erradicar.



Fuente: OEPP/EPP0 1996

Foto n° 3: Quistes blancuecinos, típicos de *Globodera pallida*

Fuente: OEPP/EPP0 1996

Foto n° 4: Quistes amarillentos, típicos de *Globodera rostochiensis*

Fuente: Uirico Zunke. University of Hamburg

Foto n° 5: Quiste de *Globodera rostochiensis*, mostrando su interior lleno de huevos.

### PREVENCIÓN Y LUCHA:

El nematodo se encuentra más frecuentemente en suelos frescos, en zonas bajas del terreno y en suelos sueltos que favorecen la supervivencia y movimiento de las larvas. La lucha contra el nematodo, una vez que se ha implantado, es muy difícil y exige la combinación de diferentes medidas de control:

- Cuarentena (no cultivo de patatas ni solanáceas). La población disminuye aproximadamente un 20% al año.
- Cultivo permanente: implantación de alfalfa, praderas, .etc.
- Nematicidas, que actúen sobre las larvas libres, o contenidas en los quistes.
- Cultivo trampa: tiene que haber un nacimiento rápido y homogéneo, y un crecimiento vegetativo importante.
- Variedades resistentes: bajan las poblaciones del nematodo. Tienen que ser resistentes a la especie y patotipo que tenemos en cada finca.
- Lucha integrada.

Las medidas preventivas que se deben adoptar son:

- No utilizar como semilla, patata procedente de zonas infectadas, o que no esté certificada por algún servicio oficial de control.
- Eliminar los rebrotes del año anterior (“bortas”), pues multiplican las poblaciones de nematodos.
- Hacer una rotación amplia de cultivos, de manera que pase el mayor tiempo posible entre un cultivo de patata y otro.
- Después de hacer un tratamiento nematicida, hay que tener mucho cuidado de no enterrar mucho los aperos, con el fin de no desenterrar los quistes de la zona no tratada con el gas.

*Meloidogyne Chitwoodi* golden, O'bannon, Santo and finley y  
*Meloidogyne Fallax* Karssen

(Nematodos del nódulo de la raíz)



Fuente: www.nematode.unl.edu

Foto nº 1: Daños de *Meloidogyne chitwoodi* en patata



Fuente: www.defra.gov.uk

Foto nº 2: Daños de *Meloidogyne sp.* en patata. Cada punto marrón contiene una hembra madura con huevos



Fuente: www.nematode.unl.edu

Foto nº 3: Pequeñas pústulas sobre bulbos de patata provocadas por un ataque de *Meloidogyne sp.*

**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

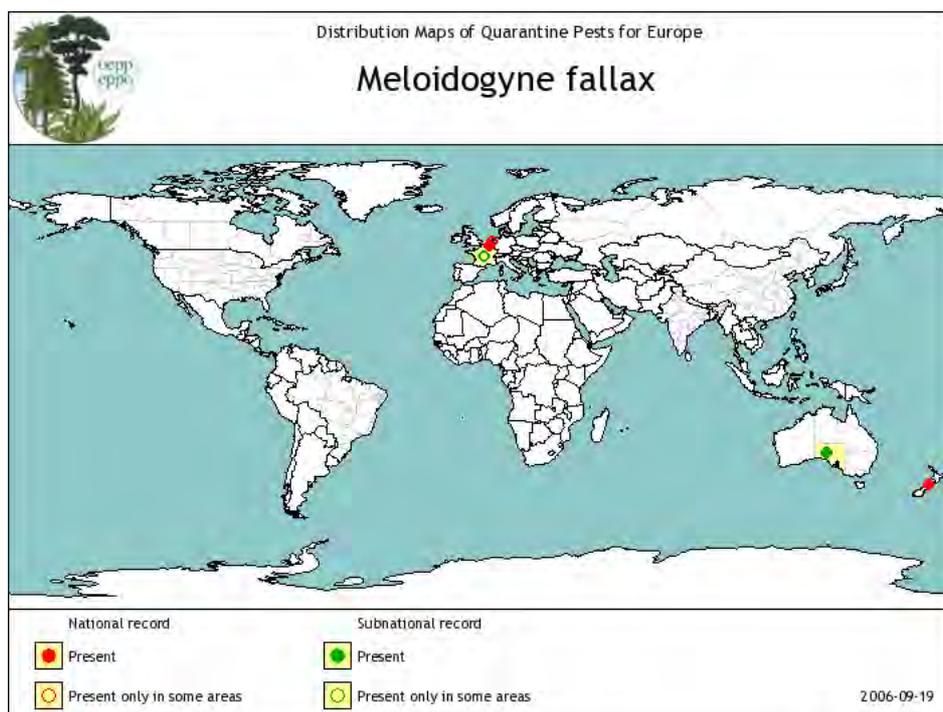
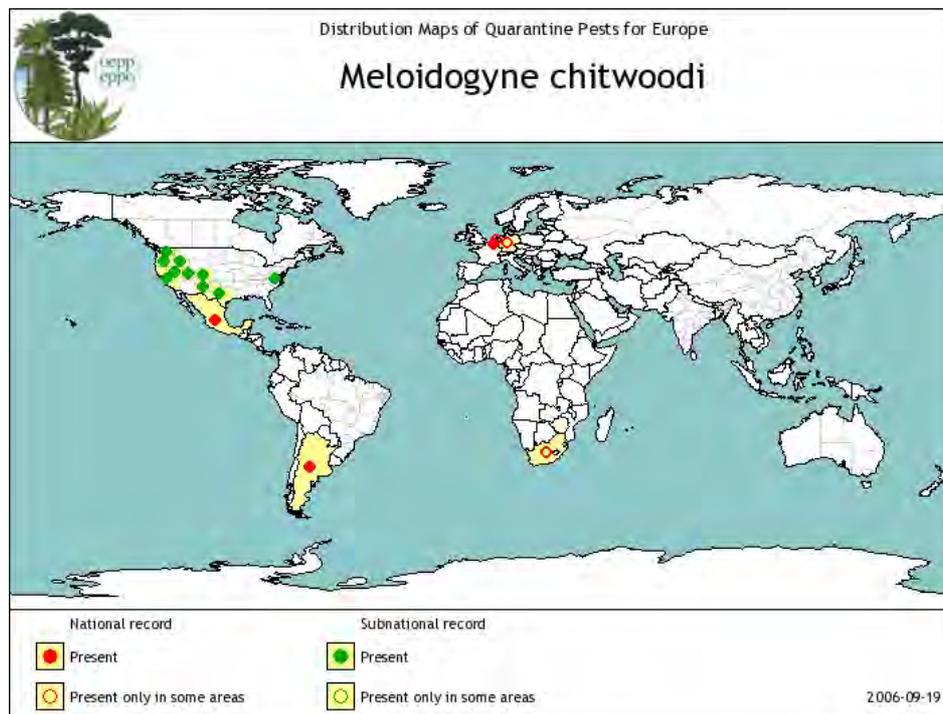
Reino: Animalia  
 Clase: Nematoda  
 Familia: Meloidogynidae

**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:**

*Solanum tuberosum*.

**SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

- Mundial (excepto UE): Sudáfrica, Argentina, Méjico y USA (*M.chitwoodi*), y Australia y Nueva Zelanda (*M.fallax*).
- Unión Europea: Bélgica, Holanda y Francia (alguna cita de *M.fallax*).
- España: no constancia de la presencia de ninguno de estos dos nematodos.



**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):**

No existen.

**SÍNTOMAS:**

En la parte aérea los síntomas no suelen ser obvios, aunque pueden consistir en atrofas, falta de vigor y tendencia al marchitamiento bajo condiciones de stress hídrico.

En el tubérculo aparecen agallas concentradas en una zona, o dispersas y próximas a los ojos y lesiones. Los tejidos internos situados bajo las agallas son necróticos y pardean. Las hembras adultas son visibles bajo la superficie como cuerpos blancos brillantes, con forma de pera, rodeados de una capa marrón de tejido del huésped. Las raíces de la patata pueden también verse afectadas, pero es difícil detectar la presencia del nematodo, pues apenas se producen agallas, o éstas son muy pequeñas, incluso con grandes infestaciones. Los cuerpos de las hembras pueden sobresalir desde la superficie de las pequeñas raicillas, siendo rodeados después por un saco de huevos, que se hace pardo oscuro con el tiempo.

**MÉTODO DE MUESTREO:****- Lugar a observar en la planta o material vegetal requerido para la muestra:**

Se realizará una inspección visual donde se recogerán muestras sintomáticas. Los síntomas se manifiestan en tubérculos (agallas) principalmente.

**- Dimensiones y forma de las muestras a recoger:**

Si durante las inspecciones visuales que se llevan a cabo en los campos de producción y en almacenes de patata de siembra, se detectan síntomas, deberán tomarse muestras de tubérculos y de planta entera para su envío al Laboratorio de diagnóstico.

**- Condiciones de conservación y transporte de la muestra:**

Conservar la muestra refrigerada en nevera y transportarla en bolsa de plástico etiquetada.

**CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:**

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

**TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:**

Técnicas según el correspondiente Laboratorio de diagnóstico.



## Potato stolbur phytoplasma

(Escoba de bruja)



Fuente: OEPP/EPPPO 1996

Foto nº 1: Síntomas de *Potato stolbur phytoplasma*. Nótese la aparición de engrosamientos en la parte aérea.

**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

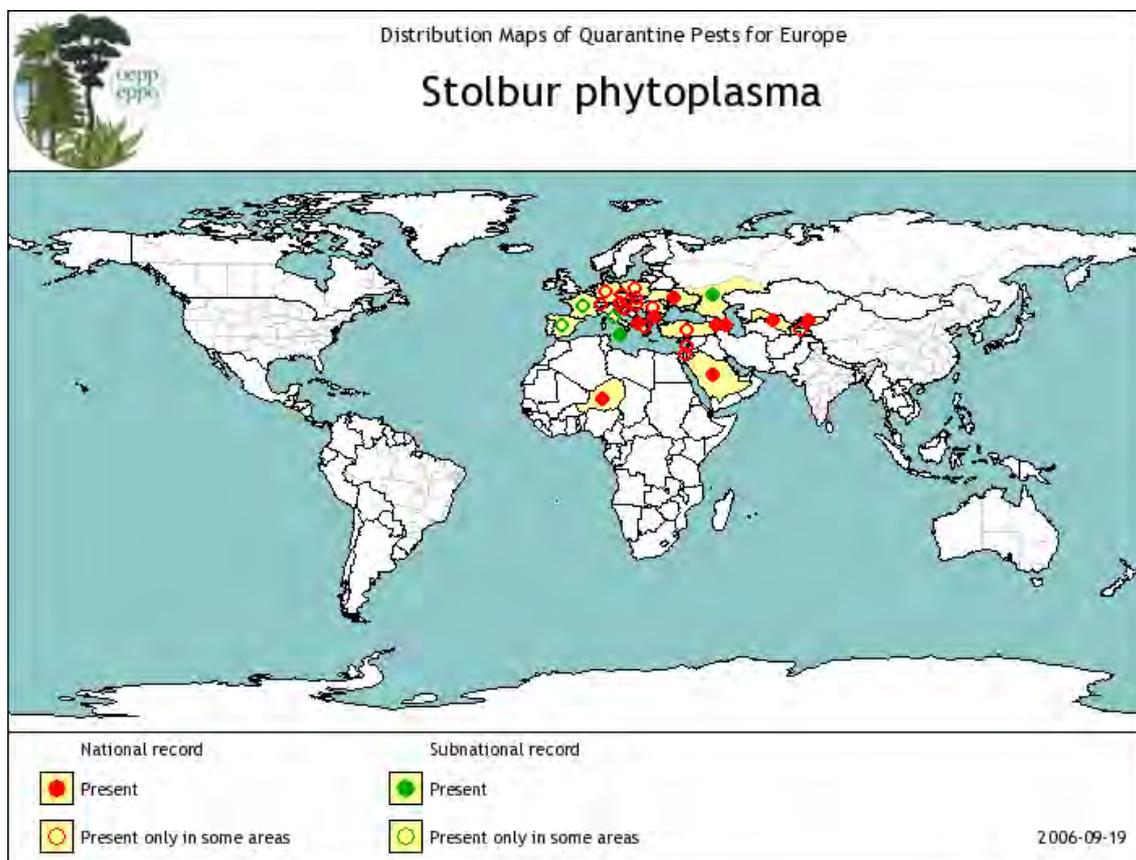
Reino: Bacteria  
 División: Mollicutes  
 Familia: Acholeplasmataceae

**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:**

Vegetales de la familia Solanaceae (especies ornamentales de la familia de las solanáceas, como las petunias, algunos falsos jazmines, dulcamara, dama de noche, estramonio, trompetero, etc). También son hospedantes el tomate (*Lycopersicon lycopersicum*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*).

**SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

- Mundial (excepto UE): Armenia, Azerbaijón, Croacia, Rusia, Suiza, Turquía, Ucrania, Yugoslavia, Nigeria, Israel (alguna cita), Kirgyzstan, Líbano, Arabia Saudí, Tajikistán y Uzbekistán.
- Unión Europea: Alemania, Bulgaria, Rumania, Eslovenia, Eslovaquia, Francia, Grecia e Italia. Alguna cita en Hungría, Rep. Checa y Polonia.
- España: presente, de limitada distribución.

**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):**

No existen.

**SÍNTOMAS:**

Se produce el enrollado de las hojas, que adquieren una tonalidad amarillenta, seguido de la producción de engrosamientos y brotes en cabellera en distintas partes del tallo.

El fitoplasma se transmite por *Hyalesthes obsoletus*, *Aphrodes bicinctus* y *Macrosteles quadripunctulatus*. También puede transmitirse por medio de los injertos.

**MÉTODO DE MUESTREO:**

- **Lugar a observar en la planta o material vegetal requerido para la muestra:**  
Al ser la muestra asintomática, no es necesario mirar en lugar alguno para la toma de muestras.
- **Dimensiones y forma de las muestras a recoger:**

Se realizará una inspección visual por la parcela y alrededores buscando síntomas sobre las plántulas. En caso de detectar síntomas sospechosos deberá tomarse muestras representativas de estos síntomas y enviarlos al laboratorio. Se recogerá la planta entera, en un porcentaje de muestreo del 1 por 1000.

- **Condiciones de conservación y transporte de la muestra:**

La muestra será transportada en una bolsa de plástico con etiquetado, conservándose entre 4 y 8 °C hasta su llegada al laboratorio (no se debe esperar más de 24 horas).

**CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:**

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

**TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:**

Para detectar este organismo, se puede recurrir a:

- razas de DNA, ya que los micoplasmas carecen de nucleidos.
- método de inmuno-fluorescencia indirecta, aunque no constituye un diagnóstico por no existir anti-sueros muy específicos.

En cualquier caso, debe ser el laboratorio de diagnóstico el que determine las técnicas a seguir para la determinación del organismo sospechoso.



## Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)

(Virus de la rizomanía de la remolacha)



Fuente: OEPP/EPP0 1996

Foto n° 1: Infección por Beet necrotic yellow vein virus en hojas de remolacha azucarera



Fuente: OEPP/EPP0 1996

Foto n° 2: Desarrollo anormal de las raíces en remolacha, motivado por *Beet necrotic yellow vein virus*

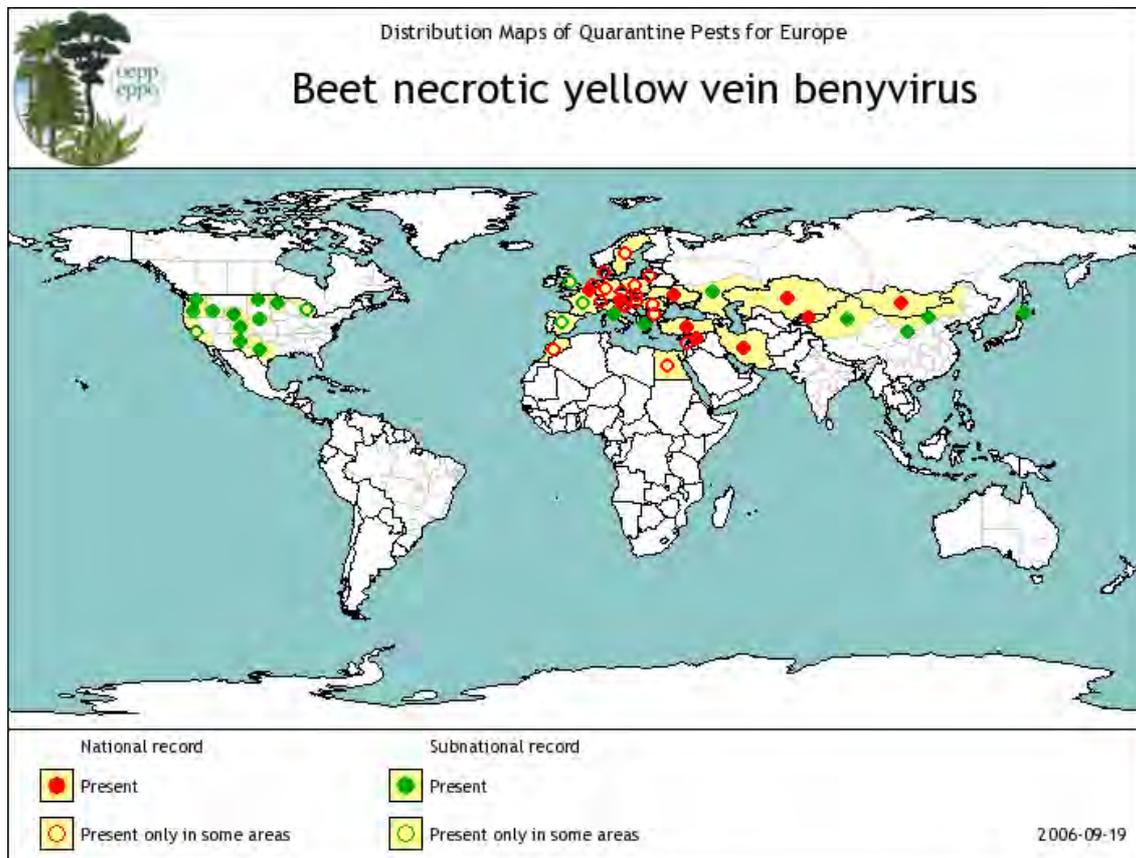
**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

Reino: Virus

Grupo: Benyvirus

**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:**Principalmente *Beta vulgaris* y *Solanum tuberosum*, aunque también *Allium porrum* y *Apium graveolens*.**SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

- Mundial (excepto UE): Croacia, Turquía, Rusia, Suiza, Yugoslavia, así como USA y numerosos países de Asia.
- Unión Europea: Austria, Bulgaria, Bélgica, Rumania, República Checa (alguna cita), Dinamarca (alguna cita), Francia (limitada distribución), Alemania, Grecia, Hungría, Italia, Holanda, Polonia, Eslovaquia, Eslovenia, Suecia y UK (limitada distribución).
- España: presente, de limitada distribución.

**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):** (R.D. 58/2005, Anexo IX, apartado d-1, Pág. 2665)

Francia (Bretaña), Dinamarca, Irlanda, Portugal (Azores), Finlandia, UK (Irlanda del Norte) y Lituania (APA/1242/2006).

**SÍNTOMAS:**

- Sobre las raíces: proliferación desordenada de pequeñas raicillas parcialmente necróticas, que dan el aspecto de una barba gris entrecana. La raíz principal presenta un estrangulamiento en la zona del ataque (forma de embudo o botijo). Al dar un corte transversal a la raíz, los anillos vasculares presentan una tendencia al pardeo.
- Sobre las hojas: coloración verde pálida; son translúcidas, erguidas y lanceoladas. El amarilleo y posterior necrosis de las venas es muy característico pero poco frecuente.

La enfermedad se presenta por rodales y manifiesta una ralentización en el crecimiento, con marchitamiento en las horas más calurosas del día.

**MÉTODO DE MUESTREO:**

- **Lugar a observar en la planta o material vegetal requerido para la muestra:**  
Al ser la muestra asintomática, no es necesario mirar en lugar alguno para la toma de muestras.
- **Dimensiones y forma de las muestras a recoger:**  
Se realizará una inspección visual por la parcela y alrededores buscando síntomas sobre las plántulas. En caso de detectar síntomas sospechosos deberá tomarse muestras representativas de estos síntomas y enviarlos al laboratorio. Se recogerá la planta entera con raíz, en un porcentaje de muestreo del 1 por 1000.
- **Condiciones de conservación y transporte de la muestra:**  
La muestra será transportada en una bolsa de plástico con etiquetado, conservándose entre 4 y 8 °C hasta su llegada al laboratorio (no se debe esperar más de 24 horas).

**CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:**

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

**TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:**

- Técnicas inmunoenzimáticas ELISA-DAS, realizadas sobre el jugo extraído de las raicillas o de la punta de la raíz.
- Transmisión mecánica a planta indicadora como *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor* y *Tetragonia expansa*.

En cualquier caso, deberá ser el Laboratorio de diagnóstico el que determine las técnicas a seguir para la identificación del organismo sospechoso.



## Tomato spotted wilt virus (TSWV)

(Bronceado del tomate)

Fuente: OEPP/EPPPO 1996



Foto nº 1: Líneas sinuosas y anillos concéntricos cloróticos en hoja de pimiento producidos por Tomato spotted wilt virus

Fuente: OEPP/EPPPO 1996



Foto nº 2: Detalle de los síntomas foliares producidos por Tomato spotted wilt virus

**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

Reino: Virus

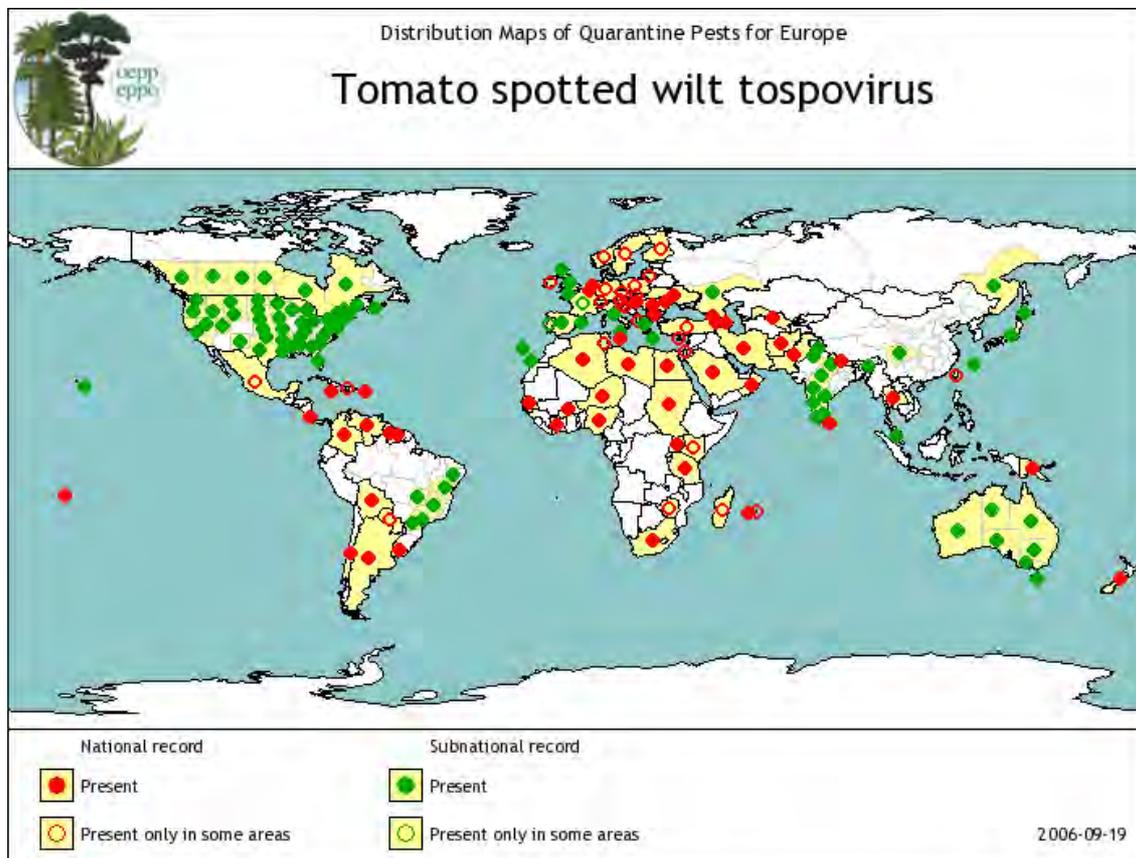
Grupo: Tospovirus

**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:**

Vegetales de *Dendrathera spp.*, *Impatiens spp.*, *Apium graveolens*, *Cucumis melo*, *Lactuca spp.*, *Capsicum annum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Solanum melongena*, *Solanum tuberosum* y *Nicotiana tabacum*.

**SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

- Mundial (excepto UE): Albania, Armenia, Azerbaijan, Croacia, Georgia, Moldavia, Noruega (alguna cita), Rusia, Suiza, Turquía, Ucrania, Yugoslavia. También está presente en distintos países de Asia, África, América, y Oceanía.
- Unión Europea: presente en Bélgica, Bulgaria, Rumania, Chipre, República Checa, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Italia, Malta, Países Bajos (Holanda), Polonia, Portugal, Eslovaquia, España y Reino Unido. Alguna cita en Austria, Estonia, Finlandia, Lituania, Eslovenia y Suecia.
- España: presente; de limitada distribución.



**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):** (R.D. 58/2005, Anexo IX, apartado d-2, Pág. 2665)

Finlandia y Suecia.

**SÍNTOMAS:**

En la planta se puede observar una falta de crecimiento, un mal desarrollo, clorosis y en algunos casos enanismo. En los peciolo, tallos y brotes terminales aparecen manchas necróticas marrones. Las hojas se deforman y adquieren un tono bronceado. Estas alteraciones pueden variar en función de la virulencia de la cepa y del cultivar al que infecte, y están condicionadas por factores ambientales, culturales, etc. A continuación se detallan los síntomas más típicos de la enfermedad en los cultivos más representativos afectados:

- *Lycopersicon lycopersicum*: En planta de semillero aparecen zonas amarillentas, manchas cloróticas que evolucionan a necróticas en las primeras hojas. En las hojas que se van desarrollando pueden aparecer tonos violáceos, comenzando por los nervios. Se produce un menor desarrollo de la planta

con disminución de la superficie foliar. En plantas adultas, las hojas aparecen amarillentas evolucionando a "bronceadas"; manchas necróticas en hojas y tallos; brotes achaparrados y amarillentos con foliolos doblados hacia el haz a lo largo del nervio principal; láminas asimétricas; frutos con deformaciones y manchas más o menos circulares de distinta coloración del resto del fruto.

- *Capsicum annum*: Tanto en planta joven como en adulta aparecen zonas amarillentas y decaimiento de los ápices que conlleva finalmente a la necrosis de los mismos. En las hojas aparecen anillos cloróticos, arabescos e incluso mosaicos. Los frutos presentan manchas redondas de color verdoso sobre fondo rojo y, en ocasiones, anillos concéntricos.
- *Lactuca sativa*: La planta de semillero aparece amarillenta, con manchas cloróticas que evolucionan a necróticas. Estas manchas necróticas, al crecer, se extienden a toda la lámina foliar, llegando a afectar al centro y al cuello de la planta que acaban presentando pudriciones. Esta sintomatología suele desarrollarse de forma lateral, lo que da a la planta infectada un aspecto asimétrico.
- *Apium graveolens*: Zonas amarillentas y manchas cloróticas que evolucionan a necróticas en hojas y tallos. Al crecer la planta, las necrosis se van extendiendo hasta ocupar toda la superficie foliar, los peciolo y tallos, provocando un menor desarrollo de la planta.

La enfermedad se transmite a través de trips. En España, la difusión de esta enfermedad parece estar asociada casi exclusivamente a *Frankliniella occidentalis* Perg., aunque también están citados como vectores en otros países *Frankliniella schultzei*, *F. Fusca*, así como *Trips tabaci*, *T. setosus* y *Scirtothrips dorsalis*.

### MÉTODO DE MUESTREO:

- **Lugar a observar en la planta o material vegetal requerido para la muestra:**  
Al ser la muestra asintomática, no es necesario mirar en lugar alguno para la toma de muestras.
- **Dimensiones y forma de las muestras a recoger:**  
Se realizará una inspección visual por la parcela y alrededores buscando síntomas sobre las plántulas. En caso de detectar síntomas sospechosos deberá tomarse muestras representativas en los semilleros. Será necesario tomar muestras al menos una vez durante el período comprendido entre la primavera y el otoño (período de producción de plántulas) para su envío al Laboratorio de diagnóstico. También se tomarán muestras de plantas que muestren síntomas. Se recogerá la planta entera, en un porcentaje de muestreo del 1 por 1000. Es necesario tener en cuenta la importancia de los vectores de estos virus de horticolas (*Frankliniella occidentalis*, *Bemisia tabaci*). Para ello se recomienda realizar muestreos aleatorios buscando dichos vectores.
- **Condiciones de conservación y transporte de la muestra:**  
La muestra será transportada en una bolsa de plástico con etiquetado, conservándose entre 4 y 8 °C hasta su llegada al laboratorio (no se debe esperar más de 24 horas).

### CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

### TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:

Para realizar el diagnóstico se recurrirá al método serológico, técnica ELISA-DAS, con anti-sueros comerciales INSV o bien polivalentes INSV+TSWC-L.

En cualquier caso, debe ser el laboratorio de diagnóstico el que determine las técnicas a seguir para la identificación del organismo sospechoso.



## **Andean potato latent virus (APLV)**

**(Virus andino latente de la patata)**



Fuente: Anne-Sophie Roy (EPPO)

Foto n° 1: Síntomas de mosaico provocados en un cultivar de patata peruano, por infección de Andean potato latent virus (APLV).

**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

Reino: Virus

Grupo: Tymovirus

**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:***Solanum tuberosum***SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

- Mundial (excepto UE): Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador y Perú.
- Unión Europea: no existe constancia de su presencia
- España: no existe constancia de su presencia

**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):**

No existen.

**SÍNTOMAS:**

Los síntomas varían dependiendo de la raza del virus, del cultivar de patata y de las condiciones de crecimiento, desde leves hasta severos mosaicos, con zonas necróticas, rizadas y necrosis en las puntas de las hojas. Las grandes fluctuaciones de temperatura diarias, y en particular, las condiciones frías, parecen favorecer la expresión de síntomas. También suelen aparecer síntomas severos en combinación con otras virosis. Este virus se transmite por contacto entre plantas, mediante insectos vectores, y a través de los tubérculos y semillas verdaderas.

**MÉTODO DE MUESTREO:**

Deben vigilarse de forma especial las parcelas, almacenes o centros de expedición que posean material vegetal procedente de los países en los que existe constancia de la presencia de la enfermedad. Si durante las inspecciones que se llevan a cabo en dichos lugares se observan síntomas que pudieran indicar la presencia de la enfermedad, deberán tomarse muestras para su envío inmediato al Laboratorio de referencia.

**CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:**

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

**TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:**

Esta virosis puede ser detectada mediante el uso de plantas indicadoras o por métodos serológicos.

En cualquier caso, debe ser el Laboratorio de referencia el que determine las técnicas a seguir para la identificación del organismo sospechoso.

## Andean potato mottle virus (APMoV)

(Virus andino del moteado de la patata)



Fuente: [www.dpyweb.net](http://www.dpyweb.net)

Foto n° 1: Síntomas de APMoV en planta de patata, con deformación de hojas y zonas cloróticas irregulares.



Fuente: [www.dpyweb.net](http://www.dpyweb.net)

Foto n° 2: Necrosis terminal, reacción primaria provocada por el virus APMoV sobre patata.

**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

Reino: Virus

Grupo: Comovirus

**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:***Solanum tuberosum***SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

- Mundial (excepto UE): Brasil, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador Honduras, Nicaragua y Perú.
- Unión Europea: no existe constancia de su presencia
- España: no existe constancia de su presencia

**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):**

No existen.

**SÍNTOMAS:**

El virus provoca mosaicos y moteados en la mayoría de los cultivares de patata andinos. Los cultivares sensibles pueden reaccionar con necrosis terminales, atrofiado y deformación de hojas. En condiciones de frío, las plantas pueden desarrollar manchas, enrojecimiento o amarilleo generalizado en hojas.

**MÉTODO DE MUESTREO:**

Deben vigilarse de forma especial las parcelas, almacenes o centros de expedición que posean material vegetal procedente de los países en los que existe constancia de la presencia de la enfermedad. Si durante las inspecciones que se llevan a cabo en dichos lugares se observan síntomas que pudieran indicar la presencia de la enfermedad, deberán tomarse muestras para su envío inmediato al Laboratorio de referencia.

**CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:**

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

**TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:**

Esta virosis puede ser detectada mediante el uso de plantas indicadoras o por métodos serológicos.

En cualquier caso, debe ser el Laboratorio de referencia el que determine las técnicas a seguir para la identificación del organismo sospechoso.

## Potato black ringspot virus (PBRSV)

(Virus de las manchas negras anulares de la patata)



Fuente: [www.eppo.org](http://www.eppo.org)

Foto nº 1: Síntomas avanzados de Potato black ringspot virus (PBRSV) sobre hojas de patata

**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

Reino: Virus

Grupo: Nepovirus

**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:***Solanum tuberosum***SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

- Mundial (excepto UE): Perú, y en general, zona andina.
- Unión Europea: no existe constancia de su presencia
- España: no existe constancia de su presencia

**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):**

No existen.

**SÍNTOMAS:**

Se desarrollan áreas amarillas brillantes en los márgenes de las hojas medias y altas de las plantas, y gradualmente se ensanchan para formar grandes manchas. La gran mayoría del follaje puede amarillear, sin llegar a atrofiarse ni deformarse. Las plantas infectadas inicialmente muestran manchas o anillos necróticos. La dispersión de la enfermedad puede producirse, a nivel local, por contacto entre plantas y posiblemente por insectos vectores, y a nivel internacional, por tubérculos o semillas verdaderas.

**MÉTODO DE MUESTREO:**

Deben vigilarse de forma especial las parcelas, almacenes o centros de expedición que posean material vegetal procedente de Perú o zona andina. Si durante las inspecciones que se llevan a cabo en dichos lugares se observan síntomas que pudieran indicar la presencia de la enfermedad, deberán tomarse muestras para su envío inmediato al Laboratorio de referencia.

**CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:**

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

**TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:**

Esta virosis puede ser detectada mediante el uso de plantas indicadoras o por métodos serológicos.

En cualquier caso, debe ser el Laboratorio de referencia el que determine las técnicas a seguir para la identificación del organismo sospechoso.

## Potato leaf roll virus (PLRV)

(Virus del enrollado de las hojas de la patata)



Fuente: [www.uidaho.edu](http://www.uidaho.edu)

Foto nº 1: Síntomas de deformación, amarilleo y curvada de hojas en patata, debidos a una infección de Potato leaf roll virus (PLRV)



Fuente: [www.uidaho.edu](http://www.uidaho.edu)

Foto nº 2: Sección transversal de un tubérculo de patata infectado por Potato leaf roll virus (PLRV). Puede observarse el típico síntoma de necrosis en forma de red.

**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

Reino: Virus

Grupo: Póterovirus

**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:***Solanum tuberosum***SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

No se dispone de datos sobre la localización geográfica de esta enfermedad

**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):**

No existen.

**SÍNTOMAS:**

La apariencia de los síntomas en un cultivo depende de si la contaminación ha tenido lugar en el mismo año, o si proviene de una infección del año anterior:

- Primer año de infección: las hojas de la parte alta de la planta se curvan ligeramente y amarillean. A veces se observa una pigmentación púrpura en los bordes de las hojas.
- Infección de segundo año: las hojas de la base están fuertemente curvadas, algunas veces con un borde malva. Los entrenudos se acortan, y la planta aparece amarillenta y algunas veces más pequeña de lo normal.

En los tubérculos de algunas variedades se observan necrosis internas, que adquieren aspecto reticular.

Existen varios áfidos vectores de la enfermedad.

**MÉTODO DE MUESTREO:**

Deben vigilarse de forma especial las parcelas, almacenes o centros de expedición que posean vegetales procedentes de los lugares de producción. Si durante las inspecciones que se llevan a cabo en dichos lugares se observan síntomas que pudieran indicar la presencia de la enfermedad, deberán tomarse muestras para su envío inmediato al Laboratorio de referencia.

**CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:**

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

**TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:**

Técnicas según el Laboratorio de referencia

## Potato spindle tuber viroid (PSTVD)

(Viroide de los tubérculos en huso de la patata)



Fuente: Department of Agriculture, Fisheries and Forestry.. Australian government

Foto n° 1: Diferencia entre tubérculos infectados por PSTVd (arriba) y sanos (abajo). Se observa que los infectados aparecen alargados y cilíndricos. Este síntoma aparece en infecciones muy avanzadas.



Fuente: Department of Agriculture, Fisheries and Forestry.. Australian government

Foto n° 2: Síntomas de PSTVd en planta de tomate. Se aprecian zonas púrpuras y cloróticas, así como deformación de hojas.



Fuente: Department of Agriculture, Fisheries and Forestry.. Australian government

Foto n° 3: Detalle de los síntomas de PSTVd en planta de tomate. Se aprecian zonas púrpuras y cloróticas, así como deformación de hojas.

**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

Reino: Virus

Grupo: Pospiviroid

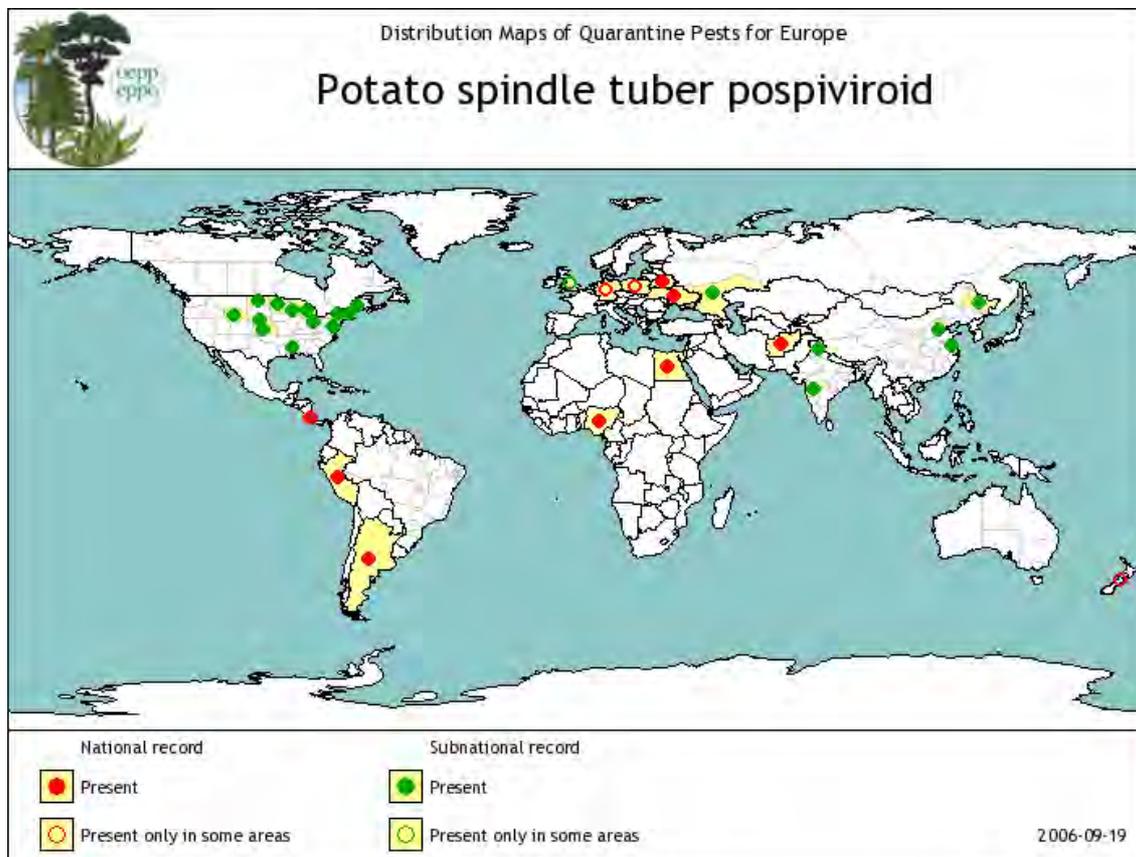
**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:**

*Lycopersicon lycopersicum*, *Capsicum annum*, *Solanum melongena*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* y ornamentales de la familia *Solanaceae*(\*).

(\*) El género *Brugmansia* y *Solanum jasminoides* son los hospedantes de la Comunidad donde se ha detectado el organismo y donde es necesario aplicar medidas para la producción y el traslado en la UE.

**SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

- Mundial (excepto UE): Bielorrusia, Rusia, Ucrania, Egipto, Nigeria, Afganistán, China, India, Argentina, Perú, Costa Rica, Canadá, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda.
- Unión Europea: limitada distribución en Polonia y alguna cita en Alemania.
- España: no existe constancia de su presencia.

**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):**

No existen.

**SÍNTOMAS:**

Los síntomas son bastante variables, sobre todo si se tiene en cuenta que existen razas suaves y severas. Las razas no severas causan síntomas poco evidentes. Los síntomas en razas severas dependen mucho del cultivar infectado y de las condiciones medioambientales, siendo más evidentes en condiciones de calor y alta intensidad lumínica. En la bibliografía suelen describirse los síntomas para patata y tomate:

- En patatas, los síntomas no suelen ser visibles durante la primera estación en que sucede la infección, pero se hacen progresivamente más severos. Las plantas infectadas se atrofan y adquieren una apariencia anormalmente vertical o erecta. El follaje cambia de color, volviéndose bien más luminoso o bien más oscuro de lo normal. Las hojas aparecen más pequeñas y deformadas. Los síntomas en tubérculos son más evidentes, pero tardan bastante más en aparecer (sólo aparecen tras varios ciclos de infección). Estos tubérculos son pequeños y deformados, volviéndose cilíndricos y alargados (en

forma de huso). Con frecuencia son puntiagudos y pueden aparecer grietas en tubérculos grandes. Los “ojos” son con frecuencia más prominentes y las brotaciones son menores que en tubérculos sanos.

- En tomates, los síntomas tardan bastante tiempo en desarrollarse, y con frecuencia no se hacen aparentes hasta cuatro o cinco semanas después de producirse la infección. Toda la planta se atrofia y toma un aspecto apretado, debido al acortamiento de los entrenudos. En ocasiones se forman brotes con forma ahusada. Los síntomas en hojas consisten en coloraciones amarillentas o púrpuras con deformaciones. Más adelante se producen necrosis en las venas de las hojas bajas y medias, que pueden finalmente morir. Las hojas más jóvenes permanecen en la planta, pero quedan reducidas de tamaño. Las flores abortan con frecuencia y se produce una maduración errática. Los frutos se hacen pequeños y duros y pueden volverse verde oscuros.

#### **MÉTODO DE MUESTREO:**

- **Lugar a observar en la planta o material vegetal requerido para la muestra:**

Al ser la muestra asintomática, no es necesario mirar en lugar alguno para la toma de muestras.

- **Dimensiones y forma de las muestras a recoger:**

Se realizará una inspección visual por la parcela y alrededores buscando síntomas sobre las plántulas. En caso de detectar síntomas sospechosos deberá tomarse muestras representativas de estos síntomas y enviarlos al laboratorio. Se recogerá la planta entera, en un porcentaje de muestreo del 1 por 1000.

- **Condiciones de conservación y transporte de la muestra:**

La muestra será transportada en una bolsa de plástico con etiquetado, conservándose entre 4 y 8 °C hasta su llegada al laboratorio (no se debe esperar más de 24 horas).

#### **CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:**

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

#### **TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:**

Los métodos más habituales de detección del patógeno son los testados sobre plantas indicadoras, la electroforesis de gel de poliacrilamida y los sondeos de ácidos nucleicos.

En cualquier caso, debe ser el Laboratorio de referencia el que determine las técnicas a seguir para la identificación del organismo sospechoso.



## Potato virus T (PVT)

### (Virus T de la patata)

#### TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:

Reino: Virus

Grupo: Trichovirus

#### HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:

*Solanum tuberosum*

#### SITUACIÓN GEOGRÁFICA:

- Mundial (excepto UE): Bolivia y Perú
- Unión Europea: no existe constancia de su presencia
- España: no existe constancia de su presencia

#### ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):

No existen.

#### SÍNTOMAS:

La mayoría de las plantas recién infectadas por el virus no presentan síntomas. En algunos cultivares aparecen ligeras necrosis vasculares y punteado clorótico, y en algunos casos, aparecen necrosis más severas. La dispersión de la enfermedad puede producirse, a nivel local, por polen y semillas, y a nivel internacional, por tubérculos o semillas verdaderas.

#### MÉTODO DE MUESTREO:

Deben vigilarse de forma especial las parcelas, almacenes o centros de expedición que posean vegetales procedentes de Bolivia y Perú. Si durante las inspecciones que se llevan a cabo en dichos lugares se observan síntomas que pudieran indicar la presencia de la enfermedad, deberán tomarse muestras para su envío inmediato al Laboratorio de referencia.

#### CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

#### TÉCNICAS DE DETECCIÓN:

Esta virosis puede ser detectada mediante el uso de plantas indicadoras o por métodos serológicos.

En cualquier caso, debe ser el Laboratorio de referencia el que determine las técnicas a seguir para la identificación del organismo sospechoso.



## Variedades A, M, S, V, X e Y no europeas de virus aislados de la patata (incluidas Yo, Yn e Yc)



Fuente: [www.inra.fr](http://www.inra.fr)

Foto n° 1: Mosaicos alternando zonas claras y oscuras en hoja de patata, motivados por Potato virus A (PVA).



Fuente: [www.plantdepommeeterre.org](http://www.plantdepommeeterre.org)

Foto n° 2: Planta de patata sana (izquierda) y afectada por Potato virus M (PVM)(derecha).



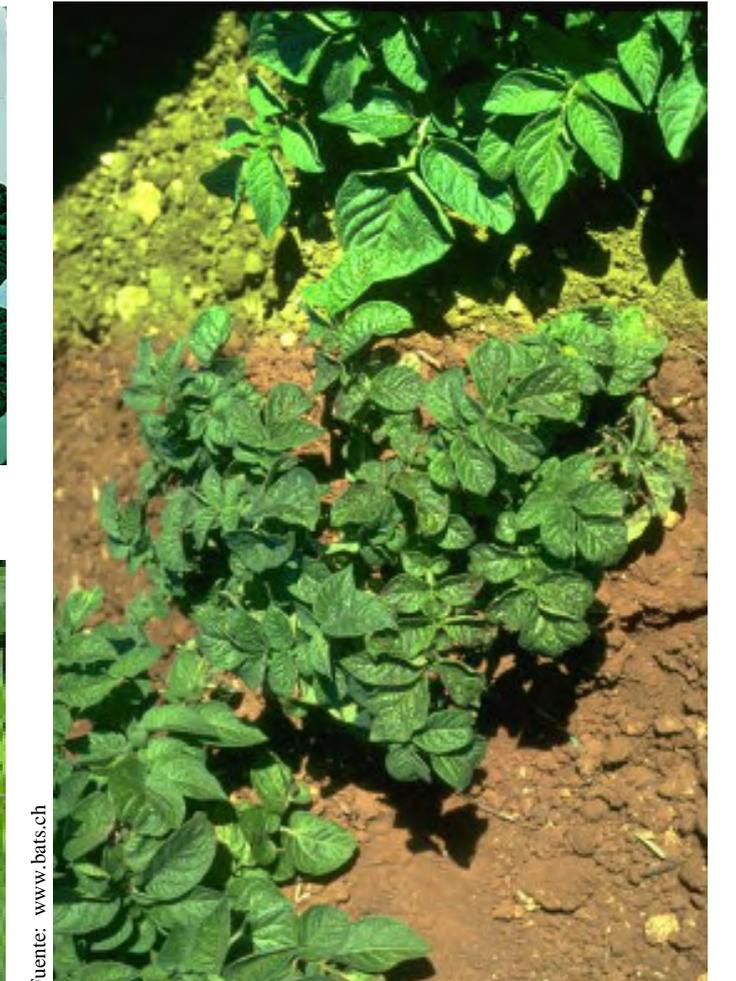
Fuente: [www.plantdepommeeterre.org](http://www.plantdepommeeterre.org)

Foto n° 3: Planta de patata sana (izquierda) y afectada por Potato virus S (PVS)(derecha).



Fuente: [www.dpiwve.tas.gov.au](http://www.dpiwve.tas.gov.au)

Foto n° 4: Planta de patata afectada por Potato virus X (PVX)



Fuente: [www.bats.ch](http://www.bats.ch)

Foto n° 5: Planta de patata afectada por Potato virus Y (PVY)

**TIPO DE ORGANISMO NOCIVO:**

Reino: Virus

Variedades no europeas de los virus PVA, PVM, PVS, PVV, PVX y PVY.

**HOSPEDANTES CITADOS EN LA LEGISLACIÓN:***Solanum tuberosum***SITUACIÓN GEOGRÁFICA:**

Se consideran únicamente aquellas variedades de los virus señalados de cuya presencia no existe constancia en la Unión Europea.

**ZONAS PROTEGIDAS (ZONAS ZP):**

No existen.

**SÍNTOMAS:**

Los síntomas son bastante variables en función de la severidad de la raza de cada virus, y del momento de la infección. Los síntomas más típicos provocados por estos virus son la aparición de mosaicos, con zonas cloróticas o más oscuras de lo normal, la reducción del tamaño de hojas y bulbos y el atrofiado o deformación de hojas. Todo esto revierte en una reducción de la producción. En el caso de PVY, PVA, PVS y PVV, la infección suele producirse con la participación de vectores, que suelen ser áfidos. En PVS, PVM y PVX en cambio, la infección se produce por contacto con material vegetal (bulbos) infectado, o por el uso de herramientas contaminadas.

**MÉTODO DE MUESTREO:**

Deben vigilarse de forma especial las parcelas, almacenes o centros de expedición que posean material vegetal procedente de Países Terceros. Si durante las inspecciones que se llevan a cabo en dichos lugares se observan síntomas que pudieran indicar la presencia de la enfermedad, deberán tomarse muestras para su envío inmediato al Laboratorio de referencia.

**CALENDARIO RECOMENDADO DE MUESTREO:**

ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC

**TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN:**

Técnicas según el correspondiente Laboratorio de referencia.

# **PROGRAMA NACIONAL DE INSPECCIÓN FITOSANITARIA**

## **PROGRAMA PARA LA APLICACIÓN DE LA NORMATIVA FITOSANITARIA DE LA PATATA**

**Manual de Procedimiento *Clavibacter  
michiganensis* spp *michiganensis* y *Ralstonia  
solanacearum***

**Diciembre 2010**



## **ÍNDICE**

	<b><u>Pág.</u></b>
<b>I. PROCEDIMIENTO GENERAL</b>	
<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2.- ANTECEDENTES .....</b>	<b>1</b>
<b>3.- ESTRUCTURA DEL MANUAL.....</b>	<b>3</b>
<b>4.-ÁMBITO DE APLICACIÓN Y VIGENCIA DEL PROGRAMA .....</b>	<b>4</b>
<b>5.- DEFINICIONES DE INTERÉS .....</b>	<b>4</b>
<b>6.- EXÁMENES OFICIALES SISTEMÁTICOS .....</b>	<b>6</b>
<b>6.1.- Desarrollo de los exámenes oficiales.....</b>	<b>6</b>
6.1.1.- EXÁMENES OFICIALES SISTEMÁTICOS SOBRE SOLANUM TUBEROSUM (PATATA).....	7
6.1.2.- EXÁMENES OFICIALES SISTEMÁTICOS SOBRE LYCOPERSICON LYCOPERSICUM (TOMATE).....	9
6.1.3.- EXÁMENES OFICIALES DERIVADOS DE LA EXISTENCIA DE RIESGO DE PROPAGACIÓN DE RALSTONIA SOLANACEARUM.....	9
6.1.4.- ACTAS DE INSPECCIÓN FITOSANITARIA .....	10
<b>6.2.- Programación de exámenes oficiales y notificación de resultados.....</b>	<b>11</b>
<b>7.- OBLIGACIÓN DE NOTIFICACIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>8.- PLAN DE CONTINGENCIA.....</b>	<b>12</b>
<b>8.1. - Medidas cautelares a adoptar en caso de sospecha de contaminación .....</b>	<b>12</b>
<b>8.2.- Confirmación del diagnóstico.....</b>	<b>15</b>
<b>8.3.- Notificación al Sector.....</b>	<b>18</b>
<b>8.4.- Medidas fitosanitarias a adoptar sobre el material contaminado .....</b>	<b>18</b>
<b>8.5.- Medidas aplicables para evitar la contaminación mediante patata de siembra.....</b>	<b>19</b>
<b>9.- PROHIBICIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>10.- EXCEPCIONES CON FINES CIENTÍFICOS.....</b>	<b>20</b>
<b>11.- MEDIDAS ADICIONALES .....</b>	<b>21</b>
<b>12.- INDEMNIZACIONES .....</b>	<b>21</b>

## II. DOCUMENTACIÓN ADICIONAL

- Plan de contingencia de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*
- Plan de contingencia de *Ralstonia (=Pseudomonas) solanacearum*

### ANEXOS DEL PROCEDIMIENTO GENERAL

**Anexo n° 1.a:** *Método de diagnóstico, detección e identificación de Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*

**Anexo n° 1.b:** *Método de diagnóstico, detección e identificación de Ralstonia solanacearum*

**Anexo n° 2:** *Estimación del número mínimo de muestras por Comunidad Autónoma*

**Anexos n° 3.a, 3.b y 3.c:** *Actas de Inspección Fitosanitaria en campo, en almacén y en instalaciones industriales respectivamente*

**Anexo n° 4:** *Notificación de los exámenes oficiales (Modelo para la presentación de los resultados)*

**Anexo n° 5:** *Proceso secuencial de las medidas a adoptar en el marco del Plan de contingencia*

**Anexo n° 6:** *Aviso de medidas provisionales para prevenir la enfermedad*

**Anexo n° 7:** *Conservación de las pruebas analíticas en caso de aparición de un brote sospechoso*

**Anexo n° 8:** *Elementos de investigación para determinar la extensión y origen de la contaminación*

**Anexo n° 9.a:** *Elementos a tener en cuenta para la determinación del alcance de la contaminación probable por Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus y Ralstonia solanacearum*

**Anexo n° 9.b:** *Elementos a tener en cuenta para la determinación de la posible propagación de Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus y Ralstonia solanacearum*

**Anexo n° 9.c:** *Notificación de la contaminación*

**Anexo n° 10.a: Proyecto de boletín de prensa (Podredumbre anular de la patata)**

**Anexo n° 10.b: Proyecto de boletín de prensa (Podredumbre parda de la patata)**

**Anexo n° 11.a: Medidas de aplicación sobre el material contaminado**

**Anexo n° 11.b: Medidas de aplicación sobre el material probablemente contaminado**

**Anexo n° 11.c: Medidas de aplicación en las zonas delimitadas debido a la contaminación por *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus***

**Anexo n° 11.d: Medidas de aplicación en las zonas delimitadas debido a la contaminación por *Ralstonia solanacearum***

**Anexo n° 12: Aviso de medidas para prevenir la enfermedad**

**Anexo n° 13: Medidas de aplicación en las plantas de transformación del "material vegetal indicado" declarado contaminado**

**Anexo n°14: Caso Práctico n°1**

**Anexo n° 15: Caso Práctico n°2**

**Anexo n° 16: Caso Práctico n°3**



# **I. PROCEDIMIENTO GENERAL**



## 1.- INTRODUCCIÓN

En el presente *Manual de Procedimiento* se pretende recoger las medidas que deben adoptarse contra *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* (necrosis bacteriana o podredumbre anular) y *Ralstonia solanacearum* (marchitamiento bacteriano o podredumbre parda), enfermedades de cuarentena en patata, con el fin de impedir su aparición, y en caso de que aparezcan, determinar su distribución y combatirlos con el fin de erradicarlos.

## 2.- ANTECEDENTES

La Directiva 2000/29/CEE, del Consejo de 8 de mayo, regula las medidas de protección contra la introducción en la Unión Europea de organismos nocivos para los vegetales y productos vegetales, y contra su propagación en el interior de la misma. Esta Directiva contempla dos bacteriosis de cuarentena en el cultivo de la patata: *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* (necrosis bacteriana o podredumbre anular) y *Ralstonia solanacearum* (marchitamiento bacteriano o podredumbre parda). En la legislación española, dicha directiva quedó transpuesta mediante el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero.

Como consecuencia de la aparición de algún foco en España de *C. michiganensis ssp. sepedonicus* y de *R. solanacearum*, se establecieron unos programas de erradicación y control para ambos organismos nocivos. El programa de erradicación y control para *C. michiganensis ssp. sepedonicus* es una adaptación a las particularidades españolas de la Directiva 93/85/CEE incorporada a la legislación española mediante la Orden Ministerial 22 de marzo de 1994. Para *R. solanacearum* se adoptó el programa de erradicación a través del Real Decreto 1644/1999, de 22 de octubre, transposición, a su vez, de la Directiva 98/57/CE.

Debido a la problemática señalada anteriormente, el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino propicia la realización de un programa único de erradicación y control, aceptado por todas las Comunidades

Autónomas implicadas, en base al artículo 15.2 de la Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de Sanidad Vegetal y al Real Decreto 1190/1998 que regula los programas nacionales de erradicación o control de organismos nocivos para los vegetales. En este sentido, en la actualidad existen programas nacionales de erradicación y control para *C. michiganensis ssp. sepedonicus* y para *R. solanacearum*.

En España, *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* (necrosis bacteriana o podredumbre anular) se detectó por primera vez en Castilla y León en 1994, concretamente en una plantación de patata de siembra ubicada en la provincia de Burgos. Desde entonces han ido apareciendo nuevos focos localizados, principalmente, en las provincias de Burgos y Palencia, así como casos aislados en otras Comunidades Autónomas, tales como Aragón (ya erradicada), Cantabria, Extremadura, Galicia, La Rioja y País Vasco.

En el caso de *Ralstonia solanacearum* (marchitamiento bacteriano o podredumbre parda), se describió por primera vez en España en la isla de La Palma. Desde 1996, hasta la actualidad, se han detectado nuevos focos muy localizados, en las Comunidades Autónomas de Canarias, Castilla y León, Galicia y País Vasco. La bacteria también ha sido encontrada en aguas de cuatro Comunidades Autónomas (Andalucía, Castilla-León, Castilla-La-Mancha y Extremadura).

La inspección Comunitaria sobre la aplicación en España de la normativa fitosanitaria referente al cultivo de la patata, que se llevó a cabo en el año 2004, puso de manifiesto la necesidad de que los agentes implicados en el sector tuviesen mayor conocimiento, tanto de esta normativa como de su forma de aplicación. Por ello, en el año 2005, se realizó un Manual de Procedimiento sobre la aplicación de la normativa fitosanitaria de la patata, que recogía toda la normativa aplicable, y explica la forma en que ésta debe desarrollarse desde el punto de vista práctico, detallándose cada paso necesario.

Posteriormente, como consecuencia de la Misión de Inspección Fitosanitaria efectuada por la Comisión Europea en noviembre de 2005, se puso en

evidencia la necesidad de profundizar en algunos aspectos del mismo con el fin de facilitar su comprensión e implementación por parte de las Comunidades Autónomas, por lo que se realizó una nueva versión del Manual que fue aprobada por el Comité Fitosanitario Nacional y posteriormente adoptada por las diferentes Comunidades Autónomas, de acuerdo con el compromiso existente con los inspectores comunitarios.

En los últimos años, se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de las enfermedades y en los métodos de detección e identificación, así como en la experiencia adquirida en el seguimiento y lucha contra los organismos objeto del presente manual. A raíz de estos cambios, se han modificado los anexos de la Directiva 93/85/CEE relativa al control de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* mediante la Directiva 2006/56/CE, e incorporados al ordenamiento jurídico interno con la Orden APA/718/2007. En relación al control de *Ralstonia solanacearum* regulado por la Directiva 98/57/CE se ha procedido a modificar sus anexos con la Directiva 2006/65/CE, incorporada a la legislación española en la Orden APA/719/2007.

Como consecuencia se considera necesario actualizar el presente manual para reflejar en él las modificaciones contempladas en la legislación.

### **3.- ESTRUCTURA DEL MANUAL**

En el presente *Manual de procedimiento* se pretende establecer un único programa para el seguimiento de las bacteriosis de cuarentena que afectan al cultivo de la patata, de acuerdo con la legislación vigente. Para este fin, y en aras de una mayor comprensión, el presente Manual se ha dividido en dos bloques:

- La primera parte establece el procedimiento general de actuación oficial, y recoge toda aquella información necesaria para la correcta aplicación de la normativa fitosanitaria. En esta parte se incluyen una serie de anexos, que tienen por objetivo el facilitar la labor del inspector fitosanitario. Es necesario resaltar que en algunos de los *Anexos* se

muestran modelos administrativos orientativos, en los que se explicita la mínima información requerida para cada uno de ellos, dejando abierta la posibilidad de añadir toda aquella información que cada Organismo competente considere necesaria.

- La segunda parte, incluye los planes de contingencia de los organismos nocivos.

#### **4.- ÁMBITO DE APLICACIÓN Y VIGENCIA DEL PROGRAMA**

Las medidas que se describen a continuación de acuerdo a la legislación vigente son de aplicación en todo el territorio nacional. En tanto la Comisión de las Comunidades Europeas no se pronuncie al respecto, la duración del programa se prevé ilimitada. En todo momento y como consecuencia de la situación de las enfermedades, el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino podrá introducir las modificaciones que se consideren necesarias o determinar su conclusión.

#### **5.- DEFINICIONES DE INTERÉS**

**Campo:** Parcela con límites definidos dentro de un lugar de producción

**Declaración oficial de contaminación:** Se trata de una resolución oficial que confirma la contaminación por un organismo nocivo en un lugar de producción, una vez finalizadas todas las pruebas reglamentarias en un laboratorio oficial (o bajo supervisión oficial), y habiéndose obtenido un resultado positivo para la presencia del organismo en alguna de las muestras analizadas.

**Extensión de la contaminación:** Área de propagación alcanzada por la enfermedad a partir de una/s fuente/s primaria/s de contaminación

**Fuente/s primaria/s de la contaminación:** Lugar/es donde se ha originado el brote de la enfermedad y desde el/los cual/es se extiende a otras zonas

**Lugar de producción:** Conjunto de campos o parcelas que se encuentran muy próximos y/o que comparten las mismas técnicas y medios de producción. Habitualmente se identifica el campo con la parcela y el lugar de producción con la explotación. No obstante, también pueden constituir un lugar de producción dos o más explotaciones (o partes de las mismas), muy cercanas y/o que comparten técnicas y medios de producción.

**“Material vegetal indicado”:** Se refiere a los hospedantes principales de las bacterias *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum*. Según la legislación, se trata de las plantas (incluidos los tubérculos), salvo las semillas verdaderas, de *Solanum tuberosum* (patata). En el caso concreto de *Ralstonia solanacearum*, se consideran también “material vegetal indicado” las plantas, salvo las semillas y los frutos, de *Lycopersicon lycopersicum* (tomate).

**Parcela:** Superficie continua de terreno geográficamente definida e inscrita en el Registro catastral a nombre de uno o más titulares

**Probable contaminación:** Posibilidad de que se haya podido extender una contaminación debido a alguna de las siguientes situaciones:

- compartir el mismo lote de siembra
- compartir la maquinaria
- contacto con los mismos medios que los vegetales contaminados (almacenes, vehículos, etc)
- riego o rociamiento de parcelas con aguas declaradas contaminadas (sólo en el caso de *Ralstonia solanacearum*)

**Solanáceas silvestres hospedantes (de *Ralstonia solanacearum*):** Existen varias especies silvestres de la familia *Solanaceae*, potencialmente hospedantes de la bacteria *Ralstonia solanacearum*, como *Solanum*

*dulcamara*, *Solanum nigrum*, *Datura estramonium*, etc. No obstante, entre todas ellas destaca la especie *Solanum dulcamara* (dulce amarga o dulcamara). Esta especie suele vivir junto a los cauces fluviales, y constituye un importante reservorio de bacterias en ríos o arroyos cuyas aguas han sido contaminadas.

**Sospecha de contaminación:** Posibilidad de que exista una contaminación que esté pendiente de confirmación oficial. La sospecha de contaminación puede ser por:

- observación visual de síntomas sospechosos
- prueba de inmunofluorescencia (IF) positiva
- información de la sospecha facilitada por otro organismo oficial o particular

**Zona delimitada:** Se trata de un área que se establece alrededor del lugar o lugares de producción declarados contaminados, teniendo en cuenta el alcance de la probable contaminación que haya sido determinado.

## 6.- EXÁMENES OFICIALES SISTEMÁTICOS

Para localizar la posible presencia de los organismos nocivos *Clavibacter michiganensis spp. sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum*, la legislación establece la realización de exámenes oficiales sistemáticos que se llevan a cabo sobre el "material vegetal indicado". También establece que debe realizarse una evaluación del riesgo de propagación de *Ralstonia solanacearum* para determinar otras posibles fuentes de contaminación y, en su caso, llevar a cabo los oportunos exámenes oficiales sobre otros materiales distintos del "material vegetal indicado".

### 6.1.- Desarrollo de los exámenes oficiales

Los Organismos Oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma a los que se hace referencia en el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, relativo

a las medidas de protección contra la introducción y difusión, en el territorio nacional y de la Comunidad Europea, de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia Países Terceros, y el Organismo competente de la Comunidad Autónoma de Canarias, llevarán a cabo anualmente exámenes oficiales sistemáticos para detectar la posible presencia de los organismos nocivos objeto de este Manual en el "material vegetal indicado" originario de su territorio. Estos exámenes oficiales deben basarse en la biología de los distintos organismos, así como en los sistemas de producción concretos que se utilicen en la Comunidad Autónoma de que se trate.

#### *6.1.1.- EXÁMENES OFICIALES SISTEMÁTICOS SOBRE SOLANUM TUBEROSUM (PATATA)*

Los exámenes oficiales deben ser planificados en función del destino de las patatas, debido al diferente riesgo de transmisión de las enfermedades citadas que existe para cada tipo de producción:

- Patatas de multiplicación (patatas de siembra destinadas a producir patatas de siembra): El control de este tipo de material es especialmente importante, pues su contaminación puede suponer la extensión a gran escala de alguna de las enfermedades citadas. Por este motivo, debe analizarse la totalidad de los lotes de patata de multiplicación en el almacén, anteriormente a la siembra de las mismas.
  
- Patatas de siembra (patatas destinadas a producir patatas de consumo): La contaminación de este tipo de material también supone un grave riesgo de dispersión a gran escala de enfermedades, aunque algo menor que en el caso anterior. Por esta razón, debe tomarse al menos una muestra de patatas de cada variedad cultivada por cada agricultor. Dicho muestreo debe llevarse a cabo al final del ciclo de obtención de las patatas de siembra o bien a la entrada en almacén de las mismas, con el fin de poder realizar los análisis antes de precintar los lotes de patatas de siembra. Además, cuando la toma de muestras se realice en campo, deben llevarse a cabo inspecciones visuales sobre los vegetales, que en

caso de detección de síntomas, deben incluir la extracción de tubérculos de las plantas sospechosas, y su posterior corte para detectar posibles síntomas internos. Cuando la toma de muestras se realice a la entrada en almacén, debe llevarse a cabo una inspección visual que incluya corte de tubérculos.

- Patatas de siembra procedentes de importación (patatas originarias de otros Estados de la UE, destinadas a producir patatas de consumo): Para controlar el riesgo de entrada en el territorio del Estado Español de los organismos nocivos citados, deben tomarse muestras conforme los comerciantes de patata comunican las entradas de estos lotes en su almacén, o bien tomando en cuenta otra información de la que se disponga.
- Patatas de consumo: Aunque el riesgo de dispersión a gran escala de patógenos es menor que en los casos anteriores, evidentemente también es necesario el control de este tipo de material. Para ello, deben realizarse inspecciones visuales en campo, aproximadamente a la mitad del ciclo productivo de las patatas de consumo, así como muestreos en las variedades más cultivadas en el territorio de las diferentes Comunidades Autónomas, en campo o en almacén, a lo largo de la segunda mitad del ciclo de cultivo.

La época recomendada para las inspecciones visuales y los muestreos, debe ser en cada zona, aquella que garantice que existen las máximas posibilidades de detección de los organismos nocivos citados.

Las muestras tomadas durante los exámenes oficiales que se acaban de describir deben ser enviadas al correspondiente laboratorio de diagnóstico. Los análisis de laboratorio deben realizarse conforme a los métodos pertinentes establecidos en los **Anexos nº 1.a y 1.b**.

En lo que se refiere al número mínimo de muestras a tomar en cada Comunidad Autónoma, éste debe ser establecido en función de la superficie cultivada, estructurándose en base a unos mínimos acordes con la media de

la Unión Europea. Tomando como referencia la media de muestras recogidas en la Unión Europea, que en el año 2003 fue de una muestra por cada 1,8 hectáreas, para patata de siembra, y de una muestra por cada 71 hectáreas, para patata de consumo (Fuente: *Report of a follow-up misión to Spain from 07 to 11 June 2004 on plant health in the potato sector - European Commission*), se ha elaborado el cuadro de número mínimo de muestreos que se presenta en el **Anexo nº 2**.

Es necesario destacar que el número de muestras establecido para patatas de siembra corresponde al número conjunto de muestras de patatas de multiplicación, de siembra y de siembra procedente de importación. Sobre la base del número mínimo de muestras a tomar para patatas de siembra, cada Comunidad Autónoma debe decidir sobre qué lotes muestrea, para lo cual debe dar prioridad a los productores de patatas de multiplicación, y en especial a los que producen patatas de multiplicación de las primeras generaciones (de prebase y de base).

La toma de muestras que se realice en almacén, debe efectuarse sobre una partida uniforme o lote, con una selección representativa de 200 tubérculos.

#### **6.1.2.- EXÁMENES OFICIALES SISTEMÁTICOS SOBRE LYCOPERSICON LYCOPERSICUM (TOMATE)**

Se debe realizar una inspección visual, al menos del cultivo en crecimiento, de plantas destinadas a la replantación para la utilización profesional, con la finalidad de detectar la posible presencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.

En el caso de detectar síntomas de la presencia de la enfermedad, deben tomarse muestras para su envío al laboratorio de diagnóstico, utilizando para ello el modelo recogido en el **Anexo nº 3**.

#### **6.1.3.- EXÁMENES OFICIALES DERIVADOS DE LA EXISTENCIA DE RIESGO DE PROPAGACIÓN DE RALSTONIA SOLANACEARUM**

Con objeto de determinar otras posibles fuentes de contaminación de *Ralstonia solanacearum* para el cultivo del "material vegetal indicado", los Organismos Oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma deben llevar a cabo una evaluación de riesgo y, salvo que no se detecte riesgo alguno de propagación durante dicha evaluación, deben efectuar, en las zonas productoras de dicho material, exámenes oficiales orientados específicamente a la detección de los citados organismos nocivos en:

- Plantas hospedantes distintas del "material vegetal indicado", tales como la berenjena (*Solanum melongena*), el pimiento (*Capsicum annum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), y las solanáceas silvestres hospedantes (ver definiciones de interés).
- Aguas de superficie y residuos líquidos vertidos por las instalaciones industriales de transformación o de embalaje (en las que se manipule el material indicado), y que se utilicen para regar el "material vegetal indicado".
- Otros materiales como el medio de cultivo, suelo, y residuos sólidos procedentes de las instalaciones industriales de transformación o embalaje.

Los exámenes oficiales deben ser efectuados, en el caso de las plantas hospedantes de los organismos distintas del "material vegetal indicado" y en el de las aguas, incluidos los residuos líquidos, aplicando métodos apropiados y, cuando proceda, tomando muestras y sometiénolas a análisis de laboratorio oficiales o bajo supervisión oficial. Cabe señalar que la toma de muestras de aguas, debe realizarse cuando la temperatura de las mismas sea igual o superior a 15°C. En cualquier caso, los análisis de laboratorio sobre aguas, deben realizarse conforme a los método pertinentes establecidos en el **Anexo nº1.b**.

En el caso de los otros materiales citados, dichos exámenes oficiales deben efectuarse utilizando métodos adecuados.

#### 6.1.4.- ACTAS DE INSPECCIÓN FITOSANITARIA

Los Organismos Oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma deben dejar constancia de la realización de los exámenes oficiales a través de las correspondientes actas de inspección fitosanitaria. En los **Anexos nº 3.a, 3.b y 3.c** se muestran las distintas actas de inspección fitosanitaria en función del lugar físico donde se lleve a cabo el examen oficial (en campo, en almacén o en instalaciones industriales, respectivamente).

## **6.2.- Programación de exámenes oficiales y notificación de resultados**

Los Organismos Oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma, a los que se hace referencia en el Real Decreto 58/2005 de 21 de enero, deben elaborar anualmente un programa en el que se determine el número, origen, clasificación y calendario de toma de muestras, así como los pormenores de los procedimientos de inspección, basándose en principios científicos y estadísticos sólidos, y en la biología de los organismos nocivos objeto de este Manual, teniendo en cuenta los sistemas concretos que se utilicen en cada Comunidad Autónoma para la producción del "material vegetal indicado" y, en su caso, de otras plantas hospedantes de dichos organismos.

Los detalles y resultados de los exámenes oficiales deben notificarse anualmente al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino , y éste, a su vez, a través del cauce correspondiente, a los demás Estados miembros y a la Comisión Europea, siguiendo, a tal efecto, las disposiciones recogidas en el **Anexo nº 4**. Estas notificaciones se presentarán, a más tardar, el 15 de mayo, salvo en el caso de patatas utilizadas para siembra en la propia explotación, que se presentarán, a más tardar, el 15 de agosto. Los detalles y resultados relativos a los cultivos se referirán a la producción del año anterior.

## **7.- OBLIGACIÓN DE NOTIFICACIÓN**

Los productores, los almacenes colectivos y los centros de expedición del "material vegetal indicado" deben notificar inmediatamente a los Organismos Oficiales de las Comunidades Autónomas en que estén situados sus parcelas o establecimientos, la aparición sospechosa o la presencia confirmada de alguno de los organismos objeto de este Manual en el material que produzcan, almacenen o comercialicen.

## **8.- PLAN DE CONTINGENCIA**

La sospecha de la presencia de un foco de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* o de *Ralstonia solanacearum*, y en su caso, la confirmación de la contaminación por cualquiera de estas dos bacterias, obligan a tomar una serie de medidas, con el fin de evitar la extensión de la enfermedad y de erradicar el foco localizado. Esta serie de medidas reciben el nombre de Plan de contingencia, y aparecen reflejadas de forma resumida en el diagrama de flujo que se presenta en el **Anexo nº 5**.

Por otro lado, y debido a la complejidad de la interpretación de la legislación vigente, se ha creído conveniente añadir unos casos prácticos a modo de ejemplo, que aparecen recogidos en los **Anexos nº 14, 15 y 16**

### **8.1. - Medidas cautelares a adoptar en caso de sospecha de contaminación**

Cuando en una Comunidad Autónoma se tenga sospecha de la presencia de cualquiera de los organismos nocivos objeto del presente Manual (sospecha de contaminación), a través de los exámenes oficiales, de las notificaciones pertinentes, o de cualquier otro medio, deben adoptarse una serie de medidas cautelares orientadas a confirmar o desmentir la presencia de la enfermedad y a evitar su extensión mientras se define la situación. Estas medidas son las siguientes:

- Confirmación o desmentido de la presencia del organismo nocivo en el foco bajo sospecha.

- Hasta tanto no se haya confirmado ni desmentido la presencia del organismo nocivo, prohibición de la circulación de las plantas y tubérculos de todos los cultivos, lotes o partidas de los que se hayan tomado las muestras, excepto bajo control oficial, y siempre que se compruebe que no existe ningún riesgo identificable de propagación de los organismos<sup>1</sup>. En este sentido, en el **Anexo nº 6** se adjunta un modelo de aviso al propietario y/o cultivador de la explotación o explotaciones bajo sospecha (“aviso de medidas provisionales”).
- Determinación de la fuente/s primaria/s de la sospecha de contaminación.
  - Establecimiento de medidas complementarias adecuadas basadas en el nivel de riesgo estimado, para evitar cualquier propagación de los organismos. Estas medidas podrán incluir el control oficial de la circulación del resto del “material vegetal indicado” dentro o fuera de las instalaciones relacionadas con la sospecha de contaminación.
  - Si existe riesgo de contaminación del “material vegetal indicado”, o de las aguas de superficie que procedan o se dirigen a otra Comunidad Autónoma o Estado Miembro (para el caso de *R. solanacearum*), la Comunidad Autónoma en la que se haya observado el presunto brote debe informar inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino del nivel de riesgo identificado, para que éste a su vez informe a los Estados Miembros

---

<sup>1</sup> El objeto de esta medida, recogida en el Artículo 4 (2) (ii) (a) de la Directiva del Consejo 93/85/CEE y de la Directiva del Consejo 98/57/CE, es prevenir la dispersión de la contaminación desde el lote “sospechoso”, mientras está en espera de los resultados finales del laboratorio. Por lo tanto, el agricultor no debe tener permiso para hacer manejo alguno con el lote “sospechoso”, excepto bajo control oficial. En este sentido, sólo se pueden contemplar excepciones, siempre que los Organismos Oficiales de control estimen que no hay riesgo de dispersión de la contaminación, para movimientos tales como el traslado del material a los laboratorios para su análisis o para su almacenamiento en condiciones de mayor seguridad, así como los movimientos resultantes de considerar el lote como “contaminado” antes de que el resultado haya sido confirmado finalmente por los análisis del laboratorio (teniendo presente la posibilidad de obtener un resultado final negativo del laboratorio, y sus posibles consecuencias legales). En ningún caso, y bajo ningún concepto, debe permitirse el movimiento del lote “sospechoso” bajo la consideración de “material probablemente contaminado”.

afectados. Las Comunidades Autónomas a las que se informe aplicarán las medidas preventivas que se consideren oportunas.

Para la consecución de estos objetivos, los representantes de los Servicios de Sanidad Vegetal y de Certificación de Patatas deben realizar una visita a la explotación o explotaciones bajo sospecha, con el fin llevar a cabo los siguientes cometidos:

- Obtener tanta información como sea posible, incluyendo la historia del cultivo, el o los orígenes de la semilla, cualquier uso compartido de la maquinaria y detalles de cualquier movimiento de patatas en la explotación.
- Localizar los cultivos cercanos de patata.
- Realizar un muestreo completo de todas las existencias de patata en la explotación, y si se considera oportuno, de aguas y de solanáceas silvestres hospedantes. Las muestras que sean recogidas durante los muestreos indicados deben ser analizadas en laboratorios oficiales o bajo supervisión oficial, con el fin confirmar o desmentir la presencia de los organismos. Los citados análisis de laboratorio deberán realizarse conforme a los métodos pertinentes establecidos en los **Anexos nº 1.a** y **1.b**, y de acuerdo con los criterios citados en el **Anexo nº 7**.
- Preparar un informe detallado de la visita.

Con posterioridad a la visita a la explotación o explotaciones bajo sospecha, debe concertarse una reunión de seguimiento, en la que podrán participar, según la organización de la Comunidad Autónoma, el organismo de Sanidad Vegetal, el laboratorio de diagnóstico y el servicio de certificación de patata correspondiente. Los puntos a tratar deben ser los siguientes:

1. Discusión del informe de la visita a la explotación o explotaciones bajo sospecha de contaminación
2. Recomendaciones para la ejecución de procedimientos de control:
3. Recomendaciones sobre los recursos requeridos
4. Asignación de las siguientes responsabilidades:

- Determinación de lugares que dispongan de métodos oficialmente autorizados para la eliminación de residuos.
- Localización en planos de los cultivos de patata cercanos
- Obtención de un listado de las explotaciones con relación clonal con las patatas sospechosas
- Obtención de un listado de explotaciones con patata de siembra que haya estado en contacto con las patatas bajo sospecha
- Obtención de un listado de las explotaciones que hayan empleado maquinaria en común con la explotación bajo sospecha
- Obtención de un listado de las explotaciones que empleen aguas del mismo origen
- Obtención de un listado de los lotes de tubérculos trasladados desde la explotación y de los lotes con los cuales es posible que hayan tenido contacto

5. Informe al Director General de la Comunidad Autónoma y al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

## 8.2.- Confirmación del diagnóstico

Si la presencia de cualquiera de los dos organismos nocivos, *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* o *Ralstonia solanacearum*, en una muestra tomada en cumplimiento de la Legislación vigente, fuera confirmada mediante análisis de laboratorios oficiales o bajo supervisión oficial, los Organismos Oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma deberán adoptar las siguientes medidas:

a) En el caso del "material vegetal indicado":

1. Se emprenderá una investigación para determinar la extensión y la fuente o fuentes primarias de la contaminación, con arreglo a las disposiciones del **Anexo nº 8** efectuando nuevos análisis de laboratorio oficiales o bajo supervisión oficial, como mínimo, en todas

- las existencias de patata de siembra relacionadas de forma clonal con las muestras cuyo diagnóstico positivo ha sido confirmado.
2. Se declararán contaminados la partida o el lote del "material vegetal indicado" de los que se haya tomado la muestra, así como la maquinaria, vehículos, almacenes, y cualesquiera otros objetos (incluido el material de embalaje) que hayan estado en contacto con el mismo. Asimismo, se declararán contaminados, en su caso, el lugar o lugares de producción en los que se haya cosechado el "material vegetal indicado", de los que proceda la muestra.
  3. Se determinará, con arreglo a las disposiciones del **Anexo nº 9.a**, el alcance de la contaminación que probablemente se haya producido por contactos anteriores o posteriores a la cosecha, por nexos de la producción, riego o por relaciones clonales con la contaminación declarada.
  4. Se delimitará una zona en función de la declaración de contaminación, del alcance de la contaminación probable y, con arreglo a las disposiciones del **Anexo nº 9.b**, de la posible propagación de los organismos nocivos.
- b) En el caso de los cultivos de plantas hospedantes de *Ralstonia solanacearum* distintas del "material vegetal indicado", tales como la berenjena (*Solanum melongena*), el pimiento (*Capsicum annum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), y las solanáceas silvestres hospedantes, en los que se haya identificado un riesgo para la producción de este último:
1. Se emprenderá una investigación para determinar la extensión y la fuente o fuentes primarias de la contaminación, efectuando (si procede) análisis de laboratorio oficiales o bajo supervisión oficial.
  2. Se declararán contaminadas las plantas de las que se hayan tomado muestras, y los análisis hayan arrojado un resultado positivo.
  3. Con respecto al "material vegetal indicado", se determinará el alcance de la contaminación probable, y se establecerá una Zona delimitada conforme a lo explicado en los puntos 3 y 4 del apartado a).

c) En el caso de las aguas de superficie (incluidos los vertidos de residuos líquidos procedentes de instalaciones industriales de transformación o envasado en las que se manipule el "material vegetal indicado") y en el de las solanáceas silvestres hospedantes de *Ralstonia solanacearum*, en las que por causa del riego o rociamiento, se haya identificado un riesgo para la producción del "material vegetal indicado":

1. Se emprenderá una investigación para determinar la extensión de la contaminación, realizando en los momentos oportunos un examen oficial de muestras de las aguas de superficie, y en su caso, de las solanáceas silvestres hospedantes del organismo.
2. Se declararán, en la medida que sea pertinente, contaminadas las aguas de superficie de las que se hayan tomado muestras.
3. Se determinará el alcance de la contaminación probable, y se delimitará una zona en función de la declaración de contaminación, y con arreglo a las disposiciones del **Anexo nº 9.b**, de la posible propagación de los organismos nocivos.

Las Comunidades Autónomas notificarán inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, a través del cauce correspondiente a los otros Estados Miembros y a la Comisión Europea, cualquier caso de contaminación declarada. La notificación referida incluirá los datos que se detallan en el **Anexo nº 9.c**.

Cuando el Estado Español sea mencionado en la notificación de contaminación confirmada por otros Estados miembros, las autoridades competentes de la/s Comunidad/s Autónoma/s implicadas deberán declarar la contaminación, determinar el alcance de la probable contaminación, y establecer una Zona delimitada acorde a lo ya mencionado en los párrafos anteriores.

El Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino debe registrar las explotaciones, los almacenes colectivos y los centros de explotación afectados.

### 8.3.- Notificación al Sector

La autoridad competente en Sanidad Vegetal de las diferentes Comunidades Autónomas debe informar puntualmente (utilizando los métodos que estime adecuados) a las personas y entidades implicadas en la producción de patatas, de la aparición en su territorio de cualquier brote infeccioso provocado por alguno de los organismos nocivos citados. En este sentido, en los **Anexos nº 10.a** y **10.b**, se adjuntan ejemplos de boletines de prensa, que pueden ser utilizados para los casos de aparición confirmada de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum* respectivamente.

### 8.4.- Medidas fitosanitarias a adoptar sobre el material contaminado

Cuando exista material, vegetal o no, que haya sido declarado contaminado, los Organismos Oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma deberán adoptar las siguientes medidas:

- Cuando se trate de "material vegetal indicado" declarado contaminado (de acuerdo al *punto 2* de la *letra a*) del *apartado 8.2*), prohibir su plantación y someterlo a alguna de las medidas recogidas en el **Anexo nº 11.a**.
- Cuando se trate de "material vegetal indicado" considerado probablemente contaminado (de acuerdo al *punto 3* de la *letra a*), al *punto 3* de la *letra b*) y al *punto 3* de la *letra c*) del *apartado 8.2*), prohibir su plantación y someterlo a alguna de las medidas recogidas en el **Anexo nº 11.b**.
- Cuando se trate de maquinaria, vehículos, naves, almacenes o unidades de éstos, y cualesquiera otros objetos, incluido el material de embalaje,

declarados contaminados (con arreglo al *punto 2* de la *letra a*) del *apartado 8.2*) o considerados probablemente contaminados (con arreglo al *punto 3* de la *letra a*) del *apartado 8.2*), serán destruidos o descontaminados, aplicando métodos apropiados conformes a lo expuesto en los **Anexos nº 11.a y 11.b**. Tras su descontaminación, todos estos objetos dejarán de considerarse contaminados.

- En la zona delimitada (con arreglo al *punto 4* de la *letra a*) y al *punto 3* de la *letra c*) del *apartado 8.2*), sin perjuicio de las medidas señaladas con anterioridad, se aplicarán una serie de medidas acordes con lo dispuesto en el **Anexo nº 11.c** (si el organismo que ha causado la contaminación es *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*) y con el **Anexo nº 11.d** (si se trata de *Ralstonia solanacearum*).

Las medidas fitosanitarias, ordenadas por los Organismos oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma, deben ser llevadas a cabo por el propietario del material afectado, bajo control oficial, para lo cual serán comunicadas al mismo mediante un "aviso de medidas para prevenir la enfermedad" (ver modelo en **Anexo nº 12** ). En el caso de que los afectados no ejecuten, en tiempo y forma, dichas medidas, la Comunidad Autónoma correspondiente procederá a ejecutarlas, con sus propios medios o empleando servicios ajenos, cargando los gastos correspondientes a los interesados, cuyo importe podrá ser exigido por vía de apremio, con independencia de las sanciones a que hubiere lugar.

Las Comunidades Autónomas notificarán, anualmente, los detalles de las medidas adoptadas sobre el material contaminado, al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, a través del cauce correspondiente a los otros Estados Miembros y a la Comisión Europea.

## **8.5.- Medidas aplicables para evitar la contaminación mediante patata de siembra**

Las patatas de siembra deben reunir los requisitos contemplados en el Real Decreto 58/2005 y proceder, en línea directa, de patatas que, habiéndose obtenido en el marco de un programa oficialmente aprobado, hayan dado resultados negativos en cuanto a la presencia de los organismos nocivos objeto del presente Manual, en análisis oficiales u oficialmente supervisados en los que se haya utilizado el método pertinente de los recogidos en los **Anexos nº 1.a y 1.b**.

Los análisis mencionados deben ser realizados de acuerdo a los siguientes criterios:

- Cuando se haya confirmado la presencia de alguno de los organismos nocivos objeto del presente Manual en la producción propia de patata de siembra, se debe analizar:
  - el material propagado anteriormente, incluida la selección clonal inicial y, sistemáticamente, los clones de patatas de siembra de base, o
  - cuando se haya demostrado que no existe relación clonal, el material propagado anteriormente, incluida la selección clonal inicial, o todos los clones de patatas de siembra de base.
  
- En el resto de casos, se debe analizar:
  - muestras representativas del material propagado anteriormente o de las patatas de siembra de base o cada una de las plantas de la selección clonal inicial.

## **9.- PROHIBICIONES**

Se prohíbe la conservación y manipulación de los organismos nocivos objeto del presente Manual.

## **10.- EXCEPCIONES CON FINES CIENTÍFICOS**

Sin perjuicio de las disposiciones del Real Decreto 58/2005, se podrán autorizar excepciones a lo dispuesto en el *apartado 8* del presente Manual,

de conformidad con las normas establecidas para la realización de pruebas e investigaciones científicas o de estudios en materia de selección de variedades en el Real Decreto 401/1996, de 1 de marzo, y en el Real Decreto 39/1998, de 16 enero, por los que se establecen las condiciones para la introducción en el territorio nacional de determinados organismos nocivos, vegetales, productos vegetales y otros objetos, con fines de ensayo, científicos y para la actividad de selección de variedades.

## **11.- MEDIDAS ADICIONALES**

Los Organismos oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma podrán adoptar las medidas complementarias o más estrictas que sean necesarias para combatir los organismos nocivos objeto del presente Manual o impedir su propagación, siempre que tales medidas se ajusten a las disposiciones del Real Decreto 58/2005.

Las Comunidades Autónomas notificarán los detalles de las medidas adicionales adoptadas, al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, a través del cauce correspondiente a los otros Estados Miembros y a la Comisión Europea.

## **12.- INDEMNIZACIONES**

Se aplicará el sistema de indemnizaciones previsto en el artículo 18 del Real Decreto 1190/1998, de 12 de junio, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación o control de organismos nocivos de los vegetales aún no establecidos en el territorio nacional.

No recibirán indemnización, ni los gastos ocasionados ni el material destruido en aplicación de una medida oficial, cuando el propietario de los vegetales o productos vegetales afectados haya incumplido la normativa vigente y, especialmente, lo determinado en el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, relativo a las medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Unión Europea de organismos

nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia Países Terceros.

En el caso de que el afectado por la contaminación de un lote suministrado por un productor, almacenista u operador que hubiera incumplido lo determinado en la legislación vigente, percibiera indemnización por parte de cualquiera de estos sujetos, y por parte de la Administración, reembolsará a la Administración la indemnización percibida.

El Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, dentro de los límites establecidos por los créditos disponibles para estos fines, participará, con cargo a sus presupuestos, en la cuantía del 50 % de los gastos ocasionados en la ejecución del programa.

## **ANEXOS DEL PROCEDIMIENTO GENERAL**



## **ANEXO N° 1.A: MÉTODO DE DIAGNÓSTICO, DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA NECROSIS BACTERIANA, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS***

### **ÁMBITO DE APLICACIÓN DEL MÉTODO**

El método expuesto describe diversos procedimientos relacionados con:

- i) el diagnóstico de la necrosis bacteriana en tubérculos y plantas de patata,
- ii) la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* en muestras de tubérculos y plantas de patata,
- iii) la identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*).

### **PRINCIPIOS GENERALES**

Los apéndices recogen protocolos optimizados para los distintos métodos, reactivos validados y datos relativos a la preparación de los materiales utilizados en las pruebas y de los materiales de control. El apéndice 1 incluye una lista de los laboratorios que participaron en la optimización y la validación de los protocolos.

Dado que los protocolos entrañan la detección de un organismo sujeto a cuarentena e incluirán la utilización de cultivos viables de *C. m.* subsp. *sepedonicus* como materiales de control, será necesario ejecutar los procedimientos en las condiciones de cuarentena apropiadas con las instalaciones necesarias para el desecho de los residuos y contando con los permisos pertinentes emitidos por las autoridades oficiales responsables de la cuarentena fitosanitaria.

Los parámetros de prueba deben garantizar la detección coherente y reproducible de los niveles de *C. m.* subsp. *sepedonicus* en los límites fijados por los métodos seleccionados.

Es esencial una preparación precisa de los controles positivos.

El hecho de ejecutar las pruebas de acuerdo con los límites exigidos implica también la utilización de los ajustes correctos, el mantenimiento y la calibración del equipo, una cuidadosa manipulación y conservación de los reactivos, y la aplicación de todas las medidas destinadas a evitar la contaminación entre las muestras, como, por ejemplo, la separación de los controles positivos de las muestras de prueba. Se deben aplicar normas relativas al control de la calidad con el fin de evitar errores administrativos y de otro tipo, especialmente por lo que se refiere al etiquetado y la documentación.

Toda aparición sospechosa, entraña un resultado positivo en las pruebas de diagnóstico o de selección realizadas con una muestra tal como se especifica en los diagramas de flujo.

Si en la primera prueba de selección (IF o PCR/FISH) se obtiene un resultado positivo, puede sospecharse la contaminación con *C. m. subsp. sepedonicus* y se debe efectuar una segunda prueba de selección. Si el resultado de la segunda prueba de selección es positivo, la sospecha se confirma (aparición sospechosa) y las pruebas deben proseguir de acuerdo con el método. En el caso de que el resultado de la segunda prueba de selección sea negativo, la muestra no se considerará contaminada con *C. m. subsp. sepedonicus*.

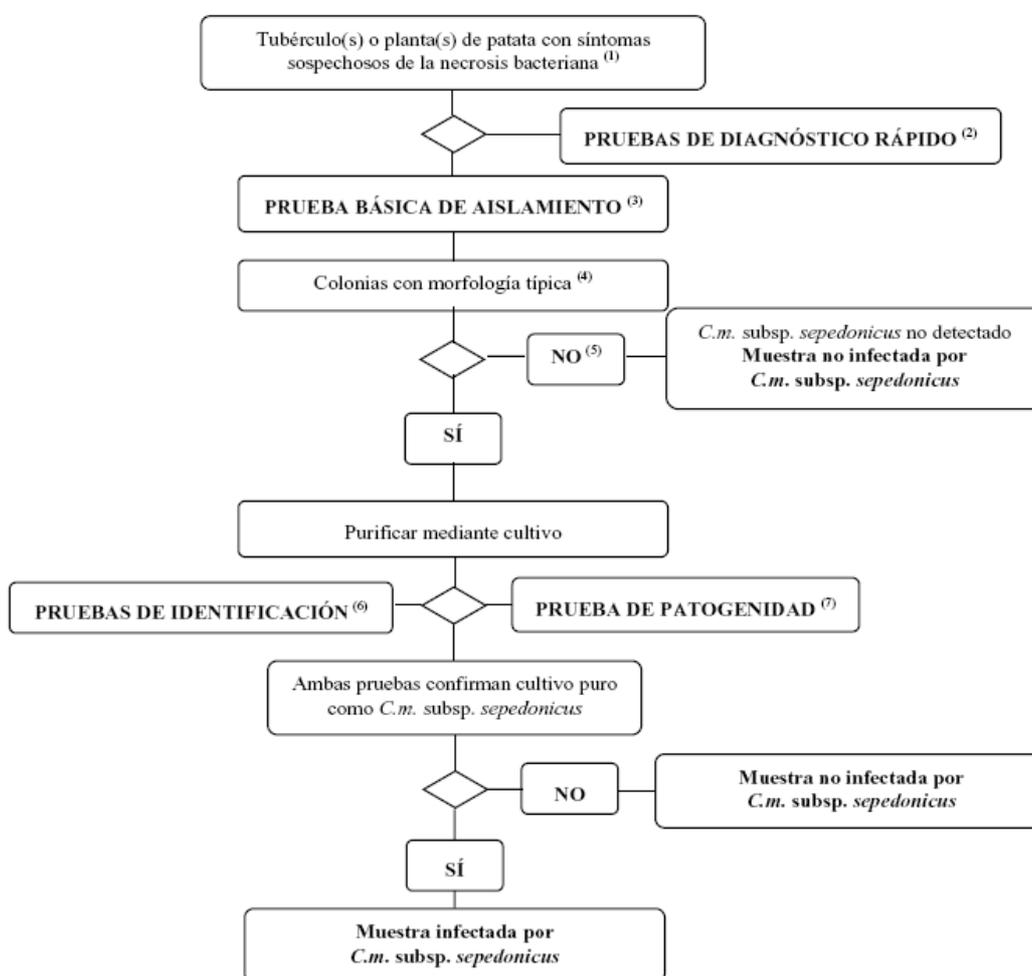
Por tanto, los resultados positivos de una prueba IF, se definen mediante una lectura positiva en una prueba IF confirmada por una segunda prueba de selección (PCR/FISH).

La presencia confirmada requiere el aislamiento y la identificación de un cultivo puro de *C. m. subsp. sepedonicus* con confirmación de su patogenicidad.

## 1. PRESENTACIÓN EN DIAGRAMAS DE FLUJO

### 1.1 Método de detección para el diagnóstico de la necrosis bacteriana en tubérculos y plantas de patata que presentan síntomas de necrosis bacteriana

Este protocolo de análisis está destinado a los tubérculos y plantas de patata que muestran síntomas típicos o sospechosos de necrosis bacteriana. Incluye una prueba de selección rápida, el aislamiento del patógeno del tejido vascular infectado en un medio de diagnóstico y, en caso de resultado positivo, la identificación del cultivo como *C. m. subsp. Sepedonicus*.



(1). El punto 2 recoge una descripción de los síntomas.

(2). Se consideran adecuadas las pruebas siguientes:

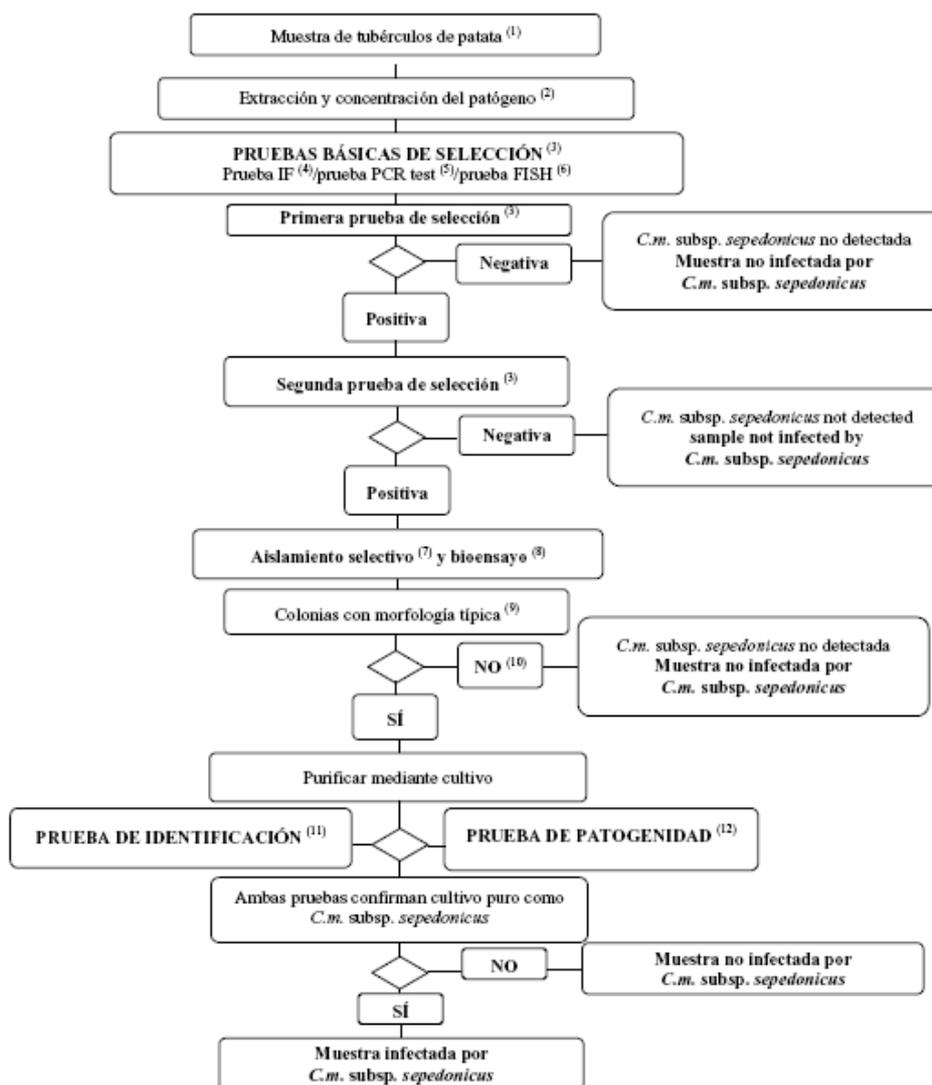
-la prueba IF (punto 4),

-la prueba PCR (punto 5), -la prueba FISH (punto 6).

- (3). Aunque el aislamiento de patógeno a partir de material vegetal con síntomas típicos mediante dilución de placas es sencillo, el aislamiento puede fallar en estados avanzados de infección, las bacterias saprofitas que crecen en el tejido enfermo pueden enmascarar o inhibir el patógeno en el medio de aislamiento. Se recomienda, por tanto, utilizar medios selectivos y no selectivos, preferiblemente MTNA (punto 8) o la prueba de bioensayo (punto 7).
- (4). El punto 8 recoge una descripción de la morfología típica de las colonias.
- (5). Si los resultados de la prueba de aislamiento son negativos, pero los síntomas de la enfermedad son los típicos, deberá repetirse el aislamiento.
- (6). La identificación fiable de un cultivo puro de *C.m. subsp. sepedonicus* se consigue utilizando las pruebas que se enumeran en el punto 9.
- (7). En el punto 10 se describe la prueba de patogenicidad.

## **1.2 Método de detección e identificación de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* en muestras de tubérculos de patata asintomáticos**

Este protocolo de análisis se destina a la detección de infecciones latentes en tubérculos de patata asintomáticos mediante al menos dos pruebas de selección basadas en distintos principios biológicos que, de ser positivas, deberán complementarse con el aislamiento del patógeno; en caso de aislamiento de colonias típicas, se procede a continuación a la identificación de un cultivo puro como *C. m. subsp. sepedonicus*. El hecho de obtener resultados positivos sólo en una de las pruebas no es suficiente para considerar la muestra sospechosa. Las pruebas de selección y aislamiento deben permitir límites de detección de 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> células por ml de precipitado resuspendido, incluidos como controles positivos en cada serie de pruebas.



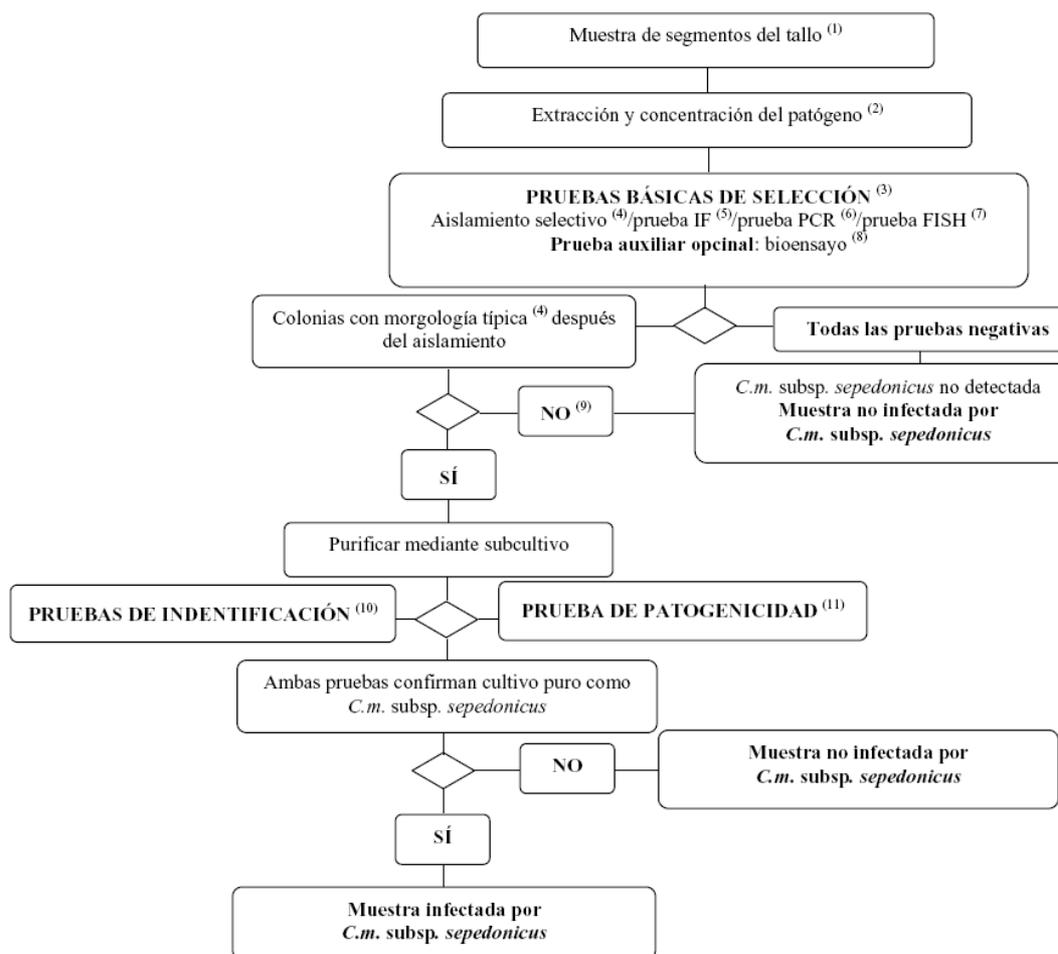
- (1) El tamaño normal de la muestra es de 200 tubérculos, aunque el procedimiento puede adaptarse para muestras con menos tubérculos en el caso de que no se disponga de 200.
- (2) Los métodos de extracción y concentración del patógeno se describen en el punto 3.1.
- (3) En el caso de que al menos dos de las pruebas basadas en principios biológicos diferentes proporcionen resultados positivos, habrá de procederse al aislamiento y la confirmación. Debe realizarse como mínimo una prueba de selección. Cuando el resultado de esta prueba sea negativo, la muestra se considerará negativa. En el caso de que el resultado de esta prueba sea positivo, será necesario realizar dos o

más pruebas de selección basadas en principios biológicos diferentes con el fin de verificar el primer resultado positivo. Sí la segunda prueba o el resto de las pruebas proporcionan resultados negativos, la muestra se considerará negativa y no será necesario llevar a cabo más pruebas.

- (4) Prueba de inmunofluorescencia (IF}. Para la prueba de selección IF debe utilizarse siempre un anticuerpo policlonal, los anticuerpos monoclonales adicionales pueden proporcionar una mayor especificidad (véase el punto 4).
- (5) Prueba PCR. Deben utilizarse reactivos y protocolos PCR convenientemente validados (véase el punto 6).
- (6) Prueba FISH. Deben utilizarse reactivos y protocolos convenientemente validados (véase el punto 5).
- (7) Aislamiento selectivo. Con el medio MTNA o el medio NCP-88 y una dilución al 1/100 del precipitado resuspendido, es en muchos casos un método adecuado para el aislamiento directo de *C. m. subsp. sepedonicus*. Entre 3 y 10 días después de la siembra selectiva pueden obtenerse colonias típicas. Posteriormente se puede purificar e identificar el patógeno. Para poder aprovechar plenamente el potencial de la prueba, es necesario preparar con cuidado las cuñas de la parte basal a fin de evitar que otras bacterias secundarias asociadas al tubérculo de la patata, que compitan con *C. m. subsp. sepedonicus* en el medio, puedan afectar al desarrollo del patógeno. Si la prueba de la siembra selectiva no resulta efectiva, se deberá proceder al aislamiento a partir de las plantas utilizadas para el bioensayo (véase el punto 8).
- (8) La prueba de bioensayo se utiliza para el aislamiento de *C. m. subsp. sepedonicus* a partir de precipitado de extracto de patatas mediante el enriquecimiento selectivo de la bacteria en berenjenas (*Solanum melongena*). Exige que las condiciones de incubación sean óptimas, según se especifican en este método. Es muy probable que las bacterias inhibidoras de *C. m. subsp. sepedonicus* en los medios MTNA o NCP-88 no interfieran en esta prueba (véase el punto 7).
- (9) En el punto 8 se describe la morfología típica de las colonias.

- (10) Los cultivos o bioensayos pueden fallar debido a la competencia de las bacterias saprofitas o a la inhibición provocada por las mismas. En el caso de que se obtengan resultados positivos en las pruebas de selección pero negativos en las de aislamiento, se deberán repetir las pruebas de aislamiento a partir del mismo precipitado o utilizando además tejido vascular de la parte basal de tubérculos cortados de la misma muestra y, si fuese necesario, con otras muestras.
- (11) La identificación fiable de cultivos puros supuestamente de *C. m. subsp. sepedonicus* se consigue utilizando las pruebas que se describen en el punto 9.
- (12) En el punto 10 se describe la prueba de patogenicidad.

### 1.3 Método de detección e identificación de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* en muestras de plantas de patata asintomáticas



- (1) Véase el punto 3.2 para obtener información sobre los tamaños recomendados de la muestra.
- (2) Los métodos de extracción y concentración del patógeno se describen .en el punto 3.2.
- (3) En el caso de que al menos dos de las pruebas basadas en principios biológicos diferentes proporcionen resultados positivos, habrá de procederse al aislamiento y la confirmación. Debe realizarse como mínimo una prueba de selección. Cuando el resultado de la prueba sea negativo, la muestra se considerará negativa. En el caso de que el resultado de esta prueba sea positivo, será necesario realizar dos o más pruebas de selección basadas en principios biológicos diferentes con el fin de verificar el primer resultado positivo. Si la segunda prueba o el resto de las pruebas proporcionan resultados negativos, la muestra se considerará negativa y no será necesario llevar a cabo más pruebas.
- (4) En el punto 8 se describe la prueba de aislamiento selectivo y la morfología típica de las colonias.
- (5) En el punto 4 se describe la prueba IF.
- (6) En el punto 6 se describe la prueba PCR.
- (7) En el punto 5 se describe la prueba FISH.
- (8) En el punto 7 se describe la prueba de bioensayo.
- (9) Los cultivos o bioensayos pueden fallar debido a la competencia de las bacterias saprofitas o a la inhibición provocada por las mismas. En el caso de que se obtengan resultados positivos en las pruebas de selección pero negativos en las de aislamiento, se deberán repetir las pruebas de aislamiento y, si fuese necesario, efectuar pruebas con otras muestras.
- (10) La identificación fiable de cultivos puros supuestamente de *C. m. subsp. sepedonicus* se consigue utilizando las pruebas que se describen en el punto 9.
- (11) En el punto 10 se describe la prueba de patogenicidad.

## **2. EXAMEN VISUAL PARA DETECTAR SÍNTOMAS DE NECROSIS BACTERIANA**

### **2.1 Plantas de patata**

En las condiciones climáticas europeas, los síntomas se presentan rara vez en el campo y con frecuencia sólo al final de la temporada. Por otra parte, en numerosos casos, otras enfermedades, la senescencia o los daños mecánicos enmascaran los síntomas o se confunden con ellos. Por tanto, puede ser fácil pasar por alto los síntomas en las inspecciones de campo. Los síntomas de marchitamiento son muy distintos de los de la podredumbre parda; el marchitamiento es normalmente un proceso lento y se limita en principio a los bordes de las hojas. El crecimiento de las hojas jóvenes infectadas no suele detenerse, aunque sea más lento en las zonas infectadas. Esto hace que las hojas tengan formas extrañas. Las hojas afectadas por el bloqueo de los tejidos vasculares de la parte baja del tallo desarrollan con frecuencia zonas inteneviales cloróticas amarillas o anaranjadas. Los folíolos, hojas e incluso tallos infectados pueden llegar a morir. Con frecuencia las hojas y tubérculos muestran simplemente un tamaño reducido. En algunos casos las plantas se atrofian. Se pueden consultar fotografías en color de algunos de estos síntomas en el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

### **2.2 Tubérculos de patata**

Los primeros síntomas consisten en un ligero aspecto vítreo o traslúcido del tejido, sin ablandamiento, en torno al sistema vascular, en especial cerca de la parte basal. La corona vascular de la parte basal puede tener un color ligeramente más oscuro de lo normal. El primer síntoma claramente detectable consiste en que la corona vascular adquiere una coloración amarillenta y al comprimir suavemente el tubérculo emergen de los vasos unos exudados de aspecto lechoso. Dicho exudado contiene millones de bacterias. Se puede producir el oscurecimiento del tejido vascular y los síntomas que presentan los tubérculos en esta fase son similares a los de la podredumbre parda provocada por *Ralstonia solanacearum*. Al principio, estos síntomas pueden limitarse a una parte de la corona, no

necesariamente cerca de la parte basal, y pueden extenderse posteriormente a la totalidad de la corona.

A medida que la infección progresa, se produce destrucción de tejido vascular; la zona cortical externa puede separarse de la zona cortical interna. En las fases avanzadas de la infección, se producen grietas en la superficie del tubérculo, que suelen tener un color pardo rojizo en los bordes. Recientemente se han producido varios casos en Europa en los que la zona cortical central se ha podrido al mismo tiempo que la corona vascular provocando una invasión secundaria con oquedades y necrosis interna.

Los síntomas pueden verse enmascarados por una invasión secundaria fúngica o bacteriana que puede hacer difícil, o incluso imposible, diferenciar los síntomas de necrosis bacteriana avanzada de otras necrosis de los tubérculos. Pueden presentarse síntomas atípicos. Se pueden consultar fotografías en color de algunos de estos síntomas en el sitio web:

<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

### **3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

#### **3.1 Tubérculos de patata**

- El tamaño normal de la muestra es de 200 tubérculos por ensayo. Para realizar un muestreo más intensivo es preciso llevar a cabo más pruebas con muestras de este tamaño. El hecho de disponer de un número mayor de tubérculos en la muestra puede provocar la inhibición o dificultar la interpretación de los resultados. No obstante, el procedimiento puede adaptarse convenientemente a muestras formadas por un número menor de tubérculos en el caso de que no se disponga de 200.
- La validación de todos los métodos de detección descritos más adelante se basa en los ensayos realizados con muestras de 200 tubérculos.
- El extracto de patata descrito a continuación puede emplearse también para la detección de la bacteria de la podredumbre parda de la patata, *Ralstonia solanacearum*.

Pretratamiento opcional previo a la preparación de la muestra: Lavar los tubérculos. Utilizar desinfectantes (cuando se vaya a efectuar la prueba PCR, la desinfección con compuestos de cloro puede interferir en la extracción de ADN del patógeno) y detergentes adecuados para cada muestra. Secar los tubérculos al aire. Este procedimiento de lavado resulta particularmente útil (aunque no necesario) en el caso de muestras con exceso de tierra y cuando se vaya a efectuar una prueba PCR o un procedimiento de aislamiento directo.

**3.1.1** Quitar la epidermis de la parte basal de cada tubérculo con un bisturí o un cuchillo limpio y desinfectado, de modo que el tejido vascular quede a la vista. Extraer cuidadosamente una pequeña cuña de tejido vascular de la parte basal y el mínimo volumen posible de tejido no vascular.

Véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

Nota: Retirar los tubérculos que presenten síntomas sospechosos de necrosis bacteriana y analizarlos separadamente. En el caso de que se observen síntomas sospechosos de necrosis bacteriana durante la extracción de la cuña de la parte basal, deberá realizarse una inspección visual del tubérculo una vez cortado a la altura de la parte basal. Todo tubérculo cortado que presente síntomas sospechosos deberá suberizarse a temperatura ambiente durante dos días y almacenarse en cuarentena (a una temperatura de entre 4 y 10 °C) hasta que concluyan todos los ensayos.

**3.1.2** Introducir las cuñas de la parte basal en recipientes desechables que no hayan sido utilizados previamente y que puedan cerrarse y/o sellarse (en el caso de que estos recipientes vayan a volver a utilizarse deberán limpiarse y desinfectarse concienzudamente con compuestos de cloro). Preferiblemente, las cuñas deben procesarse inmediatamente. Si esto no fuese posible, deberán almacenarse en el recipiente, sin tampón, y conservarse por un período máximo de 72 horas refrigeradas o de 24 horas a temperatura ambiente. El secado y la suberización de las cuñas, así como

el crecimiento de saprofitos durante el almacenamiento, pueden dificultar la detección de la bacteria causante de la necrosis bacteriana.

**3.1.3** Procesar las cuñas basales por uno de los métodos siguientes:

- a) bien añadir la solución de tampón de extracción (apéndice 3) en cantidad suficiente para que cubra las cuñas (aproximadamente 40 ml) y agitar en un agitador rotatorio (50-100 rpm) durante 4 horas a una temperatura inferior a 24 °C o durante 16 a 24 horas si están refrigeradas;
- b) bien homogeneizar las cuñas con solución de tampón de extracción (apéndice 3) en cantidad suficiente (aproximadamente 40 ml), ya sea mediante una trituradora (por ejemplo, Waring o Ultra Thurax) o machacándolas en una bolsa de maceración desechable sellada (por ejemplo, bolsas resistentes Stomacher o Bioreba de polietileno de 150 mm × 250 mm, esterilizadas por radiación) utilizando un mazo de caucho o un aparato triturador adecuado (por ejemplo, Homex).

Nota: El riesgo de contaminación cruzada de las muestras es alto cuando éstas se homogeneizan mediante una trituradora. Se debe actuar con precaución para evitar la generación de aerosoles o el vertido durante el proceso de extracción. Es preciso asegurarse de que se esterilizan las cuchillas de la trituradora y los recipientes que vayan a utilizarse para cada muestra. Si se va a realizar la prueba PCR, es preciso evitar que existan restos de ADN en los recipientes o el aparato triturador. Cuando se vaya a efectuar la prueba PCR se recomienda la trituración en bolsas desechables y la utilización de tubos desechables.

**3.1.4** Decantar el sobrenadante. Si presenta un aspecto excesivamente turbio, clarificarlo centrifugándolo a baja velocidad (a 180 g como máximo, durante 10 minutos, a una temperatura entre 4 y 10 °C) o mediante filtración al vacío (40-100 µm), lavando el filtro con solución adicional (10 ml) de tampón de extracción (apéndice 3).

**3.1.5** Concentrar la fracción bacteriana mediante centrifugación a 7.000 g durante 15 minutos (o a 10.000 g durante 10 minutos) a una temperatura entre 4 y 10 °C y descartar el sobrenadante sin perturbar el precipitado.

**3.1.6** Resuspender el precipitado en un 1,5 ml de tampón de precipitado (apéndice 3). Utilizar 500 µl para la prueba de *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl para *Ralstonia solanacearum* y 500 µl a efectos de referencia. Añadir glicerol estéril en una concentración final de 10-25 % (v/v) a los 500 µl de la alícuota de referencia y a la alícuota restante de cada prueba, homogeneizar por agitación y guardar a una temperatura entre - 16 y - 24 °C (semanas) o entre - 68 y - 86 ° C (meses). Mantener las alícuotas de la prueba a una temperatura comprendida entre 4 y 10 °C durante los ensayos.

No es recomendable congelar y descongelar el extracto en repetidas ocasiones. Si fuese preciso transportar el extracto, es conveniente asegurarse de que la entrega se efectúa en una caja refrigerada en el plazo de 24 a 48 horas.

**3.1.7** Es imprescindible que todos los controles y muestras positivas de *C. m. subsp. sepedonicus* se procesen por separado, a fin de evitar la contaminación. Esto se aplica a las preparaciones para IF y a todas las pruebas.

## **3.2 Plantas de patata**

Nota: Para la detección de poblaciones latentes de *C. m. subsp. sepedonicus* se recomienda efectuar las pruebas con muestras mixtas. El procedimiento se puede adaptar convenientemente para muestras mixtas de hasta 200 partes de tallos (los estudios deberán basarse en una muestra representativa desde el punto de vista estadístico de la población vegetal que se someta a investigación).

**3.2.1** Extraer una sección de 1 a 2 cm de la base de cada tallo, justo por encima del nivel del suelo, utilizando un cuchillo o tijeras de podar limpios y desinfectados. Desinfectar ligeramente las secciones de tallo con etanol al

70 % y secar inmediatamente con un pañuelo de papel. Introducir las secciones de tallo en un recipiente estéril cerrado de acuerdo con los siguientes procedimientos de muestreo:

**3.2.2** Procesar las secciones de tallo mediante uno de los métodos siguientes:

- a) bien añadir la solución de tampón de extracción (apéndice 3) en cantidad suficiente para que cubra las secciones (aproximadamente 40 ml) y agitar en un agitador rotatorio (50-100 rpm) durante 4 horas a una temperatura inferior a 24 °C o durante 16 a 24 horas si están refrigeradas;
- b) o bien procesar inmediatamente triturando las secciones en una bolsa de maceración resistente (p. ej. Stomacher o Bioreba) con una cantidad adecuada de tampón de extracción (apéndice 3) utilizando para ello un mazo de caucho o un aparato triturador adecuado (p. ej. Homex). Si esto no es posible, almacenar las secciones de tallo refrigeradas durante 72 horas como máximo o a temperatura ambiente durante 24 horas como máximo.

**3.2.3** Decantar el sobrenadante tras haberlo dejado reposar durante 15 minutos.

**3.2.4** Normalmente no es necesario clarificar más el extracto ni la concentración de la fracción bacteriana, pero esto se puede lograr mediante la filtración y/o la centrifugación, tal como se describe en los puntos 3.1.4 a 3.1.6.

**3.2.5** Dividir el extracto puro o concentrado de la muestra en dos partes iguales. Mantener una de las partes a 4-10 °C durante los ensayos y almacenar la parte restante, tras haber añadido glicerol estéril al 10-25 % (v/v), a una temperatura comprendida entre - 16 y - 24 °C (semanas) o entre - 68 y - 86 °C (meses) en el caso de que sea necesario realizar nuevas pruebas.

## 4. PRUEBA IF

Principio:

La utilización de la prueba IF como principal prueba de selección está recomendada por su solidez demostrada para alcanzar los límites exigidos.

Cuando se utilice la prueba IF como principal prueba de selección y ésta proporcione resultados positivos, deberán realizarse las pruebas PCR o FISH como segunda prueba de selección. Cuando se utilice la prueba IF como segunda prueba de selección y ésta proporcione resultados positivos, será preciso realizar las pruebas establecidas en el diagrama de flujo para completar el análisis.

Nota: Cuando se utilice la prueba IF como principal prueba de selección, deberá utilizarse siempre un anticuerpo policlonal. En el caso de resultados IF positivos con un anticuerpo policlonal, la selección posterior de la muestra con un anticuerpo monoclonal puede proporcionar una mayor especificidad pero ser menos sensible.

Conviene utilizar anticuerpos frente a la cepa de referencia de *C. m. subsp. sepedonicus*. Se recomienda determinar el título para cada nuevo lote de anticuerpos. El título se define como la dilución superior en la que se produce la reacción óptima cuando se realiza la prueba con una suspensión que contiene entre  $10^5$  y  $10^6$  células por ml de la cepa homóloga de *C. m. subsp. sepedonicus* y se utiliza una dilución apropiada del conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC), según las recomendaciones del fabricante.

Los anticuerpos policlonales o monoclonales crudos deberían tener un título IF de al menos 1:2000. Durante las pruebas, los anticuerpos deberían utilizarse en diluciones de trabajo (DT) próximas o iguales al título. Utilizar anticuerpos validados.

Véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

La prueba debería realizarse con extractos de muestras que se acaben de preparar. Si fuese necesario, puede efectuarse también con extractos almacenados a una temperatura comprendida entre  $-68$  y  $-86$  °C en glicerol. El glicerol puede separarse de la muestra mediante la adición de 1 ml de tampón de precipitado (apéndice 4), la recentrifugación durante 15 minutos a 7.000 g y la resuspensión en el mismo volumen de tampón de precipitado. Normalmente esto no es necesario, especialmente si las muestras se fijan al portaobjetos flameándolas (véase el punto 2.2).

Preparar otros portaobjetos con controles positivos de la cepa homóloga o de cualquier otra cepa de referencia de *C. m. subsp. sepedonicus*, suspendida en extracto de patata, tal como se especifica en el apéndice 2 y, opcionalmente, en tampón.

De ser posible, deberán utilizarse tejidos infectados de forma natural (conservados mediante liofilización o congelación a temperaturas comprendidas entre  $-16$  y  $-24$  °C) como control similar, en el mismo portaobjetos.

Como controles negativos, utilizar alícuotas de extractos de muestra que previamente hayan proporcionado resultados negativos en la prueba.

Utilizar portaobjetos de pocillos múltiples, de preferencia con 10 pocillos de 6 mm de diámetro como mínimo. Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

#### **4.1 Preparar los portaobjetos según uno de los procedimientos siguientes:**

- i) Para precipitados con una cantidad relativamente pequeña de sedimento de almidón:  
Verter con una pipeta un volumen determinado (15  $\mu$ l es suficiente para pocillos de 6 mm de diámetro; aumentar el volumen si el diámetro es mayor) de una dilución al 1/100 del precipitado de patata resuspendido en el primer pocillo. Posteriormente, verter un volumen similar de precipitado sin diluir (1/1) en los demás pocillos de la fila.

La otra fila puede utilizarse como duplicado o para una segunda muestra, tal como se indica en la figura 1.

ii) Para otros precipitados:

Preparar diluciones decimales (1/10 y 1/100) del precipitado resuspendido en el tampón de precipitado. Verter con una pipeta un volumen determinado (15 µl es suficiente para pocillos de 6 mm de diámetro; aumentar el volumen si el diámetro es mayor) del precipitado resuspendido y de cada dilución en una de las filas de pocillos. La otra fila puede utilizarse como duplicado o para una segunda muestra, tal como se indica en la figura 2.

## **4.2 Dejar secar las gotitas a temperatura ambiente o calentándolas a una temperatura comprendida entre 40 y 45 °C.**

Fijar las células bacterianas al portaobjetos calen-tándolo (15 minutos a 60 °C), flameándolo, mediante etanol al 95 %, o de acuerdo con las instrucciones específicas de los proveedores de los anticuerpos. De ser necesario, los portaobjetos fijados pueden almacenarse congelados en una caja seca durante el mínimo tiempo posible (hasta un máximo de tres meses) antes de realizar nuevas pruebas.

## **4.3 Procedimiento IF:**

i) si el portaobjetos se ha preparado según el inciso i) del punto 4.1:

Preparar un conjunto de diluciones a 1/2 del anticuerpo en el tampón IF. El primer pocillo deberá tener 1/2 del título (T/2) y el resto 1/4 del título (T/4), 1/2 del título (T/2), el título (T) y dos veces el título (2T),

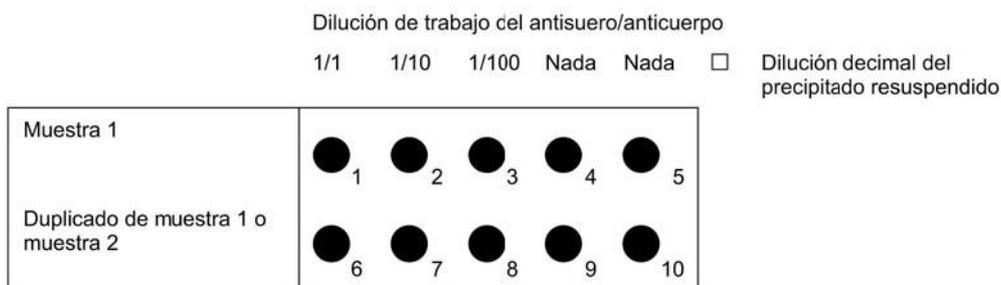
ii) si el portaobjetos se ha preparado según el inciso ii) del punto 4.1:

Preparar la dilución de trabajo (DT) del anticuerpo en tampón IF. La dilución de trabajo afecta a la especificidad.

Figura 1. Preparación del portaobjetos de acuerdo con el punto 4.1, inciso i), y el punto 4.3, inciso i)



Figura 2. Preparación del portaobjetos de acuerdo con el punto 4.1, inciso ii), y el punto 4.3, inciso ii)



**4.3.1** Colocar los portaobjetos en papel humedecido. Cubrir completamente cada pocillo con la dilución o diluciones del anticuerpo. El volumen del anticuerpo aplicado en cada pocillo debe ser equivalente al menos al del extracto aplicado.

A falta de instrucciones específicas de los proveedores de anticuerpos, deberá seguirse el procedimiento siguiente:

**4.3.2** Tapar los portaobjetos y dejar incubar sobre papel humedecido durante 30 minutos a temperatura ambiente (18 a 25 °C).

**4.3.3** Sacudir las gotitas de cada portaobjetos y enjuagar cuidadosamente con tampón IF. Lavar por inmersión durante 5 minutos en tampón IF-Tween (apéndice 3) y repetir la operación durante 5 minutos en tampón IF. Deben evitarse los aerosoles o la transferencia de gotitas que puedan provocar la

contaminación cruzada. Eliminar cuidadosamente el exceso de humedad secándolos ligeramente.

**4.3.4** Colocar los portaobjetos en papel humedecido. Cubrir los pocillos con la dilución del conjugado FITC utilizado para determinar el título. El volumen de conjugado aplicado en los pocillos debe ser idéntico al volumen de anticuerpo aplicado.

**4.3.5** Tapar los portaobjetos y dejar incubar sobre papel humedecido durante 30 minutos a temperatura ambiente (18 a 25 °C).

**4.3.6** Sacudir las gotitas de conjugado del portaobjetos. Enjuagar y lavar como antes (punto 4.3.3). Retirar con cuidado el exceso de humedad.

**4.3.7** Verter con una pipeta de 5 a 10  $\mu$ l de tampón fosfato glicerol de 0,1 M (véase el apéndice 3) o una solución comercial similar que proteja la fluorescencia (anti-fading) en cada pocillo y tapar.

## **4.4 Lectura de la prueba IF:**

**4.4.1** Examinar los portaobjetos en un microscopio epifluorescente con filtros adecuados para que se produzca la excitación del FITC, con aceite o agua de inmersión y a 500-1.000 aumentos. Recorrer los pocillos a lo largo de dos diámetros perpendiculares entre sí y alrededor del perímetro. En el caso de muestras que no presenten células o sólo un pequeño número de ellas es preciso observar como mínimo 40 campos microscópicos.

En primer lugar, comprobar el control positivo. Las células deben ser fluorescentes brillantes y estar completamente teñidas al título de anticuerpos determinado o la dilución de trabajo. La prueba IF (punto 4) debe repetirse si la tinción no es correcta.

**4.4.2** Comprobar si hay células fluorescentes brillantes con la morfología característica de *C. m. subsp. sepedonicus* en los pocillos de los portaobjetos.

Véase el sitio web:  
<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

La intensidad de la fluorescencia debe ser equivalente a la de la cepa de control positivo a la misma dilución del anticuerpo o mejor que ésta. Deberán descartarse las células que presenten una tinción incompleta o cuya fluorescencia sea escasa.

En el caso que se sospeche cualquier posible contaminación, deberá repetirse la prueba. Esto puede ocurrir cuando todos los portaobjetos de un lote presenten células positivas debido a la contaminación del tampón o cuando se encuentren células positivas (fuera de los pocillos) en la superficie del portaobjetos.

**4.4.3** Existen varios problemas inherentes a la especificidad de la prueba de inmunofluorescencia. En los precipitados de cuñas basales y secciones de tallo de patata pueden aparecer poblaciones de base de células fluorescentes de morfología atípica y bacterias saprofitas con reacción cruzada cuyo tamaño y morfología sean similares a los de *C. m. subsp sepedonicus*.

**4.4.4** Sólo deben considerarse las células fluorescentes con tamaño y morfología típicos, al título o la dilución de trabajo de los anticuerpos, al igual que en el punto 4.3.

**4.4.5** Interpretación de los resultados de la prueba IF:

- i) si se encuentran células fluorescentes brillantes con morfología característica, calcular el número medio de células típicas por campo microscópico y el número de células típicas por ml de precipitado resuspendido (apéndice 4). La prueba IF es positiva para las muestras que presenten al menos  $5 \times 10^3$  células típicas por ml de precipitado resuspendido. La muestra se considera potencialmente contaminada y es necesario realizar nuevas pruebas,

- ii) la prueba IF es negativa para las muestras que presenten menos de  $5 \times 10^3$  células por ml de precipitado resuspendido y la muestra se considera negativa. No es necesario realizar nuevas pruebas.

## 5. PRUEBA FISH

Principio: Cuando se utilice la prueba FISH como primera prueba de selección y ésta proporcione resultados positivos, deberá realizarse la prueba IF como segunda prueba obligatoria de selección. Cuando se utilice la prueba FISH como segunda prueba de selección y ésta proporcione resultados positivos, será preciso realizar las pruebas establecidas en el diagrama de flujo para completar el diagnóstico.

Nota: Utilizar oligosondas específicas para *C. m. subsp. sepedonicus* validadas (apéndice 7). Las pruebas preliminares realizadas con este método deberán permitir la detección reproducible de al menos 103-104 células de *C. m. subsp. sepedonicus* por ml añadidas a los extractos de muestras que previamente proporcionaron resultados negativos.

El procedimiento siguiente debería llevarse a cabo, a ser posible, con extracto de muestra que se acabe de preparar, pero también puede realizarse con extracto de muestra que se haya almacenado en glicerol a una temperatura comprendida entre  $-16$  y  $-24$  °C o entre  $-68$  y  $-86$  °C.

Como controles negativos, deben utilizarse alícuotas de extracto de muestra que previamente haya arrojado resultados negativos para *C. m. subsp. sepedonicus*.

Como controles positivos, deben prepararse suspensiones que contengan de 105 a 106 células por ml de *C. m. subsp. sepedonicus* (por ejemplo, la cepa NCPPB 4053, o PD 406) en tampón fosfato de concentración 0,01 M de un cultivo de 3 a 5 días (para la preparación véase el apéndice 2). Preparar en otro portaobjetos controles positivos de la cepa homóloga o de cualquier otra cepa de referencia de *C. m. subsp. sepedonicus*, suspendida en extracto de patata, tal como se especifica en el apéndice 2.

El uso de una oligosonda eubacteriana marcada con FITC ofrece un control para el proceso de hibridación, ya que teñirá todas las eubacterias que estén presentes en la muestra.

Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

## **5.1 Fijación del extracto de patata El protocolo siguiente se basa en Wullings et al., (1998):**

**5.1.1** Preparar la solución de fijación (véase el apéndice 7).

**5.1.2** Verter 100 µl de cada extracto de muestra en un tubo eppendorf y centrifugar durante 8 minutos a 7 000 g.

**5.1.3** Quitar el sobrenadante y disolver el precipitado en 500 µl de solución fijadora preparada con menos de 24 horas de antelación. Agitar e incubar de un día para otro a 4 °C.

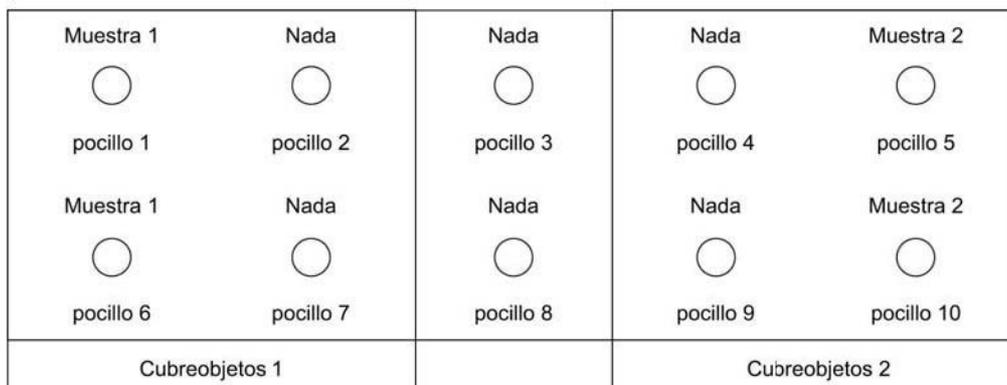
El etanol al 96 % constituye una solución fijadora alternativa. Para utilizarlo, disolver el precipitado a partir del paso 5.1.2. en 50 µl de tampón fosfato de concentración 0,01 M y 50 µl de etanol al 96 %. Agitar la mezcla e incubar a 4 °C durante 30 a 60 minutos.

**5.1.4** Centrifugar durante 8 minutos a 7 000 g, quitar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 75 µl de tampón fosfato de concentración 0,01 M (véase el apéndice 3).

**5.1.5** Colocar 16 µl de las suspensiones fijadas en un portaobjetos múltiple limpio, tal como muestra la figura 3. Aplicar 2 muestras diferentes por portaobjetos sin diluir y utilizar 10 µl para realizar una dilución al 1:100 (en tampón fosfato de concentración 0,01 M). La solución de la muestra restante (49 µl) puede almacenarse a – 20 °C tras la adición de 1 volumen de etanol al 96 %. En el caso de que sea necesario repetir la prueba FISH, separar el etanol mediante centrifugación y añadir un volumen equivalente de tampón fosfato de concentración 0,01 M (mezclar mediante agitación).

Figura 3

Distribución del portaobjetos para la prueba FISH



**5.1.6** Secar los portaobjetos al aire (o con secador de portaobjetos a 37 °C) y fijarlos flameándolos.

El procedimiento puede interrumpirse en esta fase, pudiéndose proseguir con la hibridación al día siguiente. Los portaobjetos deben almacenarse secos y sin polvo a temperatura ambiente.

## 5.2 Prehibridación e hibridación

**5.2.1** Preparar una solución de lisozima que contenga 10 mg de lisozima (Sigma L-6876) en 10 ml de tampón (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Esta solución puede almacenarse pero sólo debe congelarse y descongelarse una vez. Cubrir todas las muestras bien con aproximadamente 50 µl de solución de lisozima e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Sumergir los portaobjetos en agua desmineralizada una única vez y secar con papel de filtro.

Alternativamente, en lugar de lisozima, añadir 50 µl de 40-400 µg ml<sup>-1</sup> de proteinasa K en tampón (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) en cada pocillo e incubar a 37 °C durante 30 minutos.

**5.2.2** Deshidratar las células en series de etanol escalonadas al 50 %, 80 % y 96 % durante 1 minuto cada una. Secar las preparaciones en un portaobjetos.

**5.2.3** Preparar una cámara de incubación húmeda recubriendo el fondo de una caja hermética con un pañuelo de papel o papel de filtro empapado en 1x hybmix (apéndice 7). Preincubar la caja en el horno de hibridación a 55 °C durante 10 minutos como mínimo.

**5.2.4** Preparar la solución de hibridación (apéndice 7) con 45 µl por portaobjeto, y preincubar durante 5 minutos a 55 °C.

**5.2.5** Colocar los portaobjetos en una placa caliente a 45 °C y aplicar 10 µl de solución de hibridación en cada uno de los 4 pocillos del (o de los) portaobjetos.

**5.2.6** Aplicar 2 cubreobjetos (24 x 24 mm) a cada portaobjeto evitando la entrada de aire. Colocar los portaobjetos en la cámara húmeda precalentada y dejar que se produzca la hibridación de un día para otro a 55 °C en la oscuridad.

**5.2.7** Preparar 3 vasos de precipitado que contengan 1 l de agua ultrapura, 1 l de 1x hybmix (334 ml 3x hybmix y 666 ml de agua ultrapura) y 1 l de 1/2x hybmix (167 ml 3x hybmix y 833 ml de agua ultrapura). Preincubarlos al baño maría a 55 °C.

**5.2.8** Quitar los cubreobjetos de los portaobjetos y colocar los portaobjetos en un soporte.

**5.2.9** Lavar el exceso de sonda mediante incubación durante 15 minutos en el vaso de precipitado con 1x hybmix a 55 °C.

**5.2.10** Transferir el portaobjetos a una solución de lavado de hybmix al 1/2 e incubar durante otros 15 minutos.

**5.2.11** Sumergir las preparaciones brevemente en agua ultrapura y colocarlas en papel de filtro. Eliminar el exceso de humedad cubriendo la superficie con cuidado con papel de filtro. Verter de 5 a 10 µl de solución de montaje protectora de la fluorescencia (p. ej. Vectashield, Vecta

Laboratories, CA, USA o equivalente) en cada pocillo y aplicar un cubreobjetos grande (24 × 60 mm) sobre la totalidad de los portaobjetos.

### **5.3 Lectura de la prueba FISH:**

**5.3.1** Los portaobjetos deben examinarse inmediatamente utilizando un microscopio epifluorescente a 630 o 1.000 aumentos con aceite de inmersión. Con un filtro adecuado para isotiocianato de fluoresceína (FITC) las células eubacterianas (incluidas la mayoría de las células gramnegativas) de la muestra aparecen teñidas de verde fluorescente. Utilizando un filtro para tetrametilrodamina-5-isotiocianato, las células de *C. m. subsp. sepedonicus* marcadas con Cy3 aparecen teñidas de rojo fluorescente. Comparar la morfología de las células con la de los controles positivos. Las células deben ser fluorescentes brillantes y estar completamente teñidas.

Debe repetirse la prueba FISH (punto 9.4) si la tinción es aberrante. Recorrer los pocillos a lo largo de dos diámetros perpendiculares entre sí y alrededor del perímetro. En el caso de muestras que no presenten células o sólo un pequeño número de ellas es preciso observar como mínimo 40 campos microscópicos.

**5.3.2** Comprobar si hay células fluorescentes brillantes con la morfología característica de *C. m. subsp. sepedonicus* en los pocillos de los portaobjetos.

Véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

La intensidad de la fluorescencia debe ser mejor que la de la cepa de control positivo o equivalente a la misma. Deberán descartarse las células que presenten una tinción incompleta o cuya fluorescencia sea escasa.

**5.3.3** En el caso que se sospeche cualquier posible contaminación, deberá repetirse la prueba. Esto puede ocurrir cuando todos los portaobjetos de un lote presenten células positivas debido a la contaminación del tampón o cuando se encuentren células positivas (fuera de los pocillos) en la superficie del portaobjetos.

**5.3.4** Existen varios problemas inherentes a la especificidad de la prueba FISH. En los precipitados de cuñas basales y secciones de tallo de patata pueden aparecer poblaciones de base de células fluorescentes de morfología atípica y bacterias saprofitas con reacción cruzada cuyo tamaño y morfología sean similares a los de *C. m. subsp. sepedonicus*, aunque con mucha menor frecuencia que en la prueba IF.

**5.3.5** Deben tenerse en cuenta únicamente las células fluorescentes de tamaño y morfología típicos (véase el punto 5.3.2).

**5.3.6** Interpretación de los resultados de la prueba FISH:

- i) se obtendrán resultados válidos en la prueba FISH siempre que en todos los controles positivos y en ninguno de los controles negativos se observen células teñidas de verde fluorescente brillante, cuyo tamaño y morfología sean los típicos de las de *C. m. subsp. sepedonicus*, cuando se utilice el filtro FITC, y células teñidas de rojo fluorescente brillante cuando se utilice el filtro de rodamina. Si se encuentran células fluorescentes brillantes con morfología característica, calcular el número medio de células típicas por campo microscópico y el número de células típicas por ml de precipitado resuspendido (apéndice 4). Las muestras que presenten al menos  $5 \times 10^3$  células típicas por ml de precipitado resuspendido se considerarán potencialmente contaminadas y será preciso realizar nuevas pruebas. Las muestras que presenten menos de  $5 \times 10^3$  células típicas por ml de precipitado resuspendido se considerarán negativas,
- ii) los resultados de la prueba FISH serán negativos cuando, utilizando el filtro de rodamina, no se observen células teñidas de rojo fluorescente brillante con un tamaño y morfología típicos de *C. m. subsp. sepedonicus*, siempre que se observen células teñidas de rojo fluorescente brillante típicas en las preparaciones de control positivo cuando se utilice el filtro de rodamina.

## 6. PRUEBA PCR

Principio: Cuando se utilice la prueba PCR como principal prueba de selección y ésta proporcione resultados positivos, deberá realizarse la prueba IF como segunda prueba obligatoria de selección. Cuando se utilice la prueba PCR como segunda prueba de selección y ésta proporcione resultados positivos, será preciso realizar las pruebas establecidas en el diagrama de flujo para completar el diagnóstico.

La plena explotación de este método como principal método de selección sólo se recomienda en el caso de que se hayan adquirido conocimientos especializados del mismo.

Nota: Las pruebas preliminares realizadas con este método deberán permitir la detección reproducible de  $10^3$  a  $10^4$  células de *C. m. subsp. sepedonicus* por ml añadidas a los extractos de muestras que previamente proporcionaron resultados negativos. Puede ser necesario llevar a cabo experimentos de optimización para lograr niveles máximos de sensibilidad y especificidad en todos los laboratorios.

Deben utilizarse reactivos y protocolos PCR validados. Seleccionar preferiblemente un método con control interno.

Tomar las precauciones necesarias para evitar la contaminación de la muestra con el ADN buscado. La prueba PCR deben llevarla a cabo técnicos experimentados en laboratorios especializados en biología molecular, con el fin de reducir al máximo la posibilidad de contaminación con el ADN buscado.

Como prueba final del procedimiento siempre deben efectuarse controles negativos (extracción de ADN y PCR) que dejen constancia de que no se ha producido arrastre de ADN.

En la prueba PCR deben incluirse los siguientes controles negativos:

- Extracto de la muestra que previamente haya proporcionado resultados negativos para *C. m. subsp. sepedonicus*,
- Controles de tampón utilizados para extraer la bacteria y el ADN de la muestra,
- Mezcla para la reacción PCR. Deben incluirse los siguientes controles positivos:
  - Alícuotas de los precipitados resuspendidos a los que se haya añadido *C. m. subsp. sepedonicus* (para la preparación, véase el apéndice 2),
  - Una suspensión de 10<sup>6</sup> células por ml de *C. m. subsp. sepedonicus* en agua de un aislado virulento (por ejemplo, NCPPB 2140 o NCPPB 4053),
  - Siempre que sea posible, utilizar también ADN extraído de las muestras de control positivas en la prueba PCR.

Para evitar toda posible contaminación, preparar los controles positivos en un entorno distinto al de las muestras que se vayan a someter a prueba.

Los extractos de muestras deben estar, en la medida de lo posible, libres de tierra. En determinados casos puede ser recomendable preparar las extracciones a partir de patatas lavadas cuando vayan a utilizarse protocolos PCR.

## **6.1 Métodos de purificación del ADN**

Utilizar muestras de control positivas y negativas, como se indica más arriba.

Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

Para la purificación del ADN buscado a partir de sustratos de muestras complejas, existen diversos métodos que eliminan los inhibidores de PCR y otras reacciones enzimáticas y concentran el ADN buscado en el extracto de la muestra. El siguiente método ha sido optimizado para su utilización con el método PCR validado que figura en el apéndice 6.

### **6.1.a) Método de Pastrok (2000):**

1. Verter con una pipeta 220 µl de tampón de lisis (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) en un tubo eppendorf de 1,5 ml.
2. Añadir 100 µl de extracto de muestra y colocar en un calentador o al baño maría a 95 °C durante 10 minutos.
3. Colocar el tubo en hielo durante 5 minutos.
4. Añadir 80 µl de solución madre de lisozima (50 mg de lisozima por ml en 10 mM Tris HCl, pH 8,0) e incubar a 37 °C durante 30 minutos.
5. Añadir 220 µl de solución A Easy DNA® (Invitrogen), mezclar adecuadamente por agitación e incubar a 65 °C durante 30 minutos.
6. Añadir 100 µl de solución B Easy DNA® (Invitrogen) y agitar vigorosamente hasta que el precipitado se mueva libremente en el tubo y la muestra sea uniformemente viscosa.
7. Añadir 500 µl de cloroformo y agitar hasta que disminuya la viscosidad y la mezcla sea homogénea.
8. Centrifugar a 15.000 g durante 20 minutos a 4 °C para separar las fases y formar la interfase.
9. Transferir la fase superior a un tubo eppendorf sin utilizar.
10. Añadir 1 ml de etanol al 100 % (- 20 °C), agitar brevemente e incubar en hielo durante 10 minutos.
11. Centrifugar a 15.000 g durante 20 minutos a 4° C y retirar el etanol del precipitado.
12. Añadir 500 µl de etanol al 80 % (- 20 °C) y mezclar invirtiendo el tubo.

13. Centrifugar a 15.000 g durante 10 minutos a 4° C, guardar el precipitado y retirar el etanol.

14. Dejar que el precipitado se seque al aire o en un Speed Vac de ADN.

15. Resuspender el precipitado en 100 µl de agua ultrapura estéril y dejar a temperatura ambiente durante un mínimo de 20 minutos.

16. Almacenar a - 20 °C hasta que se necesite para PCR.

17. Decantar todo precipitado blanco mediante centrifugación, y utilizar 5 µl del sobrenadante que contenga ADN para la prueba PCR.

### **6.1.b) Otros métodos**

Se pueden aplicar otros métodos de extracción de ADN (como p. ej. Qiagen DNeasy Plant Kit) siempre que hayan demostrado ser igual de eficaces para purificar el ADN de muestras de control que contengan de 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> células patógenas por ml.

## **6.2 PCR**

**6.2.1** Preparar los ensayos controles de PCR de acuerdo con el protocolo validado (apéndice 6). Preparar una dilución decimal de extracto de ADN de la muestra (1:10 en agua ultrapura).

**6.2.2** Preparar la mezcla de reacción PCR adecuada en un entorno libre de contaminación de acuerdo con el protocolo publicado (apéndice 6). El protocolo PCR validado es una reacción «multiplex» que también incorpora un protocolo PCR interno.

**6.2.3** Añadir 5 µl de extracto de ADN por 25 µl de reacción PCR en tubos PCR estériles.

**6.2.4** Incorporar una muestra de control negativa que contenga sólo mezcla de reacción PCR y añadir la misma fuente de agua ultrapura utilizada en la mezcla PCR en lugar de la muestra.

**6.2.5** Colocar los tubos en el mismo termociclador utilizado en las pruebas preliminares y aplicar el programa PCR optimizado adecuado (apéndice 6).

### **6.3 Análisis del producto de la PCR**

**6.3.1** Confirmar los amplicones PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Correr al menos 12 µl de mezcla de reacción de ADN amplificada de cada muestra mezclada con 3 µl de tampón de carga (apéndice 6) en un gel de agarosa al 2,0 % (p/v) en tampón tris-acetato-EDTA (TAE) (apéndice 6) a 5-8 V por cm. Utilizar un marcador de ADN adecuado, por ejemplo, 100 bp ladder.

**6.3.2** Revelar las bandas de ADN mediante la tinción con bromuro de etidio (0,5 mg por l) durante 30 a 45 minutos, tomando las precauciones adecuadas para el manejo de este mutágeno.

**6.3.3** En el caso de los productos PCR amplificados del tamaño esperado (apéndice 6), visualizar el gel teñido mediante transiluminación UV de onda corta (por ejemplo, = 302 nm) y anotar los resultados.

**6.3.4** Para todos los resultados o casos nuevos, verificar la autenticidad del amplicón de PCR realizando un análisis con enzima de restricción en una muestra del ADN amplificado restante mediante la incubación a la temperatura óptima y durante el tiempo necesario con una enzima y tampón adecuados (véase el apéndice 6). Confirmar los fragmentos digeridos mediante electroforesis en gel de agarosa, siguiendo el método indicado anteriormente, y observar el patrón característico del fragmento de restricción con transiluminación UV una vez teñido con bromuro de etidio y comparar con el control positivo no digerido y digerido.

Interpretación de los resultados de la prueba PCR

La prueba PCR es negativa si el amplicón PCR específico de la *C. m. subsp. sepedonicus* del tamaño esperado no se detecta en la muestra en cuestión pero sí en todas las muestras de los controles positivos (en el caso de PCR «multiplex» con cebadores de control interno específicos de la planta, se debe amplificar con la muestra en cuestión un segundo producto PCR del tamaño esperado).

La prueba PCR es positiva si se detecta el amplicón PCR específico de la *C. m. subsp. sepedonicus* del tamaño y patrón de restricción (cuando sea necesario) esperados, siempre que no se amplifique a partir de ninguna de las muestras de los controles negativos. La confirmación fiable de un resultado positivo puede obtenerse también repitiendo la prueba con un segundo conjunto de cebadores PCR (punto 9.3).

Nota: Se puede sospechar la inhibición de la PCR si el amplicón esperado se obtiene de la muestra de control positiva que contiene *C. m. subsp. sepedonicus* en agua pero se obtienen resultados negativos de los controles positivos con *C. m. subsp. sepedonicus* en extracto de patata. En protocolos PCR «multiplex» con controles PCR internos, la inhibición de la reacción aparece indicada cuando no se obtiene ninguno de los dos amplicones.

Se puede sospechar la existencia de contaminación si el amplicón esperado se obtiene a partir de uno o varios de los controles negativos.

## **7. PRUEBA DE BIOENSAYO**

Nota: Las pruebas preliminares realizadas con este método deberán permitir la detección reproducible de  $10^3$  a  $10^4$  unidades de formación de colonias de *C. m. subsp. sepedonicus* por ml añadidas a los extractos de muestras que previamente proporcionaron resultados negativos (para la preparación véase el apéndice 2).

La máxima sensibilidad de detección se alcanzará cuando se utilicen extractos de muestras que se acaben de preparar y cuando las condiciones de cultivo sean las óptimas. No obstante, este método puede aplicarse

también con éxito a extractos que se hayan almacenado en glicerol a una temperatura comprendida entre - 68 y - 86 °C.

Algunas variedades de berenjena constituyen un medio de enriquecimiento selectivo excelente para la proliferación de *C. m. subsp. sepedonicus*, incluso en ausencia de síntomas, y facilitan también una prueba confirmatoria de huésped excelente.

Las condiciones de cultivo deben ser óptimas para reducir el riesgo de obtener falsos resultados negativos en las pruebas.

Para más detalles sobre el cultivo, véase el apéndice 8.

### **7.1 Distribuir la totalidad de la alícuota de prueba**

sobranante del precipitado resuspendido de los puntos 3.1.6. o 3.2.5. entre las berenjenas, siguiendo uno de los métodos que se exponen a continuación (7.3. o 7.4.). Utilizar exclusivamente plantas que se encuentren en la fase foliar 2 - 3 y hasta la plena expansión de la tercera hoja verdadera. A fin de garantizar la utilización completa del precipitado resuspendido, así como la inoculación efectiva, se requerirán entre 15 y 25 berenjenas por muestra para los procedimientos que se esbozan a continuación.

### **7.2 Las berenjenas no deben regarse de uno a dos días antes de la inoculación para reducir la presión de turgencia.**

### **7.3 Inoculación en estrías.**

**7.3.1** Sosteniendo la planta entre dos dedos aplíquese con una pipeta una gota (de unos 5-10 µl) del precipitado en suspensión en el tallo situado entre los cotiledones y la primera hoja.

**7.3.2** Con un bisturí estéril practicar una incisión diagonal de aproximadamente 1,0 cm de largo y una profundidad de aproximadamente

2/3 del grosor del tallo, comenzando el corte a partir de la gota del precipitado.

**7.3.3** Sellar el corte con vaselina estéril con una jeringa.

## **7.4 Inoculación con jeringa.**

Inocúlense los tallos de la berenjena justo por encima de los cotiledones utilizando una jeringa provista de aguja hipodérmica (no menos de 23G). Distribuir la muestra entre las berenjenas.

**7.5 Como controles positivos,** inocular 5 plantas con una suspensión acuosa de 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> células por ml de un cultivo conocido de *C. m. subsp. sepedonicus* y, siempre que sea posible, con tejido de tubérculo infectado de forma natural (véase el punto 4) mediante el mismo método de inoculación (7.3. o 7.4.).

**7.6 Como control negativo,** inocular 5 plantas con tampón de precipitado estéril mediante el mismo método de inoculación (7.3. o 7.4.).

## **7.7 Incubar las plantas en instalaciones adecuadas para la cuarentena durante un máximo de 4 semanas a una temperatura de 18 a 24 °C.**

Incubar las plantas con suficiente luz y un elevado nivel de humedad (70 a 80 %) y agua, evitando que el agua se estanque y que las plantas se marchiten por falta de agua. Las células de *C. m. subsp. sepedonicus* mueren a temperaturas superiores a 30 °C y la temperatura óptima es 21 °C.

Para evitar la contaminación se deben incubar las plantas de control positivo y negativo en bancos claramente separados en un invernadero o cámara de cultivo; en el caso de que se disponga de un espacio reducido, garantizar la estricta separación entre tratamientos. En el caso de que plantas para distintas muestras deban incubarse juntas, deben separarse con las pantallas adecuadas. Durante la fertilización, el riego, la inspección y cualquier otra manipulación deben extremarse las precauciones para evitar

la contaminación cruzada. Es esencial mantener los invernaderos y las cámaras libres de toda plaga de insectos, ya que estos pueden transmitir la bacteria de una muestra a otra.

### **7.8 Transcurrida una semana, examinar con regularidad a fin de detectar los síntomas.**

Contar el número de plantas que muestren síntomas. *C. m. subsp. sepedonicus* provoca el marchitamiento de las hojas en las berenjenas, que puede iniciarse con flacidez internervial o de los bordes. El tejido marchito puede aparecer al principio de color verde oscuro o moteado, pero se vuelve más pálido antes de necrosarse.

Las zonas de marchitamiento internerviales suelen tener un aspecto graso o húmedo como empapados en agua. El tejido necrosado presenta a veces un borde amarillo brillante. Las plantas no están necesariamente muertas; cuanto más tardan en aparecer los síntomas, tanto mayor es la posibilidad de supervivencia. Las plantas pueden superar la infección. Las berenjenas jóvenes son mucho más sensibles a las poblaciones bajas de *C. m. subsp. sepedonicus* que las plantas de más edad, por lo que es necesario utilizar plantas en el estadio foliar 3, o inmediatamente antes del mismo.

El marchitamiento puede estar inducido también por poblaciones de otras bacterias u hongos presentes en el precipitado de tejido tuberoso. Entre estos se incluyen *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora subsp. carotovora* y *E. carotovora subsp. atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua var. foveata*, así como grandes poblaciones de bacterias saprofitas. En particular, *Erwinia chrysanthemi* puede provocar síntomas y marchitamiento en las hojas muy parecidos a los de *C. m. subsp. sepedonicus*. La única diferencia en el caso de las infecciones causadas por *Erwinia chrysanthemi* es el ennegrecimiento de los tallos. Dichos marchitamientos se pueden distinguir de los causados por *C. m. subsp. sepedonicus*, porque se marchitan rápidamente hojas o plantas enteras. También puede prepararse una tinción de Gram, esta prueba diferenciará a *C. m. subsp. sepedonicus* de *Erwinia ssp.*

**7.9 Tan pronto como se observen síntomas en las berenjenas deberá procederse al reaislamiento, utilizando secciones de tejido foliar o del tallo de las plantas marchitas** (véase el punto 3.1.3 para la maceración del tejido). Desinfectar la superficie de las hojas y tallos de berenjena frotándolos con etanol al 70 %. Realizar una prueba IF o PCR con la savia de la planta de berenjena y aislar en medios (selectivos) adecuados (véase el punto 8). También puede prepararse una tinción de Gram (apéndice 9). Identificar los cultivos purificados de presunta *C. m. subsp. sepedonicus* y confirmar la patogenicidad (véanse las secciones 9 y 10).

**7.10 En determinadas circunstancias, en particular cuando las condiciones de cultivo no sean óptimas, puede ocurrir que *C. m. subsp. sepedonicus* esté presente de forma latente en las berenjenas, incluso después de períodos de incubación de hasta 4 semanas.**

En el caso de que, transcurridas 4 semanas, no se observen síntomas, realizar una prueba IF/PCR con una muestra mixta de secciones de tallo de 1 cm de cada planta tomadas por encima de la sección de inoculación. Si los resultados de la prueba son positivos, deberá procederse al reaislamiento en medios (selectivos) adecuados de acuerdo con el procedimiento descrito en el punto 8. Identificar los cultivos purificados de posible *C. m. subsp. sepedonicus* y confirmar la patogenicidad (secciones 9 y 10).

Interpretación de los resultados de la prueba del bioensayo

Se obtendrán resultados válidos en la prueba del bioensayo cuando las plantas de control positivo muestren síntomas típicos, se puedan reaislar las bacterias de dichas plantas y no se detecten síntomas en los controles negativos.

Los resultados de la prueba del bioensayo serán negativos si las plantas sometidas a la prueba no están infectadas por *C. m. subsp. sepedonicus* y

siempre que se detecte la *C. m. subsp. sepedonicus* en los controles positivos.

Los resultados de la prueba del bioensayo serán positivos cuando las plantas sometidas a la prueba estén infectadas por *C. m. subsp. sepedonicus*.

## **8. AISLAMIENTO DE C. M. SUBSP. SEPEDONICUS**

Nota: El diagnóstico sólo estará completo cuando se haya aislado e identificado (véase el punto 9) *C. m. subsp. sepedonicus*, y posteriormente confirmado mediante una prueba de patogenicidad (punto 10).

Aunque *C. m. subsp. sepedonicus* es un organismo delicado, puede aislarse a partir de tejido sintomático.

No obstante, puede verse inhibida por las bacterias saprofitas que proliferan rápidamente y, por tanto, los aislamientos directos a partir del precipitado de tejido tuberoso o del tallo (punto 3.1.6. o 3.2.5.) son difíciles. El aislamiento directo de *C. m. subsp. sepedonicus* se puede realizar con un medio selectivo y la dilución adecuada del precipitado resuspendido de las cuñas basales o tallos de patatas.

Los aislamientos se realizarán con todos los tubérculos o secciones de tallo de patata sintomáticos y con las berenjenas en las no se observen síntomas pero con las que la prueba IF/PCR realizada a partir de la muestra mixta haya arrojado resultados positivos (véase el punto 7.10.). Cuando sea necesario, la maceración de los tallos de berenjena deberá realizarse siguiendo el procedimiento descrito en el punto 3.1.3.

Como controles positivos preparar diluciones decimales a partir de una suspensión de 10<sup>6</sup> cfu por ml de *C. m. subsp. sepedonicus* (p. ej. NCPPB 4053 o PD 406). Para evitar cualquier posibilidad de contaminación, preparar los controles positivos separadamente de las muestras que se vayan a someter a prueba.

Cada lote de medio selectivo que se prepare deberá someterse a prueba a fin de determinar su idoneidad para el cultivo del patógeno con anterioridad a su utilización en pruebas con muestras rutinarias.

Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

## **8.1 Siembra en medio selectivo**

**8.1.1** A partir de una alícuota de 100 µl de una muestra de precipitado de patata resuspendido o de savia de berenjena, realizar diluciones decimales en tampón de precipitado (apéndice 3).

**8.1.2** El aislamiento a partir de precipitado de patata sin diluir no suele funcionar debido a la lentitud de crecimiento de *C. m. subsp. sepedonicus* y a la competencia de saprofitas. Dado que en los tejidos infectados suele haber poblaciones elevadas de la bacteria, las saprofitas se diluyen normalmente, mientras que el patógeno persiste. Se recomienda, por tanto, recurrir a la técnica de la extensión en placa y extender, con ayuda de un asa de extensión («palos de hockey»), 100 µl de cada una de las muestras, en diluciones de 1/100 hasta 1/10 000, en medio MTNA o NCP-88 (apéndice 5) (si se utilizan placas de Petri de 90 mm de diámetro, se deberá ajustar el volumen para tamaños alternativos de placa).

Nota: Otra estrategia alternativa consiste en extender la alícuota inicial de 100 µl de precipitado de patata en una primera placa de agar con ayuda de un aplicador y posteriormente extender, en estrías, todos los residuos que queden en el aplicador en una segunda placa de agar. Repetir por último con una tercera placa, logrando así, mediante el aplicador, el efecto de dilución en las placas.

**8.1.3** Incubar las placas en la oscuridad a una temperatura de 21 a 23 °C.

**8.1.4** Las observaciones iniciales de las placas, incluidos los recuentos de colonias típicas de la *C. m. subsp. sepedonicus* en relación con las placas de control, se realizan 3 días después, con recuentos posteriores transcurridos 5, 7 y, finalmente, 10 días.

## 8.2 Purificación de las colonias sospechosas

Nota: El subcultivo de colonias de aspecto similar a *C. m. subsp. sepedonicus* debe realizarse en medios YMG para la inoculación de berenjenas y/o la posterior identificación. Esto debe realizarse antes de que las placas crezcan demasiado, es decir, preferiblemente transcurridos de 3 a 5 días.

**8.2.1** Practicar una siembra en estrías de colonias de aspecto similar a la *C. m. subsp. sepedonicus* en la superficie de uno de los siguientes medios (apéndice 5): agar de dextrosa nutritivo (NAD) (para su utilización exclusiva en el subcultivo), agar de levadura, peptona, glucosa (YPGA), agar de extracto de levadura, sales minerales (YGM).

Incubar a 21–24 °C durante 10 días como máximo. *C. m. subsp. sepedonicus* crece lentamente y suele pro-vocar unas colonias punteadas, de color crema, de forma abovedada, en el plazo de diez días. [Fotos de colonias típicas de *C. m. subsp. Sepedonicus*.

Véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

**8.2.2** Volver a sembrar en estrías para obtener cultivos puros. El ritmo de crecimiento mejora con subcultivos. Las colonias típicas son de color blanco crema o marfil, amarillas en ocasiones, redondeadas, lisas, abultadas, abovedadas en forma convexa, mucoso-fluidas, con bordes intactos y normalmente de un diámetro de 1 a 3 mm.

Una simple tinción de Gram (apéndice 9) puede resultar útil para seleccionar colonias para pruebas posteriores.

1 Identificar los supuestos cultivos (véase el punto 9) y realizar una prueba de patogenicidad (véase el punto 10).

2 Identificar cultivos puros de posibles aislados de *C. m. subsp. sepedonicus*, utilizando al menos dos de las pruebas siguientes basadas en principios biológicos diferentes.

Cuando proceda, incluir cepas de referencia conocidas para cada prueba efectuada, como controles positivos.

## 9.1 Pruebas de identificación nutricional y enzimática.

Determinar las propiedades fenotípicas siguientes que estén universalmente presentes o ausentes en la *C. m. subsp. sepedonicus*, de acuerdo con los métodos de Lelliott y Stead (1987), Klement et al. (1990), Schaad (2001), Anónimo (1987). Incubar todos los medios a 21 °C y examinar transcurridos 6 días. Si no se ha producido crecimiento, incubar 20 días. En todas las pruebas deberá incluirse un control conocido de *C. m. subsp. sepedonicus*. Las pruebas fisiológicas y nutricionales deberán realizarse utilizando inoculaciones de subcultivos en agar nutritivo. Las comparaciones morfológicas deberán realizarse a partir de cultivos de agar de dextrosa nutritivos.

Pruebas	Resultado esperado
Prueba de la oxidación/fermentac. (O/F)	Inerte o ligeramente oxidante
Actividad oxidasa	-
Crecimiento a 37 °C	-
Actividad ureasa	-
Hidrólisis de la esculina	+
Hidrólisis del almidón	- o débil
Tolerancia de NaCl al 7 %	-
Producción de indol	-
Actividad catalasa	+
Producción de H <sub>2</sub> S	-
Utilización de citrato	-
Licuefacción de la gelatina	-
Producción de ácido de glicerol	-
Producción de ácido de lactosa	- o débil
Producción de ácido de ramnosa	-
Producción de ácido de salicina	-
Tinción de Gram (apéndice 9)	+

## 9.2 Prueba IF

- a) Preparar una suspensión de aproximadamente 10<sup>6</sup> células por ml en tampón IF (apéndice 3).
- b) Preparar una serie de diluciones a 1/2 de un antisuero adecuado.
- c) Aplicar el procedimiento IF (punto 4).
- d) La prueba IF será positiva si el título IF del cultivo es equivalente al del control positivo.

## 9.3 Prueba PCR

- a) Preparar una suspensión de aproximadamente 10<sup>6</sup> células por ml en agua ultrapura.
- b) Calentar 100 µl de la suspensión celular en tubos cerrados en un calentador o al baño maría a 100 °C durante 4 minutos. Si fuese necesario, la adición de NaOH recién preparado a una concentración final de 0,05 M puede ayudar a la lisis celular. Las muestras pueden almacenarse entonces a una temperatura de - 16 a - 24 °C hasta que sea necesario.
- c) Aplicar los procedimientos PCR adecuados para amplificar los amplicones específicos de *C. m. subsp. sepedonicus* (por ejemplo, Pastrik, 2000; véase el apéndice 4; Li y de Boer, 1995; Mills et al., 1997; Pastrik y Rainey, 1999; Schaad et al., 1999).
- d) Se logrará la identificación positiva de *C. m. subsp. sepedonicus* si los amplicones de PCR son del mismo tamaño y presentan polimorfismos del fragmento de restricción con la misma longitud que los de la cepa de control positivo.

## 9.4 Prueba FISH

- a) Preparar una suspensión de aproximadamente 10<sup>6</sup> células por ml en agua ultrapura.
- b) Aplicar el procedimiento FISH (punto 5).
- c) La prueba FISH será positiva si se obtienen las mismas reacciones del cultivo y el control positivo.

## 9.5 Perfiles de ácidos grasos (Fatty acid profiling o FAP)

- a) Mantener el cultivo en agar de tripticasa de soja (Oxoid) durante 72 horas a 21 °C (+/- 1°).
- b) Aplicar un procedimiento FAP adecuado (Janse, 1991; Stead, 1992).
- c) La prueba FAP será positiva si el perfil del supuesto cultivo es idéntico al del control positivo. Los ácidos grasos cuya presencia es característica son 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 y 17:0. El Anteiso es altamente indicativo de *C. m. subsp sepedonicus*. Otros géneros tales como *Curtobacterium*, *Arthrobacter* y *Micrococcus* cuentan también con algunos de estos ácidos. No obstante, el 15:1 Anteiso A es un ácido raro en estas bacterias que, sin embargo, está presente en todas las spp. *Clavibacter* en una proporción que oscila entre el 1 y el 5 %. En *C. m. subsp sepedonicus* el valor se sitúa normalmente en torno al 5 %.

## 9.6 BOX-PCR

- a) Preparar una suspensión de aproximadamente 10<sup>6</sup> células por ml en agua ultrapura.
- b) Aplicar la prueba con arreglo al procedimiento (Smith et al., 2001).

## 10. PRUEBA DE CONFIRMACIÓN DE PATOGENICIDAD

Como confirmación final del diagnóstico de *C. m. subsp. sepedonicus* y para la evaluación de la virulencia de cultivos identificados como *C. m. subsp. sepedonicus* debe realizarse la prueba de patogenicidad.

**10.1 Preparar un inóculo** de aproximadamente 10<sup>6</sup> células por ml de cultivos de 3 días del aislado que se vaya a someter a prueba y de una cepa de control positivo adecuada de *C. m. subsp. sepedonicus*.

**10.2 Inocular** entre 5 y 10 tallos de plántulas de berenjena en la fase de la tercera hoja (punto 7.3. o 7.4.).

**10.3 Incubar** a una temperatura de 18 a 24 °C, con luz suficiente, humedad relativa alta y riego adecuado, evitando tanto el estancamiento del agua como el estrés provocado por la sequía (punto 7.7) Con los cultivos puros deberá obtenerse el marchitamiento típico en el plazo de dos semanas.

Transcurrido este plazo, las plantas que no muestren síntoma alguno (véase el punto 7.8.) deberán incubarse durante un máximo de 3 semanas a temperaturas que favorezcan su crecimiento pero que no superen los 25 °C (apéndice 8). Si después de 3 semanas no se presentan los síntomas, no podrá confirmarse que el cultivo es una forma patógena de *C. m. subsp. sepedonicus*.

**10.4 Aislar de las plantas sintomáticas** separando una sección de tallo que esté 2 cm por encima de la sección de inoculación. Dilacerar y suspender en un pequeño volumen de agua destilada estéril o

Laboratorio (1)	Ciudad	País
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viena y Linz	Austria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Bélgica
Plantedirektoratet	Lyngby	Dinamarca
Central Science Laboratory	York	Inglaterra
Scottish Agricultural Science Agency	Edimburgo	Escocia
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité Bactériologie	Angers	Francia
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francia
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Alemania
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Alemania
State Laboratory	Dublín	Irlanda
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Países Bajos
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Noruega
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisboa	Portugal
Nacionalni institut za biologijo	Liubliana	Eslovenia
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	España

(1) Científicos de contacto: véase el sitio web

<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

en tampón fosfato 50 mM (apéndice 3). Aislar de la suspensión mediante dilución, extendiendo o aplicando en estrías en MTNA e YPGA (apéndice 5), incubar entre 3 y 5 días a una temperatura de 21 a 23 °C y examinar la formación de colonias típicas de *C. m. subsp. sepedonicus*.

### **Apéndice 1: Laboratorios dedicados a la optimización y la validación de los protocolos**

### **Apéndice 2: Preparación de controles positivos y negativos para las pruebas de selección básicas PCR/IF y FISH**

Preparar un cultivo de 72 horas de una cepa virulenta de *C. m. subsp. sepedonicus* [NCPB 4053 o PD 406] en medio base MTNA y suspender en tampón fosfato 10 mM para obtener una concentración de aproximadamente  $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  cfu por ml. Esto se obtiene normalmente mediante una suspensión ligeramente turbia equivalente a una densidad óptica de 0,20 a 600 nm.

Separar las cuñas basales de 200 tubérculos de una variedad de piel blanca conocida por estar exenta de *C.m. subsp. sepedonicus*. Procesar las cuñas basales como siempre y resuspender el precipitado en 10 ml. Preparar 10 microviales estériles de 1,5 ml con 900 µl del precipitado resuspendido. Transferir 100 µl de la suspensión de *C. m. subsp. sepedonicus* al primer microvial. Homogeneizar por agitación. Establecer niveles decimales de contaminación realizando nuevas diluciones en los 5 microviales siguientes.

Los 6 microviales contaminados se utilizarán como controles positivos. Los 4 microviales no contaminados se utilizarán como controles negativos. Etiquetar los microviales como corresponda. Preparar alícuotas de 100 µl en microviales estériles de 1,5 ml para obtener de este modo 9 réplicas de cada muestra de control. Almacenar a una temperatura de - 16 a - 24 °C hasta su uso. La presencia y la cuantificación de *C. m. subsp. sepedonicus* en las muestras de control deberá confirmarse en primer lugar mediante una prueba IF.

Para la prueba PCR, extraer ADN de las muestras de control positivas y negativas para cada serie de muestras de ensayo. Para las pruebas IF y FISH, realizar ensayos con las muestras de control positivas y negativas para cada serie de muestras de ensayo. En las pruebas IF, FISH y PCR, debe detectarse *C. m. subsp. sepedonicus* en al menos 10<sup>6</sup> y 10<sup>4</sup> células/ml de los controles positivos y en ninguno de los controles negativos.

### Apéndice 3: Tampones para los métodos de prueba

GENERAL: Los tampones esterilizados pueden almacenarse sin abrir hasta un año.

#### 1. Tampones para el procedimiento de extracción

##### 1.1 Tampón de extracción (tampón fosfato 50 mM, pH 7,0)

Este tampón se utiliza para la extracción de la bacteria del tejido de las plantas mediante homogeneización o agitación.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Agua destilada	1,00 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Los siguientes componentes adicionales pueden resultar útiles:

Finalidad		Cantidad (por l)
Copos de Lubrol	Defloculante (*)	0,5 g
Compuesto DC silicona antiespumante	Antiespumante (*)	1,0 ml
Pirofosfato tetrasódico	Antioxidante	1,0 g
Polivinilpirrolidona -40 000 (PVP-40)	Unir los inhibidores PCR	50 g

(\*) Para su utilización en el método de extracción por homogeneización.

**1.2** Tampón de extracción (tampón fosfato 10 mM, pH 7,2)

Este tampón se utiliza para la resuspensión y la dilución de extractos de cuñas basales de tubérculos de patata tras la concentración en un precipitado mediante centrifugación.

- -Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,7 g
- -NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,4 g
- -Agua destilada 1,00 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

**2. Tampones para la prueba IF****2.1** Tampón IF [tampón fosfato salino (PBS) 10 mM, pH 7,2]

Este tampón se utiliza para la dilución de anticuerpos.

- -Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,7 g
- -NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,4 g
- -NaCl 8,0 g
- -Agua destilada 1,00 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

**2.2** Tampón IF-Tween

Este tampón se utiliza para lavar los portaobjetos. Añadir Tween 20 al 0,1 % al tampón IF.

**2.3** Solución de glicerol con tampón fosfato, pH 7,6 Este tampón se utiliza como fluido de montaje en los pocillos de los portaobjetos de IF para aumentar la fluorescencia.

- -Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 3,2 g
- -NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,15 g
- -Glicerol 50 ml
- -Agua destilada 100 ml

En el mercado se pueden encontrar soluciones de montaje que protegen la fluorescencia, como p. ej., Vectashield® (Vector Laboratories) o Citifluor® (Leica).

#### **Apéndice 4: Determinación del nivel de contaminación en las pruebas IF y FISH**

1. Contar el número de células fluorescentes típicas por campo de visión (c).
2. Calcular el número de células fluorescentes típicas por pocillo del portaobjetos del microscopio

$$(C). C = c \times S/s$$

Donde:

S = superficie del pocillo del portaobjetos múltiple y

s = superficie del campo del objetivo

$$s = \pi i^2 / 4G^2K^2$$

Donde:

i = coeficiente de campo (varía de 8 a 24 dependiendo del tipo ocular)

K = coeficiente del tubo (1 o 1,25)

G = aumentos del objetivo (100x, 40x, etc.)

3. Calcular el número de células fluorescentes típicas por ml de precipitado resuspendido (N).

$$N = C \times 1.000/y \times F$$

Donde:

y = volumen de precipitado resuspendido en cada pocillo y

F = factor de dilución del precipitado resuspendido.

#### **Apéndice 5: Medios para el aislamiento y cultivo de *C. m. subsp. sepedonicus***

a) Medios de cultivo generales:

- *Agar nutritivo (NA)*
- -Agar nutritivo (Difco) 23,0 g
- -Agua destilada 1,00 l

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

*Agar de dextrosa nutritivo (NDA)*

Agar nutritivo de Difco Bacto con un 1 % de D (+)-glucosa (monohidrato). Esterilizar en autoclave a 115 °C durante 20 minutos.

*Agar de levadura, peptona, glucosa (YPGA)*

- -Extracto de levadura (Difco) 5,0 g
- -Bacto-peptona (Difco) 5,0 g
- -D (+)-glucosa (monohidrato) 10,0 g
- -Bacto-agar (Difco) 15,0 g
- -Agua destilada 1,00 l

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

*Medio de sales minerales, extracto de levadura (YGM)*

- -Bacto-extracto de levadura (Difco) 2,0 g
- -D(+)-glucosa (monohidrato) 2,5 g
- -K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 g
- -KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 g
- -MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1 g
- -MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,015 g
- -NaCl 0,05 g
- -FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,005 g
- -Bacto-agar (Difco) 18 g
- -Agua destilada 1,00 l

Disolver los ingredientes y esterilizar volúmenes de medio litro de este medio en autoclave a 115 °C durante 20 minutos.

b) Medios de cultivo selectivo validados:

*Medio MTNA.* A menos que se especifique de otra manera, todos los componentes de los medios son de BDH.

➤ -Extracto de levadura (Difco)	2,0 g
➤ -Manitol	2,5 g
➤ -K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g
➤ -KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
➤ -NaCl	0,05 g
➤ -MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
➤ -MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,015 g
➤ -FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005 g
➤ -Agar (Oxoid nº 1)	16,0 g
➤ -Agua destilada	1,0 l

Disolver los ingredientes y ajustar el pH a 7,2. Tras esterilizar en autoclave (a 121 °C durante 15 minutos) y enfriar a 50 °C, añadir los siguientes antibióticos: 0,06 g de trimetoprim, 0,002 g de ácido nalidíxico y 0,01 g de anfotericina B. Soluciones antibióticas estándar: trimetoprim (Sigma) y ácido nalidíxico (Sigma) (en ambos casos a 5 mg/ml), en metanol al 96 %, anfotericina B (Sigma) (1 mg/ml) en dimetil sulfóxido. Las soluciones estándar se esterilizan por filtración.

Nota: La durabilidad del medio base es de 3 meses. Una vez añadidos los antibióticos, la durabilidad es de 1 mes siempre que se mantengan refrigerados.

#### *Medio NCP-88*

Agar nutritivo (Difco)	23 g
Extracto de levadura (Difco)	2 g
D-manitol	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g
Agua destilada	1,0 l

Disolver los ingredientes y ajustar el pH a 7,2. Tras esterilizar en autoclave y enfriar a 50 °C, añadir los siguientes antibióticos: 0,003 g de sulfato de

polimixina B (Sigma), 0,008 g de ácido nalidíxico (Sigma) y 0,2 g de cicloheximida (Sigma).

Disolver los antibióticos en las siguientes soluciones estándar: el ácido nalidíxico en NaOH 0,01 M, la cicloheximida en etanol al 50 % y el sulfato de polimixina B en agua destilada. Las soluciones estándar se esterilizan por filtración.

Nota: La durabilidad del medio base es de 3 meses. Una vez añadidos los antibióticos, la durabilidad es de 1 mes siempre que se mantengan refrigerados.

## **Apéndice 6: Reactivos y protocolos PCR validados**

Nota: Las pruebas preliminares deberán permitir la detección reproducible de al menos  $10^3$  a  $10^4$  células de *C. m. subsp. sepedonicus* por ml de extracto de muestra.

Por otra parte, las pruebas preliminares no deben proporcionar resultados falsos positivos con respecto a un conjunto de cepas bacterianas seleccionadas.

### **1. Protocolo PCR «multiplex» con control PCR interno (Patrik, 2000)**

#### **1.1 Cebadores oligonucleótidos**

Cebador directo PSA-1                    5'- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'

Cebador reverso PSA -R 5'- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'

Cebador directo NS-7-F                5'- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3'

Cebador reverso NS-8-R 5'- tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

Tamaño esperado del amplicón de ADN de *C. m. subsp. sepedonicus* = 502 pb (conjunto de cebadores PSA). Tamaño esperado del amplicón del control PCR interno de ARNr 18S = 377 pb (conjunto de cebadores NS).

**1.2 Mezcla para la reacción PCR**

Reactivo	Cantidad para la reacción	Concentración final
Agua ultrapura estéril	15,725 µl	
10x tampón PCR (1) (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl	
BSA (fracción V) (10 %)	0,25 µl	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
Mezcla d-nTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 %
Cebador PSA-1 (10µM)	0,5 µl	0,1 mM
Cebador PSA-R (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Cebador NS-7-F (10µM) (2)	0,1 µl	0,2 µM
Cebador NS-8-R (10µM) (2)	0,1 µl	0,04 µM
Polimerasa Taq (5U/µl) (1)	0,2 µl	0,04 µM
		1,0 U
Volumen de muestra	5,0 µl	
Volumen total	25,0 µl	

- (1). Los métodos se validaron utilizando polimerasa Taq de Perkin Elmer (AmpliAq o Gold) y Gibco BRL.
- (2). La concentración de los cebadores NS-7 F y NS-8-R se optimizó para la extracción de cuñas basales de patata utilizando el método de homogeneización y purificación del ADN de acuerdo con Pastrok (2000) (véanse los puntos 6.1.a) y 6.2). Será necesario proceder a la reoptimización de las concentraciones de reactivos si se utiliza el método de extracción por agitación u otros métodos de aislamiento del ADN.

**1.3 Condiciones de reacción PCR**

Aplicar el siguiente programa:

1 ciclo de:

- i) 3 minutos a 95 °C (desnaturalización de ADN)
- ii) 10 ciclos de:
- iii) 1 minuto a 95 °C (desnaturalización de ADN)
- iv) 1 minuto a 64 °C (anillamiento de los cebadores)
- v) 1 minuto a 72 °C (extensión de la copia) 25 ciclos de:
- vi) 30 segundos a 95 °C (desnaturalización de ADN)
- vii) 30 segundos a 62 °C (anillamiento de los cebadores)
- viii) 1 minuto a 72 °C (extensión de la copia) 1 ciclo de:

- ix) 5 minutos a 72 °C (extensión final)
- x) mantener a 4 °C

Nota: Este programa se ha optimizado para utilizarlo con un termociclador MJ Research PTC 200. Puede ser preciso modificar la duración de los ciclos ii), iii) iv), v), vi) y vii) para su utilización con otros modelos.

#### **1.4 Análisis de la enzima de restricción del amplicón**

Los productos PCR amplificados a partir de ADN de *C. m. subsp. sepedonicus* producen un polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción característico con la enzima Bgl II tras la incubación a 37 °C durante 30 minutos. Los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos a partir del fragmento específico de *C. m. subsp. sepedonicus* son de 282 pb y 220 pb.

## **2. Preparación del tampón de carga**

### **2.1 Azul de bromofenol (solución estándar al 10 %)**

Azul de bromofenol 5 g  
Agua bidestilada 50 ml

### **2.2 Tampón de carga**

Glicerol (86 %) 3,5 ml  
Azul de bromofenol (2.1.) 300 µl  
Agua bidestilada 6,2 ml

## **3. 10X tampón de tris acetato EDTA (TAE), pH 8,0**

- -Tampón tris 48,4 g
- -Ácido acético glacial 11,42 ml
- -EDTA (sal disódica) 3,72 g
- -Agua destilada 1,00 l

Diluir a 1X antes de utilizarlo.

Se encuentra también disponible en el mercado (por ejemplo, Invitrogen o equivalente).

**Apéndice 7: Reactivos validados para la prueba FISH**

1. Oligosondas:

2.

Sonda específica para Cms CMS-CY3-01:

5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'

Sonda eubacteriana no específica EUB-338-FITC:

5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Solución fijadora

[ADVERTENCIA: LA SOLUCIÓN FIJADORA CONTIENE PARAFORMALDEHÍDO QUE ES TÓXICO. UTILIZAR GUANTES Y NO INHALAR. SE RECOMIENDA TRABAJAR EN UNA CAMPANA EXTRACTORA DE GASES.]

- i) Calentar 9 ml de agua de grado molecular (p. ej. agua ultrapura) a 60 °C aproximadamente y añadir 0,4 g de paraformaldehído. El paraformaldehído se disuelve cuando se añaden 5 gotas de NaOH 1N y se remueve con un agitador magnético.
- ii) Ajustar el pH a 7,0 mediante la adición de 1 ml de tampón fosfato de concentración 0,1 M (pH 7,0) y 5 gotas de HCl 1N. Verificar el pH con bandas indicadoras y ajustar si fuese necesario con HCl o NaOH.
- iii) [ADVERTENCIA: NO UTILIZAR UN MEDIDOR DE PH EN SOLUCIONES QUE CONTENGAN PARAFORMALDEHÍDO.]
- iv) Filtrar la solución con un filtro de membrana de 0,22 µm y mantener libre de polvo a 4 °C hasta nueva utilización.
- v) Nota: Solución fijadora alternativa: etanol al 96 %.

3. 3X Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (esterilizado por filtración y autoclave)	15 mM

Diluir a 1X cuando se precise.

4. Solución de hibridación

1X Hybmix

Dodecilsulfato sódico (SDS)	0,01 %
sonda EUB 338	5 ng/μl
sonda CMSCY301	5 ng/μl

Preparar las cantidades de solución de hibridación de acuerdo con los cálculos de la tabla 1. Para cada portaobjetos (que contenga 2 muestras distintas por duplicado) se precisan 90 μl de solución de hibridación.

Tabla 1: Cantidades sugeridas para la preparación de la mezcla de hibridación

	2 Portaobjeto	8 Portaobjetos
Agua ultrapura estéril	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Sonda EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0
Sonda CMSCY301 (100 ng/μl)	4,5	18,0
Volumen total (μl)	90,0	360,0

NB. Almacenar todas las soluciones que contengan oligosondas fotosensibles en la oscuridad a - 20 °C. Proteger de la luz directa ya sea del sol o eléctrica durante su utilización.

#### 5. Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0

- -Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,52 g
- -KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,44 g
- -Agua destilada 1,00 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### Apéndice 8: Cultivo de berenjenas

Sembrar semillas de berenjena (*Solanum melongena*) en compost pasteurizado de semillas. Trasplantar las plántulas con los cotiledones completamente abiertos (1 a 14 días) en compost pasteurizado de tiesto. Las berenjenas deben cultivarse en un invernadero que cumpla las siguientes condiciones ambientales:

- -Duración diurna: 14 horas o día natural si es de mayor duración.
- -Temperatura:
  - diurna: de 21 a 24 °C
  - nocturna: 15° C
- -Variedades de berenjena sensibles:  
'Black Beauty',  
'Long Tom',  
'Rima',  
'Balsas'.

Proveedores: véase el sitio web:

<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

### **Apéndice 9: Procedimiento de la tinción de Gram (modificación de Hucker) (Doetsch, 1981) (1)**

#### *Solución de cristal violeta*

- -Disolver 2 g de cristal violeta en 20 ml de etanol al 95 %.
- -Disolver 0,8 g de oxalato amónico en 80 ml de agua destilada.

Mezclar las dos soluciones.

#### *Solución de Lugol*

- -Yodo 1 g
- -Yoduro de potasio 2 g
- -Agua destilada 300 ml

Triturar conjuntamente los sólidos en un mortero. Añadir al agua y remover hasta su disolución en un recipiente cerrado.

#### *Solución de contraste de safranina*

Solución estándar:

- -SafraninaO                    2,5 g
- -Etanol al 95 %                100 ml

Mezclar y conservar. Diluir al 1:10 para conseguir una solución de trabajo.

#### Procedimiento de tinción

1. Preparar los frotis, secar al aire y fijar por calor.

2. Sumergir el portaobjetos en la solución de cristal violeta durante un minuto.
3. Lavar brevemente con agua corriente.
4. Sumergir en solución de Lugol durante un minuto.
5. Lavar con agua corriente y secar.
6. Decolorar con etanol al 95 %, añadido gota a gota hasta que ya no se produzca ningún cambio de color, o sumergir agitando suavemente durante 30 segundos.
7. Lavar con agua corriente y secar.
8. Sumergir en la solución de safranina durante 10 segundos.
9. Lavar con agua corriente y secar.

Las bacterias Gram. positivas se tiñen de violeta-azul y las Gram. negativas de rosa-rojo.

(1) También pueden utilizarse otras soluciones y kits de tinción disponibles en el mercado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Anónimo, 1987, «Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers». Comisión de las Comunidades Europeas, Luxemburgo. Publ EUR 11 288 EN, 21 pp.
- 2 Bradbury, J. F., 1970, «Isolation and preliminary study of bacteria from plants», *Rev. Pl. Path.*, 49, pp. 213-218.
- 3 Dinesen, I. G., 1984, «The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers», *EPPO Bull.* 14 (2), pp. 147-152.
- 4 Doetsch, R. N., 1981, «Determinative methods of light microscopy», *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology. Washington, pp. 21-23.
- 5 Hugh, R. F. Leifson, 1953, «The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria», *J. Bact.*, 66, pp. 24-26.
- 6 Janse, J. D., 1991, «Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fattyacid análisis», *Systematic and Applied Microbiology* 14, pp. 335-345.
- 7 Janse, J. D. y J. Van Vaerenbergh, «The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato», *EPPO Bull.*, 17, 1987, pp. 1-10.
- 8 Jansing, H. y K. Rudolph, 1998, «Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective médium», *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105, pp. 590-601.
- 9 Klement Z.; Rudolph, K y D. C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
- 10 Kovacs, N., 1956, «Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction», *Nature, Londres*, 178, pp. 703
- 11 Lelliott, R. A., 1966, «The plant pathogenic coryneform bacteria», *J. appl. Bact.*, 29, pp. 114-118.

- 12 Lelliott, R. A., E. Billing y A. C. Hayward, 1966, «A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads », J. appl. Bact., 29, pp. 470-489.
- 13 Lelliott, R. A. y P. W. Sellar, 1976, «The detection of latent ring rot [*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.)] in potato stocks», EPPO Bull., 6 (2), pp. 101-106.
- 14 Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
- 15 Li, X. y S.H. de Boer, 1995, «Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*», Phytopathology, 85, pp. 837-842.
- 16 Mills, D., Russell, B., W. y J., W. Hanus, 1997, «Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization», Phytopathology, 87, 8, pp. 853-861.
- 17 Pastrok, K. -H. y R.A. Rainey. 1999, «Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques», J. Phytopathology 147; pp. 687-693.
- 18 Pastrok, K.-H., 2000, «Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA», European Journal of Plant Pathology, 106, pp. 155-165.
- 19 Ramamurthi, C. S., 1959, «Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the *Corynebacteria*», Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.
- 20 Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. y Knorr, D. (1999), «Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system», Plant Disease 83; pp. 1095-1100.
- 21 Schaad, W. 2001, «Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria», Schaad [Hrsg.]. 3a. ed.; St. Paul, Minnesota, 373 pp.
- 22 Skerman, V. B. D., 1967, A guide to the identification of the genera of bacteria. Segunda edición, Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1967.

- 23 Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001, «Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1/Ralstonia solanacearum primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*», *European Journal of Plant Pathology*, 107 (7), pp. 739-748.
- 24 Sneath, P. H. A. y V. G. Collins, 1974, «A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas working party», *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, pp. 481-527.
- 25 Stead, D.E., 1992, «Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles», *International Journal of Systematic Bacteriology* 42; pp. 281-295.
- 26 Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. y A. D. L. Akkermans, 1998, «Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes», *Appl. Environ. Microbiol*, 64, pp. 4546-4554.



## **ANEXO N° 1.B: MÉTODO DE DIAGNÓSTICO, DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI ET AL.**

### **ÁMBITO DE APLICACIÓN DEL MÉTODO**

El presente método describe los diversos procedimientos relacionados con:

- i) el diagnóstico de la podredumbre parda en los tubérculos de patata y de la marchitez bacteriana en las plantas de patata, tomate y otras plantas huésped,
- ii) la detección de *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) en muestras de tubérculos de patata, plantas de patata, tomate y otras plantas huésped, agua y suelo,
- iii) la identificación de *R. solanacearum*.

### **PRINCIPIOS GENERALES**

En los apéndices se presentan protocolos optimizados para los diferentes métodos y reactivos validados, así como información detallada para la preparación de materiales de prueba y control. En el *apéndice 1* se presenta una lista de los laboratorios que se incluyeron en la optimización y validación de los protocolos.

Habida cuenta de que los protocolos implican la detección de un organismo de cuarentena y de que incluirán la utilización de cultivos viables de *R. solanacearum* como materiales de control, será preciso llevar a cabo los procedimientos bajo condiciones de cuarentena apropiadas, con instalaciones adecuadas de eliminación de residuos y en aplicación de las condiciones de obtención de los permisos apropiados emitidos por las autoridades oficiales de cuarentena de las plantas.

Los parámetros de las pruebas deben garantizar una detección coherente y reproducible de niveles de *R. solanacearum* en los límites establecidos en los métodos seleccionados.

Es imprescindible una preparación precisa de los controles positivos.

Asimismo, la realización de pruebas con arreglo a los niveles requeridos implica la utilización de los parámetros correctos, el mantenimiento y el calibrado del equipo, una preservación y manipulación cuidadosa de los reactivos y todas las medidas para evitar la contaminación entre las muestras, como por ejemplo la separación de los controles positivos de las muestras de ensayo. Deben aplicarse normas de control de la calidad para evitar errores administrativos y de otro tipo, especialmente de etiquetado y documentación.

Una sospecha de brote implica la obtención de un resultado positivo de las pruebas de diagnóstico o selección efectuadas a una muestra tal como se especifica en los siguientes diagramas de flujo. Un resultado positivo en la primera prueba de selección (prueba IF, PCR/FISH, aislamiento selectivo) debe confirmarse con una segunda prueba de selección basada en un principio biológico diferente.

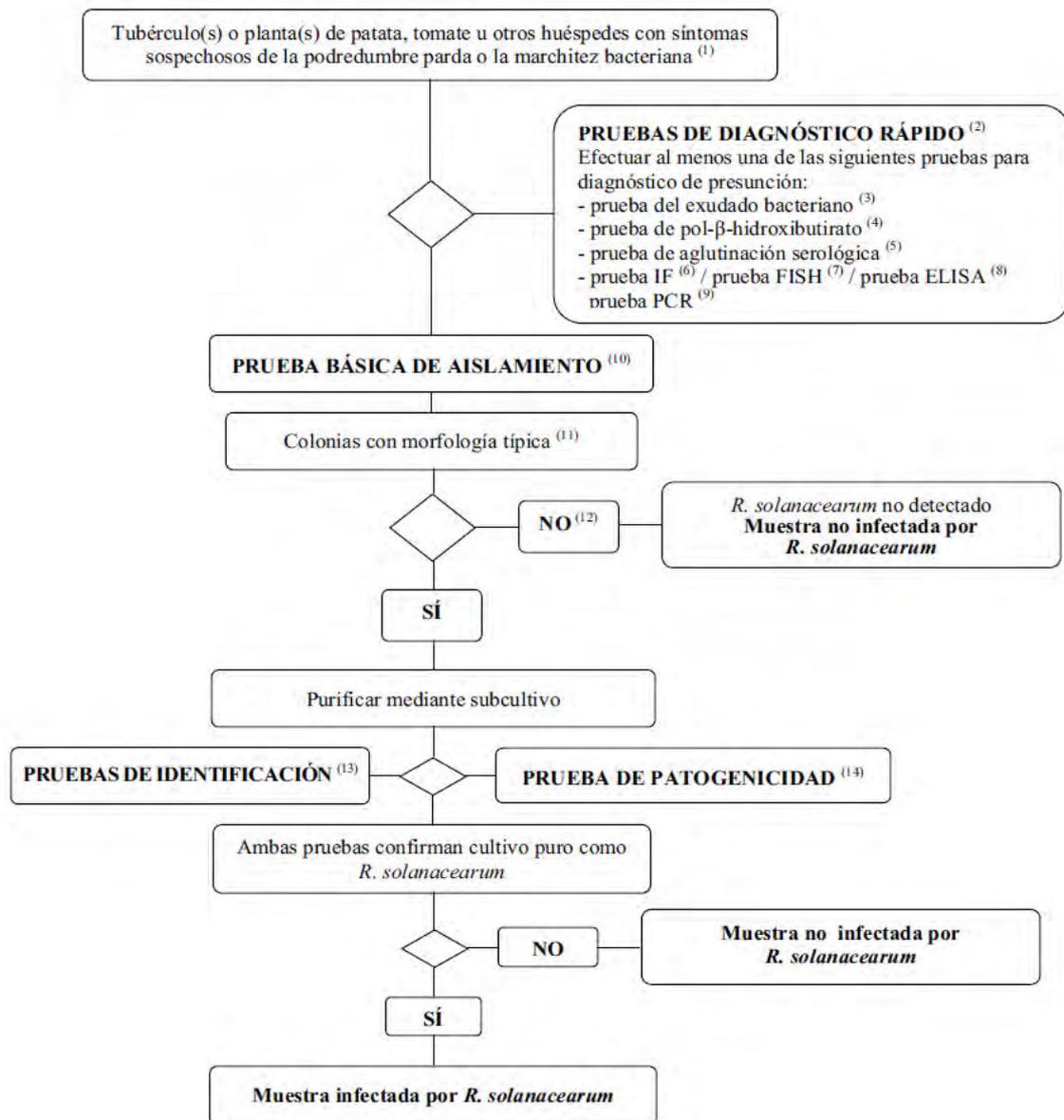
Si la primera prueba de selección proporciona un resultado positivo, se sospecha entonces la contaminación con *R. solanacearum* y debe efectuarse una segunda prueba de selección. Si la segunda prueba de selección proporciona un resultado positivo, se confirma entonces la sospecha (sospecha de presencia) y debe continuar la prueba con arreglo al método. Si la segunda prueba de selección proporciona un resultado negativo, se considera entonces que la muestra no está contaminada con *R. solanacearum*.

Una presencia confirmada implica el aislamiento y la identificación de un cultivo puro de *R. solanacearum* con confirmación de patogenicidad.

## SECCIÓN I: APLICACIÓN DEL MÉTODO

### 1. Método de detección para el diagnóstico de la podredumbre parda y la marchitez bacteriana (*R. solanacearum*) en tubérculos de patata y plantas de patata, tomate u otras plantas huésped con síntomas de podredumbre parda o marchitez bacteriana

El procedimiento de análisis está destinado a los tubérculos de patata y a las plantas que presentan síntomas típicos de la podredumbre parda o la marchitez vascular o que permiten la sospecha de su presencia. Incluye una prueba de selección rápida, el aislamiento del patógeno del tejido vascular infectado en un medio (selectivo) y, en caso de resultado positivo, la identificación del cultivo como *R. solanacearum*.



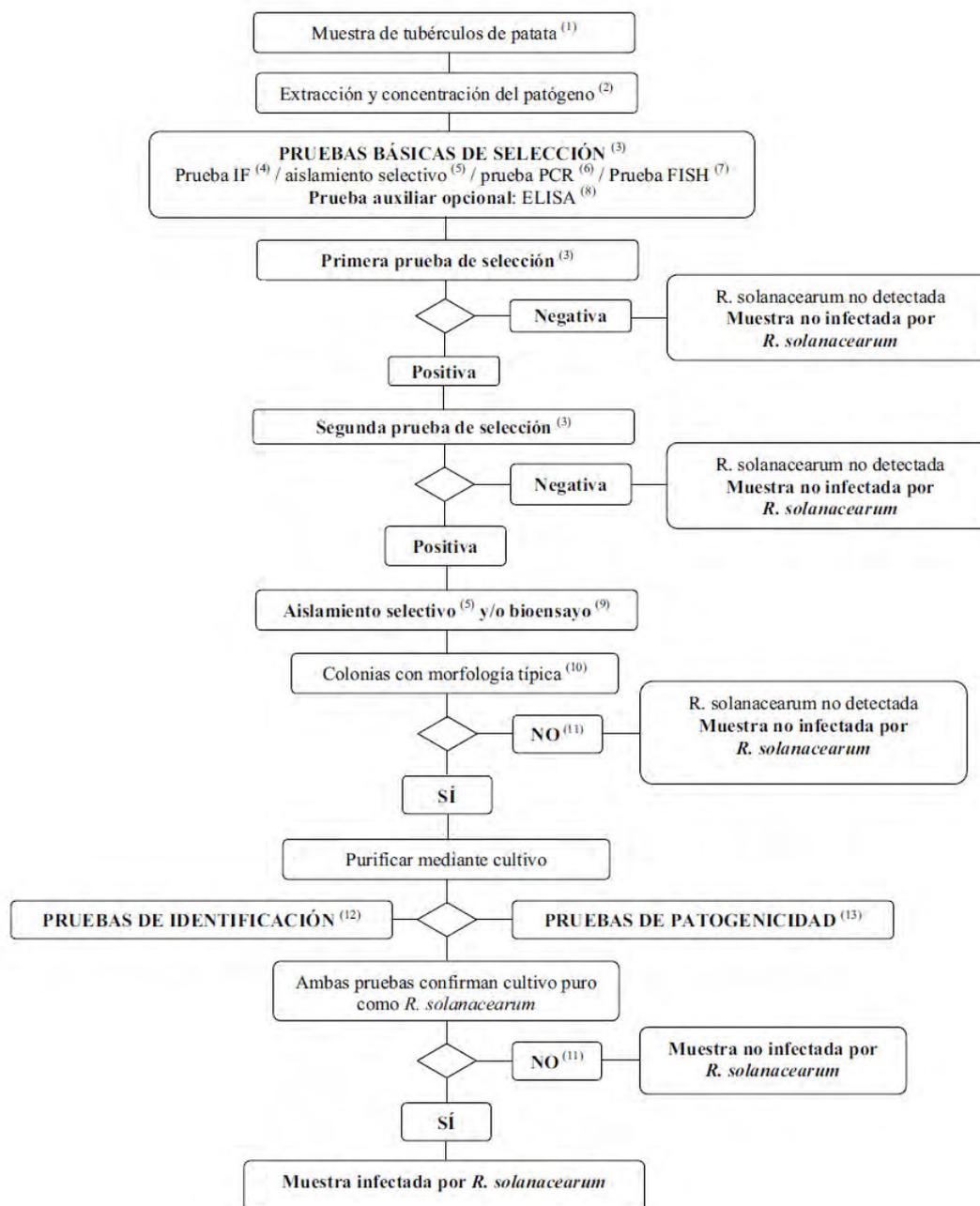
- (1) Para la descripción de los síntomas véase la sección II.1.
- (2) Las pruebas de diagnóstico rápido facilitan el diagnóstico de presunción, pero no son esenciales. Un resultado negativo no garantiza en todos los casos la inexistencia del patógeno.
- (3) En la sección VI.A.1 se describe la prueba de la exudación para el líquido bacteriano del tejido vascular del tallo.
- (4) En la sección VI.A.2 se describe la prueba de detección de gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato en células bacterianas.
- (5) En la sección VI.A.3 se describen las pruebas de aglutinación serológica en líquido bacteriano o extractos de tejido sintomático.
- (6) En la sección VI.A.5 se describe la prueba IF en líquido bacteriano suspendido en agua o extractos de tejido sintomático.
- (7) En la sección VI.A.7 se describe la prueba FISH en líquido bacteriano suspendido en agua o extractos de tejido sintomático.
- (8) En la sección VI.A.8 se describe la prueba ELISA en líquido bacteriano suspendido en agua o extractos de tejido sintomático.
- (9) En la sección VI.A.6 se describe la prueba PCR en líquido bacteriano suspendido en agua o extractos de tejido sintomático.
- (10) El patógeno suele aislarse con facilidad del material vegetal sintomático mediante dilución en placas (sección II.3).
- (11) La morfología típica de la colonia se describe en la sección II.3.d.
- (12) El aislamiento puede fallar en estados avanzados de infección debido a la competencia o el enmascaramiento por bacterias saprofitas. Si los síntomas de la enfermedad son los típicos, pero el aislamiento es negativo, deberá repetirse el aislamiento, preferentemente valiéndose de una siembra en medio selectivo.
- (13) La identificación fiable de cultivos puros posibles aislados de *R. solanacearum*, se efectúa utilizando las pruebas descritas en la sección VI.B. La caracterización subespecífica de las cepas es optativa, pero se recomienda en cada caso nuevo. (14) La prueba de patogenicidad se describe en la sección VI.C.

## **2. Método de detección e identificación de *R. solanacearum* en muestras asintomáticas de tubérculos de patata**

### Fundamento

El protocolo de análisis tiene por objeto la detección de infecciones latentes en tubérculos de patata. Un resultado positivo de un mínimo de dos pruebas de selección, basadas en diferentes principios biológicos, debe complementarse con el aislamiento del patógeno, seguido, en caso de aislamiento de colonias típicas, por la confirmación de un cultivo puro como *R. solanacearum*. Un resultado positivo de solamente una de las pruebas de selección no es suficiente para considerar sospechosa la muestra.

Las pruebas de selección y las pruebas de aislamiento deben permitir la detección de 10 a 10 células/ml de precipitado resuspendido, incluidas como controles positivos en cada serie de pruebas.



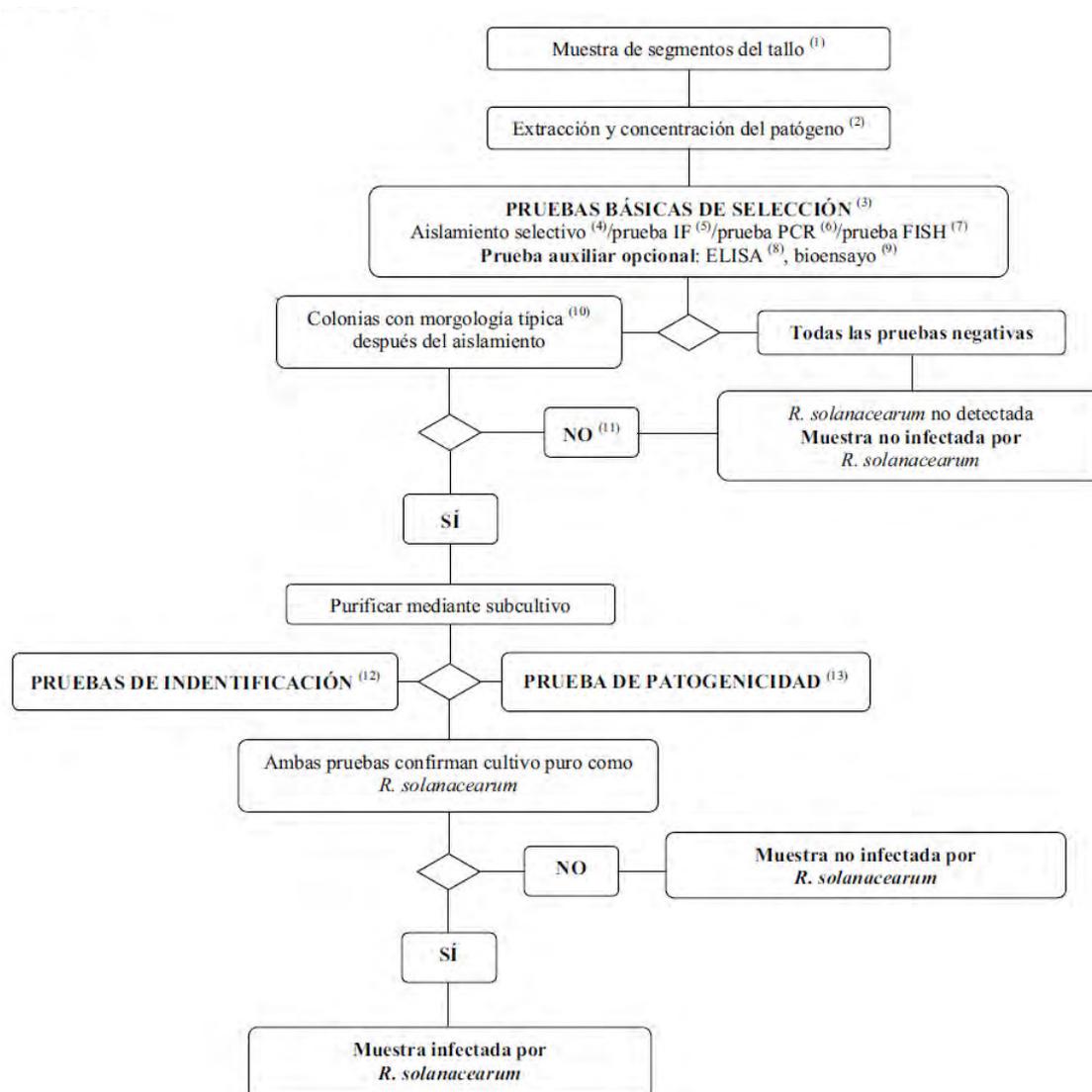
(1) El tamaño normal de la muestra es de 200 tubérculos, aunque el procedimiento puede utilizarse con muestras más pequeñas si no se dispone de 200

- (1) tubérculos.
- (2) En la sección III.1.1 se describen los métodos de extracción y concentración de patógenos.
- (3) Si un mínimo de dos pruebas basadas en diferentes principios biológicos proporcionan resultados positivos, debe efectuarse el aislamiento y la confirmación. Efectúese como mínimo una prueba de selección. Cuando esta prueba dé resultados negativos, se

considerará que la muestra es negativa. En caso de que la prueba dé resultados positivos, deberá efectuarse una segunda prueba de selección, o varias más, basadas en diferentes principios biológicos, con el fin de verificar el primer resultado positivo. Si la segunda prueba o las pruebas siguientes proporcionan resultados negativos, la muestra se considerará negativa. No será preciso efectuar otras pruebas.

- (4) En la sección VI.A.5 se describe la prueba IF.
- (5) En la sección VI.A.4 se describe la prueba de aislamiento selectivo.
- (6) En la sección VI.A. 6 se describen las pruebas PCR.
- (7) En la sección VI.A.7 se describe la prueba FISH.
- (8) En la sección VI.A.8 se describen las pruebas ELISA.
- (9) En la sección VI.A.9 se describe la prueba del bioensayo.
- (10) La morfología típica de la colonia se describe en la sección II. 3. d.
- (11) El aislamiento o los bioensayos pueden fallar debido a la competencia o la inhibición por bacterias saprofitas. Si se obtienen resultados positivos claros en las pruebas de selección, pero las pruebas de aislamiento dan resultados negativos, entonces deben repetirse las pruebas de aislamiento a partir del mismo precipitado o tomando más tejido vascular cerca de la parte basal de tubérculos cortados de la misma muestra y, en caso necesario, analizar otras muestras,
- (12) La identificación fiable de cultivos puros aislados posibles de *R. solanacearum*, se efectúa utilizando las pruebas descritas en la sección VI.B.
- (13) La prueba de patogenicidad se describe en la sección VI.C.

### 3. Método de detección e identificación de *R. solanacearum* en muestras asintomáticas de patatas, tomates y otras plantas



#### huésped

- (1) Véase la sección III.2.1 para los tamaños recomendados de las muestras.
- (2) En la sección III.2.1 se describen los métodos de extracción y concentración de patógenos.
- (3) Si un mínimo de dos pruebas basadas en diferentes principios biológicos proporcionan resultados positivos, debe efectuarse el aislamiento y la confirmación. Efectúese como mínimo una prueba de selección. Cuando esta prueba dé resultados negativos, se considerará que la muestra es negativa. En caso de que la prueba dé resultados positivos, deberá efectuarse una segunda prueba de

selección, o varias más, basadas en diferentes principios biológicos, con el fin de verificar el primer resultado positivo, Si la segunda prueba o las pruebas siguientes proporcionan resultados negativos, la muestra se considerará negativa. No será preciso efectuar otras pruebas.

- (4) En la sección VI.A.4 se describe la prueba de aislamiento selectivo.
- (5) En la sección VI.A.5 se describe la prueba IF.
- (6) En la sección VI.A.6 se describen las pruebas PCR.
- (7) En la sección VI.A.7 se describe la prueba FISH.
- (8) En la sección VI.A.8 se describen las pruebas ELISA.
- (9) En la sección VI.A.9 se describe la prueba del bioensayo.
- (10) La morfología típica de la colonia se describe en la sección II.3.d.
- (11) El aislamiento o los bioensayos pueden fallar debido a la competencia o la inhibición por bacterias saprofitas. Si se obtienen resultados positivos en las pruebas de selección, pero las pruebas de aislamiento dan resultados negativos, entonces deben repetirse las pruebas de aislamiento.
- (12) La identificación fiable de cultivos puros posibles aislados de *R. solanacearum*, se efectúa utilizando las pruebas descritas en la sección VI.B.
- (13) La prueba de patogenicidad se describe en la sección VI.C.

## **SECCIÓN II: MÉTODOS DETALLADOS DE DETECCIÓN DE *R. SOLANCEARUM* EN TUBÉRCULOS DE PATATA Y PLANTAS DE PATATA, TOMATE U OTRAS PLANTAS HUÉSPED CON SÍNTOMAS DE LA PODREDUMBRE PARDA O LA MARCHITEZ BACTERIANA**

### **1.- SÍNTOMAS**

(véase el sitio web:  
<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

#### **1.1.- Síntomas en patata:**

*En planta de patata.* La fase inicial de la infección en el campo se reconoce por un marchitamiento de las hojas en progresión ascendente hacia el extremo superior de la planta, bajo el efecto de las temperaturas diurnas altas, con una recuperación durante la noche. En las primeras fases del marchitamiento, las hojas siguen estando verdes, pero posteriormente se desarrolla necrosis parda y amarilleo. También se produce epinastia. El marchitamiento de un brote o de plantas enteras se hace rápidamente irreversible y ocasiona el colapso y la muerte de la planta. El tejido vascular de los tallos de las plantas marchitadas cortados transversalmente suele ser pardo, y de la superficie del corte brota un exudado mucoso bacteriano o este puede extraerse apretando el tallo. Si se coloca verticalmente un tallo cortado en agua, de los haces vasculares salen hilos viscosos.

*En tubérculo de patata.* Los tubérculos de patata deben cortarse transversalmente cerca de la parte basal (estolón) o bien longitudinalmente sobre el estolón. Posteriormente, la decoloración vascular adquiere un tono pardo más marcado y la necrosis puede extenderse al tejido parenquimático. En las fases avanzadas, la infección progresa desde la parte basal y los ojos, por las que pueden fluir exudados bacterianos, lo que hace que se adhieran partículas del suelo. Pueden aparecer en la piel lesiones ligeramente hundidas de color pardo rojizo debido al colapso interno de los tejidos vasculares. En las fases avanzadas de la enfermedad es habitual el desarrollo secundario de podredumbres blandas causadas por hongos y bacterias.

## 1.2.- Síntomas en tomate

*En planta de tomate.* El primer síntoma visible es el aspecto flácido de las hojas más jóvenes. Si se producen condiciones medioambientales favorables para el patógeno (temperaturas del suelo de 25 °C; humedad saturada), en un plazo de pocos días se produce epinastia y marchitamiento de un lado de la planta o de toda ella, lo que desemboca en un colapso total de la planta. En condiciones menos favorables (temperatura del suelo por debajo de 21 °C), se produce un menor marchitamiento, pero pueden surgir numerosas raíces adventicias del tallo. En ocasiones se observan estrías húmedas desde la base del tallo, lo que demuestra la existencia de necrosis en el sistema vascular.

Al cortar transversalmente el tallo, los tejidos vasculares que presentan una decoloración parda exudan gotas de líquido bacteriano blanco o amarillento.

## 1.3.- Síntomas en otros huéspedes

*Plantas de Solanum dulcamara y S. nigrum.* En condiciones naturales, en pocos casos se observan síntomas de marchitamiento en estos huéspedes herbáceos a no ser que la temperatura del suelo supere los 25 °C o los niveles de inóculo sean extremadamente elevados (por ejemplo, para *S. nigrum* que crezca junto a plantas enfermas de patatas o tomates). Cuando se produce el marchitamiento, los síntomas son como los descritos para el tomate. Las plantas de *S. dulcamara*, que no se marchitan y que crecen con tallos y raíces en el agua, pueden mostrar una decoloración interna pardo claro de los tejidos vasculares en una sección transversal de la base del tallo, o de las partes del tallo que se encuentran bajo el agua. Pueden fluir bacterias de los tejidos vasculares cortados, o formar hilos viscosos, si el tallo cortado se coloca verticalmente en el agua, incluido en caso de inexistencia de síntomas de marchitamiento.

## 2. PRUEBAS DE SELECCIÓN RÁPIDA

Las pruebas de selección rápida facilitan el diagnóstico de presunción, pero no son esenciales. Realícese una o más de las siguientes pruebas validadas:

## **2.1 Prueba de la exudación del tallo (Véase la sección VI.A.1.)**

## **2.2 Prueba de la detección de gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB)**

Los gránulos de PHB característicos en las células de *R. solanacearum* se visualizan tiñendo frotis de exudado bacteriano fijado con calor procedente de tejido infectado en un portaobjetos con azul Nilo A o negro Sudán B (véase la sección VI.A.2).

## **2.3 Pruebas de aglutinación serológica (Véase la sección VI.A.3.)**

## **2.4 Otras pruebas**

Otras pruebas de selección rápida apropiadas incluyen la prueba IF (véase la sección VI.A.5), la prueba FISH (véase la sección VI.A.7), las pruebas ELISA (véase la sección VI.A.8) y las pruebas PCR (véase la sección VI.A.6).

## **3. PROCESO DE AISLAMIENTO**

- a) Coger exudado o secciones de tejido decolorado del anillo vascular del tubérculo o de los haces vasculares del tallo de la planta de patata, de tomate o de otras plantas huésped en proceso de marchitamiento. Poner en suspensión en un volumen reducido de agua destilada estéril o en tampón fosfato 50 mM (apéndice 4) y dejar entre cinco y diez minutos.
- b) Preparar una serie de diluciones decimales de la suspensión.
- c) Echar 50-100  $\mu$ l de la suspensión y las diluciones en un medio nutritivo general (NA, YPGA o SPA; véase el apéndice 2) y/o en un medio de tetrazolio de Kelman (apéndice 2) y/o un medio selectivo validado (por ejemplo, SMSA; véase el apéndice 2). Extender o hacer estrías con una técnica adecuada de dilución en placas. Si se

considera útil, preparar un conjunto de placas distintas con un cultivo de una suspensión celular diluida de *R. solanacearum* biovar 2 como control positivo.

- d) Incubar las placas entre dos y seis días a 28 °C.
- En un medio nutritivo general, los aislados virulentos de *R. solanacearum* desarrollan colonias de color blanco nacarado, planas, irregulares y fluidas, que con frecuencia presentan los verticilos característicos en el centro. Las formas avirulentas de *R. solanacearum* forman colonias butirosas pequeñas, redondas y no fluidas, que son completamente blancas.
  - En los medios de tretrazolio de Kelman y SMSA, los verticilos son de color rojo sangre. Las formas avirulentas de *R. solanacearum* forman colonias butirosas pequeñas, redondas y no fluidas, que son totalmente de color rojo oscuro.

#### **4. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE *R. SOLANACEARUM***

Las pruebas para confirmar la identidad de presuntos aislados de *R. solanacearum* se muestran en la sección VI.B.

## SECCIÓN III

### 1. MÉTODOS DETALLADOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *R. SOLANACEARUM* EN MUESTRAS ASINTOMÁTICAS DE TUBÉRCULOS DE PATATA

#### 1.1.- Preparación de la muestra

Nota:

- El tamaño normal de la muestra es de 200 tubérculos. Un muestreo más intensivo requiere más pruebas en muestras de este tamaño. Un mayor número de tubérculos en la muestra producirá inhibición o una interpretación difícil de los resultados. Sin embargo, el procedimiento puede aplicarse convenientemente a muestras de menos de 200 tubérculos, cuando se disponga de pocos tubérculos.
- La validación de todos los métodos de detección descritos a continuación se basa en la realización de pruebas a muestras de 200 tubérculos.
- El extracto de patata descrito a continuación puede utilizarse también para la detección de la bacteria de la necrosis bacteriana de la patata, *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*.

Pretratamiento opcional previo a la preparación de la muestra:

- a) incubación de muestras a 25-30 °C, hasta un máximo de dos semanas antes de la realización de la prueba, con el fin de alentar la multiplicación de cualquier población de *R. solanacearum*;
- b) lavar los tubérculos. Utilizar desinfectantes apropiados (compuestos de cloro cuando vaya a utilizarse la prueba PCR a fin de eliminar el ADN patógeno) y detergentes entre cada muestra. Secar al aire los tubérculos. Este procedimiento de lavado es especialmente útil (pero no obligatorio) para las muestras con exceso de tierra y si debe realizarse

una prueba PCR o un procedimiento de aislamiento directo.

1.1.1.-Quitar la epidermis de la parte basal (estolón) del tubérculo con un bisturí o un cuchillo limpio y desinfectado, de modo que los tejidos vasculares queden a la vista. Extraer con cuidado una cuña cónica pequeña de tejido vascular de la parte basal y extraer el mínimo volumen posible de tejido no vascular.

(véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

*Nota:* Retirar los tubérculos (podridos) que presenten síntomas sospechosos de "podredumbre parda" y analizarlos por separado.

Si durante la extracción de la cuña de la parte basal se observan síntomas sospechosos de podredumbre parda, deberá efectuarse una inspección visual del tubérculo, y cortarse este cerca de la parte basal. Todo tubérculo cortado con síntomas sospechosos deberá guardarse durante un mínimo de dos días a temperatura ambiente a fin de permitir la suberización y almacenar refrigerado (a 4-10 °C) en condiciones de cuarentena apropiadas. Todos los tubérculos, incluidos los que presenten síntomas sospechosos, deberán mantenerse con arreglo a lo establecido en el **Anexo nº10**.

1.1.2.- Colocar las cuñas de la parte basal en recipientes desechables no utilizados que puedan cerrarse y/o sellarse (en caso de reutilización de los recipientes, deberán limpiarse y desinfectarse por completo utilizando compuestos de cloro). Es conveniente procesar las cuñas inmediatamente. Si esto no es posible, almacenarlas en el recipiente, sin añadir ningún tampón, refrigeradas durante un período máximo de 72 horas o de 24 horas a temperatura ambiente.

Procesar las cuñas por uno de los métodos siguientes:

a) bien cubrir las cuñas con un volumen suficiente (aproximadamente 40 ml) de tampón de extracción (apéndice 4) y agitar en un agitador rotatorio

(50-100 rpm) durante cuatro horas por debajo de 24 °C o refrigeradas entre 16 y 24 horas,

o bien

b) homogeneizar las cuñas con un volumen suficiente (aproximadamente 40 ml) de tampón de extracción (apéndice 4) en una trituradora (por ejemplo, Waring o Ultra Thurax) o machacándolas en una bolsa de maceración desechable sellada (por ejemplo, Stomacher o Bioreba de polietileno de gran calibre, 150 mm × 250 mm; esterilizada por radiación) utilizando un mazo de goma o un aparato de trituración adecuado (por ejemplo, Homex).

*Nota:* Existe un elevado riesgo de contaminación cruzada de muestras cuando se homogenizan las muestras utilizando una trituradora. Tomar precauciones a fin de evitar la generación de aerosoles o el vertido durante el proceso de extracción. Debe asegurarse que se utilizan para cada muestra recipientes y cuchillas de trituradora esterilizados. Si se utiliza la prueba PCR, evitar la transferencia de ADN en los recipientes o el aparato de trituración. Al utilizar PCR, se recomienda machacar el material en bolsas desechables y utilizar tubos desechables.

1.1.3 Se decanta el sobrenadante. Si es demasiado turbio, clarificarlo con una centrifugación a baja velocidad (no más de 180 g durante diez minutos a una temperatura entre 4-10 °C) o mediante filtración al vacío (40-100 µm), lavando el filtro con tampón de extracción adicional (10 ml).

1.1.4 Concentrar las bacterias por centrifugación a 7.000 g durante 15 minutos (o 10.000 g durante diez minutos) a una temperatura entre 4-10 °C y descartar el sobrenadante sin perturbar el sedimento.

1.1.5 Resuspender el precipitado en 1,5 ml de tampón de precipitado (apéndice 4). Utilizar 500 µl para pruebas de *R. solanacearum*, 500 µl para *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* y 500 µl para referencia. Añadir glicerol estéril a la concentración final de 10-25 % (v/v) a los 500 µl de la alícuota de referencia y a la restante alícuota de prueba, mezclar y almacenar a una temperatura comprendida entre -16 a -24 °C (semanas) o

entre -68 a -86 °C (meses). Mantener las alícuotas de prueba a entre 4-10 °C durante la prueba.

No se aconseja congelar y descongelar repetidamente. Si debe transportarse el extracto, entréguese en un recipiente frío en un plazo de 24 a 48 horas.

1.1.6 Es de capital importancia tratar por separado todos los controles y muestras positivos de *R. solanacearum* para evitar la contaminación. Esto se aplica a los portaobjetos IF y a todas las pruebas.

## 1.2. Análisis

Véase el diagrama de flujo y la descripción de las pruebas y los protocolos optimizados en los apéndices pertinentes:

*Aislamiento selectivo* (véase la sección VI.A.4)

*Prueba IF* (véase la sección VI.A.5)

*Pruebas PCR* (véase la sección VI.A.6)

*Prueba FISH* (véase la sección VI.A.7)

*Pruebas ELISA* (véase la sección VI.A.8)

*Bioensayo* (véase la sección VI.A.9)

## 2. MÉTODOS DETALLADOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *R. SOLANACEARUM* EN MUESTRAS ASINTOMÁTICAS DE PATATAS, TOMATES Y OTRAS PLANTAS HUÉSPED

### 2.1 Preparación de la muestra

*Nota:* Para la detección de poblaciones latentes de *R. solanacearum* se aconseja someter a prueba muestras mixtas. El procedimiento puede aplicarse convenientemente a mues-tras mixtas de hasta 200 partes del tallo. Cuando se efectúen exámenes, deberán basarse en una muestra estadísticamen-te representativa de la población de plantas investigada.

2.1.1 Colocar segmentos de tallo de 1-2 cm en un recipiente estéril cerrado con arreglo a los siguientes procedimientos de muestreo:

*Plántulas de tomate de vivero:* con un cuchillo limpio y desinfectado, cortar un segmento de 1 cm de la base de cada tallo, justo por encima del nivel del suelo.

*Plantas de tomate cultivadas en el campo o en un invernadero:* con un cuchillo limpio y desinfectado, arrancar el brote lateral más inferior de cada planta cortando justo por encima de la unión con el tallo principal. Cortar un segmento de 1 cm del ex-tremo inferior de cada brote lateral.

*Otros huéspedes:* con un cuchillo limpio y desinfectado o con tijeras de podar, cortar un segmento de 1 cm de la base de cada tallo, justo por encima del nivel del suelo. En el caso de *S. dulcamara* o de otras plantas huésped que crecen en el agua, cortar secciones de 1-2 cm de los tallos bajo el agua o estolones con raíces acuáticas.

Cuando se muestree un lugar específico, se recomienda analizar una muestra estadísticamente representativa de un mínimo de diez plantas por punto de muestreo de cada huésped herbáceo potencial.

La detección del patógeno será más fiable a finales de primavera, en verano y en otoño, aunque las infecciones naturales pueden detectarse durante todo el año en *Solanum dulcamara* perenne que crece en cursos de agua. Los huéspedes conocidos incluyen plantas de patata espontáneas (*groundkeepers*), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* y otros miembros de la familia *Solanaceae*. Otros huéspedes son *Pelargonium* spp. y *Portulaca oleracea*. Entre las especies herbáceas europeas que pueden albergar potencialmente poblaciones de *R. solanacearum* biovar 2/raza 3 en raíces y/o rizosferas, en condiciones medioambientales específicas, se incluyen: *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parvi-flora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans.*, *Tussilago farfara* y *Urtica dioica*.

*Nota:* Puede efectuarse en este momento el examen visual para detectar síntomas internos (coloración vascular o líquido bacteriano). Retirar todos los segmentos del tallo con síntomas y analizarlos por separado (véase la sección II).

2.1.2 Desinfectar brevemente los segmentos del tallo con etanol al 70 % y secar inmediatamente con un pañuelo de papel. A continuación, procesar los segmentos del tallo mediante uno de los procedimientos siguientes:

a) cubrir los segmentos con un volumen suficiente (aproximadamente 40 ml) de tampón de extracción (apéndice 4) y agitar en un agitador rotatorio (50-100 rpm) durante cuatro horas por debajo de 24 °C o refrigerados entre 16 y 24 horas,

o bien

b) procesar inmediatamente machacando los segmentos en una bolsa de maceración resistente (por ejemplo, Stomacher o Bioreba) con un volumen apropiado de tampón de extracción (apéndice 4) utilizando un mazo de goma o un aparato de trituración adecuado (por ejemplo, Homex). De no ser posible, almacenar los segmentos del tallo refrigerados durante un máximo de 72 horas o un máximo de 24 horas a temperatura ambiente.

2.1.3 Desechar el sobrenadante tras 15 minutos de sedimentación.

2.1.4 No suele ser necesaria otra clarificación del extracto o la concentración de la fracción bacteriana, pero puede conseguirse por filtración y/o centrifugación tal como se describe en la sección III.1.1.3 a 1.1.5.

2.1.5 Dividir el extracto de la muestra pura o concentrada en dos partes iguales. Mantener una mitad entre 4 y 10 °C durante el análisis y almacenar la otra mitad con glicerol estéril al 10-25 % (v/v) entre -16 y -24 °C (semanas) o entre -68 y -86 °C (mes) en caso de que deban efectuarse

nuevas pruebas.

## **2.2 Análisis**

Véase el diagrama de flujo y la descripción de las pruebas y los protocolos optimizados en los apéndices pertinentes:

*Aislamiento selectivo* (véase la sección VI.A.4)

*Prueba IF* (véase la sección VI.A.5)

*Pruebas PCR* (véase la sección VI.A.6)

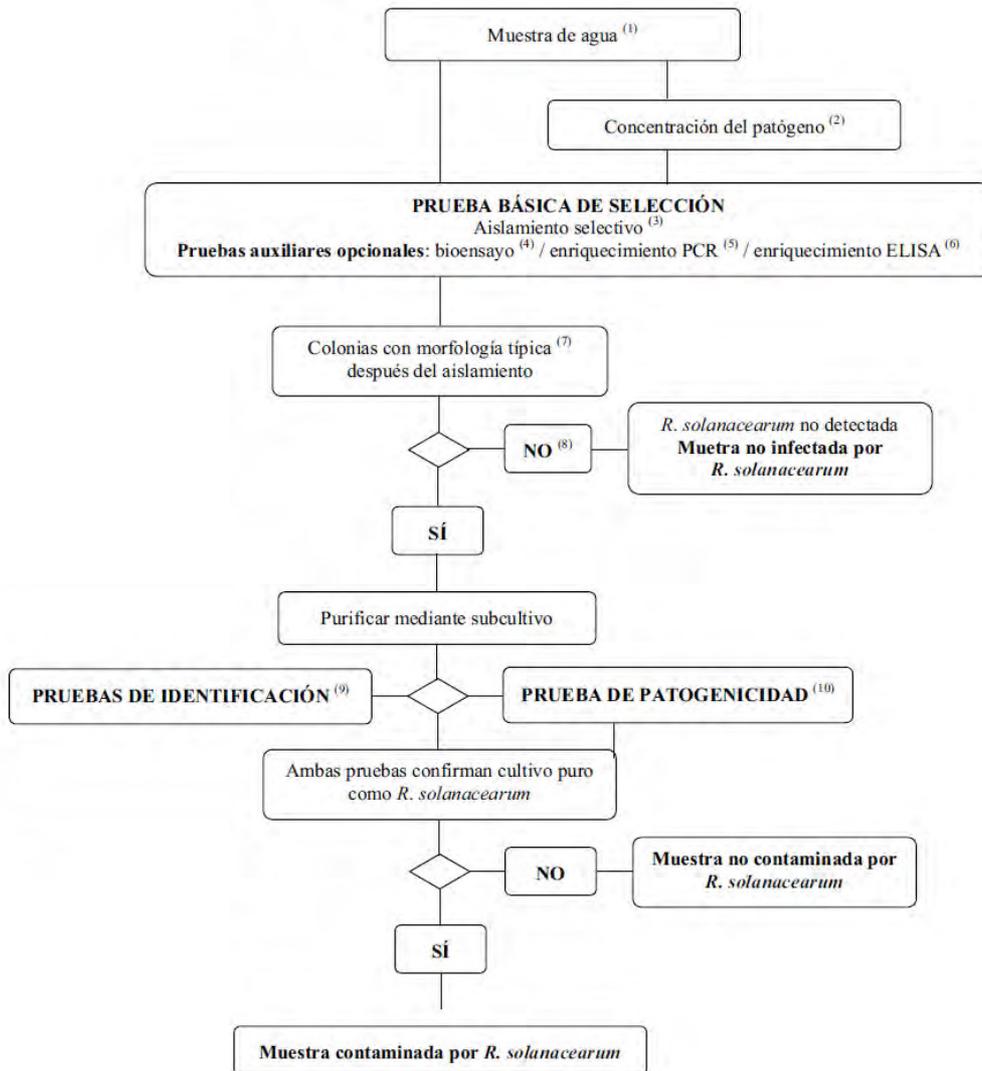
*Prueba FISH* (véase la sección VI.A.7)

*Pruebas ELISA* (véase la sección VI.A.8)

*Bioensayo* (véase la sección VI.A.9)

## SECCIÓN IV

### 1. ESQUEMA DEL MÉTODO DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *R. SOLANACEARUM* EN EL AGUA



- (1). Véase la sección IV.2.1 para los tamaños recomendados de las muestras.
- (2). En la sección IV.2.1 se describen los métodos de concentración de patógenos. La concentración incrementa las poblaciones de patógenos y de bacterias saprofitas competidoras, y únicamente se recomienda si no provoca una inhibición de la prueba de aislamiento.
- (3). En la sección VI.A.4 se describe la prueba de aislamiento selectivo.
- (4). En la sección VI.A.9 se describe la prueba del bioensayo.
- (5). En las secciones VI.A.4.2 y VI.A.6 se describen los métodos de

- enriquecimiento PCR.
- (6). En las secciones VI.A.4.2 y VI.A.8 se describen los métodos de enriquecimiento ELISA.
  - (7). (7)La morfología típica de la colonia se describe en la sección II.3.d.
  - (8). El aislamiento puede fallar debido a la competencia o la inhibición por bacterias saprofitas. Si se sospecha que una elevada población saprofita afecta a la fiabilidad del aislamiento, repetir entonces las pruebas de aislamiento tras la dilución de la muestra en agua estéril.
  - (9). La identificación fiable de cultivos puros posibles aislados de *R. solanacearum*, se efectúa utilizando las pruebas descritas en la sección VI.B.
  - (10). La prueba de patogenicidad se describe en la sección VI.C.

## **2. MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *R. SOLANACEARUM* EN EL AGUA**

### *Principio*

El método validado de detección que se describe en la presente sección es aplicable a la detección del patógeno en muestras de aguas superficiales y puede aplicarse asimismo a las muestras para análisis del proceso de transformación de la patata o de aguas residuales. No obstante, es importante señalar que la sensibilidad previsible de la detección variará en función del sustrato. La sensibilidad de la prueba de aislamiento se ve afectada por las poblaciones de bacterias saprofitas competidoras, que son generalmente muy superiores en el proceso de transformación de la patata y las aguas residuales que en las aguas superficiales.

Si bien se espera que el método que se describe a continuación solamente detecte  $10^3$  células por litro de aguas superficiales, la sensibilidad de la detección en el proceso de transformación de la patata o las aguas residuales será con toda probabilidad mucho menor. Por este motivo, se recomienda analizar las aguas residuales después de todo tratamiento de purificación (por ejemplo, sedimentación o filtración), durante el cual las poblaciones de bacterias saprofitas se reducen. Deberán tenerse en cuenta las limitaciones de sensibilidad del método de prueba a la hora de evaluar

la fiabilidad de cualquier resultado negativo obtenido. Si bien se ha utilizado con éxito este método en trabajos de investigación para determinar la presencia o ausencia del patógeno en las aguas superficiales, deberán tenerse en cuenta sus limitaciones cuando se utilice en investigaciones similares del proceso de transformación de la patata o de aguas residuales.

## 2.1 Preparación de la muestra

*Nota:*

- La detección de *R. solanacearum* en las aguas superficiales es más fiable a finales de primavera, en verano y en otoño, cuando la temperatura del agua supera los 15 °C.
- Un muestreo repetido en diferentes momentos durante los períodos mencionados en puntos de muestreo designados incrementará la fiabilidad de la detección al reducir los efectos de la variación climática.
- Ténganse en cuenta los efectos de las fuertes precipitaciones y la geografía del curso de agua a fin de evitar que se produzcan importantes efectos de dilución que puedan ocultar la presencia del patógeno.
- Tomar muestras de agua superficial en las inmediaciones de plantas huésped si estos huéspedes están presentes.

2.1.1 Recoger muestras de agua en puntos de muestreo seleccionados llenando botellas o tubos estériles desechables, a una profundidad, si es posible, por debajo de 30 cm y a 2 m de la orilla. Para los efluentes resultantes de la transformación de la patata y las aguas residuales, recoger muestras en el punto de vertido de las aguas residuales. Se recomiendan las muestras de hasta 500 ml por punto de muestreo. Si se prefieren muestras más pequeñas, se aconseja tomar muestras como mínimo en tres ocasiones por punto de muestreo, cada una de las cuales consistirá en dos submuestras duplicadas de un mínimo de 30 ml. Para un trabajo de investigación intensivo, seleccione como mínimo tres puntos de muestreo por 3 km de curso de agua y asegúrese de que también se toman muestras

en los afluentes que desembocan en el curso de agua.

2.1.2 Transportar las muestras en un entorno fresco y oscuro (4-10 °C) y analizarlas en un plazo de 24 horas.

2.1.3 Si es preciso, podrá concentrarse la fracción bacteriana utilizando uno de los métodos siguientes:

- a) centrifugar 30-50 ml de submuestras de 10.000 g durante diez minutos (o 7.000 g durante 15 minutos), preferiblemente a 4-10 °C, descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 1 ml de tampón de precipitado (apéndice 4);
- b) filtración por membrana (tamaño mínimo de los poros de 0,45 µm) y a continuación lavado del filtro en 5-10 ml de tampón de precipitado y retención de los lavados. Este método es adecuado para grandes volúmenes de agua que contengan bajos niveles de saprofitas.

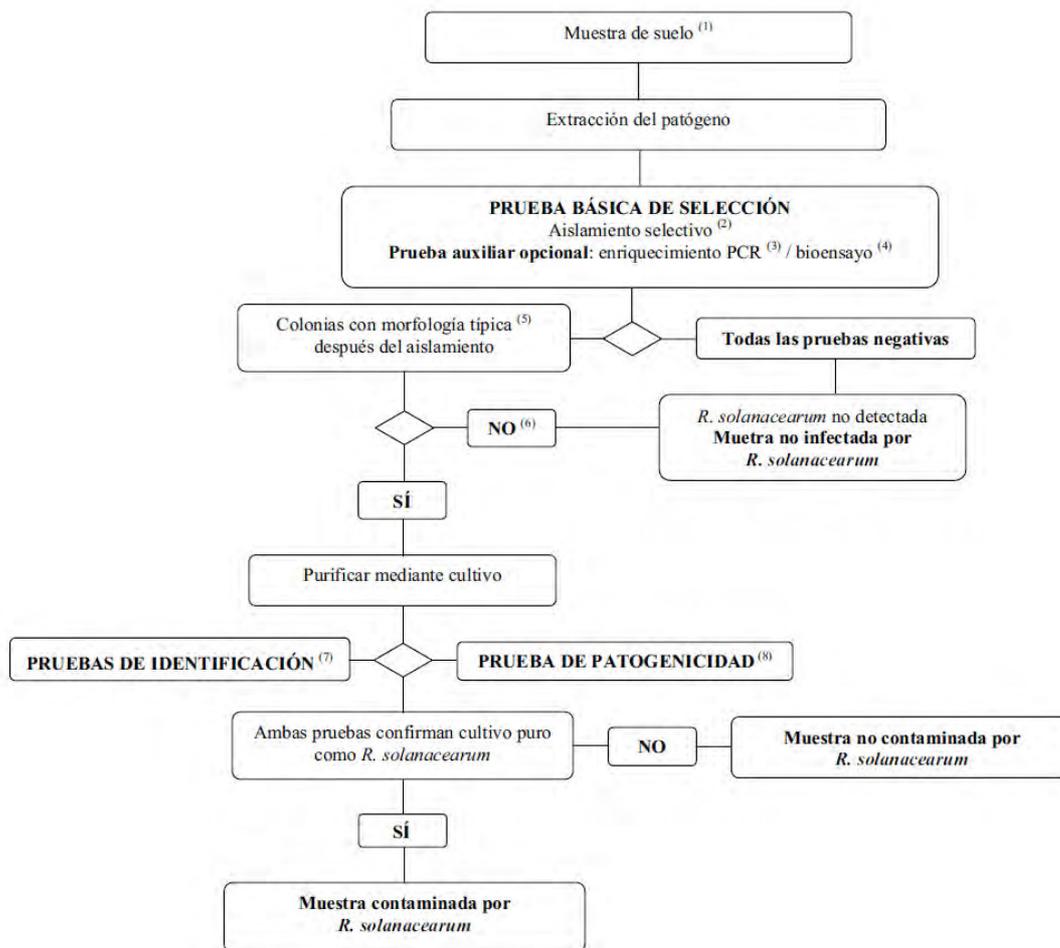
No suele aconsejarse la concentración para muestras del proceso de transformación de la patata o de aguas residuales, ya que unas poblaciones mayores de bacterias saprofitas competidoras inhibirán la detección de *R. solanacearum*.

## 2.2 Análisis

Véase el diagrama de flujo y la descripción de las pruebas en los apéndices pertinentes.

## SECCIÓN V

### 1. ESQUEMA DEL MÉTODO DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *R. SOLANACEARUM* EN EL SUELO



- (1). Véase la sección V.2.1 para los tamaños recomendados de las muestras.
- (2). En la sección VI.A.4 se describe la prueba de aislamiento selectivo.
- (3). En las secciones VI.A.4.2 y VI.A.6 se describen los métodos de enriquecimiento PCR.
- (4). En la sección VI.A.9 se describe la prueba del bioensayo.
- (5). La morfología típica de la colonia se describe en la sección II.3.d.
- (6). El aislamiento puede fallar debido a la competencia o la inhibición por

bacterias saprofitas. Si se sospecha que una elevada población saprofita afecta a la fiabilidad del aislamiento, repetir entonces las pruebas de aislamiento tras la dilución de la muestra.

- (7). La identificación fiable de cultivos puros posibles aislados de *R. solanacearum*, se efectúa utilizando las pruebas descritas en la sección VI.B.
- (8). La prueba de patogenicidad se describe en la sección VI.C.

## **2.- MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *R. SOLANACEARUM* EN EL SUELO**

### *Principios*

El método validado de detección que se describe en la presente sección es aplicable a la detección del patógeno en muestras del suelo, pero también puede utilizarse para analizar muestras de residuos sólidos de la transformación de la patata o de lodos de depuradora. No obstante, debe señalarse que estos métodos no son lo suficientemente sensibles para asegurar la detección de poblaciones pequeñas y/o irregularmente distribuidas de *R. solanacearum* que pueden encontrarse en muestras naturalmente infectadas de estos sustratos.

Deberán tenerse en cuenta las limitaciones de sensibilidad de este método de prueba a la hora de evaluar la fiabilidad de cualquier resultado negativo obtenido, así como cuando se utilice en investigaciones para determinar la presencia o ausencia del patógeno en el suelo o los lodos. El método más fiable para determinar la presencia del patógeno en el suelo del campo es plantar un posible huésped del mismo y supervisar si se produce infección, pero incluso con este método no se detectarán niveles bajos de contaminación.

### **2.1 Preparación de la muestra**

2.1.1 El muestreo del suelo del campo deberá seguir los principios habituales utilizados para el muestreo de nematodos. Para muestrear 0,3 ha, recoger muestras de 0,5 a 1 kg de suelo en 60 puntos a una

profundidad de 10 a 20 cm (o de una cuadrícula de 7 × 7 metros). Si se sospecha la presencia del patógeno, incrementar el número de puntos de recogida a 120 por 0,3 ha. Mantener las muestras a una temperatura comprendida entre 12 y 15 °C antes del análisis. Tomar muestras de la transformación de la patata y de lodos de depuradora, recogiendo un total de 1 kg de sitios que representen el volumen total de lodos que se analizará. Mezclar adecuadamente cada muestra antes del análisis.

2.1.2 Dispersar submuestras de 10 a 25 g de suelo o lodos mediante agitación rotatoria (250 rpm) en 60-150 ml de tampón de extracción (apéndice 4) durante un máximo de dos horas. En caso necesario, el añadido de 0,02 % de Tween-20 estéril y de 10 a 20 g de grava estéril puede contribuir a la dispersión.

2.1.3 Mantener la suspensión a 4 °C durante el análisis.

## **2.2 Análisis**

Véase el diagrama de flujo y la descripción de las pruebas en los apéndices pertinentes.

## **SECCIÓN VI : PROTOCOLOS OPTIMIZADOS PARA LA DETECCIÓN IDENTIFICACIÓN DE R. SOLANACEARUM**

### **A. PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN**

#### **1. PRUEBA DE LA EXUDACIÓN DEL TALLO**

La presencia de *R. solanacearum* en tallos de patata, tomate u otras plantas huésped marchitas puede observarse mediante la sencilla prueba de presunción que se indica a continuación: cortar el tallo justo por encima del nivel del suelo. Suspender la superficie del corte en un tubo de agua limpia. Observar si se produce la característica exudación espontánea de hilos de flujo bacteriano de los haces vasculares cortados unos minutos después.

#### **2. PRUEBA DE LA DETECCIÓN DE GRÁNULOS DE POLI- $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO**

- (1). Preparar un frotis de exudado bacteriano procedente del tejido infectado o de un cultivo de 48 horas en un medio YPGA o SPA (apéndice 2) en un portaobjetos.
- (2). Preparar frotis de control positivos de una cepa de biovar 2 de *R. solanacearum* y, si se considera útil, un frotis de control negativo de un PHB sp. negativo conocido.
- (3). Dejar que se seque al aire y pasar con rapidez varias veces por la llama la cara inferior del portaobjetos para fijar los frotis.
- (4). Teñir el preparado con azul Nilo A o negro Sudán B y observar microscópicamente tal como se describe a continuación.

##### *Prueba del azul Nilo*

- a) Bañar cada portaobjetos con una solución acuosa de azul Nilo A al 1 % e incubar durante diez minutos a 55 °C.

- b) Escurrir la solución de tinción. Lavar suavemente al grifo durante unos instantes. Eliminar el agua sobrante con un pañuelo de papel.
- c) Bañar el frotis con ácido acético acuoso al 8 % e incubar durante un minuto a temperatura ambiente.
- d) Lavar suavemente al grifo durante unos instantes. Eliminar el agua sobrante con un pañuelo de papel.
- e) Rehumedecer con una gota de agua y tapar con un cubreobjetos.
- f) Examinar el frotis tintado con un microscopio epifluorescente a 450 nm con gota de aceite de inmersión, a 600-1000 aumentos, utilizando un objetivo de inmersión en aceite o agua.
- g) Observar si se produce la fluorescencia naranja brillante de los gránulos de PHB. Observar también con la luz normal transmitida para cerciorarse de que los gránulos son intracelulares y de que la morfología celular es la típica de *R. solanacearum*.

#### *Prueba del negro Sudán*

- a) Bañar cada portaobjetos con una solución acuosa de negro Sudan B al 0,3 % en etanol al 70 % e incubar durante diez minutos a temperatura ambiente.
- b) Escurrir la solución de tinción y lavar suavemente con agua del grifo durante unos instantes, eliminando el agua sobrante con un pañuelo de papel.
- c) Sumergir brevemente los portaobjetos en xilol y secar con un pañuelo de papel. ¡Cuidado!: *el xilol es nocivo, deben tomarse las precauciones de seguridad necesarias y debe trabajarse en una campana extractora de humos.*

- d) Bañar el frotis con safranina acuosa al 0,5 % (p/v) y dejar durante diez minutos a temperatura ambiente. ¡Cuidado!: *la safranina es nociva, deben tomarse las precauciones de seguridad necesarias y debe trabajarse en una campana extractora de humos.*
- e) Lavar suavemente al grifo durante unos instantes, secar con un pañuelo de papel y tapar con un cubreobjetos.
- f) Examinar los frotis tintados con un microscopio óptico que utilice luz transmitida con aceite de inmersión, a 1000 aumentos, utilizando un objetivo de inmersión en aceite.
- g) Observar si los gránulos de PHB de las células de *R. solanacearum* se tiñen de negro azulado con un teñido rosáceo de las paredes de las células.

### **3. PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN SEROLÓGICA**

La mejor manera de observar la aglutinación de células de *R. solanacearum* en líquido bacteriano o extractos de tejido sintomático es utilizando anticuerpos validados (véase el apéndice 3) etiquetados con marcadores coloreados apropiados tales como células rojas de *Staphylococcus aureus* o partículas coloreadas de látex. Si se utiliza un equipo comercializado (véase el apéndice 3), siga las instrucciones del fabricante. En caso contrario, aplique el procedimiento siguiente:

- a) mezclar gotas de una suspensión de anticuerpos etiquetados y líquido bacteriano (de aproximadamente 5 µl) en pocillos de portaobjetos de pocillos múltiples;
- b) preparar controles positivos y negativos utilizando suspensiones de *R. solanacearum* biovar 2 y una cepa heteróloga;
- c) observar si se produce aglutinación en las muestras positivas tras mezclar suavemente durante 15 segundos.

## 4. AISLAMIENTO SELECTIVO

### 4.1 Siembra en medio selectivo

*Nota:*

Antes de utilizar este método por primera vez, efectúe pruebas preliminares a fin de garantizar una detección reproducible de  $10^3$  a  $10^4$  unidades formadoras de colonias de *R. solanacearum* por ml añadido a extractos de muestras que hayan dado anteriormente resultados negativos.

Utilizar un medio selectivo validado adecuado tal como SMSA (modificado por Elphinstone *et al.*, 1996; véase el apéndice 2).

Es preciso diferenciar *R. solanacearum* de otras bacterias que pueden desarrollar colonias en el medio. Además, las colonias de *R. solanacearum* pueden mostrar morfologías atípicas si las placas están superpobladas o si también contienen bacterias antagonistas. Cuando se sospeche la existencia de efectos de la competencia o el antagonismo, deberá volver a analizarse la muestra con otro método.

Para lograr la máxima sensibilidad con este método, utilizar extractos de muestras recién preparados. Sin embargo, este método también puede aplicarse a extractos que se hayan almacenado con glicerol entre -68 y -86 °C.

Como controles positivos, preparar diluciones decimales de una suspensión de  $10^6$  cfu por ml de una cepa virulenta biovar 2 de *R. solanacearum* (por ejemplo, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Para evitar toda posibilidad de contaminación, preparar controles positivos totalmente separados de las muestras que van a analizarse.

Deberá examinarse la adecuación para el crecimiento del patógeno de cada lote recién preparado de un medio selectivo antes de utilizarlo para analizar muestras rutinarias.

Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

4.1.1 Aplicar una técnica de dilución en placas apropiada a fin de garantizar la dilución de cualquier población saprofitas formadora de colonias que pudiera existir. Extender 50-100  $\mu$ l por placa de extracto de muestra y de cada dilución.

4.1.2 Incubar las placas a 28 °C. Leer las placas 48 horas después, y posteriormente a diario hasta un máximo de seis días. Las colonias típicas de *R. solanacearum* en el medio SMSA son de color blanco lechoso, planas, irregulares y fluidas y, tras tres días de incubación, se vuelven de color rosa a rojo sangre en el centro con rayas o espirales internas (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

*Nota:* En algunos casos se forman colonias atípicas de *R. solanacearum* en este medio. Estas pueden ser pequeñas, redondas, completamente rojas y no fluidas, o sólo parcialmente fluidas y, por tanto, difíciles de distinguir de las bacterias saprofitas formadoras de colonias.

4.1.3 Purificar las presuntas colonias de *R. solanacearum* tras el estriado o la dilución en placas en un medio nutritivo general a fin de obtener colonias aisladas (véase el apéndice 2).

4.1.4 Almacenar los cultivos a corto plazo en agua estéril (pH 6-8, sin cloro) a temperatura ambiente en la oscuridad, o a largo plazo en un medio crioprotector adecuado entre -68 y -86 °C o liofilizado.

4.1.5 Identificar los presuntos cultivos (véase la sección VI. B) y efectuar una prueba de patogenicidad (véase la sección VI. C).

#### *Interpretación de los resultados de la siembra en medio selectivo*

La siembra en medio selectivo es negativa si no se observan colonias bacterianas al cabo de seis días ni se encuentran presuntas colonias típicas

de *R. solanacearum*, siempre que no haya sospechas de inhibición producida por la competencia o el antagonismo de otras bacterias y que en los controles positivos se encuentren colonias típicas de *R. solanacearum*.

La siembra en medio selectivo es positiva si se aíslan presuntas colonias de *R. solanacearum*.

## 4.2 Procedimiento de enriquecimiento

Utilizar un medio de enriquecimiento validado como el caldo Wilbrink modificado (véase el apéndice 2).

Este procedimiento puede utilizarse para incrementar selectivamente las poblaciones de *R. solanacearum* en extractos de muestras e incrementar la sensibilidad de la detección. Asimismo, este procedimiento diluye efectivamente los inhibidores de la reacción PCR (1:100). Sin embargo, debe señalarse que el enriquecimiento de *R. solanacearum* puede fallar debido a la competencia o el antagonismo de organismos saprofitas, que en muchos casos se enriquecen simultáneamente. Por este motivo, el aislamiento de *R. solanacearum* a partir de cultivos de caldos enriquecidos puede resultar difícil. Además, debido a que pueden incrementarse las poblaciones de saprofitos serológicamente afines, se recomienda la utilización de anticuerpos monoclonales específicos en lugar de anticuerpos policlonales cuando se aplique la prueba ELISA.

4.2.1 Para el enriquecimiento PCR, transferir 100 µl de extracto de muestras a 10 ml de caldo de enriquecimiento (apéndice 2) previamente alicuotados en tubos o matraces sin ADN. Para el enriquecimiento ELISA, pueden utilizarse proporciones más elevadas de extracto de muestras en el caldo (por ejemplo, 100 µl en 1,0 ml de caldo de enriquecimiento).

4.2.2 Incubar durante 72 horas entre 27 y 30 °C en un cultivo agitado o un cultivo estático manteniendo el tapón del tubo sin apretar para que haya aireación.

4.2.3 Mezclar adecuadamente antes de utilizar en las pruebas ELISA o PCR.

4.2.4 Tratar el caldo enriquecido de manera idéntica a la muestra o las muestras de las pruebas anteriormente mencionadas.

Nota: Si se prevé una inhibición o un enriquecimiento de *R. solanacearum* debido a las elevadas poblaciones de determinadas bacterias saprofitas competidoras, pueden con-seguirse mejores resultados con el enriquecimiento de extractos de muestras antes de cualquier centrifugación o con otras medidas de concentración.

## **5. PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA (PRUEBA IF)**

### *Principio*

Se recomienda utilizar la prueba IF como principal prueba de selección debido a su capacidad demostrada para alcanzar los límites requeridos.

Cuando se utilice la prueba IF como principal prueba de selección y su lectura sea positiva, deberá efectuarse la prueba de aislamiento, PCR o FISH como segunda prueba de selección. Cuando se utilice la prueba IF como segunda prueba de selección y su lectura sea positiva, deberá efectuarse una nueva prueba con arreglo al diagrama de flujo para completar el análisis.

Nota: Utilizar una fuente validada de anticuerpos de *R. solanacearum* (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Se recomienda determinar el título para cada nuevo lote de anticuerpos. El título se define como la dilución más elevada en la que se produce una reacción óptima 56 cuando se analiza una suspensión que contenga de 10 a 10<sup>6</sup> células por ml de la cepa homóloga de *R. solanacearum*, utilizando un conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC) apropiado, según las recomendaciones del fabricante. Todo el antisuero policlonal validado debe presentar un título IF de al menos 1:2000. Durante el análisis, deberán utilizarse los anticuerpos en diluciones de trabajo cercanas o equivalentes al título.

La prueba debería efectuarse en extractos de muestras recién preparados. En caso necesario, puede realizarse con éxito en extractos almacenados entre -68 y -86 °C en glicerol. El glicerol puede eliminarse de la muestra si se añade 1 ml de tampón de precipitado (véase el apéndice 4), se recentrifuga durante 15 minutos a 7.000 g y se resuspende en un volumen equivalente de tampón de precipitado. En muchos casos no es necesario efectuar este procedimiento, especialmente si las muestras se han fijado en los portaobjetos mediante flameado.

Preparar en otro portaobjetos controles positivos de la cepa homóloga o de cualquier otra cepa de referencia de *R. solanacearum*, suspendida en extracto de patata, tal como se especifica en el apéndice 3, punto B, y opcionalmente en tampón.

Cuando sea posible, deberá utilizarse tejido naturalmente infectado (mantenido por liofilización o congelación entre -16 y -24 °C) como control similar en el mismo portaobjetos.

Pueden utilizarse como controles negativos alícuotas de extracto de muestras que hayan dado anteriormente resultados negativos de *R. solanacearum*.

En el apéndice 3 se enumeran los materiales normalizados de control positivo y negativo que pueden utilizarse en esta prueba.

Utilizar portaobjetos de pocillos múltiples, de preferencia con diez pocillos de 6 mm de diámetro como mínimo.

Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

## **5.1 Preparar los portaobjetos según uno de los procedimientos siguientes**

i) Para precipitados con una cantidad relativamente pequeña de sedimento de almidón:

Echar con una pipeta un volumen normalizado medido (15  $\mu$ l es suficiente para pocillos de 6 mm de diámetro; aumentar el volumen si el diámetro es mayor) de una dilución de 1/100 del precipitado de patata resuspendido en el primer pocillo. A continuación, echar con una pipeta un volumen similar de precipitado sin diluir (1/1) en los pocillos restantes de la fila. La segunda fila puede utilizarse como duplicado o para una segunda muestra, tal como se indica en la figura 1.

ii) Para otros precipitados:

Preparar diluciones decimales (1/10 y 1/100) del precipitado resuspendido en tampón de precipitado. Echar con una pipeta un volumen normalizado medido (15  $\mu$ l es suficiente para pocillos de 6 mm de diámetro; aumentar el volumen si el diámetro es mayor) del precipitado resuspendido y de cada dilución en una fila de pocillos. La segunda fila puede utilizarse como duplicado o para una segunda muestra, tal como se indica en la figura 2.

**5.2 Secar las gotitas** a temperatura ambiente o calentándolas entre 40 y 45 °C. Fijar las células bacterianas al portaobjetos calentándolo (15 minutos a 60 °C), flameándolo con etanol del 95 % o con arreglo a las instrucciones específicas de los suministradores de los anticuerpos.

En caso necesario, pueden almacenarse a continuación portaobjetos fijos en un recipiente desecado durante el menor tiempo que resulte necesario (hasta un máximo de 3 meses) antes de efectuar nuevas pruebas.

### 5.3 Procedimiento IF

- i) Si el portaobjetos se ha preparado según el punto 5.1.i): Preparar un conjunto de diluciones a 1/2. El primer pocillo deberá contener 1/2 del título (T/2), los otros 1/4 del título (T/4), 1/2 del título (T/2), el título (T) y el doble del título (2T).
- ii) Si el portaobjetos se ha preparado según el punto 5.1.ii): Preparar la

dilución de trabajo (DT) del anticuerpo en el tampón IF. La dilución de trabajo afecta a la especificidad.

Figura 1. Preparación del portaobjetos con arreglo a los puntos 5.1.i) y 5.3.i)

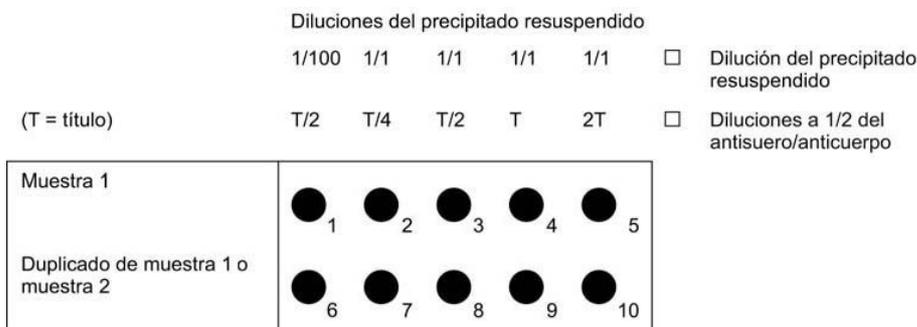


Figura 2. Preparación del portaobjetos con arreglo a los puntos 5.1.ii) y 5.3.ii)



5.3.1 Colocar los portaobjetos en un pañuelo de papel humedecido. Cubrir cada pocillo completamente con la dilución o diluciones de anticuerpos. El volumen de anticuerpos aplicado en cada pocillo debe ser como mínimo equivalente al volumen de extracto aplicado.

En caso de que no existan instrucciones específicas de los suministradores de los anticuerpos deberá aplicarse el siguiente procedimiento:

5.3.2 Dejar en incubación los portaobjetos en papel húmedo durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).

5.3.3 Sacudir las gotitas de cada portaobjetos y enjuagar cuidadosamente con tampón IF. Lavar por inmersión durante cinco minutos en tampón IF-Tween (apéndice 4) y posteriormente en tampón IF. Evitar la transferencia de aerosoles o gotitas que pudiera provocar contaminaciones cruzadas.

Eliminar cuidadosamente el exceso de humedad secándolo suavemente.

5.3.4 Colocar los portaobjetos en papel húmedo. Cubrir los pocillos con la dilución del conjugado FITC utilizado para determinar el título. El volumen de conjugado aplicado en los pocillos debe ser idéntico al volumen de anticuerpos aplicado.

5.3.5 Dejar en incubación los portaobjetos en papel húmedo durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).

5.3.6 Sacudir las gotitas de conjugado del portaobjetos. Enjuagar y lavar como antes (5.3.3).

Eliminar cuidadosamente el exceso de humedad.

5.3.7 Echar con una pipeta 5 a 10 µl de tampón fosfato glicerol de 0,1 M (apéndice 4) o un volumen de solución comercial que proteja la fluorescencia (*antifading*) en cada pocillo y colocar un cubreobjetos.

## 5.4 Lectura de la prueba IF

5.4.1 Examinar los portaobjetos en un microscopio epifluorescente con filtros adecuados para que se produzca la excitación del FITC, con aceite o agua de inmersión y a 500-1 000 aumentos. Recorrer los pocillos a lo largo de dos diámetros perpendiculares entre sí y alrededor del perímetro. En el caso de muestras que presenten un bajo número de células o ninguna, deben observarse como mínimo 40 campos microscópicos.

En primer lugar, comprobar el control positivo. Las células deben ser fluorescentes brillantes y estar completamente teñidas en el título de anticuerpos o la dilución de trabajo determinados. La prueba IF (sección VI.A.5) debe repetirse si la tinción no es correcta.

5.4.2. Comprobar si hay células fluorescentes brillantes con morfología característica de *R. solanacearum* en los pocillos de los portaobjetos (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). La intensidad de la fluorescencia debe ser equivalente a la de la cepa de

control positivo en la misma dilución de anticuerpos. Deberán descartarse las células que presenten una tinción incompleta o cuya fluorescencia sea escasa.

Deberá repetirse la prueba si se sospecha que se ha producido cualquier posible contaminación. Este puede ser el caso cuando todos los portaobjetos de un lote muestren células positivas debido a la contaminación del tampón o si se encuentran células positivas (fuera de los pocillos de los portaobjetos) en la superficie.

5.4.3 Existen varios problemas inherentes a las características específicas de la prueba de inmunofluorescencia. En los precipitados de cuñas basales de patata y los precipitados de segmentos del tallo pueden aparecer poblaciones de base de células fluorescentes de morfología atípica y bacterias saprofitas con reacción cruzada cuyo tamaño y morfología sean similares a los de *R. solanacearum*.

5.4.4 Tener solamente en cuenta las células fluorescentes con tamaño y morfología típicos en el título o la dilución de trabajo de los anticuerpos, tal como se describe en 5.3.

5.4.5 Interpretación de la lectura de la prueba IF:

i) si se encuentran células fluorescentes brillantes con morfología característica, estimar el número medio de células típicas por campo microscópico y calcular el número de células típicas por ml de precipitado resuspendido (apéndice 5). La lectura IF es positiva en las muestras con un mínimo de  $35 \times 10$  células típicas por ml de precipitado resuspendido. Se considera entonces que la muestra puede estar contaminada y deben efectuarse otras pruebas,

ii) la lectura IF es negativa en las muestras con menos 3 de  $5 \times 10$  células por ml de precipitado resuspendido, y se considera negativa la muestra. No es preciso efectuar más pruebas.

## 6. PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PRUEBA PCR)

### *Principios*

Cuando se utilice la prueba PCR como principal prueba de selección y dé resultados positivos, deberá efectuarse la prueba de aislamiento o la IF como segunda prueba obligatoria de selección. Cuando se utilice la PCR como segunda prueba de selección y dé resultados positivos, deberán efectuarse las pruebas establecidas en el diagrama de flujo para completar el diagnóstico.

La aplicación de este método como principal método de selección sólo se recomienda en el caso de que se hayan adquirido conocimientos especializados del mismo.

*Nota:* Las pruebas preliminares realizadas con este método deberían permitir la detección reproducible de 10 a 10 células de *R. solanacearum* por ml añadidas a los extractos de muestras que previamente proporcionaron resultados negativos. Puede ser necesario llevar a cabo experimentos de optimización para lograr niveles máximos de sensibilidad y especificidad en todos los laboratorios.

Utilizar reactivos y protocolos PCR validados (véase el apéndice 6). Seleccionar preferiblemente un método con control interno.

Tomar las precauciones adecuadas para evitar la contaminación de la muestra con el ADN buscado. La prueba PCR debe ser efectuada por técnicos experimentados, en laboratorios especializados en biología molecular, con el fin de reducir al máximo la posibilidad de contaminación con el ADN buscado.

Como muestras finales del procedimiento siempre deben efectuarse controles negativos (para la extracción de ADN y los procedimientos PCR) que dejen constancia de si se ha producido arrastre de ADN.

En la prueba PCR deben incluirse los siguientes controles negativos:

- extracto de la muestra que previamente haya proporcionado resultados negativos para *R. solanacearum*,
- controles de los tampones utilizados para extraer la bacteria y el ADN de la muestra,
- mezcla para la reacción PCR.

Deben incluirse los siguientes controles positivos:

- alícuotas de precipitados resuspendidos a los que se ha añadido *R. solanacearum* (para la preparación véase el apéndice 3, punto B),
- una suspensión de 10 células por ml de *R. solanacearum* en agua de un aislado virulento (por ejemplo, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; véase el apéndice 3, punto B),
- siempre que sea posible, utilizar asimismo ADN extraído de las muestras de control positivas en la prueba PCR.

Para evitar toda posible contaminación, preparar los controles positivos en un entorno distinto al de las muestras que vayan a analizarse.

Los extractos de muestras deben contener la cantidad mínima de tierra posible. En determinados casos puede ser recomendable preparar los extractos a partir de patatas lavadas cuando vayan a utilizarse protocolos PCR.

En el apéndice 3 se enumeran los materiales normalizados de control positivo y negativo que pueden utilizarse en esta prueba.

## **6.1 Métodos de purificación del ADN**

Utilizar muestras de control positivas y negativas como se indica más arriba (véase el apéndice 3).

Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

Existen diferentes métodos para purificar el ADN buscado a partir de sustratos de muestras complejas, separando de esta manera los inhibidores de PCR y otras reacciones enzimáticas y concentrando el ADN buscado en el extracto de la muestra. Se ha optimizado el método siguiente para su utilización con los métodos PCR validados mostrados en el apéndice 6.

a) Método de Pstrik (2000)

1. verter con una pipeta 220  $\mu$ l de tampón de lisis [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] en un tubo eppendorf de 1,5 ml;
2. añadir 100  $\mu$ l de extracto de muestra y colocar en un calentador o al baño maría a 95 °C durante diez minutos;
3. colocar el tubo en hielo durante cinco minutos;
4. añadir 80  $\mu$ l de solución estándar de lisozima (50 mg de lisozima por ml en 10 mM Tris HCl, pH 8,0) e incubar a 37 °C durante 30 minutos;
5. añadir 220  $\mu$ l de solución A Easy DNA® (Invitrogen), mezclar adecuadamente por agitación e incubar a 65 °C durante 30 minutos;
6. añadir 100  $\mu$ l de solución B Easy DNA® (Invitrogen) y agitar vigorosamente hasta que el precipitado se mueva libremente en el tubo y la muestra sea uniformemente viscosa;
7. añadir 500  $\mu$ l de cloroformo y agitar hasta que disminuya la viscosidad y la mezcla sea homogénea;
8. centrifugar a 15.000 g durante 20 minutos a 4 °C para separar las fases y formar la interfase;

9. transferir la fase superior a un tubo Eppendorf sin utilizar;
10. añadir 1 ml de etanol al 100 % (-20 °C), agitar brevemente e incubar en hielo durante diez minutos;
11. centrifugar a 15.000 g durante 20 minutos a 4 °C y retirar el etanol del precipitado;
12. añadir 500 µl de etanol al 80 % (-20 °C) y mezclar invirtiendo el tubo;
13. centrifugar a 15.000 g durante diez minutos a 4 °C, guardar el precipitado y retirar el etanol;
14. dejar que el precipitado se seque al aire o en un Speed Vac de ADN;
15. resuspender el precipitado en 100 µl de agua ultra-pura estéril y dejar a temperatura ambiente durante un mínimo de 20 minutos;
16. almacenar a -20 °C hasta que se necesite para la prueba PCR;
17. centrifugar todo precipitado blanco y utilizar 5 µl del sobrenadante que contenga ADN para la prueba PCR.

#### b) Otros métodos

Pueden aplicarse otros métodos de extracción del ADN, como por ejemplo Qiagen DNeasy Plant Kit, siempre que se haya demostrado que son igual de eficaces en la purificación del ADN a partir de muestras de control que contengan de 3410 a 10 células patógenas por ml.

## 6.2 PCR

6.2.1 Preparar plantillas de ensayo y de control para la prueba PCR con arreglo a los protocolos validados (sección VI.A.6). Preparar una dilución decimal de extracto de ADN de la muestra (1:10 en agua ultrapura).

6.2.2 Preparar la mezcla de reacción PCR apropiada en un entorno sin contaminación de acuerdo con los protocolos publicados (apéndice 6). Cuando sea posible, se recomienda utilizar un protocolo PCR multiplex que incorpore asimismo un control interno de la prueba PCR.

6.2.3 Añadir de 2 a 5 µl de extracto de ADN por 25 µl de reacción PCR en tubos PCR estériles con arreglo a los protocolos PCR (véase el apéndice 6).

6.2.4 Incorporar una muestra de control negativo que contenga sólo mezcla de reacción PCR y añadir la misma fuente de agua ultrapura utilizada en la mezcla PCR en lugar de la muestra.

6.2.5 Colocar los tubos en el mismo termociclador utilizado en las pruebas preliminares y aplicar el programa PCR optimizado adecuado (apéndice 6).

### **6.3 Análisis del producto de la PCR**

6.3.1 Resolver los amplicones PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Aplicar como mínimo 12 µl de mezcla de reacción de ADN amplificada de cada muestra mezclada con 3 µl de tampón de carga (apéndice 6) en 2,0 % (w/v) de geles de agarosa en un tampón de tris-acetato-EDTA (TAE) (apéndice 6) a 5-8 V por cm. Utilizar un marcador de ADN adecuado, por ejemplo, 100 pb *ladder*.

6.3.2 Revelar las bandas de ADN tiñéndolas con bromuro de etidio (0,5 mg/l) durante 30 a 60 minutos, tomando las precauciones adecuadas para el manejo de este mutágeno.

6.3.3 Observar el gel teñido mediante transiluminación en UV de onda corta ( $\lambda = 302$  nm) para productos de la PCR amplificados del tamaño esperado (apéndice 6) y anotar los resultados.

En relación con todos los nuevos descubrimientos o casos, para verificar la autenticidad del amplicón PCR efectuar un análisis de la enzima de restricción en una muestra del ADN restante amplificado incubando a la

temperatura óptima y durante el tiempo necesario con una enzima y un tampón apropiados (véase el apéndice 6). Resolver los fragmentos digeridos mediante electroforesis en gel de agarosa, al igual que antes, y observar el patrón característico del fragmento de restricción con transiluminación UV una vez teñido con bromuro de etidio y comparar con el control positivo no digerido y digerido.

#### Interpretación de los resultados de la prueba PCR

La prueba PCR es negativa si el amplicón PCR específico de *R. solanacearum* del tamaño esperado no se detecta en la muestra en cuestión pero sí se detecta en todas las muestras de controles positivos (en caso de PCR multiplex con cebadores de control interno específicos de la planta, se debe amplificar con la muestra en cuestión un segundo producto PCR del tamaño esperado).

La prueba PCR es positiva si se detecta el amplicón PCR específico de *R. solanacearum* del tamaño y patrón de restricción esperado (cuando se exija), siempre que no se amplifique a partir de ninguna de las muestras de control negativo. La confirmación fiable de un resultado positivo puede obtenerse también repitiendo la prueba con un segundo conjunto de cebadores de la PCR (apéndice 6).

Nota: Puede sospecharse la inhibición de la PCR si el amplicón esperado se obtiene a partir de la muestra de control positivo que contiene *R. solanacearum* en agua, pero se obtienen resultados negativos de los controles positivos con *R. solanacearum* en extracto de patata. En protocolos PCR multiplex con controles PCR internos, la inhibición de la reacción se indica cuando no se obtiene ninguno de los dos amplicones.

Puede sospecharse la existencia de contaminación si el amplicón esperado se obtiene a partir de uno o varios de los controles negativos.

## 7. PRUEBA DE HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (PRUEBA FISH)

### Principio

Cuando se utilice la prueba FISH como primera prueba de selección y esta proporcione resultados positivos, deberá efectuarse la prueba de aislamiento o la prueba IF como segunda prueba obligatoria de selección. Cuando se utilice la prueba FISH como segunda prueba de selección y dé resultados positivos, deberán efectuarse las pruebas establecidas en el diagrama de flujo para completar el diagnóstico.

*Nota:* Utilizar oligosondas específicas para *R. solanacearum* validadas (véase el apéndice 7)

Las pruebas preliminares realizadas con este método deberían permitir la detección reproducible de al menos  $10^3$  a  $10^4$  células de *R. solanacearum* por ml añadidas a los extractos de muestras que hayan dado anteriormente resultados negativos.

El procedimiento siguiente debería efectuarse, a ser posible, con extracto de muestra recién preparado, pero también puede realizarse con éxito con extracto de muestra que se haya almacenado en glicerol a una temperatura comprendida entre -16 y -24 °C o entre -68 y -86 °C.

Utilizar como controles negativos alícuotas de extracto de muestras que hayan dado previamente resultados negativos para *R. solanacearum*.

Como controles positivos, preparar suspensiones que contengan de  $10^5$  a  $10^6$  células por ml de *R. solanacearum* biovar 2 (por ejemplo la cepa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; véase el apéndice 3) en tampón de fosfato de 0,01 M de un cultivo de tres a cinco días. Preparar en otro portaobjetos controles positivos de la cepa homóloga o de cualquier otra cepa de referencia de *R. solanacearum*, suspendida en extracto de patata, tal como se especifica en el apéndice 3, punto B.

El uso de una oligosonda eubacteriana con etiqueta FITC ofrece un control para el proceso de hibridación, ya que teñirá todas las eubacterias presentes en la muestra.

En el apéndice 3, punto A, se enumeran los materiales normalizados de control positivo y negativo que pueden utilizarse en esta prueba.

Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

## **7.1 Fijación del extracto de patata El protocolo siguiente se basa en Wullings *et al.* (1998).**

7.1.1 Preparar la solución de fijación (véase el apéndice 7).

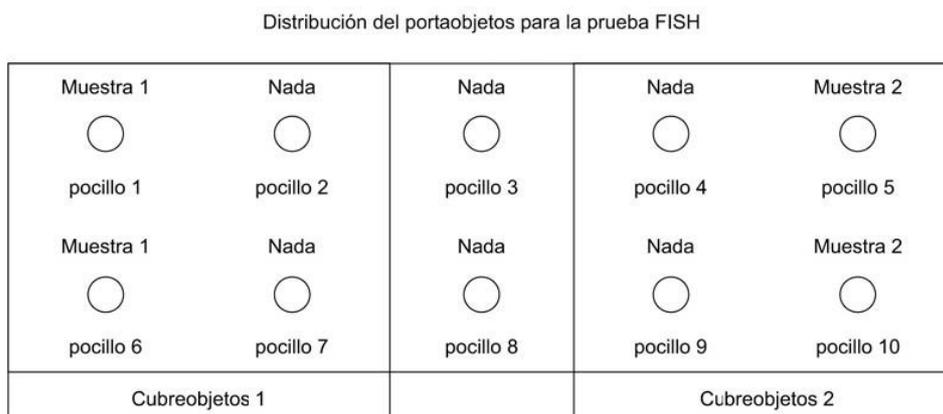
7.1.2 Verter 100 µl de cada extracto de muestra en un tubo eppendorf y centrifugar durante siete minutos a 7 000 g.

7.1.3 Separar el sobrenadante y disolver el precipitado en 200 µl de solución fijadora preparada con menos de 24 horas de antelación. Agitar e incubar durante una hora en el refrigerador.

7.1.4 Centrifugar durante siete minutos a 7 000 g, separar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 75 µl de tampón de fosfato de concentración 0,01 M (véase el apéndice 7).

7.1.5 Colocar 16 µl de las suspensiones fijadas en un portaobjetos múltiple limpio, tal como muestra la figura 7.1. Aplicar dos muestras diferentes por portaobjetos sin diluir y utilizar 10 µl para realizar una dilución a 1:100 (en tampón de fosfato de concentración 0,01 M). La solución de la muestra restante (49 µl) puede almacenarse a -20 °C tras la adición de 1 volumen de etanol al 96 %. En caso de que sea necesario repetir la prueba FISH, separar el etanol mediante centrifugación y añadir un volumen equivalente de tampón de fosfato de concentración 0,01 M (mezclar mediante agitación).

Figura 7.1. Distribución del portaobjetos para la prueba FISH.



7.1.6 Secar los portaobjetos al aire (o con secador de portaobjetos a 37 °C) y fijarlos flameándolos.

El procedimiento puede interrumpirse en esta fase, pudiéndose proseguir con la hibridación al día siguiente. Los portaobjetos deben almacenarse secos y sin polvo a temperatura ambiente.

## 7.2 Hibridación

7.2.1 Deshidratar las células en series de etanol escalonadas al 50 %, 80 % y 96 % durante un minuto cada una. Secar las preparaciones en un portaobjetos.

7.2.2 Preparar una cámara de incubación húmeda re-ubriendo el fondo de una caja hermética con papel de seda o de filtro empapado en 1x hybmix (apéndice 7). Preincubar la caja en el horno de hibridación a 45 °C durante un mínimo de diez minutos.

7.2.3 Aplicar 10 µl de solución de hibridación (apéndice 7) a ocho pocillos (pocillos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 y 10; véase la figura 7.1) de cada portaobjetos dejando vacíos los dos pocillos centrales (3 y 8).

7.2.4 Aplicar cubreobjetos (24 × 24 mm) al primer y a los cuatro últimos pocillos evitando la entrada de aire. Colocar los portaobjetos en la cámara húmeda precalentada y dejar que se produzca la hibridación durante cinco

horas a 45 °C en la oscuridad.

7.2.5 Preparar tres vasos de precipitado que contengan 1 l de agua Milli Q (grado molecular), 1 l de 1x hybmix (334 ml 3x hybmix y 666 ml agua Milli Q) y 1 l de 1/8x hybmix (42 ml 3x hybmix y 958 ml agua Milli Q). Preincubarlos al baño maría a 45 °C.

7.2.6 Quitar los cubreobjetos de las preparaciones y colocar estas en un portaobjetos.

7.2.7 Lavar el exceso de sonda mediante incubación durante 15 minutos en el vaso de precipitado con 1x hybmix a 45 °C.

7.2.8 Transferir el portaobjetos a una solución de lavado de hybmix a 1/8 e incubar durante otros 15 minutos.

7.2.9 Sumergir las preparaciones brevemente en agua Milli Q y colocarlas en papel de filtro. Eliminar el exceso de humedad cubriendo la superficie con cuidado con papel de filtro. Verter de 5 a 10 µl de solución de montaje protectora de la fluorescencia (por ejemplo Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA, o equivalente) en cada pocillo y aplicar un cubreobjetos grande (24 × 60 mm) sobre la totalidad de la preparación.

### **7.3 Lectura de la prueba FISH**

7.3.1 Los portaobjetos deben examinarse inmediatamente utilizando un microscopio epifluorescente a 630 o 1.000 aumentos con aceite de inmersión. Con un filtro adecuado para isotiocianato de fluoresceína (FITC), las células eubacterianas (incluida la mayoría de las células gramnegativas) de la muestra aparecen teñidas de verde fluorescente. Utilizando un filtro para tetrametilrodamina-5-isotiocianato, las células de *R. solanacearum* marcadas con Cy3 aparecen teñidas de rojo fluorescente. Comparar la morfología de las células con la de los controles positivos. Las células deben ser fluorescentes brillantes y estar completamente teñidas. La prueba FISH (sección VI.A.7) debe repetirse si la tinción es aberrante. Recorrer los pocillos a lo largo de dos diámetros perpendiculares entre sí y alrededor del

perímetro. En el caso de muestras que presenten un bajo número de células o ninguna, deben observarse como mínimo 40 campos microscópicos.

7.3.2 Comprobar si hay células fluorescentes brillantes con la morfología característica de *R. solanacearum* en los pocillos de los portaobjetos (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). La intensidad de la fluorescencia debe ser equivalente o mejor que la de la cepa de control positivo. Deberán descartarse las células que presenten una tinción incompleta o cuya fluorescencia sea escasa

7.3.3 Deberá repetirse la prueba si se sospecha que se ha producido cualquier posible contaminación. Este puede ser el caso cuando todos los portaobjetos de un lote muestren células positivas debido a la contaminación del tampón o si se encuentran células positivas (fuera de los pocillos de los portaobjetos) en la superficie.

7.3.4 Existen varios problemas inherentes a la especificidad de la prueba FISH. En los precipitados de cuñas basales de patata y de segmentos del tallo pueden aparecer poblaciones de base de células fluorescentes de morfología atípica y bacterias saprofitas con reacción cruzada cuyo tamaño y morfología sean similares a los de *R. solanacearum*, aunque con mucha menor frecuencia que en la prueba IF.

7.3.5 Ténganse en cuenta únicamente las células fluorescentes de tamaño y morfología típicos.

7.3.6 Interpretación de los resultados de la prueba FISH

- i) Se obtendrán resultados válidos en la prueba FISH siempre que en todos los controles positivos y en ninguno de los controles negativos se observen células teñidas de verde fluorescente brillante, cuyo tamaño y morfología sean los típicos de las de *R. solanacearum*, cuando se utilice el filtro FITC, y células teñidas de rojo fluorescente brillante cuando se utilice el filtro de rodamina. Si se encuentran células fluorescentes brillantes con morfología característica, estimar

el número medio de células típicas por campo microscópico y calcular el número de células típicas por ml de precipitado resuspendido (apéndice 4). Las muestras que presenten al menos  $5 \times 10$  células típicas por ml de precipitado resuspendido se consideran potencialmente contaminadas. Es preciso efectuar nuevas pruebas. Las muestras que presenten menos de  $5 \times 10$  células típicas por ml de precipitado resuspendido se consideran negativas.

- ii) Los resultados de la prueba FISH serán negativos cuando no se observen células teñidas de rojo fluorescente brillante con un tamaño y morfología típicos de *R. solanacea-rum* utilizando el filtro de rodamina, siempre que se observen células teñidas de rojo fluorescente brillante típicas en las preparaciones de control positivo cuando se utilice el filtro de rodamina.

#### 8. 8. Pruebas de ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA)

##### *Principio*

Las pruebas ELISA solamente pueden utilizarse como prueba opcional además de las pruebas IF, PCR o FISH, debido a la sensibilidad relativamente baja de esta prueba. Cuando se utilice ELISA-DASI, es obligatorio efectuar un enriquecimiento y utilizar anticuerpos monoclonales (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Puede resultar de utilidad efectuar un enriquecimiento de las muestras antes de utilizar la prueba.

ELISA, a fin de incrementar la sensibilidad de la prueba, pero puede fracasar debido a la competencia de otros organismos en la muestra.

*Nota:* Utilizar una fuente validada de anticuerpos de *R. solanacearum* (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Se recomienda determinar el título para cada nuevo lote de anticuerpos. El título se define como la dilución más elevada en la que se produce una re-acción óptima cuando se analiza una

suspensión que contenga de  $10^5$  a  $10^6$  células por ml de la cepa homóloga de *R. solanacearum*, utilizando conjugados de anticuerpos secundarios apropiados, según las recomendaciones del fabricante. Durante el análisis, deben utilizarse los anticuerpos en diluciones de trabajo cercanas o equivalentes a la formulación comercial.

Determinar el título de los anticuerpos en una suspensión de  $10^5$  a  $10^6$  células por ml de la cepa homóloga de *R. solanacearum*.

Incluir una muestra de extracto que haya dado previamente resultados negativos para *R. solanacearum* y una suspensión de una bacteria que no tenga reacción cruzada en tampón fosfato salino (PBS) como controles negativos.

Como control positivo utilizar alícuotas de extracto de muestra que haya dado previamente resultados negativos, mezcladas con  $10^3$  a  $10^4$  células por ml de *R. solanacearum* biovar 2 (por ejemplo, cepa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; véase el apéndice 3, puntos A y B). Para la comparación de los resultados de cada placa utilizar una suspensión normalizada de  $10^5$  a  $10^6$  células por ml en PBS de *R. solanacearum*. Debe asegurarse que los controles positivos estén bien separados en la placa de microtitulación de la muestra o las muestras analizadas.

En el apéndice 3, punto A, se enumeran los materiales normalizados de control positivo y negativo que pueden utilizarse en esta prueba.

Procesar el material de control de la misma manera que la muestra o muestras.

Se han validado dos protocolos ELISA:

a) ELISA indirecto (Robinson Smith *et al.*, 1995):

1) utilizar de 100 a 200  $\mu$ l de alícuotas de extracto de muestra. (Si se

calienta a 100 °C durante cuatro minutos al baño maría o un calentador pueden reducirse en algunos casos los resultados no específicos.);

2) añadir un volumen igual de tampón de tapizado de doble concentración (apéndice 4) y agitar;

3) aplicar 100 µl de alícuotas en al menos dos pocillos de una placa de microtitulación (por ejemplo, Nunc-Polysorp o equivalente) e incubar durante una hora a 37 °C o durante una noche a 4 °C;

4) quitar los extractos de los pocillos. Lavar estos tres veces con PBS-Tween (apéndice 4), dejando en ellos la última solución de lavado durante al menos cinco minutos;

5) preparar la dilución adecuada de anticuerpos contra *R. solanacearum* en tampón de bloqueo (apéndice 4). Para anticuerpos comerciales validados, utilizar las diluciones recomendadas (normalmente una concentración que duplique el título);

6) añadir 100 µl a cada pocillo e incubar durante una hora a 37 °C;

7) quitar la solución de anticuerpos de los pocillos y lavar como se describe en el punto 4;

8) preparar la dilución adecuada de conjugado de fosfa-tasa alcalina de anticuerpos secundarios en tampón de bloqueo. Añadir 100 µl a cada pocillo e incubar durante una hora a 37 °C;

9) quitar los anticuerpos conjugados de los pocillos y lavar como se describe en el punto 4;

10) añadir 100 µl de solución de sustrato de fosfatasa alcalina (apéndice 4) a cada pocillo. Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente y leer la absorbencia a 405 nm a intervalos regulares durante 90 minutos.

b) ELISA-DASI (doble sándwich de anticuerpos indirecto):

1. Preparar la dilución adecuada de inmunoglobulinas policlonales contra *R. solanacearum* en tampón de bloqueo de pH 9,6 (apéndice 4). Añadir 200 µl a cada pocillo. Incubar a 37 °C de cuatro a cinco horas o a 4 °C durante 16 horas;

2. Lavar tres veces los pocillos con PBS-Tween (apéndice 4). Añadir 190 µl de extracto de muestra en al menos dos pocillos. Añadir asimismo controles positivos y negativos en dos pocillos de cada placa. Incubar durante 16 horas a 4 °C;

3) lavar tres veces los pocillos con PBS-Tween (apéndice 4);

4) preparar una dilución apropiada de anticuerpos monoclonales específicos de *R. solanacearum* en PBS (apéndice 4) que contenga asimismo 0,5 % de seroalbúmina bovina (BSA) y añadir 190 µl a cada pocillo. Incubar a 37 °C durante dos horas;

5) lavar tres veces los pocillos con PBS-Tween (apéndice 4);

6) preparar una dilución apropiada de inmunoglobulinas antiratón conjugadas con fosfatasa alcalina en PBS. Añadir 190 µl a cada pocillo. Incubar a 37 °C durante dos horas;

7) lavar tres veces los pocillos con PBS-Tween (apéndice 4);

8) preparar una solución de sustrato de fosfatasa alcalina que contenga 1 mg de p-nitrofenil fosfato por ml de tam-pón de sustrato (apéndice 4). Añadir 200 µl a cada pocillo. Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente y leer la absorbencia a 405 nm a intervalos regulares durante 90 mi-nutos.

*Interpretación de los resultados de la prueba ELISA*

La prueba ELISA es negativa si la lectura media de la densidad óptica (DO) de los pocillos de cada muestra duplicada es  $< 2$  veces la DO del pocillo de control del extracto de muestra negativa, siempre y cuando todas las DO de los controles positivos sean superiores a 1,0 (tras 90 minutos de incubación con el sustrato) y sean más de dos veces superiores a la DO obtenida a partir de extractos de muestra negativa.

La prueba ELISA es positiva si las lecturas medias de la DO de los pocillos de cada muestra duplicada es  $> 2$  veces la DO en el pocillo del extracto de muestra negativa, siempre y cuando las lecturas de DO en todos los pocillos de control negativo sean  $< 2$  veces las de los pocillos de control positivo.

Las lecturas ELISA negativas en pocillos de control positivo indican que no se ha efectuado correctamente la prueba o que ha estado inhibida. Las lecturas ELISA positivas en pocillos de control negativo indican que se ha producido contaminación cruzada o unión de anticuerpos no específicos.

## 9. PRUEBA DE BIOENSAYO

Nota: Las pruebas preliminares realizadas con este método deberían permitir la detección reproducible de 10 a 10 unidades formadoras de colonias de *R. solanacearum* por ml añadidas a los extractos de muestras que previamente proporcionaron resultados negativos (para la preparación véase el apéndice 3).

Se puede alcanzar la máxima sensibilidad de detección cuando se utilicen extractos de muestras que se acaben de preparar y cuando las condiciones de cultivo sean las óptimas. No obstante, este método puede aplicarse también con éxito a extractos que se hayan almacenado en glicerol a una temperatura comprendida entre  $-68$  y  $-86$  °C.

El protocolo siguiente se basa en Janse (1988):

**9.1 Utilizar diez plantas de prueba** de un cultivar de tomate sensible (por ejemplo, Moneymaker o cultivar con sensibilidad equivalente determinado por el laboratorio de análisis) en la fase de la tercera hoja

verdadera para cada muestra. Para más detalles de cultivo, véase el apéndice 8. Otra alternativa es utilizar berenjenas (por ejemplo, cultivar Black Beauty o cultivares con sensibilidad equivalente), únicamente plantas en fase de hoja 23 hasta la plena expansión de la tercera hoja verdadera. Se ha observado que los síntomas son menos graves y que se desarrollan más lentamente en la berenjena. Por tanto, cuando sea posible se recomienda utilizar plántulas de tomate.

## **9.2 Distribuir 100 µl de extracto de muestra entre las plantas analizadas.**

### 9.2.1 Inoculación con jeringa

Inocular los tallos de las patatas justo por encima de los cotiledones con una jeringa provista de una aguja hipodérmica (no menos de 23G). Distribuir la muestra entre las plantas analizadas.

### 9.2.2 Inoculación en estrías

Sosteniendo la planta entre dos dedos, aplíquese con una pipeta una gota (de unos 5-10 µl) del precipitado en suspensión en el tallo situado entre los cotiledones y la primera hoja.

Con un bisturí estéril practicar una incisión diagonal de aproximadamente 1,0 cm de largo y una profundidad de aproximadamente 2/3 del grosor del tallo, comenzando el corte a partir de la gota del precipitado.

Sellar el corte con vaselina estéril utilizando una jeringa.

**9.3 Inocular con la misma técnica** cinco plantones con una suspensión acuosa de 10 a 10 células por ml preparada a partir de un cultivo de 48 horas de una cepa biovar 2 virulenta de *R. solanacearum* como control positivo y con tampón de precipitado (apéndice 4) como control negativo. Separar las plantas de control positivo y negativo de las otras para evitar la contaminación cruzada.

**9.4 Cultivar las plantas de prueba** en instalaciones de cuarentena hasta un máximo de cuatro semanas entre 25 y 30 °C con elevada humedad relativa, regándolas adecuadamente para evitar que se aneguen o se marchiten por deficiencia hídrica. Para evitar la contaminación se deben incubar las plantas de control positivo y negativo en bancos claramente separados en un invernadero o cámara de cultivo; en el caso de que se disponga de un espacio reducido, garantizar la estricta separación entre tratamientos. En el caso de que deban incubarse juntas plantas para distintas muestras, deben separarse con las pantallas adecuadas. Durante la fertilización, el riego, la inspección y cualquier otra manipulación deben extremarse las precauciones para evitar la contaminación cruzada. Es esencial mantener los invernaderos y las cámaras libres de toda plaga de insectos, ya que estos pueden transmitir la bacteria de una muestra a otra.

Comprobar si se aprecian síntomas de marchitamiento, epinastia, clorosis y/o crecimiento reducido.

9.5 Aislarlas de las plantas infectadas (sección II.3) e identificar cultivos purificados de presunta *R. solanacearum* (sección VI. B).

9.6 Si no se observan síntomas después de tres semanas, efectuar una prueba IF/PCR/Aislamiento en una muestra mixta de secciones de 1 cm del tallo de cada planta analizada, tomadas por encima del punto de inoculación. Si la prueba es positiva, efectuar una dilución en placas (sección 4.1).

9.7 Identificar cualquier cultivo purificado de presunta *R. solanacearum* (sección VI. B).

Interpretación de los resultados de la prueba del bioensayo

Se obtienen resultados válidos de la prueba del bioensayo cuando las plantas del control positivo muestran síntomas típicos, pueden reaislarse las bacterias de estas plantas y no se encuentran síntomas en los controles

negativos.

La prueba del bioensayo es negativa si las plantas analizadas no están infectadas por *R. solanacearum*, siempre que se detecte *R. solanacearum* en los controles positivos.

La prueba del bioensayo es positiva si las plantas analizadas están infectadas por *R. solanacearum*.

## **B. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN**

Identificar cultivos puros de aislados de presunta *R. solanacearum* utilizando al menos dos de las pruebas siguientes basadas en principios biológicos diferentes.

Cuando proceda, incluir cepas de referencia conocidas para cada prueba efectuada (véase el apéndice 3).

### 1. Pruebas de identificación nutricional y enzimática

Determinar las propiedades fenotípicas siguientes que estén universalmente presentes o ausentes en *R. solanacearum*, de acuerdo con los métodos de Lelliott y Stead (1987), Klement *et al.* (1990) y Schaad (2001).

<b>Pruebas</b>	<b>Resultado esperado</b>
Producción de pigmento fluorescente	-
Inclusiones de poli- $\beta$ -hidroxibutirato	+
Prueba de la oxidación/fermentación (O/F)	O+/F-
Actividad catalasa	+
Prueba de oxidasa de Kovac	+
Reducción de nitratos	+
Utilización de citratos	+
Crecimiento a 40 °C	-
Crecimiento en NaCl al 1 %	+
Crecimiento en NaCl al 2 %	-
Actividad de dihidrolasa de arginina	-
Licuefacción de la gelatina	-
Hidrólisis del almidón	-

## 2. Prueba IF

2.1 Preparar una suspensión de aproximadamente 10 células por ml en tampón IF (apéndice 4).

2.2 Preparar una serie de diluciones a 1/2 de un antisuero adecuado (véase el sitio web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

2.3 Aplicar el procedimiento IF (sección VI.A.5).

2.4 La prueba IF será positiva si el título IF del cultivo es equivalente al del control positivo.

## 3. Prueba ELISA

*Nota:* Si solamente se efectúan dos pruebas de identificación, no debe utilizarse ninguna otra prueba serológica además de este método.

3.1 Preparar una suspensión de aproximadamente 10 células por ml en 1X PBS (apéndice 4).

3.2 Llevar a cabo un procedimiento ELISA adecuado con un anticuerpo monoclonal específico de *R. solanacearum*.

3.3 La prueba ELISA será positiva si la lectura ELISA obtenida del cultivo es como mínimo la mitad de la obtenida para el control positivo.

## 4. Prueba PCR

4.1 Preparar una suspensión de aproximadamente 10 células por ml en agua estéril de grado molecular.

4.2 Calentar 100 µl de la suspensión celular en tubos cerrados en un calentador o al baño maría a 100 °C durante cuatro minutos. Las muestras pueden almacenarse entonces a una temperatura de - 16 a - 24 °C hasta que sea necesario.

4.3 Aplicar los procedimientos PCR adecuados para amplificar los amplicones específicos de *R. solanacearum* [por ejemplo, Seal *et al.* (1993); Pastrok y Maiss (2000); Pastrok *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997); Weller *et al.* (1999)].

4.4 Se logrará la identificación positiva de *R. solanacearum* si los amplicones de la PCR son del mismo tamaño y tienen los mismos polimorfismos de la longitud del fragmento de restricción que los de la cepa de control positivo.

## 5. Prueba FISH

5.1 Preparar una suspensión de aproximadamente 10 células por ml en agua ultrapura.

5.2 Aplicar el procedimiento FISH (sección VI.A.7) con al menos dos oligosondas específicas para *R. solanacearum* (apéndice 7).

5.3 La prueba FISH será positiva si se obtienen las mismas reacciones del cultivo y el control positivo.

## 6. Perfiles de ácidos grasos (Fatty acid profiling o FAP)

6.1 Mantener el cultivo en agar de tripticasa de soja (Oxoid) durante 48 horas a 28 °C.

6.2 Aplicar un procedimiento FAP adecuado (Janse, 1991; Stead, 1992).

6.3 La prueba FAP será positiva si el perfil del presunto cultivo es idéntico al del control positivo. Los ácidos grasos cuya presencia es característica son 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH y 18:1 2OH, y la ausencia de 16:0 3OH es altamente indicativa de *Ralstonia sp.*

## 7. Métodos de caracterización de las cepas

Se recomienda efectuar la caracterización de las cepas con uno de los métodos siguientes para cada nuevo caso de aislamiento de *R. solanacearum*.

Cuando proceda, incluir cepas de referencia conocidas para cada prueba efectuada (véase el apéndice 3).

### 7.1 Determinación de los biovars

*R. solanacearum* se separa en biovars en función de la capacidad para utilizar y/o oxidar tres disacáridos y tres hexosas alcohólicas (Hayward, 1964 y Hayward *et al.*, 1990). Los medios nutritivos para la prueba del biovar se describen en el apéndice 2. Esta prueba puede efectuarse con éxito inoculando los medios por perforación con cultivos puros de aislados de *R. solanacearum* e incubando a 28 °C. Si los medios se distribuyen en placas estériles de cultivo de células de 96 pocillos (200 µl por pocillo) puede observarse en un plazo de 72 horas un cambio de color, del verde oliva al amarillo, lo que indica un resultado positivo de la prueba.

Utilización de:	Biovar				
	1	2	3	4	5
Maltosa .....	-	+	+	-	+
Lactosa .....	-	+	+	-	+
D (+) Celobiosa.....	-	+	+	-	+
Manitol .....	-	-	+	+	+
Sorbitol.....	-	-	+	+	-
Dulcitol .....	-	-	+	+	-

El biovar 2 se diferencia en subfenotipos mediante pruebas adicionales

	Biovar 2A (distribución mundial)	Biovar 2A (en Chile y Colombia)	Biovar 2T (en áreas tropicales)
Utilización de trehalosa .....	-	+	+
Utilización de <i>meso</i> -inositol .....	+	-	+
Utilización de D (-) ribosa .....	-	-	+
Actividad pectolítica .....	baja	baja	alta

(1) Véase Lelliott y Stead (1987).

## 7.2 Obtención de la huella dactilar genómica

La diferenciación molecular de las cepas en el complejo de *R. solanacearum* puede conseguirse mediante diferentes técnicas, entre las que se incluyen:

7.2.1 Análisis de los polimorfismos de la longitud del fragmento de restricción (RFLP) (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2 PCR de secuencia repetitiva utilizando cebadores REP, BOX y ERIC (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3 Análisis de los polimorfismos de la longitud del fragmento amplificado (AFLP) (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3 Métodos PCR Pueden utilizarse cebadores específicos de PCR (Patrik *et al.*, 2002; véase el apéndice 6) para diferenciar cepas que pertenezcan a la división 1 (biovares 3, 4 y 5) y la división 2 (biovares 1, 2A y 2T) de *R. solanacearum*, tal como se define originalmente con el análisis RFLP (Cook *et al.*, 1989) y la secuenciación de 16S rADN (Taghavi *et al.*, 1996).

## **C. PRUEBA DE CONFIRMACIÓN DE PATOGENICIDAD**

Como confirmación final del diagnóstico de *R. solanacearum* y para la evaluación de la virulencia de cultivos identificados como *R. solanacearum* debe realizarse la prueba de patogenicidad:

1) preparar un inóculo de aproximadamente 10 células por ml de cultivos de 24 a 48 horas a partir del aislado que se vaya a someter a prueba y una cepa de control positivo adecuada de *R. solanacearum* (por ejemplo, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; véase el apéndice 3);

2) inocular entre cinco y diez tallos de plántulas de tomate o berenjena sensibles en la fase de la tercera hoja verdadera (véase la sección VI.A.9);

3) incubar durante un máximo de dos semanas a una temperatura de 25 a 28 °C, con humedad relativa alta y riego adecuado, evitando tanto el

estancamiento del agua como el estrés provocado por la sequía. Con los cultivos puros deberá obtenerse el marchitamiento típico en el plazo de 15 días. Si después de este período no se presentan los síntomas, no podrá confirmarse que el cultivo es una forma patógena de *R. solanacearum*;

4) comprobar si se aprecian síntomas de marchitamiento y/o epinastia, clorosis y crecimiento reducido;

5) aislar las plantas sintomáticas separando una sección de tallo que esté 2 cm por encima del punto de inoculación. Dilacerar y suspender en un pequeño volumen de agua destilada estéril o en tampón fosfato 50 mM (apéndice 4). Aislar de la suspensión mediante dilución, extendiendo o haciendo estrías en un medio adecuado, preferentemente en un medio selectivo (apéndice 2), incubar entre 48 y 72 horas a 28 °C y examinar la formación de colonias típicas de *R. solanacearum*.

## Apéndice 1

### Laboratorios que han participado en la optimización y la validación de los protocolos

<b>Laboratorio (1)</b>	<b>Ciudad</b>	<b>País</b>
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viena y Linz	Austria
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Bélgica
Plantedirektoratet	Lyngby	Dinamarca
Central Science Laboratory	York	Inglaterra
Scottish Agricultural Science Agency	Edimburgo	Escocia
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité Bactériologie	Angers	Francia
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francia
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Alemania
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Alemania
State Laboratory	Dublín	Irlanda
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bolonia	Italia
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italia
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Países Bajos
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Países Bajos
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisboa	Portugal
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	España
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	España
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Suecia

(1) Científicos de contacto: véase el sitio web

<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

## Apéndice 2

### Medios para el aislamiento y el cultivo de *R. solanacearum*

h) Medios de cultivo en general para el aislamiento y el cultivo de *R. solanacearum*

#### *Agar nutritivo (NA)*

Agar nutritivo (Difco) 23 g

Agua destilada 1,0 l

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### *Agar de levadura, glucosa, peptona (YPGA)*

Extracto de levadura (Difco) 5,0 g

Bacto-peptona (Difco) 5,0 g

Agar nutritivo (Difco) 23,0 g

D(+)-glucosa (monohidrato) 10,0 g

Agua destilada 1,0 l Bacto-agar (Difco) 15,0 g

Agua destilada 1,0 l

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

#### *Agar de sacarosa y peptona (SPA)*

Sacarosa 20,0 g

Bacto-peptona (Difco) 5,0 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,25 g

Bacto-agar (Difco) 15,0 g

Agua destilada 1,0 l

pH 7,2-7,4

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

*Medio de tetrazolio de Kelman*

Casaminoácidos (Difco) 1,0 g

Bacto-peptona (Difco) 10,0 g

Dextrosa 5,0 g

Bacto-agar (Difco) 15,0 g

Agua destilada 1,0 l

Cristal violeta (Sigma) 5 mg por l

Polimixina-B-Sulfato (Sigma P-1004) 600.000 U (aproximadamente 100 mg) por l

Bacitracina (Sigma B-0125) 1 250 U (aproxim. 25 mg) por l

Cloranfenicol (Sigma C-3175) 5 mg por l

Penicilina-G (Sigma P-3032) 825 U (aproximadamente 0,5 mg) por l

Cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (Sigma) 50 mg por l

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos

Enfriar a 50 °C y añadir una solución de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (Sigma), esterilizada por filtración, para conseguir una concentración final de 50 mg/l.

b) Medios de cultivo selectivo validados

*Medio SMSA (Englebrecht, 1994, modificado por Elphinstone et al., 1996)**Medio de base*

Casaminoácidos (Difco) 1,0 g

Bacto-peptona (Difco) 10,0 g

Glicerol 5,0 ml

Bacto-agar (Difco) (véase la nota 2) 15,0 g

Agua destilada 1,0 l

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Enfriar a 50 °C y añadir soluciones estándar acuosas, esterilizadas por filtración, de los siguientes ingredientes, a fin de obtener las concentraciones finales especificadas:

*Nota:*

1. La utilización de reactivos diferentes de los especificados arriba puede afectar al crecimiento de *R. solanacearum*.
2. Puede utilizarse Agar oxoide #1 en lugar de Bacto-agar (Difco). En este caso, el crecimiento de *R. solanacearum* será más lento, aunque también puede reducirse el crecimiento de saprofitas competidoras. Las colonias típicas de *R. solanacearum* pueden necesitar de uno a dos días más para formarse y la coloración rojiza puede ser más ligera y difusa que en Bacto-agar.
3. Si se incrementa la concentración de bacitracina a 2 500 U por l pueden reducirse las poblaciones de bacterias competidoras sin que se vea afectado el crecimiento de *R. solanacearum*.

Almacenar los medios y las soluciones estándar de antibióticos a 4 °C en la oscuridad y utilizar en el plazo de un mes.

Las placas deberán carecer de condensación de superficie antes de su utilización.

Evitar un secado excesivo de las placas.

Deberá efectuarse un control de calidad tras la preparación de cada nuevo lote de medio mediante siembra de una suspensión de un cultivo de referencia de *R. solanacearum* (véase el apéndice 3) y observación de la formación de colonias típicas después de incubación a 28 °C de dos a cinco días.

c) Medios de enriquecimiento validados

*Caldo SMSA (Elphinstone et al., 1996)*

Preparar como para medio de agar selectivo SMSA pero omitir Bacto-agar y cloruro de 2,3,5-tetrazolio.

*Caldo Wilbrink modificado (Caruso et al., 2002)*

Sacarosa 10 g

Peptona proteosa 5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g

MgSO<sub>4</sub> 0,25 g

NaNO<sub>3</sub> 0,25 g

Agua destilada 1 l

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y enfriar a 50 °C.

Añadir soluciones estándar de antibióticos como para el caldo SMSA.

### Apéndice 3

#### A. Material de control normalizado comercialmente disponible

##### a) Aislados bacterianos

Se recomiendan los siguientes aislados bacterianos para su utilización como material normalizado de referencia, bien como controles positivos (cuadro 1) o durante la optimización de las pruebas para evitar reacciones cruzadas (cuadro 2). Todas las cepas están comercializadas por:

- 1 National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, Reino Unido.
- 2 Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Países Bajos.
- 3 Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP) — INRA Station Phytobactériologie, Angers, Francia.

Cuadro 1. Panel de referencia SMT de aislados de *R. solanacearum*

Código NCPBP	SMT#	Otros códigos	País de origen	Biovar
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egipto	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turquía	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Inglaterra	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Chipre	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Suecia	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Bélgica	2
NCPBP 4156	71(*)	PD 2762, CFBP 3857	Países Bajos	2
(*)NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Francia	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80, NCPBP	Portugal	2
NCPBP 4160	69	4066	España	2
NCPBP 4161	76	IVIA-1632-2	Alemania	2
NCPBP 325	41	B3B	Estados Unidos	1
NCPBP 3967	42	CFBP 2047, KEL60-1, R842	Costa Rica	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4610, R285, GONG7	Colombia	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Perú	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4612, R578, CIP312	Brasil	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 4613, R568, CIP226	Perú	3
NCPBP 3997	47	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Australia	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Sri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4615, R297/349, CIP121,	Filipinas	4
NCPBP 4011	50	CMIB2861	China	5
		CFBP 4616, R470		
		CFBP 4617, R288, HEmp2		

*Nota:* La autenticidad de las cepas mencionadas solamente puede garantizarse

Cuadro 2. Panel de referencia SMT de bacterias serológica o genéticamente relacionadas para su utilización en la optimización de las pruebas de detección

Código NCPPB	SMT#	Otros código	Identificación
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> (1)
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>Marginalis</i>
NCPPB 4164	-	CFBP 2227	(1)
NCPPB 4165	-	CFBP 2459	<i>Burkholderia cepacia</i> (2)
NCPPB 4166	58	CFBP 3567	<i>Ralstonia pickettii</i> (2)
NCPPB 4167	60	CSL Pr1150	<i>Ralstonia pickettii</i> (1)
		PD 2778	<i>Ralstonia</i> sp. (1)
	53	CFBP 3575	
NCPPB 1127	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia andropogonis</i> (1)
NCPPB 353	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia caryophylli</i> (1)
NCPPB 945	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia cepacia</i> (1)
NCPPB 3708	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia glumae</i> (1)
NCPPB 3590	59	CFBP 3568	<i>Burkholderia plantarii</i> (1)
NCPPB 3726	61	CFBP 4619	<i>Banana Blood Disease Bacterium</i> (1) (2)
		IPO S339	(3)
NCPPB 4168	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. (1)
	63		
		CFBP 4621	<i>Enterobacter</i> sp. (1)
NCPPB 4169	64	IPO S306	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (1) (2)
NCPPB 4170	65	CFBP 4622	
	-	IPO 1693	<i>Curtobacterium</i> sp. (1) (2)
NCPPB 4171	81	IPO 1 696 <sup>a</sup>	<i>Pseudomonas</i> sp. (1)
		PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. (2)
		IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium</i> sp. (1) (2)
NCPPB 4172			
NCPPB 4173			
NCPPB 4174			

- (1). Cepa que puede presentar reacción cruzada en pruebas serológicas (IF y/o ELISA) con antisueros policlonales.
- (2). Cepa de la que puede amplificarse el producto de la PCR en algunos laboratorios de un tamaño similar al esperado utilizando cebadores específicos OLI1 y Y-2 (véase el apéndice 6).
- (3). Probablemente tendrá reacciones cruzadas en la mayor parte de las pruebas, pero solamente se conoce su aparición en bananas en Indonesia.

*b) Material de control normalizado comercialmente disponible*

El siguiente material de control normalizado puede obtenerse a partir de un cultivo NCPPB:

Congelar precipitado seco de extracto de patata a partir de 200 tubérculos de patata sanos como control negativo para todas las pruebas.

Congelar precipitado seco de extracto de patata a partir de 200 tubérculos de patata sanos que contengan de 10 a 10 y 10 a 10 células de *R. solanacearum* biovar 2 (por ejemplo, cepa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) como controles positivos para pruebas serológicas y PCR. Teniendo en cuenta que la viabilidad de las células se ve afectada durante la criodesecación, no son adecuados como controles normalizados para pruebas de aislamiento o de bioensayo.

Utilizar suspensiones fijadas con formalina de *R. solanacearum* biovar 2 (cepa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) de 10 células por ml como controles positivos para pruebas serológicas.

## **B. Preparación de controles positivos y negativos**

Preparar un cultivo de 48 horas de una cepa virulenta de *R. solanacearum* raza 3/biovar 2 (por ejemplo, cepa NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) en medio base SMSA y suspender en tampón fosfato 10 mM para obtener una densidad celular de aproximadamente  $2 \times 10^8$  cfu por ml. Esto se obtiene normalmente mediante una suspensión ligeramente turbia equivalente a una densidad óptica de 0,15 a 600 nm.

Separar las cuñas basales de 200 tubérculos de una variedad de piel blanca conocida por estar exenta de *R. solanacearum*.

Procesar las cuñas basales como es habitual y resuspender el precipitado en 10 ml.

Preparar diez microviales estériles de 1,5 ml con 900  $\mu$ l del precipitado resuspendido.

Transferir 100  $\mu$ l de la suspensión de *R. solanacearum* al primer microvial. Homogeneizar por agitación.

Establecer niveles decimales de contaminación realizando nuevas diluciones

en los cinco microviales siguientes.

Los seis microviales contaminados se utilizarán como controles positivos. Los cuatro microviales no contaminados se utilizarán como controles negativos. Etiquetar los microviales como corresponda.

Preparar alícuotas de 100 µl en microviales estériles de 1,5 ml para obtener de este modo nueve réplicas de cada muestra de control. Almacenar a una temperatura de - 16 a - 24 °C hasta que se vayan a utilizar.

La presencia y la cuantificación de *R. solanacearum* en las muestras de control deberá confirmarse en primer lugar mediante una prueba IF.

Para la prueba PCR, extraer ADN de las muestras de control positivas y negativas para cada serie de muestras de ensayo.

Para las pruebas IF y FISH, realizar ensayos con las muestras de control positivas y negativas para cada serie de muestras de ensayo.

En las pruebas IF, FISH y PCR, debe detectarse *R. solanacearum* en al menos 10 y 10 células/ml de los controles positivos y en ninguno de los controles negativos.

## Apéndice 4

### Tampones para procedimientos de ensayo

GENERAL: Los tampones esterilizados que no se hayan abierto pueden almacenarse hasta un año.

#### 1. Tampones para el procedimiento de extracción

##### 1.1 Tampón de extracción (tampón fosfato 50 mM, pH 7,0)

Este tampón se utiliza para la extracción de la bacteria del tejido de las plantas mediante la homogeneización o la agitación.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhidro) 4,26 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,72 g

Agua destilada 1,00 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Los siguientes componentes adicionales pueden resultar útiles:

	<i>Finalidad</i>	<i>Cantidad (por l)</i>
Copos de Lubrol.....	Defloculante (*).....	0,5 g 1,0
Compuesto DC silicona antiespumante.....	Antiespumante (*).....	ml 1,0 g
Pirofosfato tetrasódico .....	Antioxidante .....	50 g
Polivinilpirrolidona-40000 (PVP-40).....	Unir los inhibidores PCR ..	

(\*) Para su utilización en el método de extracción por homogeneización.

##### 1.2 Tampón de precipitado (tampón fosfato 10 mM, pH 7,2)

Este tampón se utiliza para la resuspensión y la dilución de extractos de cuñas basales de tubérculos de patata tras la concentración en un precipitado mediante centrifugación.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,7 g  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,4 g  
Agua destilada 1,0 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

## 2. Tampones para la prueba IF

### 2.1 Tampón IF [tampón fosfato salino (PBS) 10 mM, pH 7,2]

Este tampón se utiliza para la dilución de anticuerpos.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,7 g  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,4 g  
NaCl 8,0 g  
Agua destilada 1,0 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### 2.2 Tampón IF-Tween

Este tampón se utiliza para lavar los portaobjetos. Añadir 0,1 % de Tween 20 al tampón IF.

### 2.3 Solución de glicerol con tampón de fosfato, pH 7,6

Este tampón se utiliza como fluido de montaje en los pocillos de los portaobjetos de IF para aumentar la fluorescencia.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 3,2 g  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,15 g  
Glicerol 50 ml  
Agua destilada 100 ml

En el mercado pueden encontrarse soluciones de montaje que protegen la fluorescencia, como, por ejemplo, Vectashield® (Vector Laboratories) o Citifluor® (Leica).

### 3 Tampones para la prueba ELISA-indirecto

#### 1.1 Tampón fuerza doble para tapizado, pH 9,6

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 6,36 g

NaHCO<sub>3</sub> 11,72 g

Agua destilada 1,00 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Puede añadirse como antioxidante sulfito de sodio (0,2 %) si es necesario para evitar la acumulación de compuestos aromáticos oxidados.

#### 1.2 Tampón fosfato salino (PBS), 10X pH 7,4

NaCl 80,0 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 29,0 g

KCl 2,0 g

Agua destilada 1,0 l

#### 1.3 PBS-Tween

PBS 10X 100 ml

Tween 20 al 10 % 5 ml

Agua destilada 895 ml

3.4 Tampón de bloqueo (anticuerpos) (debe prepararse en el momento de su utilización)

PBS 10X 10,0 ml  
Polivinilpirrolidona-44000 2,0 g  
(PVP-44)  
Tween 20 al 10 % 0,5 ml  
Leche en polvo 0,5 g  
Agua destilada completar hasta 100 ml

### 3.5 Solución de sustrato fosfatasa alcalina, pH 9,8

Dietanolamina 97 ml  
Agua destilada 800 ml

Mezclar y ajustar el pH a 9,8 con HCl concentrado. Completar hasta 1 litro con agua destilada. Añadir 0,2 g de  $MgCl_2$ . Disolver dos pastillas de 5 mg de sustrato fosfatasa (Sigma) por cada 15 ml de solución.

## 4 Tampones para la prueba ELISA-DASI

### 4.1 Tampón de tapizado, pH 9,6

$Na_2CO_3$  1,59 g  
 $NaHCO_3$  2,93 g  
Agua destilada 1000ml  
Disolver los ingredientes y comprobar el pH.

### 4.2 Tampón fosfato salino (PBS), 10X pH 7,2-7,4

NaCl 80,0 g  
 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  4,0 g  
 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  27,0 g  
Agua destilada 1000 ml

### 4.3 PBS-Tween

10X PBS 50 ml  
Tween 20 al 10 % 5 ml

Agua destilada 950 ml

4.4 Tampón de sustrato, pH 9,8

Dietanolamina 100 ml

Agua destilada 900 ml

Mezclar y ajustar el pH a 9,8 con HCl concentrado.

### **Apéndice 5**

Determinación del nivel de contaminación en las pruebas IF y FISH

- 1 Contar el número medio de células fluorescentes típicas por campo de visión (c).
- 2 Calcular el número de células fluorescentes típicas por pocillo del portaobjetos del microscopio (C):

$$C = c \times S/s$$

donde:

S = superficie del pocillo del portaobjetos múltiple

s = superficie del campo del objetivo

$$s = \pi i^2 / 4G^2 K^2$$

donde:

i = coeficiente del campo (varía de a 24 dependiendo del tipo ocular)

K = coeficiente del tubo (1 o 1,25).

G = aumentos del objetivo (100x, 40x, etc.)

3. Calcular el número de células fluorescentes típicas porcionar resultados positivos falsos con respecto a un con-por ml de precipitado resuspendido (N):

$$N = C \times 1\,000/y \times F$$

y = volumen de precipitado resuspendido en cada pocillo

F = factor de dilución del precipitado resuspendido

## **Apéndice 6**

### **Protocolos y reactivos PCR validados**

*Nota:* Las pruebas preliminares deberán permitir la detección reproducible de al menos  $10^3$  a  $10^4$  células de *R. solanacearum* por ml de extracto de muestra.

Por otra parte, las pruebas preliminares no deben proporcionar resultados positivos falsos con respecto a un conjunto de cepas bacterianas seleccionadas (véase el apéndice 3).

#### 1. Protocolo PCR de Seal *et al.* (1993)

##### 1.1 Cebadores del oligonucleótido

Cebador directo OLI-1 5´-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3´

Cebador reverso Y-2 5´-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3´

Tamaño esperado del amplicón de los moldes de ADN de *R. solanacearum* = 288 pb.

##### 1.2 Mezcla para la reacción PCR

Reactivo	Cantidad por reacción	Concentración final
Agua ultrapura estéril	17,65 µl	1x (1,5 mM
10x tampón PCR (1) (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl	MgCl <sub>2</sub> )
Mezcla dNTP (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Cebador OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Cebador Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1µM

Polimerasa Taq (5 U/ $\mu$ l) (1)	0,1 $\mu$ l	0,5 U
Volumen de muestra	2,0 $\mu$ l	
Volumen tota	25 $\mu$ l	

(1) El método se validó utilizando polimerasa *Taq* de Perkin Elmer (AmpliTaq) y Gibco BRL.

### 1.3 Condiciones de reacción PCR

Aplicar el siguiente programa:

1 ciclo de:

i) 2 minutos a 96 °C (desnaturalización del molde de ADN)

35 ciclos de:

i) 20 segundos a 94 °C (desnaturalización del molde de ADN)

ii) 20 segundos a 68 °C (hibridación de los cebadores)

iv) 30 segundos a 72 °C (extensión de la copia)

*Nota:* Este programa se optimizó para utilizarlo con un termociclador Perkin Elmer 9600. Puede ser preciso modificar la duración de los ciclos ii), iii), y iv) para su utilización con otros modelos.

### 1.4 Análisis de la enzima de restricción del amplicón

Los productos PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* producen un polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción característico con la enzima *Ava* II tras la incubación a 37 °C.

## 2 Protocolo PCR de Pastrok y Maiss (2000)

### 2.1 Cebadores del oligonucleótido

Cebador directo Ps-1 5' - agt cga acg gca gcg ggg g 3'

Cebador reverso Ps-2 5' - ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca -3'

Tamaño esperado del amplicón de los moldes de ADN de *R. solanacearum* = 553 pb.

## 2.2 Mezcla para la reacción PCR

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad por reacción</b>	<b>Concentración final</b>
Agua ultrapura estéril.....	16,025 µl	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
10x tampón PCR (1) .....	2,5 µl	

Reactivo	Cantidad por reacción	Concentración final
BSA (fracción V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
.....	0,125 µl	0,1 mM
Mezcla d-nTP (20 mM)	0,5 µl	0,2 µM
.....	0,5 µl	0,2 µM
Cebador Ps-1 (10 µM)	0,1 µl	0,5 U
.....		
Cebador Ps-2 (10 µM)		
.....		
Polimerasa Taq (5 U/µl) (1)		
.....		
Volumen de muestra	5,0 µl	
.....		
Volumen total	25,0 µl	
.....		

(1) Los métodos se validaron utilizando polimerasa *Taq* de Perkin Elmer (AmpliAq) y Gibco BRL. *Nota:* Originalmente optimizado para termociclador MJ Research PTC 200 con polimerasa Gibco Taq. También pueden utilizarse Perkin Elmer AmpliAq y tampón con las mismas concentraciones.

### 2.3 Condiciones de reacción PCR

Aplicar el siguiente programa:

1 ciclo de:

- i) 5 minutos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)

35 ciclos de:

- ii) 30 segundos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)
- iii) 30 segundos a 68 °C (hibridación de los cebadores)
- iv) 45 segundos a 72 °C (extensión de la copia)

1 ciclo de:

- v) 5 minutos a 72 °C (extensión final)

vi) Mantener a 4 °C.

*Nota:* Este programa está optimizado para utilizarlo con un termociclador MJ Research PTC 200. Puede ser preciso: modificar la duración de los ciclos ii), iii) y iv) para su utilización con otros modelos.

#### 2.4 Análisis de la enzima de restricción del amplicón 35 ciclos de:

Los productos PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* producen un polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción característico con la enzima Taq I s del tras la incubación a 65 °C durante 30 minutos. Los fragmentos de restricción obtenidos a partir del fragmento de *R. solanacearum* tienen un tamaño de 457 pb y 96 pb.

### 3. Protocolo PCR multiplex con control PCR interno (Patrik *et al.*, 2002)

#### 3.1 Cebadores del oligonucleótido

Cebador directo RS-1-F 5' - ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'

Cebador reverso RS-1-R 5' - CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'

Cebador directo NS-5-F 5' - AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G -3'

Cebador reverso NS-6-R 5' - GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC -3'

Tamaño esperado del amplicón de los moldes de ADN de *R. solanacearum* = 718 pb (conjunto de cebadores RS). Tamaño esperado del amplicón de control PCR interno 18S rARN = 310 pb (conjunto de cebadores NS).

#### 3.2 Mezcla para la reacción PCR

Reactivo	Cantidad por reacción	Concentración final
----------	-----------------------	---------------------

Agua ultrapura estéril.....	12,625 µl 2,5 µl	
10x tampón PCR (1) (15 mM MgCl <sub>2</sub> ) .....	0,25 µl 0,125 µl	
BSA (fracción V) (10 %).....	2,0 µl 2,0 µl	
Mezcla d-nTP (20 mM).....	0,15 µl 0,15 µl	
Cebador RS-1-F (10 µM).....	0,2 µl	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
Cebador RS-1-R (10 µM) .....		0,1 %
Cebador NS-5-F (10 µM) (2) .....		0,1 mM 0,8 µM
Cebador NS-6-R (10 µM) (2) .....		0,8 µM 0,06 µM
Polimerasa Taq (5 U/µl) (1) .....		0,06 µM 1,0 U
Volumen de muestra .....	5,0 µl	
Volumen total .....	25,0 µl	

(1) Los métodos se validaron utilizando polimerasa *Taq* de Perkin Elmer (AmpliTaq) y Gibco BRL.

(2) La concentración de los cebadores NS-5-F y NS-6-R se optimizó para la extracción de cuñas basales de patata utilizando el método de homogeneización y purificación del ADN de acuerdo con Pastrok (2000) (véase la sección VI.A.6.1.a). Será necesario proceder a la reoptimización de las concentraciones de reactivos si se utilizan la extracción por agitación u otros métodos de aislamiento del ADN.

### 3.3 Condiciones de reacción PCR

Aplicar el siguiente programa:

1 ciclo de:

i) 5 minutos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)

35 ciclos de:

ii) 30 segundos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)

iii) 30 segundos a 58 °C (hibridación de los cebadores)

iv) 45 segundos a 72 °C (extensión de la copia)

1 ciclo de:

v) 5 minutos a 72 °C (extensión final)

vi) Mantener a 4 °C.

*Nota:* Este programa está optimizado para utilizarlo con un termociclador MJ Research PTC 200. Puede ser preciso modificar la duración de los ciclos ii), iii) y iv) para su utilización con otros modelos.

### 3.4 Análisis de la enzima de restricción del amplicón

Los productos PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* producen un polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción característico con la enzima *Bsm I* o un *Isoschizomere* (por ejemplo, *Mva 1269 I*) del tras la incubación a 65 °C durante 30 minutos.

## 4. Protocolo PCR específico del biovar de *R. solana*

### 4.1 Cebadores del oligonucleótido

Cebador directo Rs-1-F 5´ - ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3´

Cebador reverso Rs-1-R 5´ - CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3´

Cebador reverso Rs-3-R 5´ - TTC ACG GCA AGA TCG CTC -3´

Tamaño esperado del amplicón de los moldes de ADN de *R. solanacearum*:

con Rs-1-F/Rs-1-R = 718 pb  
 con Rs-1-F/Rs-3-R = 716 pb.

#### 4.2 Mezcla para la reacción PCR

##### a) Biovar 1/2 específico PCR

Reactivo	Cantidad por reacción	Concentración final
Agua ultrapura estéril.....	12,925 µl	
10X tampón PCR (1) .....	2,5 µl	
BSA (fracción V) (10 %).....	0,25 µl	
Mezcla d-NTP (20 mM) .....	0,125 µl	
Cebador Rs-1-F (10 µM) .....	2 µl	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
Cebador Rs-1-R (10 µM) .....	2 µl	0,1 %
Polimerasa Taq (5 U/µl) (1) .....	0,2 µl	0,1 mM
		0,8 µM
		0,8 µM
		1 U
Volumen de muestra.....	5,0 µl	
Volumen total .....	25,0 µl	

(1) Los métodos se validaron utilizando polimerasa *Taq* de Perkin Elmer (AmpliTaq) y Gibco BRL.

##### b) Biovar 3/4/5 específico PCR

Reactivo	Cantidad por reacción	Concentración final

Agua ultrapura estéril.....	14,925 µl 2,5 µl	
10X tampón PCR (1) .....	0,25 µl 0,125 µl	
BSA (fracción V) (10 %).....	1 µl 1 µl	
Mezcla d-NTP (20 mM) .....	0,2 µl	1x (1,5 mM M <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> )
Cebador Rs-1-F (10 µM) .....		0,1 %
Cebador Rs-3-R (10 µM) .....		0,1 mM
Polimerasa Taq (5 U/µl) (1) .....		0,4 µM 0,4 µM 1 U
Volumen de muestra.....	5,0 µl	
Volumen total .....	25,0 µl	

(1) Los métodos se validaron utilizando polimerasa *Taq* de Perkin Elmer (AmpliTaq) y Gibco BRL

#### 4.3 Condiciones de reacción PCR

Aplicar el siguiente programa:

1 ciclo de:

vii) 5 minutos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)

35 ciclos de:

viii) 30 segundos a 95 °C (desnaturalización del molde de ADN)

ix) 30 segundos a 58 °C (hibridación de los cebadores)

x) 45 segundos a 72 °C (extensión de la copia)

1 ciclo de:

- xi) 5 minutos a 72 °C (extensión final)
- xii) Mantener a 4 °C.

*Nota:* Este programa está optimizado para utilizarlo con un termociclador MJ Research PTC 200. Puede ser preciso modificar la duración de los ciclos ii), iii) y iv) para su utilización con otros modelos.

#### 4 Análisis de la enzima de restricción del amplicón

Los productos PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* utilizando cebadores Rs-1-F y Rs-1-R producen un polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción característico con la enzima *Bsm* I o un *Isoschizomere* (por ejemplo, *Mva* 1269 I) tras la incubación a 65 °C durante 30 minutos. Los productos PCR amplificados a partir de ADN de *R. solanacearum* utilizando los cebadores Rs-1-F y Rs-3R no poseen sitios de restricción.

#### 5. Preparación del tampón de carga

##### 5.1 Azul de bromofenol (solución estándar al 10 %)

Azul de bromofenol 5 g

Agua bidestilada 50 ml

##### 5.2 Tampón de carga

Glicerol (86 %) 3,5 ml

Azul de bromofenol (5,1) 300 µl

Agua bidestilada 6,2 ml

#### 6. 10X tampón de tris acetato EDTA (TAE), pH 8,0

Tampón tris 48,40 g

Ácido acético glacial 11,42 ml

EDTA (sal disódica) 3,72 g

Agua destilada 1,00 l

Diluir a 1X antes de utilizarlo.

Se encuentra también disponible en el mercado (por ejemplo, Invitrogen o equivalente).

### **Apéndice 7**

#### **Reactivos validados para la prueba FISH**

##### 1. Oligosondas

Sonda específica para *R. solanacearum* OLI-1-CY3:

5' - GGC AGG TAG CAA GCT ACC CCC-3'

Sonda eubacteriana no específica EUB-338-FITC:

5' - GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'

##### 2. Solución fijadora

*¡ADVERTENCIA! LA SOLUCIÓN FIJADORA CONTIENE PARAFORMALDEHÍDO QUE ES TÓXICO. UTILIZAR GUANTES Y NO INHALAR. SE RECOMIENDA TRABAJAR EN UNA CAMPANA EXTRACTORA DE GASES.*

i) Calentar 9 ml de agua de grado molecular, por ejemplo agua ultrapura, a 60 °C aproximadamente y añadir 0,4 g de paraformaldehído. El paraformaldehído se disuelve cuando se añaden 5 gotas de 1N NaOH y se remueve con un agitador magnético.

ii) Ajustar el pH a 7,0 mediante la adición de 1 ml de tampón de fosfato de concentración 0,01 M y 5 gotas de 1N HCl. Verificar el pH con bandas indicadoras y ajustar si fuese necesario con HCl o NaOH. *¡ADVERTENCIA! NO UTILIZAR UN MEDIDOR DE PH EN SOLUCIONES QUE CONTENGAN PARAFORMALDEHÍDO.*

- iii) Filtrar la solución con un filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  y mantener libre de polvo a 4 °C hasta nueva utilización.

### 3. 3X Hybmix

NaCl 2,7 M

Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)

EDTA (filtro esterilizado con autoclave) 15 mM

Diluir a 1X como se precisa.

### 2. Solución de hibridación

1X Hybmix

Dodecilsulfato sódico (SDS) 0,01 %

Formamida 30 %

Sonda EUB 338 5 ng/ $\mu\text{l}$

Sonda OLI-1 o OLI-2 5 ng/ $\mu\text{l}$

Preparar las cantidades de solución de hibridación de acuerdo con los cálculos de la tabla 1. Para cada portaobjetos (que contenga dos muestras distintas por duplicado) se precisan 90  $\mu\text{l}$  de solución de hibridación. **IMPORTANTE: DEBE TENERSE EN CUENTA QUE LA FORMAMIDA ES MUY TÓXICA, POR LO QUE DEBEN UTILIZARSE GUANTES Y TOMARSE LAS PRECAUCIONES DE SEGURIDAD NECESARIAS.**

Tabla 1: Cantidades sugeridas para la preparación de la mezcla de hibridación

Número de portaobjetos		1	4	6	8	10
Agua ultrapura		23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
estéril.....		30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
3X hybmix		0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
.....		27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
SDS al 1 %		4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
.....						
Formamida						

..... Sonda EUB 338 (100 ng/μl).....					
--	--	--	--	--	--

Número de portaobjetos	1	4	6	8	10
Sonda OLI-1 u OLI-2 (100 ng/μl) .....	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Volumen total (μl) .....	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

*Nota:* Almacenar todas las soluciones que contengan oligosondas fotosensibles en la oscuridad a – 20 °C.

Proteger de la luz del sol o eléctrica directa durante su utilización.

5. Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,52 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,44 g Agua destilada 1,00 l

Disolver los ingredientes, verificar el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### **Apéndice 8**

Condiciones de cultivo para el tomate y la berenjena

Sembrar semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) o berenjena (*Solanum melongena*) en compost pasteurizado de semillas. Trasplantar las plántulas con los cotiledones completamente abiertos (10 a 14 días) en compost pasteurizado de tiesto.

Las berenjenas o tomates deben cultivarse en un invernadero que cumpla las siguientes condiciones medioambientales antes de la inoculación:

Duración diurna: 14 horas o día natural si es de mayor

duración Temperatura:

diurna: 21 a 24 °C

nocturna: 14 a 18 °C

Variedad de tomate sensible: 'Moneymaker'

Variedad de berenjena sensible: 'Black Beauty'

Proveedores: véase el sitio web:

[http://forum.europa.eu.int/ Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)

## REFERENCIAS

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105; 373-380.
4. Caruso, P., Gorriss, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3634-3638.
5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113-121.
6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26; 663-678.

7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semiselective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) Bacterial Wilt Newsletter 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27; 265-277.
9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 69; 269-280.
10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. J. Phytopathology 146; 379-384.
11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 18, 343-351.
12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.
13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44; 693-695.
14. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.

16. López, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne *et al.*, (eds). Kluwer Academic Publishers. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5; 19-33.
20. Pstrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology* 148; 619-626.
21. Pstrik, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology* 108, 831-842.
22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudo-monassolanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-

79.

23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.

24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.

25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.

26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.

27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.

28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.

29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and

quantitative fluorescent 5' nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.

30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of *R. solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4546-4554.



## ANEXO Nº 2: ESTIMACIÓN DEL NÚMERO MÍNIMO DE MUESTRAS POR COMUNIDAD AUTÓNOMA

	Comunidad Autónoma	Superficie cultivada (ha) <sup>(1)</sup>	Nº de muestras mínimo a tomar <sup>(2)</sup>
<b>Patata de siembra</b>	Castilla y León	2.196	1.220
	Navarra	284,94	159
	País Vasco	581,2	323
	<b>TOTAL</b>	<b>3.062,14</b>	<b>1.702</b>
<b>Patata de consumo</b>	Andalucía	21.249	292
	Aragón	572	8
	Asturias	300	4
	Baleares	1.000	14
	Cantabria	180	2
	Castilla La Mancha	4.692	66
	Castilla y León	22.017	310
	Cataluña	6.500	92
	Extremadura	2.100	30
	Galicia	21.771	307
	La Rioja	3.191	45
	Madrid	1.639	23
	Murcia	2.300	32
	Navarra	699	10
	País Vasco	1.835	26
	Comunidad Valenciana	4.139	58
	<b>TOTAL</b>	<b>94.184</b>	<b>1.326</b>

(1). Datos correspondientes a la campaña de cultivo 2003/2004

(2). El número de muestras mínimo que debe tomarse en cada Comunidad Autónoma es proporcional a la superficie que se estime que va a ser cultivada durante la campaña. Por lo tanto, estas cifras son sólo orientativas y están basadas en los datos de producción ofrecidos en la columna anterior.



## ANEXO Nº 3.A: ACTA DE INSPECCIÓN FITOSANITARIA EN CAMPO

A las \_\_\_\_\_ horas del día \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_\_\_, en la localidad de \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_\_), el Inspector Fitosanitario D. \_\_\_\_\_ en presencia de D. \_\_\_\_\_ en calidad de \_\_\_\_\_, procede al examen oficial <sup>(1)</sup> \_\_\_\_\_ de la explotación \_\_\_\_\_ con Dirección \_\_\_\_\_ en la Localidad \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_\_) inscrita en el Registro Oficial de Productores, Comerciantes e Importadores de Vegetales con el nº \_\_\_\_/\_\_\_\_, llevando a cabo las siguientes actuaciones:

MATERIAL INSPECCIONADO			
PATATA ( <i>Solanum tuberosum</i> ):	<input type="checkbox"/> tubérculo	<input type="checkbox"/> cultivo en crecimiento	
	<input type="checkbox"/> siembra	<input type="checkbox"/> consumo	<input type="checkbox"/> otros: _____
TOMATE ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ):		<input type="checkbox"/> cultivo en crecimiento	
OTRAS PLANTAS HOSPEDANTES:	<input type="checkbox"/> solánáceas silvestres	<input type="checkbox"/> otras solánáceas de cultivo	<input type="checkbox"/> otros: _____
OTROS MATERIALES:	<input type="checkbox"/> medio de cultivo	<input type="checkbox"/> suelo/residuos sólidos	<input type="checkbox"/> otros: _____
DATOS GENERALES			
Superficie total (ha):	_____		
Cantidad patata de siembra utilizada (kg):	_____	País de origen:	_____
Variedad:	_____	Categoría:	_____ Clase: _____
Adquirida a:	_____		
Aportación de etiquetas reglamentarias con números de serie:	_____		
TOMA DE MUESTRAS			
<input type="checkbox"/> sí		<input type="checkbox"/> no	
OBSERVACIONES			
Realizada la inspección se observan las siguientes incidencias:			
RESULTADOS <sup>(2)</sup>			
<input type="checkbox"/> SIN SÍNTOMAS / FAVORABLE		<input type="checkbox"/> CON SÍNTOMAS / INMOVILIZACIÓN CAUTELAR	

(1) Rutinario (anual) o a petición de la Explotación/Almacén

(2) Las inspecciones visuales y tomas de muestras (si las hubiere) han quedado recogidas en los apartados A y B, respectivamente, del presente Acta

El inspector

El interesado

Fdo.:  
DNI:

Fdo.:  
DNI:



**B. TOMA DE MUESTRAS (FICHA):**

Parcela/Polígono	Código asignado a la muestra
Motivo de la toma de muestra:	
Muestras Reglamentarias <input type="checkbox"/>	Confirmación de síntomas visuales <input type="checkbox"/>
Muestra de:	
Material _____	
Tamaño de muestra (nº) _____ Órgano <sup>(3)</sup> _____	
Análisis requeridos:	
Nombre del inspector _____	
Fecha de la toma de muestra _____	
Punto de la toma de muestra:	
- Identificación catastral _____	
- Término municipal _____	
- Provincia _____	
Datos del productor/comerciante:	
- Explotación _____	
- Número de Registro __ __/__ __ __ __	
- Dirección _____	
- Localidad _____	
- Provincia _____	
Laboratorio donde se remite:	
Fecha de remisión:	
Observaciones:	

(3) Tubérculo, tallo, hoja, brote, semilla, etc.

(Se rellenará el número de hojas necesarias)







**B. TOMA DE MUESTRAS (FICHA):**

Serie/lote/partida	Código asignado a la muestra
Motivo de la toma de muestra:	
Muestras Reglamentarias <input type="checkbox"/> Confirmación de síntomas visuales <input type="checkbox"/>	
Muestra de:	
Tamaño de muestra (nº) _____	
Análisis requeridos:	
Nombre del inspector _____	
Fecha de la toma de muestra _____	
Punto de la toma de muestra (observaciones):	
Datos del comerciante:	
- Almacén _____	
- Número de Registro __ __/__ __ __ __	
- Dirección _____	
- Localidad _____	
- Provincia _____	
Laboratorio donde se remite:	
Fecha de remisión:	
Observaciones:	

(Se rellenará el número de hojas necesarias)



### Anexo nº 3.c: Acta de Inspección Fitosanitaria en Instalaciones Industriales

A las \_\_\_\_ horas del día \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_, en la localidad de \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_\_), el Inspector Fitosanitario D. \_\_\_\_\_ en presencia de D. \_\_\_\_\_ en calidad de \_\_\_\_\_, procede al examen oficial <sup>(1)</sup> \_\_\_\_\_ de la instalación \_\_\_\_\_ con Dirección \_\_\_\_\_ en la Localidad \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_\_), llevando a cabo las siguientes actuaciones:

MATERIAL INSPECCIONADO		
Tipo de residuos:	<input type="checkbox"/> líquidos	<input type="checkbox"/> sólidos
DATOS GENERALES		
Instalación industrial de:	<input type="checkbox"/> transformación	<input type="checkbox"/> embalaje <input type="checkbox"/> otras: _____
Producto manipulado:	<input type="checkbox"/> patata	<input type="checkbox"/> tomate <input type="checkbox"/> otro: _____
- Procedencia:	_____	
- Destino:	_____	
TOMA DE MUESTRAS		
	<input type="checkbox"/> sí	<input type="checkbox"/> no
OBSERVACIONES		
Realizada la inspección se observan las siguientes incidencias:		
RESULTADOS <sup>(2)</sup>		
<input type="checkbox"/> SIN SÍNTOMAS / FAVORABLE <input type="checkbox"/> CON SÍNTOMAS / INMOVILIZACIÓN CAUTELAR		

(1) Rutinario (anual) o a petición de la Explotación/Almacén

(2) Las inspecciones visuales y tomas de muestras (si las hubiere) han quedado recogidas en los apartados A y B respectivamente, del presente Acta

El inspector

El interesado

Fdo.:  
DNI:

Fdo.:  
DNI:



**B. FICHA MUESTRAL:**

Código asignado a la muestra :
Motivo de la toma de muestra: Muestras Reglamentarias <input type="checkbox"/> Confirmación de síntomas visuales <input type="checkbox"/>
Muestra de: Tamaño de muestra _____ Análisis requeridos:
Nombre del inspector _____ Fecha de la toma de muestra _____ Punto de la toma de muestra (observaciones):
Datos de la industria: - Tipo _____ - Dirección _____ - Localidad _____ - Provincia _____
Laboratorio donde se remite: Fecha de remisión: Observaciones:

(Se rellenará el número de hojas necesarias)



## Anexo n° 4: Notificación de los exámenes oficiales (Modelo para la presentación de los resultados)

CATEGORÍA	SUP. (*) (ha)	ANÁLISIS DE LABORATORIO						INSPECCIONES VISUALES DE TUBÉRCULOS			INSPECCIONES VISUALES DE CULTIVO			OTRAS INFORMACIONES	
		N° de muestras	Tamaño de los lotes (t o ha)	Período de muestreo	N° de positivos (muestras/ lotes)	N° de inspecciones	Tamaño de las inspecciones (t o ha)	N° de inspecc. positivas	N° de inspecc.	Tamaño de las inspecc. (ha) (**)	N° de inspecc. positivas				
Prebase															
Base															
Certificada															
Multiplicación (1)															
Otras (2)															
Patata de consumo															
Otras patatas (rebrotés)															
Plantones de tomate (3)															
Otros huéspedes (4)															
Aguas/Vertidos de residuos líquidos (5)															

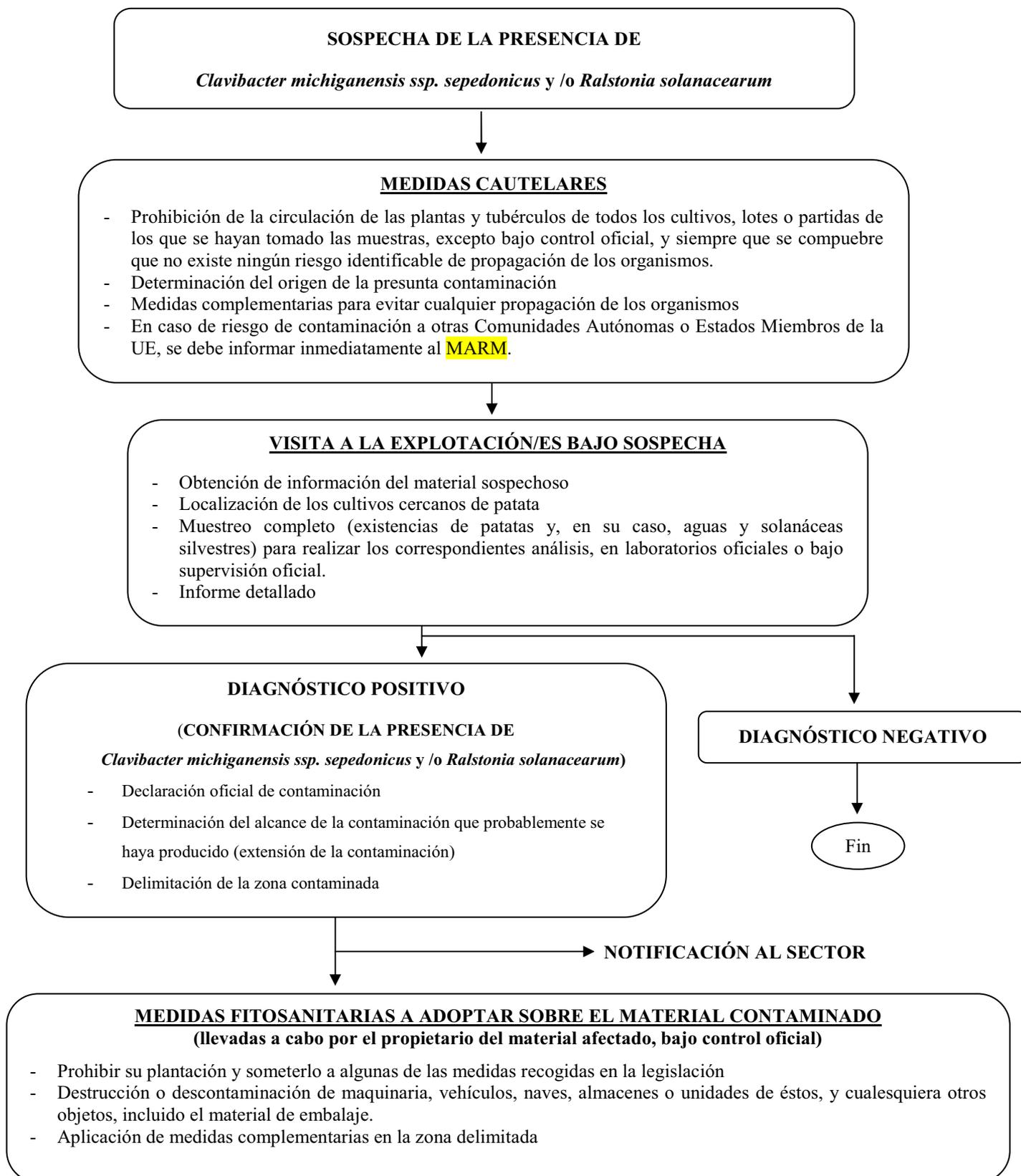
(\*) En la celda correspondiente a la categoría de plantones de tomate, se debe reseñar el número de Entidades que produzcan plantones con destino a profesionales.

(\*\*) En la celda correspondiente a la categoría de plantones de tomate, se debe reseñar el número de plantones inspeccionados visualmente.

- (1) Patatas producidas en la misma superficie de patata de siembra certificada de la Comunidad Autónoma durante el año anterior y destinadas a la producción de patata de siembra en zonas autorizadas de dicha Comunidad Autónoma. Análisis previos a la plantación.
- (2) Patata certificada pero producida en otra Comunidad Autónoma y analizada antes de su plantación para producir patata de consumo
- (3) Sólo en el caso de *Ralstonia solanacearum*, plantones de tomate destinados a la replantación para utilización profesional
- (4) Especificar la especie, la zona o río objeto del muestreo y el método de análisis.
- (5) Especificar la zona, río o ubicación de la instalación objeto de muestreo y el método de análisis.



## Anexo nº 5: Proceso secuencial de las medidas a adoptar en el marco del Plan de contingencia





## Anexo nº 6: Aviso de medidas provisionales para prevenir la enfermedad

Directiva 2000/29/CE del Consejo de la Comunidad Europea, incorporada a la normativa jurídica interna por el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero (Introducción de organismos nocivos de vegetales o productos vegetales) (Prohibición). Directiva 93/85/CEE del Consejo, incorporada por Orden de 22 de marzo de 1994 relativa a la lucha contra la necrosis bacteriana de la patata. Directiva 98/57/CE del Consejo, incorporada por Real Decreto 1644/1999 sobre el control de *Ralstonia solanacearum*.

A D/Dª (Propietario/Cultivador) .....  
Dirección .....

Respecto al brote sospechoso de podredumbre anular de la patata (*Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*) / podredumbre parda de la patata (*Ralstonia solanacearum*) en la parcela de su propiedad / cultivada por usted, e identificada con polígono catastral ....., parcela catastral ....., situada en la localidad de ....., municipio ....., provincia de .....; la parcela en cuestión está señalada en el plano adjunto.

La presente es para confirmarle la notificación verbal que le dio a Ud. D. ...., de esta Unidad o Departamento, el día ..... de ..... de ....., que de conformidad con la legislación arriba mencionada le emplaza a asegurar que todos los movimientos de plantas de patata, tubérculos y plantas para transplante de patata, así como la entrada o salida de equipos de la explotación (tractores, maquinaria, etc) en la parcela identificada en el plano mencionado anteriormente, se suspenden de inmediato a partir de esta notificación, hasta nuevo aviso.

Firmado .....  
(Oficial/inspector/funcionario autorizado para los fines de insp.fitosanitaria)

Fecha .....

**Aviso: Cualquier persona que incumpla esta notificación será sancionada**



## **Anexo nº 7: Conservación de las pruebas analíticas en caso de aparición de un brote sospechoso**

1. En cada caso de foco sospechoso para el que se haya realizado una o varias pruebas de selección con resultados positivos *Clavibacter michiganensis ssp.sepedonicus* o de *Ralstonia solanacearum* de acuerdo con los métodos establecidos en los Anexos nº 4.a y 4.b, y se espere recibir confirmación o refutación por aplicación de los citados métodos, se deberá proceder a la retención y adecuada conservación de:

- Todos los tubérculos y, siempre que sea posible, las plantas de los que se hayan obtenido muestras
- Cualquier extracto sobrante y cualquier material adicional que se haya preparado para la prueba o pruebas de selección, como por ejemplo placas de inmunofluorescencia
- Toda la documentación pertinente

La retención de los tubérculos permitirá que se puedan llevar a cabo pruebas de variedades cuando se estime oportuno.

2. En el caso de confirmación de la presencia del organismo, se procederá a la retención y adecuada conservación hasta un mes después, como mínimo de:

- El material especificado en el punto 1 del presente Anexo
- Cuando sea adecuado, una muestra de las berenjenas o los tomates infectados inoculados con extracto de tubérculo o de planta
- El cultivo aislado del organismo en cuestión



## **Anexo nº 8: Elementos de investigación para determinar la extensión y la fuente/s primaria/s de la contaminación**

Los elementos de la investigación serán, cuando proceda, los siguientes:

### 1. Lugares de producción:

- En los que se estén cultivando o se hayan cultivado patatas que estén relacionadas clónicamente con aquellas en las que se haya comprobado la infección por *Clavibacter michiganensis ssp.sepedonicus* o por *Ralstonia solanacearum*.
- En los que se estén cultivando o se hayan cultivado tomates que procedan de las mismas fuentes que aquellos en los que se haya comprobado la infección por *Ralstonia solanacearum*.
- En los que se estén cultivando o se hayan cultivado patatas o tomates<sup>1</sup> que se hayan puesto bajo control oficial por sospecharse la presencia de alguno de los organismos.
- En los que se estén cultivando o se hayan cultivado patatas que estén relacionadas clónicamente con las que hayan sido cultivadas en lugares de producción de los que se sospeche la infección por el organismo.
- En los que se cultiven patatas o tomates<sup>1</sup>, que estén localizados en las proximidades de los lugares de producción infectados, incluidos aquellos en los que se compartan equipos e instalaciones de producción directamente o por intervención de un contratista común.
- En los que se utilicen, para las labores de riego o rociamiento, aguas de superficie de cualquier fuente en la que se haya confirmado o de la que se sospeche la infección por *Ralstonia solanacearum*.
- En los que se utilicen para las labores de riego o rociamiento aguas de superficie de una fuente explotada en común con lugares de producción en los que se haya confirmado o de los que se sospeche la infección por *Ralstonia solanacearum*.
- Que estén o hayan sido anegados con aguas de superficie en las que se haya confirmado o de las que se sospeche la infección por *Ralstonia solanacearum*.

### 2. Las aguas de superficie que se utilicen para el riego por aspersión o rociamiento, o para la anegación, de un campo o campos, o de un lugar o lugares de producción en los que se haya confirmado la infección por *R. solanacearum*.

---

<sup>1</sup> En el caso de contaminación por *Ralstonia solanacearum*



**Anexo nº 9.a: Elementos a tener en cuenta para la  
determinación del alcance de la contaminación probable por  
*Clavibacter michiganensis ssp.sepedonicus* y *Ralstonia  
solanacearum***

Los elementos para la determinación de la probable extensión de la contaminación, incluirán:

- El “material vegetal indicado” obtenido en un lugar de producción que haya sido declarado contaminado por *Clavibacter michiganensis ssp.sepedonicus* o *Ralstonia solanacearum*.
- El lugar o lugares de producción que tengan una relación de producción con el “material vegetal indicado” que haya sido declarado contaminado (por alguno de los dos organismos citados), incluidos aquellos lugares que compartan equipos e instalaciones de producción directamente o por intervención de un contratista común.
- El “material vegetal indicado” que se haya producido en el lugar o lugares de producción contemplados en el guión anterior o que estuviera presente en tales lugares durante el tiempo en que el “material vegetal indicado” declarado contaminado (por alguno de los dos organismos citados) se hallará presente en los lugares de producción mencionados en el primer guión.
- Las instalaciones que hayan manipulado el “material vegetal indicado” procedente de los lugares de producción a los que se refieren los guiones anteriores.
- Cualquier maquinaria, vehículo, buque, almacén o unidades de éstos, y cualesquiera otros objetos (incluido el material de embalaje), que puedan haber

estado en contacto con el “material vegetal indicado” declarado contaminado por alguno de los dos organismos citados.

- Cualquier “material vegetal indicado” que haya sido almacenado o haya estado en contacto con cualquiera de las estructuras y los objetos mencionados en el guión anterior antes de la limpieza y desinfección de éstos.
- Como resultado de la investigación y de los análisis que deben llevarse a cabo, en el caso de las patatas, aquellos tubérculos o plantas que tengan una relación clonal fraterna o parental y, en el caso del tomate<sup>1</sup>, aquellas plantas que procedan de las mismas fuentes que el “material vegetal indicado” declarado contaminado, y para las cuales, aunque las pruebas de detección del organismo hayan sido negativas, parezca probable la contaminación a través de un vínculo clonal. Puede efectuarse una prueba de variedades para verificar la identidad de los tubérculos o plantas contaminados que estén relacionados clónicamente.
- El lugar o lugares de producción del “material vegetal indicado” a que se refiere el guión anterior.
- El lugar o lugares de producción del “material vegetal indicado” en los que se utilicen para las labores de riego o rociamiento, aguas que hayan sido declaradas contaminadas por *Ralstonia solanacearum*.
- El “material vegetal indicado” producido en campos anegados con aguas de superficie en las que se haya confirmado la infección por *Ralstonia solanacearum*.

---

<sup>1</sup> En el caso de contaminación por *Ralstonia solanacearum*

## **Anexo n° 9.b: Elementos a tener en cuenta para la determinación de la posible propagación de *Clavibacter michiganensis ssp.sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum***

Los elementos para la determinación de la posible propagación, incluirán:

- La proximidad de otros lugares de producción en los que se cultive el “material vegetal indicado”.
- La producción y utilización comunes de existencias de patatas de siembra
- Los lugares de producción en los que se utilicen aguas de superficie para el riego o rociamiento del “material vegetal indicado”, cuando exista o haya existido el riesgo de escorrentía, o de anegamiento, de aguas superficiales procedentes de un lugar o lugares de producción que hayan sido declarados contaminados por *Ralstonia solanacearum*.
- En los casos en que se hayan declarado contaminadas aguas de superficie por *Ralstonia solanacearum*:
  - El lugar o lugares productores del “material vegetal indicado” contiguos a las aguas superficiales declaradas contaminadas, o que corran el riesgo de ser anegados con esta agua.
  - Cualquier fuente de riego separada que se comunique de alguna forma con las aguas superficiales declaradas contaminadas.
  - Masas de agua conectadas con el agua superficial declarada contaminada, teniendo en cuenta:
    - La dirección y el nivel de flujo del agua declarada contaminada
    - La presencia de solanáceas silvestres huésped



## Anexo nº 9.c: Notificación de contaminación

La notificación se efectuará de manera inmediata una vez que la presencia haya sido confirmada por las pruebas de laboratorio e incluirá los datos siguientes:

### Para las patatas:

- Nombre de la variedad del lote
- Tipo (patata de consumo, patata de siembra, etc.) y, en su caso, la categoría de la siembra

### Para las tomateras<sup>1</sup>:

- Nombre de la variedad del lote y, en su caso, la categoría

### Requisitos de la notificación en situaciones particulares:

- Cuando exista riesgo de contaminación del “material vegetal indicado” hacia otra u otras Comunidades Autónomas, la Comunidad Autónoma en la que se haya confirmado la presencia del organismo transmitirá inmediatamente a las Comunidades Autónomas afectadas la siguiente información:
  - Nombre de la variedad del lote de patatas o tomateras<sup>1</sup>
  - Nombre y dirección del expedidor y del destinatario
  - Fecha de entrega del lote de patatas o tomateras<sup>1</sup>
  - Tamaño del lote de patatas o tomates<sup>1</sup> entregados
  - Copia del pasaporte fitosanitario o, como mínimo, el número de pasaporte fitosanitario, cuando sea apropiado, o en su caso, el número de registro del ROPCIV y una copia del aviso de entrega.
  
- Cuando exista riesgo de contaminación del “material vegetal indicado” hacia otro u otros Estados Miembros, la comunidad Autónoma en la que se haya confirmado la presencia del organismo transmitirá inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino y este a su vez, a través del cauce correspondiente a los Estados Miembros afectados la siguiente información:

---

<sup>1</sup> En el caso de contaminación por *Ralstonia solanacearum*

- Nombre de la variedad del lote de patatas o tomateras<sup>1</sup>
  - Nombre y dirección del expedidor y del destinatario
  - Fecha de entrega del lote de patatas o tomateras<sup>1</sup>
  - Tamaño del lote de patatas o tomates<sup>1</sup> entregados
  - Copia del pasaporte fitosanitario o, como mínimo, el número de pasaporte fitosanitario, cuando sea apropiado, o en su caso, el número de registro del ROPCIV y una copia del aviso de entrega.
- Cuando exista riesgo de contaminación del “material vegetal indicado” procedente de otro u otros Estados Miembros a raíz de la correspondiente notificación o notificaciones de los mismos, el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino comunicará la información recibida a las Comunidades Autónomas interesadas.

Una vez finalizadas todas las investigaciones, las Comunidades Autónomas facilitarán la siguiente información con objeto de posibilitar la notificación adicional (complementaria):

- Fecha en la que se confirmó la contaminación
- Breve descripción de la investigación llevada a cabo para identificar la fuente y posible propagación de la contaminación, incluido el nivel de muestreo efectuado
- Información sobre la fuente o fuentes de contaminación determinadas o presuntas
- Detalles relativos al alcance de la contaminación declarada, incluido el número de lugares de producción y, en el caso de las patatas, el número de lotes, con la indicación de la variedad y, en el caso de las patatas de siembra, la categoría
- Detalles relativos a la delimitación de la zona, incluido el número de lugares de producción no declarados contaminados pero incluidos en la zona
- En el caso de contaminación por *Ralstonia solanacearum*, detalles relativos a la designación del agua, incluido el nombre y la ubicación de la masa de agua y el alcance de la prohibición de riego/designación
- En el caso de cualquier partida o lote de tomateras<sup>1</sup> declarado contaminado, los certificados prescritos en el artículo 10, apartado 1, letra a), del Real Decreto

58/2005, y el número de pasaporte, de acuerdo con la lista que se recoge en el Anexo V, parte A, sección I, punto 2.2, del Real Decreto 58/2005.

- Cualesquiera otros datos que requiera el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino o, en su caso, la Comisión relativos al brote o los brotes confirmados.



## **Anexo nº 10.a: Proyecto de boletín de prensa (Podredumbre anular de la patata)**

### **Podredumbre anular de la patata**

Ha habido un brote de podredumbre anular de la patata en una parcela de la Comunidad Autónoma/provincia/comarca/localidad de.....

Se han recogido muestras oficiales de los tubérculos / plantas sospechosos en .....y éstas han sido confirmadas positivas en .....

La explotación en la que el brote ha aparecido ha sido delimitada de acuerdo con lo previsto en el artículo 5 de la Directiva 93/85/CEE (Artículo 5 de la Orden de 22 de marzo de 1994) y su posterior modificación de determinados anexos en la Directiva 2006/56/CE transpuesta por la Orden APA/718/2007, sobre el control de la podredumbre anular de la patata y las demás medidas especificadas en la citada legislación (por ejemplo, desinfección de la maquinaria, equipos y almacenes, restricciones de cultivo, dispositivo de seguridad con el material infectado, etc) han sido ejecutadas o están en curso de ejecución.

### **ENFERMEDAD DE LA PODREDUMBRE ANULAR DE LA PATATA**

La causa de la podredumbre anular de la patata es la bacteria *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp.sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff)Davis et al.

La enfermedad no plantea riesgo alguno para la salud humana.

La confirmación del laboratorio de la presencia del organismo es esencial.

Los primeros síntomas, que aparecen generalmente tarde en el período de cultivo, pueden ser variables y consisten normalmente en marchitamientos de hojas y tallos, siendo a veces sólo unas pocas plantas en un surco infectado las que muestran síntomas. Las hojas más bajas son las que normalmente primero se marchitan y comienzan a enrollarse levemente (hacia arriba y hacia adentro) en los márgenes y se vuelven verde pálido. Cuando la enfermedad se manifiesta se desarrollan áreas amarillentas entre los nervios de las hojas y éstas finalmente se vuelven pardas y se necrosan. Un exudado blanco lechoso se puede exprimir del anillo vascular de tubérculos y tallos cuando se seccionan transversalmente en la base por encima de cualquier decoloración (de aquí, el nombre de la enfermedad). Al exprimir los tubérculos, especialmente aquellos almacenados, segregan un exudado similar a queso cremoso o cintas desmenuzables de exudado bacteriano inodoro, dejando una separación clara de los tejidos adyacentes al tejido vascular. La bacteria puede distribuirse hacia fuera de la región vascular y provocar el que la piel se vuelva pardo rojiza y se agriete. El agrietamiento de los tubérculos facilita la invasión de organismos nocivos secundarios que incrementan el agrietamiento, enmascarando los síntomas de la podredumbre anular. Las infecciones latentes son una característica de esta enfermedad y los tubérculos de las cosechas posteriores pueden infectarse sin que aparezcan síntomas de la enfermedad en el follaje. Los tubérculos almacenados pueden permanecer sin síntomas durante largos períodos de tiempo. Los organismos nocivos invernan fundamentalmente en los tubérculos infectados, bien en los almacenados o bien en aquellos que sobreviven al invierno en el campo. Pueden también ser transportados como restos desecados en el envasado, contenedores, vehículos, maquinaria, paredes y otras superficies de almacén, etc, y pueden seguir siendo infecciosos de esta manera durante muchos meses. La infección se produce a través de las heridas, especialmente las causadas por la maquinaria y los contenedores contaminados. Las superficies de tubérculos recién cortados proporcionan un medio ideal para la transmisión de la enfermedad. En el cultivo en desarrollo, la bacteria pasa del tubérculo madre infectado a los tubérculos hijos a través del sistema vascular de los estolones.

Los aspectos importantes del control del organismo están en el empleo de patatas de siembra sanas, la detección rápida de los primeros síntomas sospechosos, la aplicación de medidas de cuarentena en parcelas y explotaciones infectadas, una rotación de cultivos adecuada y el control de bortas o rebrotes.



## **Anexo nº 10.b: Proyecto de boletín de prensa (Podredumbre parda de la patata)**

### **Podredumbre parda de la patata.**

Ha habido un brote de podredumbre parda de la patata en una parcela de cultivo de la Comunidad Autónoma/provincia/comarca/localidad de.....

Se han recogido muestras oficiales de los tubérculos / plantas sospechosos en ..... y éstas han sido confirmadas positivas en .....

La explotación en la que ha aparecido el brote ha sido delimitada de acuerdo con lo previsto en el artículo 5 de la Directiva 98/57/CEE (Artículo 6 del Real Decreto 1644/1999) y su posterior modificación de determinados anexos en la Directiva 2006/63/CE transpuesta por la Orden APA/719/2007, sobre el control de la podredumbre parda de la patata y las demás medidas especificadas en la citada legislación (por ejemplo, desinfección de la maquinaria, equipos y almacenes, restricciones de cultivo, eliminación segura del material infectado, etc.) han sido ejecutadas o están en curso de ejecución.

### **ENFERMEDAD DE LA PODREDUMBRE PARDA DE LA PATATA**

La causa de la podredumbre parda de la patata es la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi.

La raza de la bacteria que esta presente en Europa y que tiene potencial para extenderse por ella tiene un limitado espectro de hospedantes, pero entre ellos se incluyen las patatas, los tomates y ls semillas de *Solanum dulcamara* (amaradulce o uva de zorro) y *Solanum nigrum* (hierba mora o tomatara del diablo).

La enfermedad no plantea riesgo alguno para la salud humana.

La bacteria puede dispersarse por el suelo y por el agua de riego. *Solanum dulcamara* es un importante hospedante alternativo ya que se le encuentra creciendo en las riberas de los ríos y la baja tasa de crecimiento de la bacteria en las semillas le permite resistir la infección y mantener la bacteria entre los cultivos.

El primer síntoma visible de la enfermedad en los cultivos de patatas es el marchitamiento de hojas al final de los tallos durante los días calurosos con recuperación por la noche. Una decoloración parda veteada de los tallos a dos o tres centímetros por encima del nivel del suelo puede observarse cuando la enfermedad se desarrolla y las hojas tienen un tono bronceado.

La sintomatología externa puede o no ser visible en los tubérculos, dependiendo del estado de desarrollo de la enfermedad. Exudados de la bacteria a menudo emergen de los ojos y de los estolones de los tubérculos infectados. Cuando el exudado se seca, la tierra se adhiere a los tubérculos en la zona de los ojos.

La confirmación por parte del Laboratorio de la presencia del organismo es esencial.

Los aspectos importantes del control del organismo están en el empleo de patatas de siembra controladas oficialmente y sanas, la detección rápida de los primeros síntomas sospechosos, la aplicación de medidas de cuarentena en parcelas y explotaciones afectadas, una rotación de cultivos adecuada y el control de las malas hierbas y bortas hospedantes y el empleo de aguas no infectadas para el riego y pulverizaciones.

## Anexo n° 11.a: Medidas de aplicación sobre el material contaminado

Cuando el “material vegetal indicado” se haya declarado contaminado, además de prohibirse su plantación, y con el fin de poder establecer que no exista ningún riesgo identificable de propagación de *Clavibacter michiganensis ssp.sepedonicus* ni de *Ralstonia solanacearum*, debe ser sometido alguna de las siguientes medidas:

- Incineración
- Utilización como piensos, previo tratamiento térmico adecuado, de forma que no haya riesgo alguno de supervivencia del organismo nocivo.
- Eliminación en un verterdero de eliminación de residuos autorizado oficialmente en donde no exista ningún riesgo identificable de escape del organismo al medio ambiente, por ejemplo, a través de filtración a tierras agrícolas ni de contacto con fuentes de agua<sup>1</sup> que puedan utilizarse para el riego de dichas tierras.
- Transformación industrial mediante entrega directa e inmediata a una planta de transformación dotada de instalaciones de eliminación de residuos autorizadas oficialmente, para las que se establezca la ausencia de riesgos detectables de propagación del organismo, y de un sistema de limpieza y desinfección de los vehículos de transporte, al menos. Los métodos oficialmente autorizados para la eliminación de residuos deben ajustarse a las disposiciones del *Anexo n°16*.
- Otras medidas, siempre que se haya establecido que no existe ningún riesgo identificable de propagación de los organismos citados, y a condición de que tales medidas sean notificadas inmediatamente al Ministerio de Medio

---

<sup>1</sup> En el caso de contaminación por *Ralstonia solanacearum*

Ambiente, y Medio Rural y Marino y éste a su vez, a través del cauce correspondiente, a la Comisión y a los demás Estados miembros.

Toda maquinaria, vehículos, naves, almacenes o unidades de éstos, y cualesquiera otros objetos, incluido el material de embalaje, declarados contaminados deben ser destruidos o descontaminados. En este último caso, los métodos adecuados consistirán en una limpieza y, en su caso, una desinfección que permitan descartar todo riesgo identificable de propagación de los organismos citados. Tras su descontaminación, todos estos objetos dejarán de considerarse contaminados.

Cualquier medida fitosanitaria a adoptar sobre el material contaminado debe ser realizada bajo el control y la aprobación de los Organismos oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma.

## **Anexo nº 11.b: Medidas de aplicación sobre el material probablemente contaminado**

Cuando el “material vegetal indicado” se haya considerado probablemente contaminado por *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* o por *Ralstonia solanacearum*, además de prohibirse su plantación, y con el fin de poder establecer que no exista ningún riesgo identificable de propagación de los citados organismos nocivos, debe ser destinado a un uso adecuado o a su eliminación de acuerdo a alguna de las siguientes medidas:

- En el caso de los tubérculos de patata:
  - El uso como patatas de consumo destinadas al consumo, envasadas para su distribución y venta directa sin cambio de envase, en un lugar dotado de instalaciones de eliminación de residuos adecuadas. Las patatas destinadas a la siembra sólo pueden manipularse en el mismo lugar si esto se realiza separadamente o tras la limpieza y desinfección.
  - El uso como patatas de consumo para la transformación industrial, y destinadas a la entrega directa e inmediata a una planta de transformación dotada de instalaciones de eliminación de residuos adecuadas y de un sistema de limpieza y desinfección de vehículos de transporte, al menos.
  - Algún otro tipo de uso o eliminación, siempre que se establezca que no existe ningún riesgo identificable de propagación del organismo, y previa aprobación de los Organismos oficiales responsables.
  
- En el caso de las otras partes de las plantas, incluidos los detritos del tallo y de las hojas:
  - Destrucción
  - Algún otro tipo de uso o eliminación, a condición de que se garantice que no existe riesgo identificable de dispersar el organismo, y previa aprobación de los citados organismos oficiales responsables.

Toda maquinaria, vehículos, naves, almacenes o unidades de éstos, y cualesquiera otros objetos, incluido el material de embalaje, considerados probablemente contaminados, deben ser destruidos o descontaminados. En este último caso, los métodos adecuados consistirán en una limpieza y, en su caso, una desinfección que permitan descartar todo riesgo identificable de propagación de los organismos citados. Tras su descontaminación, todos estos objetos dejarán de considerarse probablemente contaminados.

Cualquier medida fitosanitaria a adoptar sobre el material considerado contaminado debe ser efectuada bajo el control de los Organismos oficiales responsables interesados, así como como con la oportuna comunicación entre estos Organismos para garantizar en todo momento dicho control, y con la aprobación del Organismo oficial de cada Comunidad Autónoma donde vayan a envasarse o transformarse las patatas, en lo que se refiere a los vertederos citados.

## **Anexo n° 11.c: Medidas de aplicación en las zonas delimitadas debido a la contaminación por *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus***

La serie de medidas que se deben aplicar dentro de las zonas delimitadas que se hayan establecido por causa de la contaminación por *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, serán las siguientes:

### **1. En los casos en que en virtud del punto 2 de la letra a) del apartado 8.2 del presente Manual, se hayan declarado contaminados lugares de producción, las medidas consistirán en lo siguiente:**

#### a) En los campos que se hayan declarado contaminados en virtud de esa misma disposición, se debe aplicar uno de los dos grupos de medidas que se exponen a continuación:

1º Durante al menos los tres años de cultivo siguientes a la declaración de la contaminación:

- Se deben adoptar medidas para eliminar las patatas espontáneas, así como otras plantas hospedantes de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*.

- No se plantarán:

- Tubérculos, plantas ni semillas propiamente dichas de patata,
- Ninguna otra planta que pueda contener naturalmente al organismo,
- Ningún cultivo que presente un cierto riesgo de supervivencia o propagación del organismo, mientras el campo no haya estado exento de plantas espontáneas de patata durante al menos dos años consecutivos.

- En la primera temporada de cultivo de patatas siguiente al período indicado en el guión anterior y, siempre que en las inspecciones oficiales se haya comprobado que, durante al menos los dos años de vegetación inmediatamente anteriores a la plantación, el campo estuvo libre de plantas de patata espontáneas y otras plantas que puedan contener naturalmente el organismo, sólo se permitirá la producción de patatas de consumo y los tubérculos recolectados se someterán a pruebas adecuadas.

- En la temporada de cultivo de patatas siguiente a la indicada en el guión anterior, y tras un ciclo de rotación adecuado, se procederá, en el caso de las patatas, a la plantación de patatas de siembra certificadas oficialmente para

la producción de patatas de siembra o de consumo, y a la realización del examen oficial que dispone el *apartado 6* del presente Manual.

2º Durante los cuatro años de cultivo siguientes al de la declaración de la contaminación:

- Se adoptarán medidas para eliminar las plantas espontáneas de patata, así como otras plantas que puedan ser hospedantes de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, y
- Se dejará y mantendrá el campo, o bien en barbecho completo, o bien como pasto permanente, con siega intensa y frecuente o pastoreo intensivo.
- En la primera temporada de cultivo de patatas siguiente al período indicado en el guión anterior y, siempre que en las inspecciones oficiales se haya comprobado que, durante al menos los dos años de vegetación inmediatamente anteriores a la plantación, el campo estuvo libre de plantas de patata espontáneas y otras plantas que puedan contener naturalmente el organismo, sólo se permitirá la producción de patatas de consumo y los tubérculos recolectados se someterán a prueba conforme al procedimiento preceptivo.

b) En el resto de los campos del lugar de producción contaminado, y a condición de que los organismos oficiales competentes tengan la certeza de que se ha eliminado el riesgo de plantas de patata espontáneas y de cualquier otra planta que pueda contener naturalmente el organismo, las medidas consistirán en lo siguiente:

➤ Durante el año de cultivo siguiente a la declaración de la contaminación:

- No se plantarán tubérculos, plantas ni semillas (en sentido estricto) de patata ni otras plantas que puedan ser hospedantes de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* o se podrán plantar exclusivamente patatas de siembra certificadas oficialmente, para la producción de patatas de consumo, y se adoptarán medidas para eliminar las plantas espontáneas de patata del modo que se considere necesario.

➤ Durante el segundo año de cultivo siguiente al de declaración de contaminación sólo se podrán plantar patatas de siembra certificadas o patatas de siembra que hayan sido sometidas a pruebas oficiales para determinar la ausencia de necrosis bacteriana y cultivadas bajo control oficial en lugares de producción no contaminados por el organismo, ya sea para la producción de siembra o de consumo.

➤ Durante el tercer año de cultivo siguiente al de declaración de contaminación, al menos, sólo se podrán plantar patatas de siembra certificadas o patatas de siembra cultivadas bajo control oficial a partir de patatas de siembra certificadas, ya sea para la producción de siembra o de consumo.

- En cada uno de los dos años de cultivo indicados en los guiones anteriores, se adoptarán medidas para eliminar las plantas espontáneas de patata, así como otras plantas que puedan ser hospedantes del organismo nocivo; además, se efectuará el examen oficial preceptivo.
- c) Inmediatamente después de haberse declarado la contaminación, y en cada uno de los años de cultivo siguientes, hasta inclusive, la primera temporada de cultivo permisible de patatas en el campo o campos declarados contaminados que se contemplan en la letra a) anterior:
- Toda la maquinaria e instalaciones de almacenamiento del lugar de producción que se utilicen en la producción de patatas, se limpiarán, y en su caso se desinfectarán, utilizando métodos adecuados de la forma que se dispone en los **Anexos n° 7.a y n° 7.b**, y
- d) En el caso de las unidades de producción de cultivos protegidos que hayan sido declaradas contaminadas, y en las que sea posible una sustitución total de los medios de cultivo:
- No se plantarán tubérculos, plantas ni semillas (en sentido estricto), a menos que, por una parte, dichas unidades se hayan sometido a medidas oficialmente supervisadas que, teniendo por objeto la eliminación del organismo nocivo y la retirada de todas las patatas y otras solanáceas, incluyendo como mínimo, un cambio completo de los medios de cultivo y una limpieza, y en su caso, una desinfección de tales unidades y de todo el equipo y que, por otra parte, los Organismos oficiales responsables hayan dado subsiguientemente su autorización para la producción de patatas.
  - La producción de patatas procederá de patatas de siembra certificadas oficialmente o de microtubérculos o microplantas obtenidos de fuentes analizadas.

**2. Dentro de la zona delimitada y sin perjuicio de las medidas dispuestas en el punto 1 del presente Anexo, los Organismos oficiales responsables de las Comunidades Autónomas deben adoptar las siguientes medidas:**

- a) Inmediatamente después de la declaración de contaminación, velarán para que toda la maquinaria e instalaciones de almacenamiento de la explotación que hayan intervenido en la producción de patatas se limpien y desinfecten como resulte adecuado y con los métodos apropiados.
- b) Inmediatamente y durante al menos tres temporadas de cultivo después de la declaración de contaminación:
- Controlarán a través de sus Organismos Oficiales responsables las explotaciones que cultiven, almacenen o manipulen tubérculos de patata, además de las explotaciones que contraten máquinas para este cultivo.

- Requerirán que, para todos los cultivos de patata dentro de la zona delimitada, se planten exclusivamente semillas certificadas o semillas cultivadas bajo control oficial, y se efectúe un análisis después de recolectar los cultivos de patatas de siembra en lugares de producción declarados probablemente contaminados.
  - Exigirán que se manipulen por separado las existencias de patatas de siembra y de patatas de consumo recolectadas en todas las explotaciones de la zona, o que se establezca un sistema de limpieza y desinfección entre el manejo de las existencias de patatas de siembra y el de las de consumo.
  - Llevarán a cabo el examen oficial preceptivo.
- c) Establecerán un programa, según corresponda, para la sustitución de todas las existencias de patatas de siembra por un período de tiempo conveniente

## **Anexo nº 11.d: Medidas de aplicación en las zonas delimitadas debido a la contaminación por *Ralstonia solanacearum***

La serie de medidas que se deben aplicar dentro de las zonas delimitadas que se hayan establecido por causa de la contaminación por *Ralstonia solanacearum*, serán las siguientes:

### **1. En los casos en se hayan declarado contaminados lugares de producción, las medidas consistirán en lo siguiente:**

- a) En los campos o unidades de producción de cultivos protegidos que se hayan declarado contaminados, se debe aplicar uno de los dos grupos de medidas que se exponen a continuación:

1º Durante al menos los cuatro años de cultivo siguientes a la declaración de la contaminación:

- Se deben adoptar medidas para eliminar las patatas y tomatas espontáneas así como otras plantas hospedantes de *Ralstonia solanacearum*, incluidas las malas hierbas solanáceas.

- No se plantarán:

- Tubérculos, plantas ni semillas propiamente dichas de patata
- Tomateras y semillas de tomatas

Y teniendo en cuenta la biología del organismo nocivo:

- Otras plantas hospedantes
- Plantas de especies de *Brassica* para las que exista un riesgo identificado de supervivencia del organismo nocivo.
- Otros cultivos para los que exista un riesgo identificado de propagación del organismo nocivo.

- En la primera temporada de cultivo de patatas o tomates siguiente al período indicado y, siempre que se haya comprobado que durante al menos los dos años de vegetación inmediatamente anteriores a la plantación, el campo estuvo libre de patatas y tomatas espontáneas y de otras plantas hospedantes del organismo nocivo, incluidas las malas hierbas solanáceas:

- En el caso de las patatas, solamente se autorizará la producción de patatas de consumo

- En el caso de las patatas y los tomates, los tubérculos de patata cosechados, o las tomateras, según corresponda, serán analizados.

- En la temporada de cultivo de patatas o tomates siguiente a la indicada en el guión anterior y tras un ciclo de rotación adecuado, que será de un mínimo de dos años si se cultivan patatas de siembra, se efectuará un examen oficial

2º Durante los cinco años de cultivo siguientes al de la declaración de la contaminación:

- Se adoptarán medidas para eliminar las patatas y tomateras espontáneas, así como otras plantas que puedan contener naturalmente al organismo, incluidas las malas hierbas solanáceas.

- Durante los tres primeros años, se dejará y mantendrá el campo, bien en barbecho completo, bien para el cultivo de cereales, con arreglo al riesgo que se haya determinado, bien como pasto permanente, con siega intensa y frecuente o pastoreo intensivo, o bien como pastizal para la producción de semillas y, a continuación, en los dos años subsiguientes, se plantarán plantas que no sean hospedantes del organismo nocivo para las que no exista ningún riesgo identificado de supervivencia o propagación de éste.

- En la primera temporada de cultivo de patatas o tomates siguiente al período indicado y, siempre que se haya comprobado que, durante al menos los dos años de vegetación inmediatamente anteriores a la plantación, el campo estuvo libre de patatas y tomateras espontáneas y de otras plantas huésped del organismo, incluidas las malas hierbas solanáceas:

- En el caso de las patatas, se autorizará la producción de patatas de siembra y de consumos
- Los tubérculos de patata cosechados, o las tomateras, según corresponda, serán analizados.

b) En el resto de los campos del lugar de producción contaminado, y a condición de que los organismos oficiales competentes tengan la certeza de que se ha eliminado adecuadamente el riesgo de plantas de patata y de tomate espontáneas, y de cualquier otra planta que pueda contener naturalmente el organismo, incluidas las malas hierbas solanáceas, las medidas consistirán en lo siguiente:

➤ Durante el año de cultivo siguiente a la declaración de la contaminación:

No se plantarán tubérculos, plantas ni semillas propiamente dichas de patata, ni de cualquier otra planta que pueda contener naturalmente *Ralstonia solanacearum*, o bien

- En el caso de los tubérculos de patata, se podrán plantar patata de siembra oficialmente certificada, pero sólo para la producción de patata de consumo,
  - En el caso de las tomatas, solamente se plantarán tomatas para la producción de fruto obtenidas de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, de 8 de mayo de 2000, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad.
- Durante el segundo año de cultivo siguiente al de declaración de contaminación:
- En el caso de las patatas, solamente se plantarán, para la producción de patatas de siembra o de consumo, patatas de siembra certificadas o patatas de siembra analizadas para determinar la inexistencia de podredumbre parda, y cultivadas bajo control oficial en lugares de producción diferentes a los declarados contaminados.
  - En el caso de los tomates, solamente se plantarán tomatas para la producción de plantas o fruto obtenidas de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, o si se han propagado vegetativamente, de tomatas producidas a partir de esas semillas y cultivadas bajo control oficial en lugares de producción diferentes de los mencionados.
- Durante al menos los tres años de cultivo siguientes al de declaración de contaminación:
- En el caso de las patatas, se plantarán para la producción de patatas de siembra o de consumo exclusivamente patatas de siembra certificadas o patatas de siembra que se hayan cultivado bajo control oficial a partir de patatas de siembra certificadas
  - En el caso de los tomates, solamente se plantarán tomatas para la producción de plantas o fruto, obtenidas de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/CE o tomatas cultivadas bajo control oficial a partir de estas plantas
  - En cada uno de los años de cultivo indicados en los guiones anteriores, se tomarán medidas para eliminar las plantas de patata espontáneas y otras plantas que puedan contener naturalmente al organismo, si existen, y se efectuarán una inspección oficial del cultivo en crecimiento en los momentos pertinentes y, en cada campo de patatas, se efectuarán pruebas oficiales de las patatas cosechadas
- c) Inmediatamente después de haberse declarado la contaminación, y tras el primer año de cultivo siguiente:
- Toda la maquinaria e instalaciones de almacenamiento del lugar de producción que se utilicen en la producción de patatas o tomates se limpiarán y, en su caso, desinfectarán utilizando métodos adecuados consistentes en una limpieza, y en su caso, una desinfección que permitan descartar todo riesgo identificable de propagación del organismo. Estas operaciones se efectuarán

bajo la supervisión de los organismos oficiales responsables de las Comunidades Autónomas.

- Con el fin de impedir la propagación del organismo nocivo, se efectuarán controles oficiales de los planes de riego y rociamiento, y en caso necesario, se prohibirán los mismos.
- d) En el caso de las unidades de producción de cultivos protegidos que hayan sido declaradas contaminadas, y en las que sea posible una sustitución total de los medios de cultivo:
- No se plantarán tubérculos, plantas ni semillas propiamente dichas de patata, ni otras plantas que puedan ser huésped del organismo, incluidas tomateras y semillas de tomate, a menos que, por una parte, la unidad de producción se haya sometido a medidas oficialmente supervisadas que, teniendo por objeto la eliminación del organismo nocivo y la retirada de todo el material vegetal hospedante, incluyan, como mínimo, un cambio completo de los medios de cultivo y una limpieza, y en su caso, una desinfección de tales unidades y de todo el equipo y que, por otra parte, los Organismos oficiales responsables hayan dado subsiguientemente su autorización para la producción de patatas o tomates
  - La producción procederá, en el caso de la patata, de patatas de siembra certificadas o de minitubérculos o microplantas obtenidos de fuentes analizadas.
  - En cuanto a la producción de tomates, la producción deberá proceder de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/CE o, si se han propagado vegetativamente, de tomateras producidas a partir de estas semillas y cultivadas bajo control oficial
  - Asimismo, con el fin de impedir la propagación del organismo nocivo, se efectuarán controles oficiales de los planes de riego y rociamiento, y en su caso, se prohibirán los mismos.

**2. Dentro de la Zona delimitada y sin perjuicio de las medidas dispuestas en el punto 1 del presente Anexo, las Comunidades Autónomas deben adoptar las siguientes medidas:**

- a) Inmediatamente después de la declaración de contaminación, garantizarán que se limpie y desinfecte toda la maquinaria e instalaciones de almacenamiento de la explotación que se hayan utilizado para la producción de patatas y tomates, como resulte adecuado y con los métodos apropiados consistentes en una limpieza, y en su caso, una desinfección que permitan descartar todo riesgo identificable de propagación del organismo. Estas operaciones se efectuarán bajo la supervisión de los organismos oficiales responsables de las Comunidades Autónomas.
- b) Inmediatamente y durante al menos tres años de cultivo después de la declaración de contaminación:

- En los casos en que la delimitación de la Zona haya sido efectuada:
  - Se garantizará que sus organismos oficiales responsables supervisen las instalaciones que cultiven, almacenen o manipulen tubérculos de patata o tomates, así como aquellas otras instalaciones que utilicen en el marco de un contrato, maquinaria para la producción de patatas o tomates.
  - Se requerirá que, para todos los cultivos de patata dentro de la Zona delimitada, se planten exclusivamente semillas certificadas o semillas cultivadas bajo control oficial, y se efectúe un análisis después de cosechar los cultivos de patatas de siembra en lugares de producción determinados como probablemente contaminados.
  - Se exigirá que se manipulen por separado las existencias de patatas de siembra y de patatas de consumo recolectadas en todas las explotaciones de la zona o, cuando sea adecuado, que se efectúe una desinfección entre la manipulación de las existencias de patatas de siembra y de patatas de consumo
  - Se exigirá que, para todos los cultivos de tomate de la zona, solamente se planten tomateras obtenidas de semillas que cumplan con los requisitos de la Directiva 2000/29/CE o, si se han propagado vegetativamente, de tomateras producidas a partir de estas semillas y cultivadas bajo control oficial
  - Se efectuará el examen oficial preceptivo.
- En los casos en que se hayan declarado contaminadas aguas de superficie o en que se hayan incluido dichas aguas entre los factores de la posible propagación del organismo nocivo:
  - Se realizará un examen anual, en los momentos oportunos, con una toma de muestras de las aguas de superficie y, cuando sea oportuno, de las plantas hospedantes solanáceas presentes en las fuentes hídricas pertinentes, así como análisis con arreglo a los métodos pertinentes establecidos para el “material vegetal indicado” y para otros casos
  - Con el fin de impedir la propagación del organismo nocivo, se deben establecer controles oficiales de los planes de riego y rociamiento, así como una prohibición del uso de las aguas declaradas contaminadas para el riego y rociamiento del “material vegetal indicado”, y en su caso, de otras plantas hospedantes. Esta prohibición podrá reexaminarse en función de los resultados obtenidos en el examen anual mencionado, y podrán revocarse las declaraciones cuando los organismos oficiales responsables tengan la certeza de que las aguas superficiales ya no están contaminadas. Podrá autorizarse el uso del agua sometida a prohibición, bajo control oficial, para el riego y el rociamiento de las plantas huéspedes, cuando se utilicen técnicas aprobadas oficialmente que eliminen el organismo y eviten su propagación

- En los casos en que se hayan contaminado por vertidos de residuos líquidos, se deben establecer controles oficiales de la eliminación de los residuos sólidos o líquidos procedentes de las instalaciones industriales de transformación o envasado que manipulen el “material vegetal indicado”.
- c) Se establecerá, cuando sea pertinente, un programa para la sustitución en un plazo adecuado de todas las existencias de patatas de siembra.

## Anexo nº 12: Aviso de medidas para prevenir la enfermedad

Directiva 2000/29/CE del Consejo de la Comunidad Europea, incorporada a la normativa jurídica interna por el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero (Introducción de organismos nocivos de vegetales o productos vegetales) (Prohibición). Directiva 93/85/CEE del Consejo, incorporada por Orden de 22 de marzo de 1994 relativa a la lucha contra la necrosis bacteriana de la patata y su posterior modificación de determinados anexos en la Directiva 2006/56/CE transpuesta por la Orden APA/718/2007, Directiva 98/57/CE del Consejo, incorporada por Real Decreto 1644/1999 sobre el control de *Ralstonia solanacearum*, y su posterior modificación de determinados anexos en la Directiva 2006/63/CE transpuesta por la Orden APA/719/2007

A D/Dª (Propietario/Cultivador) .....  
Dirección .....

Las muestras de plantas de patata / tubérculos, recogidas en la parcela / almacén de su propiedad / cultivada / utilizado por usted, e identificada con polígono catastral ....., parcela catastral ....., situada en la localidad de ....., municipio ....., provincia de ....., han sido encontradas infectadas por podredumbre anular de la patata (*Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*) / podredumbre parda de la patata (*Ralstonia solanacearum*) en los análisis de laboratorio. La parcela en cuestión está marcada en el plano adjunto.

Debo informarle de que en cumplimiento de la normativa citada, ahora se le requiere lo siguiente:

- 1.-
- 2.-
- 3.-
- 4.-

Firmado .....  
(Oficial/inspector/funcionario autorizado para los fines de insp.fitosanitaria)

Fecha .....

**Aviso: Cualquier persona que incumpla esta notificación será sancionada**



## **Anexo n° 13: Medidas de aplicación en las plantas de transformación del “material vegetal indicado” declarado contaminado**

Con el fin de evitar todo riesgo identificable de propagación del organismo, las instalaciones de eliminación de residuos autorizadas oficialmente, a las que se hace referencia en el *Anexo n° 14.a* del presente Manual, deben cumplir las disposiciones que se indican a continuación:

- Los residuos de patatas y tomates<sup>1</sup> (incluidas las patatas, montaduras y tomates descartados) y cualquier otro residuo sólido asociado con las patatas y los tomates<sup>1</sup> (incluido el suelo, las piedras y los restos) se eliminarán de una de las siguientes maneras:
  - En un vertedero de eliminación de residuos autorizado oficialmente en donde no exista ningún riesgo identificable de escape del organismo al medio ambiente, por ejemplo, a través de filtración a tierras agrícolas ni de contacto con fuentes de agua que puedan utilizarse para el riego de dichas tierras. Los residuos se conducirán directamente al vertedero en unas condiciones de confinamiento que impidan todo riesgo de pérdida de los mismos.
  - Incineración
  - A través de otras medidas, siempre que se descarte el posible riesgo de propagación del organismo. Dichas medidas se notificarán inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino y éste, a su vez, a través del cauce correspondiente, a la Comisión y a los demás Estados miembros.
  
- Los residuos líquidos que contengan elementos sólidos en suspensión, se someterán a procesos de filtración o sedimentación para eliminar dichos sólidos. Por su parte, los residuos sólidos se eliminarán tal como se establece en el

---

<sup>1</sup> En el caso de contaminación por *Ralstonia solanacearum*

apartado anterior. A continuación, los residuos sólidos se someterán a alguna de las medidas siguientes:

- Calentamiento a una temperatura mínima de 60 °C en todo su volumen durante un mínimo de treinta minutos antes de la eliminación.
- Eliminación, previa autorización oficial y bajo control oficial, de manera que no exista ningún riesgo identificable de que los residuos puedan entrar en contacto con tierras agrícolas ni fuentes de agua que puedan utilizarse para el riego de tierras agrícolas. Los detalles de estas medidas se notificarán al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino y este a su vez, a través del cauce correspondiente a los demás Estados miembros y a la Comisión.

Las opciones descritas se aplican asimismo a los residuos asociados a la manipulación, la eliminación y el tratamiento de lotes contaminados.

## Anexo nº 14: Caso práctico nº 1

### SITUACIÓN INICIAL

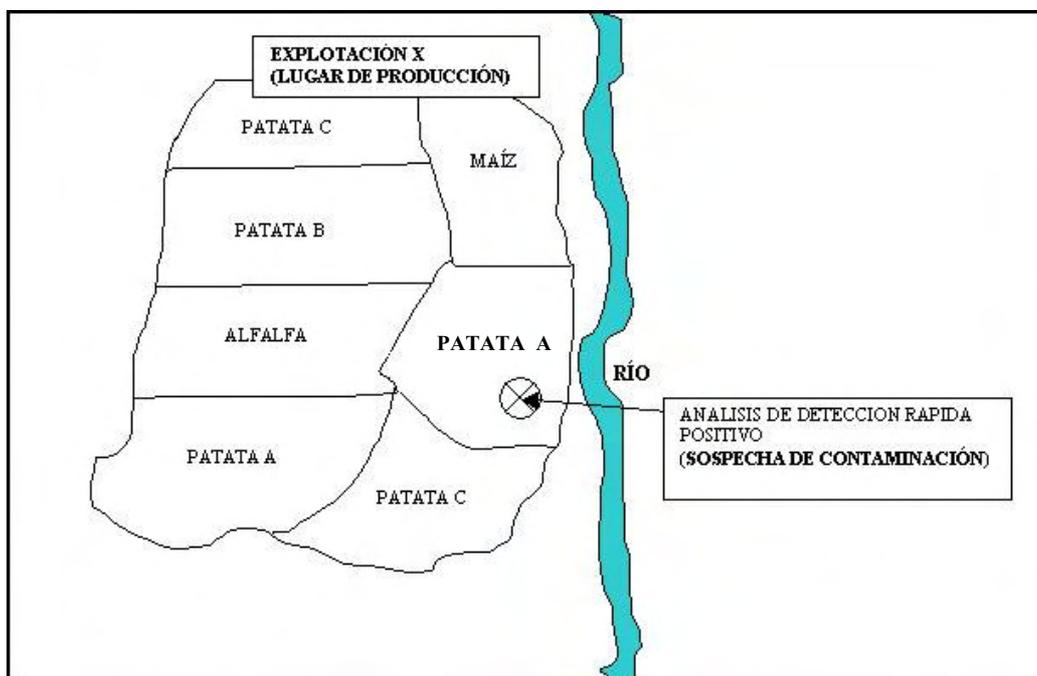
Un agricultor X tiene una explotación que cuenta con 7 parcelas (campos), de las cuales siembra 3 de patata de consumo, 2 de patata de siembra, 1 de maíz y 1 de alfalfa. Los lotes de patata que han sido sembrados en las parcelas dedicadas a este cultivo son los siguientes:

LOTE	VARIEDAD	Nº DE PARCELAS	DESTINO
1	A	2	Consumo
2	B	1	Consumo
3	C	2	Siembra

Por otra parte, el agricultor X comparte maquinaria de cultivo con otro agricultor Y, y ambos entregan las patatas a un almacenista W. Tras evaluarse si podrían considerarse las explotaciones X e Y como partes de un mismo lugar de producción, esto queda desestimado pues, aunque ambas comparten maquinaria, están distanciadas entre sí y no comparten técnicas de producción (se labran en distintos momentos, no se plantaron a la vez, etc). Por lo tanto, las explotaciones X e Y constituyen distintos lugares de producción.

### SOSPECHA DE CONTAMINACIÓN

Siguiendo las directrices establecidas por la legislación vigente, los inspectores de Sanidad Vegetal de la Comunidad Autónoma decidieron llevar a cabo una inspección en la explotación, en la segunda mitad del ciclo productivo de las patatas, realizando inspección visual y toma de muestras de todas las parcelas de patata de siembra de la misma, así como de una parcela por cada variedad de patata de consumo. Como resultado de los análisis de detección rápida realizados sobre las muestras recogidas, aparece un resultado positivo para *Ralstonia solanacearum* en una de las parcelas de patatas de la variedad A (lote 1). Este positivo constituye la **sospecha de contaminación**.



### **MEDIDAS CAUTELARES**

Hasta que se produce la confirmación o desmentido de la contaminación, se adoptan las siguientes medidas cautelares destinadas a tratar de evitar la dispersión de la enfermedad:

- Prohibición de los movimientos de plantas y tubérculos de patata, tractores y maquinaria, desde o hacia la parcela (campo) bajo sospecha de contaminación.
- Control oficial de cualquier circulación de patatas desde o hacia el resto de parcelas de patata del agricultor X, y del agricultor Y (debido al peligro que supone el hecho de compartir maquinaria). Si se considera necesario, una vez estudiado el nivel de riesgo de propagación de la sospecha de contaminación, también podrá prohibirse la citada circulación. No obstante, en caso de permitirse la circulación, si durante los controles se detectan síntomas, se prohibirá el movimiento de patatas y se tomarán inmediatamente muestras para su análisis.

- Realización de un estudio para determinar la fuente o fuentes de la sospecha de contaminación. Este estudio es preliminar y se desarrollará más exhaustivamente en caso de que se confirme la contaminación. No obstante, el estudio se irá intensificando si, durante su desarrollo, comienzan a aparecer más puntos de sospecha de contaminación. Se procede de la siguiente manera:
- Inspección visual, muestreo y análisis de todas las parcelas de patata de la explotación del agricultor X. Tras comprobar que comparte maquinaria con el agricultor Y, se hace lo mismo con las parcelas de patata de su explotación. Durante los análisis de detección rápida aparece un resultado positivo en una de las parcelas de la variedad C (lote 3) del agricultor X. Esta parcela pasa a formar parte de la sospecha de contaminación, y se prohíbe cualquier movimiento desde o hacia la misma.
  - Se investiga cuál es el origen de los lotes 1 y 3, con el fin de averiguar qué otros agricultores han podido plantarlos. Se realizan inspecciones visuales en esas explotaciones, se toman muestras y se envían a analizar. Si el número de explotaciones lo permite, se tomarán muestras de todas ellas; en caso contrario, se elegirá un número representativo de las explotaciones (las de mayor superficie sembrada de patata de los lotes 1 y 3). Los análisis de detección rápida dan un resultado negativo a la presencia de la enfermedad, por lo que no parece que ésta sea la causa de la sospecha de contaminación.
  - Tras verificarse que las dos parcelas bajo sospecha de contaminación se riegan con aguas de un cauce contiguo, se toman muestras de las citadas aguas junto a la toma de riego, así como de solanáceas silvestres del margen del cauce en la zona cercana a la toma. Los análisis de detección rápida arrojan un resultado positivo a la presencia de la enfermedad, por lo que parece que la fuente de la sospecha de contaminación podría ser el agua.
  - Localización de cultivos de patata cercanos a las parcelas de la explotación bajo sospecha de contaminación, información de gran interés si se confirma la contaminación.

## **DECLARACIÓN OFICIAL DE CONTAMINACIÓN**

Una vez que terminan los análisis completos sobre las muestras de la explotación X que dieron resultado positivo en los análisis de detección rápida, se concluye que efectivamente las dos muestras sobre las que existía sospecha de contaminación, están contaminadas.

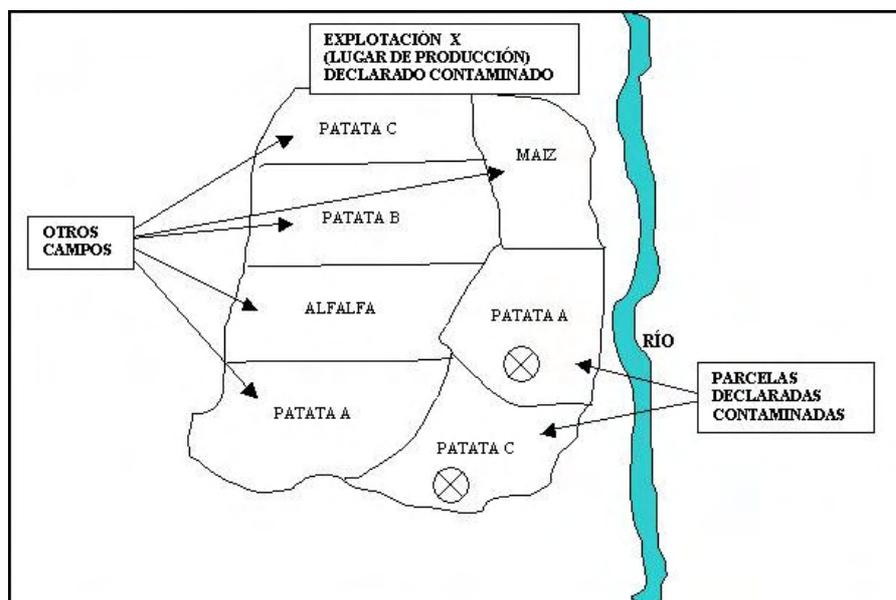
Las autoridades competentes de las Comunidades Autónomas implicadas notificarán inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, a través del cauce correspondiente a los otros Estados Miembros y a la Comisión Europea, cualquier caso de contaminación declarada.

En este sentido, se toman las siguientes medidas:

### ***MEDIDAS A ADOPTAR EN LA EXPLOTACIÓN DEL AGRICULTOR X***

Se **declaran contaminadas las parcelas** de patata en que se ha confirmado la presencia de la enfermedad (las dos parcelas de la explotación X), y también **se declara contaminada la explotación**. En las parcelas declaradas contaminadas debe seguirse una **cuarentena bastante severa (ver apartado 1.a del Anexo nº 14.d)**.

Por su parte, las plantas y tubérculos de patata que se encuentran en las parcelas declaradas contaminadas se consideran **material declarado contaminado**, por lo que deben ser incinerados, utilizados como piensos tras un tratamiento térmico, eliminados en un verterdero de eliminación de residuos autorizado oficialmente o destinados a transformación industrial.



En la explotación declarada contaminada existen parcelas de patatas que no han sido declaradas contaminadas, y parcelas cultivadas de otros vegetales (maíz y alfalfa). A pesar de que todas estas parcelas pertenecen a una explotación declarada contaminada, las citadas parcelas se consideran “**otros campos**” y no parcelas declaradas contaminadas. Tanto si están cultivadas de patata, como si lo están de otro cultivo, en dichas parcelas se llevará a cabo una **cuarentena** (ver apartado 1.b del Anexo nº 14.d), que será algo **menos exigente** que la que debe llevarse a cabo en la parcela declarada contaminada.

Por su parte, los tubérculos y plantas de patata que se encuentran en parcelas de la explotación no declaradas contaminadas (en los citados “otros campos”) se consideran **material probablemente contaminado**, por lo que deben ser utilizados como patatas de consumo envasadas y listas para su distribución directa sin re-ensasar, como patatas de consumo destinadas a transformación industrial, o utilizados o destruidos de forma que no exista ningún riesgo identificable de propagación de la enfermedad. Asimismo, los vegetales de las otras especies cultivadas en los “otros campos” de la explotación (maíz y alfalfa), pueden utilizarse para cualquier otro fin, pues en principio, no existe peligro de dispersión de la enfermedad.

### ***MEDIDAS A ADOPTAR EN LA EXPLOTACIÓN DEL AGRICULTOR Y***

La explotación Y forma parte del alcance de la contaminación probable, y por tanto de la Zona delimitada, y deberá someterse a las **condiciones de cuarentena** definidas **para la Zona delimitada** en el **apartado 2 del Anexo 14.d**. Las plantas y tubérculos de patata de esta explotación se consideran material probablemente contaminado, por lo que deben ser utilizadas como patatas de consumo envasadas y listas para su distribución directa sin re-ensasar, como patatas de consumo destinadas a transformación industrial, o utilizados o destruidos de forma que no exista ningún riesgo identificable de propagación de la enfermedad.

### ***MEDIDAS A ADOPTAR SOBRE LA MAQUINARIA Y VEHÍCULOS DE LAS EXPLOTACIONES X E Y***

La maquinaria y vehículos que han sido utilizados en las parcelas declaradas contaminadas, es decir, la maquinaria y vehículos utilizados en patata en las explotaciones X e Y, deben declararse **material contaminado**, y deben ser descontaminados, tras lo cual, dejarán de considerarse contaminados. Además, deberán ser desinfectados en cada uno de los años de cultivo siguientes, hasta inclusive, la primera temporada de cultivo permisible de patatas o tomates en el campo o campos declarados contaminados.

### ***MEDIDAS A ADOPTAR EN EL ALMACÉN W***

En el tiempo transcurrido entre el resultado de los análisis de detección rápida y la declaración oficial de contaminación, podría haber sido permitido (según criterio del Organismo de Sanidad Vegetal) el envío bajo control oficial de patatas de otros campos de la explotación X, o del agricultor Y, al almacén W. Las citadas patatas se consideran material probablemente contaminado, por lo que en ese caso, el almacén W pasaría a considerarse probablemente contaminado, y debería ser desinfectado. Las patatas que se encontrasen en el almacén W deberían ser tratadas como material probablemente contaminado, y por tanto, deberían ser utilizadas como patatas de consumo envasadas y listas para su distribución directa sin re-ensasar, como patatas de consumo destinadas a

transformación industrial, o utilizadas o destruidas de forma que no exista ningún riesgo identificable de propagación de la enfermedad.

Además, en ese caso, durante un período de al menos tres años de cultivo, se exigiría que en el almacén se manipulasen separadamente las existencias de patatas de siembra y de patatas de consumo.

### ***INVESTIGACIÓN SOBRE LA CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS SUPERFICIALES:***

Una vez confirmado el positivo en la muestra tomada junto a la toma de agua del cauce, se toman nuevas muestras aguas arriba y abajo de la zona del río próxima a la toma de riego de la explotación (en el caso de la Comunidad Autónoma del ejemplo, hasta tres kilómetros aguas arriba y abajo de la toma). Se toman muestras de agua cada 1.000 metros, y muestras de solanáceas silvestres localizadas en los márgenes del cauce. Cuando se obtienen resultados positivos en los análisis de detección rápida, se continúa el muestreo, siguiendo a lo largo del cauce hasta que se obtienen resultados negativos continuados. En nuestro caso, se obtienen resultados positivos en ambos sentidos del cauce. Tres kilómetros aguas arriba, el río se adentra en otra Comunidad Autónoma. Cuatro kilómetros aguas abajo, llega a una central hidroeléctrica, tras la cual dejan de aparecer positivos. Se deduce que **la fuente de la contaminación está en la Comunidad Autónoma de la que provienen las aguas**, lo que se notifica inmediatamente al MARM para que éste a su vez, lo notifique a la citada Comunidad Autónoma, con el fin de que ésta pueda continuar con la investigación.

El tramo de río desde la Comunidad Autónoma vecina hasta la presa situada cuatro kilómetros aguas abajo de la explotación forman parte de la extensión de la contaminación. En el momento en que concluyan los análisis de aguas, si resultan positivos, se declarará contaminado el cauce, en los tramos en que corresponda. A partir de dicho momento, se deberá prohibir el uso de estas aguas para el riego de patatas y tomates y, en su caso, de otras plantas hospedantes.

Todas aquellas explotaciones que tengan parcelas que se rieguen con las aguas del cauce declarado contaminado forman parte también del alcance de la contaminación probable. Por su parte, las patatas que se cultivan en todas estas explotaciones se consideran **material probablemente contaminado**, por lo que deben ser utilizadas como patatas de consumo envasadas y listas para su distribución directa sin re-ensasar, como patatas de consumo destinadas a transformación industrial, o utilizadas o destruidas de forma que no exista ningún riesgo identificable de propagación de la enfermedad.

### ***MEDIDAS A ADOPTAR EN LA ZONA DELIMITADA***

Se establecerá una **Zona delimitada** dentro de la cual se incluirán la explotación declarada contaminada, el tramo de cauce declarado contaminado, la explotación Y (probablemente contaminada) y las explotaciones regadas con aguas del tramo de cauce declarado contaminado (explotaciones probablemente contaminadas).

También se incluirán en la Zona delimitada otras explotaciones que se determinen, una vez valorados los elementos recogidos en el Anexo nº 12.b. Estas explotaciones constituyen la **posible propagación**. En este caso, se establecieron como explotaciones consideradas dentro de la posible propagación:

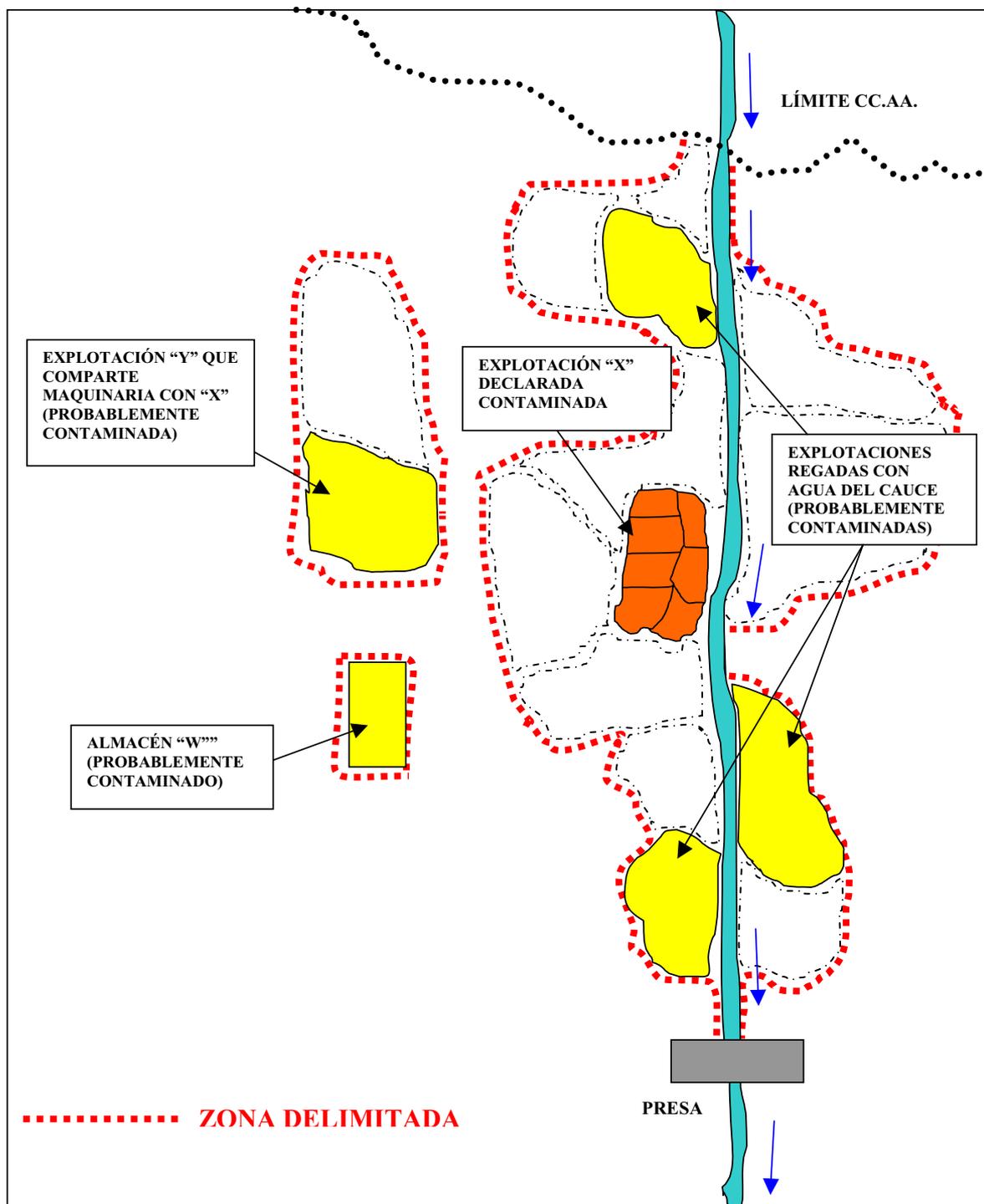
- Determinadas explotaciones contiguas al tramo de río declarado contaminado, que poseen parcelas de patata y tomate, pero que no son regadas con aguas del citado cauce, debido al peligro de ser inundadas total o parcialmente con sus aguas, o de que los pozos con los que se riegan sean contaminados por escorrentía del agua del cauce.
- Determinadas explotaciones próximas a alguna de las declaradas contaminadas o probablemente contaminadas, dado que se determinó que podía existir algún riesgo de dispersión del patógeno.
- Determinadas explotaciones contiguas a la declarada contaminada, que se riega con un pozo que se considera que podría estar infectado debido a la escorrentía del agua procedente de la explotación declarada contaminada.

Además de las medidas de cuarentena adoptadas sobre el lugar de producción, mencionadas con anterioridad, sobre la Zona delimitada, así como sobre la maquinaria y almacenes que se encuentran en la misma, se establecerán las medidas de cuarentena establecidas en el apartado 2 del Anexo nº 14.d.

### **CONCLUSIONES**

Tras las investigaciones realizadas, se ha establecido que la fuente de la contaminación detectada es el agua procedente del río. En este sentido, se ha comunicado a la Comunidad Autónoma de la que proceden las aguas del río de dicha contaminación, con el fin de que adopte las medidas que considere oportunas.

Se han tomado todas las medidas de cuarentena establecidas en la legislación vigente, y se han establecido la *extensión de la contaminación, el alcance de la probable contaminación, la posible propagación*, y por lo tanto la *Zona delimitada*.



## Anexo nº 15: Caso práctico nº 2

### SITUACIÓN INICIAL

Un agricultor X tiene una explotación (lugar de producción) que cuenta con 7 parcelas (campos), de las cuales siembra 3 de patata de consumo, 2 de patata de siembra, 1 de maíz y 1 de alfalfa. Las 5 parcelas de patata proceden de los siguientes lotes:

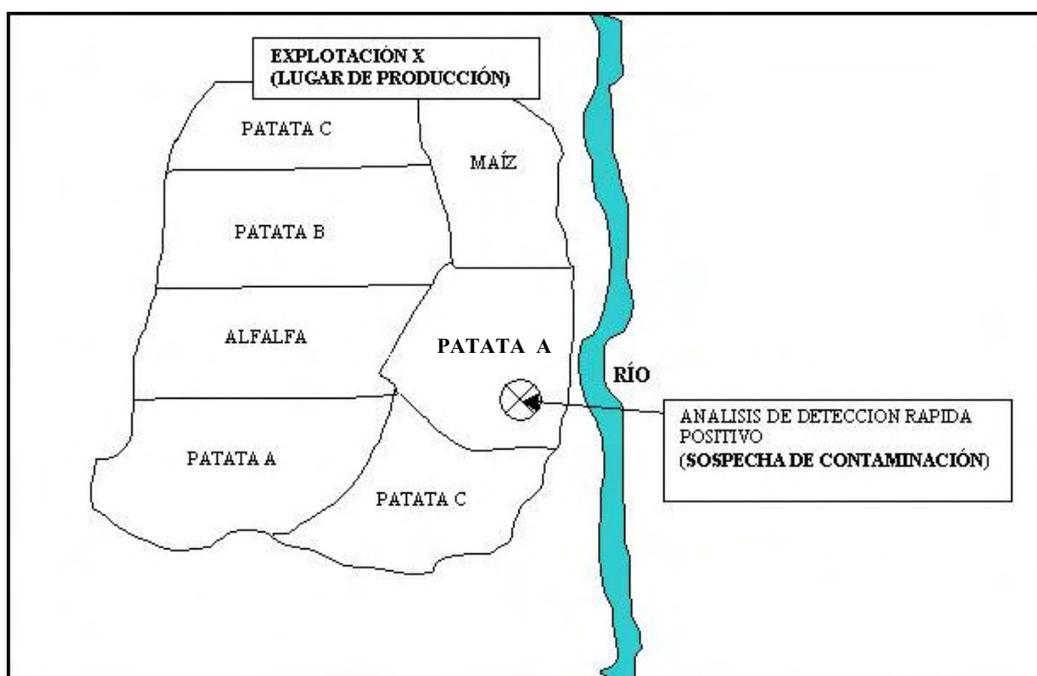
LOTE	VARIEDAD	Nº DE PARCELAS	DESTINO
1	A	2	Consumo
2	B	1	Consumo
3	C	2	Siembra

Por otra parte, el agricultor X comparte maquinaria de cultivo con otro agricultor Y, y ambos entregan las patatas a un almacenista W. Tras evaluarse si podrían considerarse las explotaciones X e Y como partes de un mismo lugar de producción, esto queda desestimado pues, aunque ambas comparten maquinaria, están distanciadas entre sí y no comparten técnicas de producción (se laborean en distintos momentos, no se plantaron a la vez, etc). Por lo tanto, las explotaciones X e Y constituyen distintos lugares de producción.

### SOSPECHA DE CONTAMINACIÓN

Siguiendo las directrices establecidas por la legislación vigente, los inspectores de Sanidad Vegetal de la Comunidad Autónoma decidieron llevar a cabo una inspección en la explotación, en la segunda mitad del ciclo productivo de las patatas, realizando inspección visual y toma de muestras de todas las parcelas de patata de siembra de la misma, así como de una parcela por cada variedad de patata de consumo. Como resultado de los análisis de detección rápida realizados sobre las muestras recogidas, aparece un resultado positivo para *Ralstonia solanacearum* en una de las parcelas de

patatas de la variedad A (lote 1). Este positivo constituye la **sospecha de contaminación**.



### MEDIDAS CAUTELARES

Hasta que se produce la confirmación o desmentido de contaminación, se adoptan las siguientes medidas cautelares destinadas a tratar de evitar la dispersión de la enfermedad:

- Prohibición de los movimientos de plantas y tubérculos de patata, tractores y maquinaria, desde o hacia la parcela (campo) bajo sospecha de contaminación.
- Control oficial de cualquier circulación de patatas desde o hacia el resto de parcelas de patata del agricultor X, y del agricultor Y (debido al peligro que supone el hecho de compartir maquinaria). Si se considera necesario, una vez estudiado el nivel de riesgo de propagación de la sospecha de contaminación, también podrá prohibirse la citada circulación. No obstante, en caso de permitirse la circulación, si durante los controles se detectan síntomas, se

prohibirá el movimiento de patatas y se tomarán inmediatamente muestras para su análisis.

- Realización de un estudio para determinar la fuente o fuentes de la sospecha de contaminación. Este estudio es preliminar y se desarrollará más exhaustivamente en caso de que se confirme la contaminación. No obstante, el estudio se irá intensificando si, durante su desarrollo, comienzan a aparecer más puntos de sospecha de contaminación. Se procede de la siguiente manera:
  - Inspección visual, muestreo y análisis de todas las parcelas de patata de la explotación del agricultor X. Tras comprobar que comparte maquinaria con el agricultor Y, se hace lo mismo con las parcelas de patata de su explotación. Durante los análisis de detección rápida aparece un resultado positivo en la otra parcela de la variedad A (lote 1) del agricultor X. Esta parcela pasa a formar parte de la sospecha de contaminación, y se prohíbe cualquier movimiento desde o hacia la misma. A partir de la obtención de estos resultados preliminares, podría pensarse que la fuente de la sospecha de contaminación es el lote 1.
  - Dado que se piensa que la fuente puede estar en el lote 1, se investiga cuál es el origen del mismo, con el fin de averiguar qué otros agricultores han podido plantarlo. Se obtiene la información de que el lote 1 ha sido distribuido por el almacén W a diversos agricultores de la comarca. Se realizan inspecciones visuales en las explotaciones que han plantado patatas procedentes del citado lote, se toman muestras y se envían a analizar. En este sentido, si el número de explotaciones lo permite, se tomarán muestras de todas ellas; en caso contrario, se elegirá un número representativo de las explotaciones (incluyendo las de mayor superficie sembrada de patata del lote 1). Los análisis de detección rápida dan un resultado negativo a la presencia de la enfermedad en todas las muestras analizadas. No obstante, aún no ha sido confirmada la presencia de la enfermedad en las dos parcelas para las cuales se obtuvo un resultado positivo en los análisis de detección rápida.
  - Tras verificarse que toda la explotación X se riega con aguas de un cauce contiguo, se toman muestras de las citadas aguas junto a la toma, así

como de solanáceas silvestres del margen del cauce en la zona cercana a la toma. Los análisis de detección rápida arrojan un resultado negativo a la presencia de la enfermedad, por lo que parece que la fuente de la sospecha de contaminación no debería ser el agua.

- Localización de cultivos de patata cercanos a las parcelas de la explotación bajo sospecha de contaminación, información de gran interés si se confirma la contaminación.

### **DECLARACIÓN OFICIAL DE CONTAMINACIÓN**

Una vez que terminan los análisis completos sobre las muestras de la explotación X que dieron resultado positivo en los análisis de detección rápida, se concluye que efectivamente las dos muestras sobre las que existía sospecha de contaminación, están contaminadas.

Las autoridades competentes de las Comunidades Autónomas implicadas notificarán inmediatamente Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, a través del cauce correspondiente a los otros Estados Miembros y a la Comisión Europea, cualquier caso de contaminación declarada.

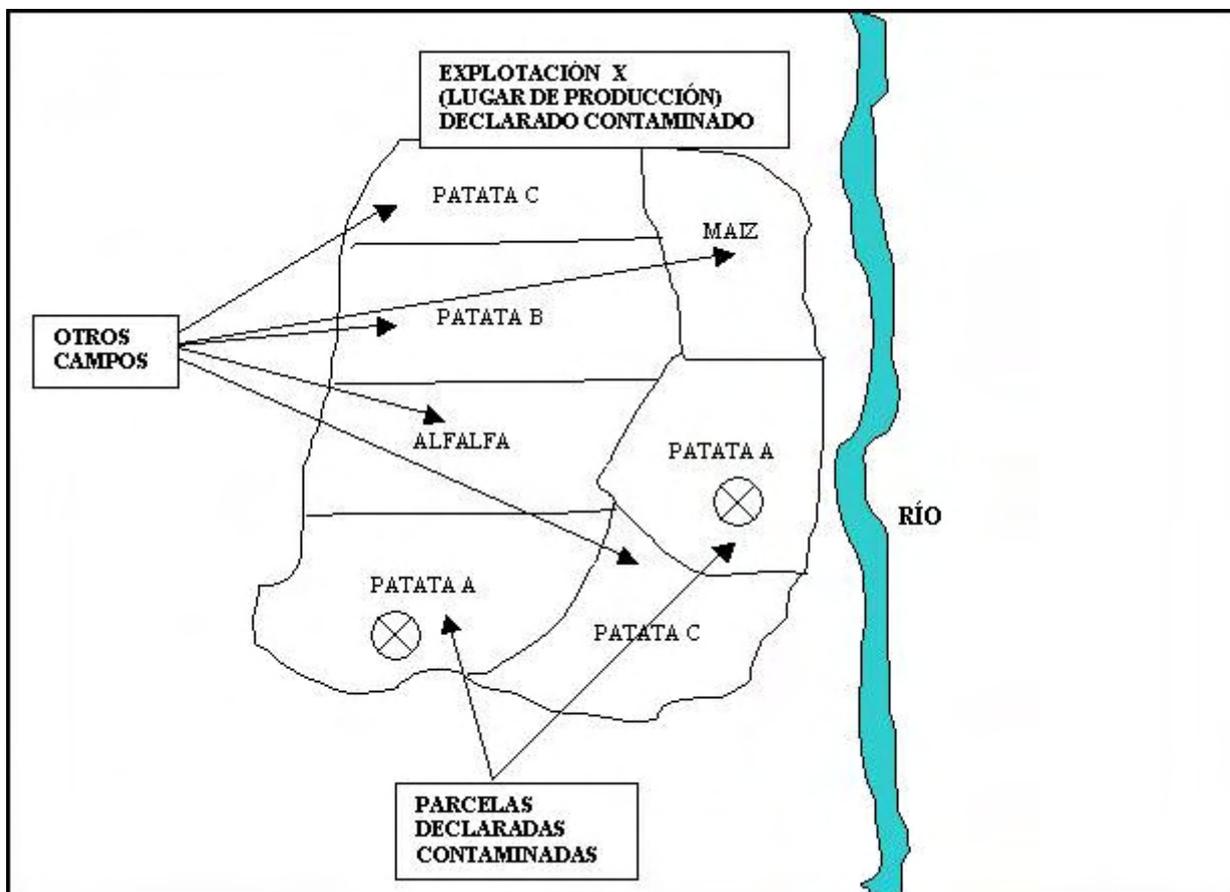
En este sentido, se toman las siguientes medidas:

### ***MEDIDAS A ADOPTAR EN LA EXPLOTACIÓN DEL AGRICULTOR X***

Se **declaran contaminadas las parcelas** de patata en que se ha confirmado la presencia de la enfermedad (las dos parcelas de la explotación X), y también **se declara contaminada la explotación**. En las parcelas declaradas contaminadas debe seguirse una **cuarentena bastante severa (ver apartado 1.a del Anexo nº 14.d)**.

Por su parte, las plantas y tubérculos de patata que se encuentran en las parcelas declaradas contaminadas se consideran **material declarado contaminado**, por lo que deben ser incinerados, utilizados como piensos tras un tratamiento térmico, eliminados

en un verteradero de eliminación de residuos autorizado oficialmente o destinados a transformación industrial.



En la explotación declarada contaminada existen parcelas de patatas que no han sido declaradas contaminadas, y parcelas cultivadas de otros vegetales (maíz y alfalfa). A pesar de que todas estas parcelas pertenecen a una explotación declarada contaminada, las citadas parcelas se consideran “**otros campos**” y no parcelas declaradas contaminadas. Tanto si están cultivadas de patata, como si lo están de otro cultivo, en dichas parcelas se llevará a cabo una **cuarentena** (ver apartado 1.b del Anexo nº 14.d), que será algo **menos exigente** que la que debe llevarse a cabo en la parcela declarada contaminada.

Por su parte, los tubérculos y plantas de patata que se encuentran en parcelas de la explotación no declaradas contaminadas (en los citados “**otros campos**”) se consideran **material probablemente contaminado**, por lo que deben ser utilizados como patatas de consumo envasadas y listas para su distribución directa sin re-ensasar,

como patatas de consumo destinadas a transformación industrial, o utilizados o destruidos de forma que no exista ningún riesgo identificable de propagación de la enfermedad. Asimismo, los vegetales de las otras especies cultivadas en los “otros campos” de la explotación (maíz y alfalfa), pueden utilizarse para cualquier otro fin, pues en principio, no existe peligro de dispersión de la enfermedad.

### ***MEDIDAS A ADOPTAR EN LA EXPLOTACIÓN DEL AGRICULTOR Y***

La explotación Y forma parte del alcance de la contaminación probable, y por tanto de la Zona delimitada, y deberá someterse a las **condiciones de cuarentena** definidas **para la Zona delimitada** en el **apartado 2 del Anexo 14.d**. Las plantas y tubérculos de patata de esta explotación se consideran material probablemente contaminado, por lo que deben ser utilizadas como patatas de consumo envasadas y listas para su distribución directa sin re-ensasar, como patatas de consumo destinadas a transformación industrial, o utilizados o destruidos de forma que no exista ningún riesgo identificable de propagación de la enfermedad.

### ***MEDIDAS A ADOPTAR SOBRE LA MAQUINARIA Y VEHÍCULOS DE LAS EXPLOTACIONES X E Y***

La maquinaria y vehículos que han sido utilizados en las parcelas declaradas contaminadas, es decir, la maquinaria y vehículos utilizados en patata en las explotaciones X e Y, deben declararse **material contaminado**, y deben ser descontaminados, tras lo cual, dejarán de considerarse contaminados. Además, deberán ser desinfectados en cada uno de los años de cultivo siguientes, hasta inclusive, la primera temporada de cultivo permisible de patatas o tomates en el campo o campos declarados contaminados.

### ***MEDIDAS A ADOPTAR EN EL ALMACÉN W***

Dado que aún no se ha determinado cuál puede ser la fuente de la contaminación, se decide investigar el almacén W como posible fuente de la contaminación. Para este fin, se toman muestras de las existencias de patata, tratando de

tomar muestras representativas de las diferentes partes del almacén (naves, instalaciones separadas, etc). Deberá tenerse especial atención a la posible existencia de patatas que se conserven del lote 1, o a patatas que pudieran proceder de otros lotes que tengan un origen común al del lote 1 (que procedan del mismo importador o empresa, etc).

Como resultado de los análisis de detección rápida, se obtiene un resultado negativo a la presencia de la enfermedad, con lo cual, se descarta al almacén W como posible fuente de la contaminación.

Por otro lado, en el tiempo transcurrido entre el resultado de los análisis de detección rápida de las parcelas declaradas contaminadas y la declaración oficial de contaminación, podría haber sido permitido (según criterio del Organismo de Sanidad Vegetal) el envío bajo control oficial de patatas de otros campos de la explotación X, o del agricultor Y, al almacén W. Las citadas patatas se consideran material probablemente contaminado, por lo que en ese caso, el almacén W pasaría a considerarse probablemente contaminado, y debería ser desinfectado. Las patatas que se encuentran en el almacén W deberían ser tratadas como material probablemente contaminado, y por tanto, deberían ser utilizadas como patatas de consumo envasadas y listas para su distribución directa sin re-ensasar, como patatas de consumo destinadas a transformación industrial, o utilizadas o destruidas de forma que no exista ningún riesgo identificable de propagación de la enfermedad. En ese caso, durante un período de al menos tres años de cultivo, se exigiría que en el almacén se manipulasen separadamente las existencias de patatas de siembra y de patatas de consumo.

### ***MEDIDAS A ADOPTAR EN LA ZONA DELIMITADA***

Se establecerá una **Zona delimitada** dentro de la cual se incluirán la explotación declarada contaminada y la explotación Y (probablemente contaminada).

También se incluirán en la Zona delimitada otras explotaciones que se determinen, una vez valorados los elementos recogidos en el Anexo nº 12.b. Estas explotaciones constituyen la **posible propagación**. En este caso, se establecieron como explotaciones consideradas dentro de la posible propagación:

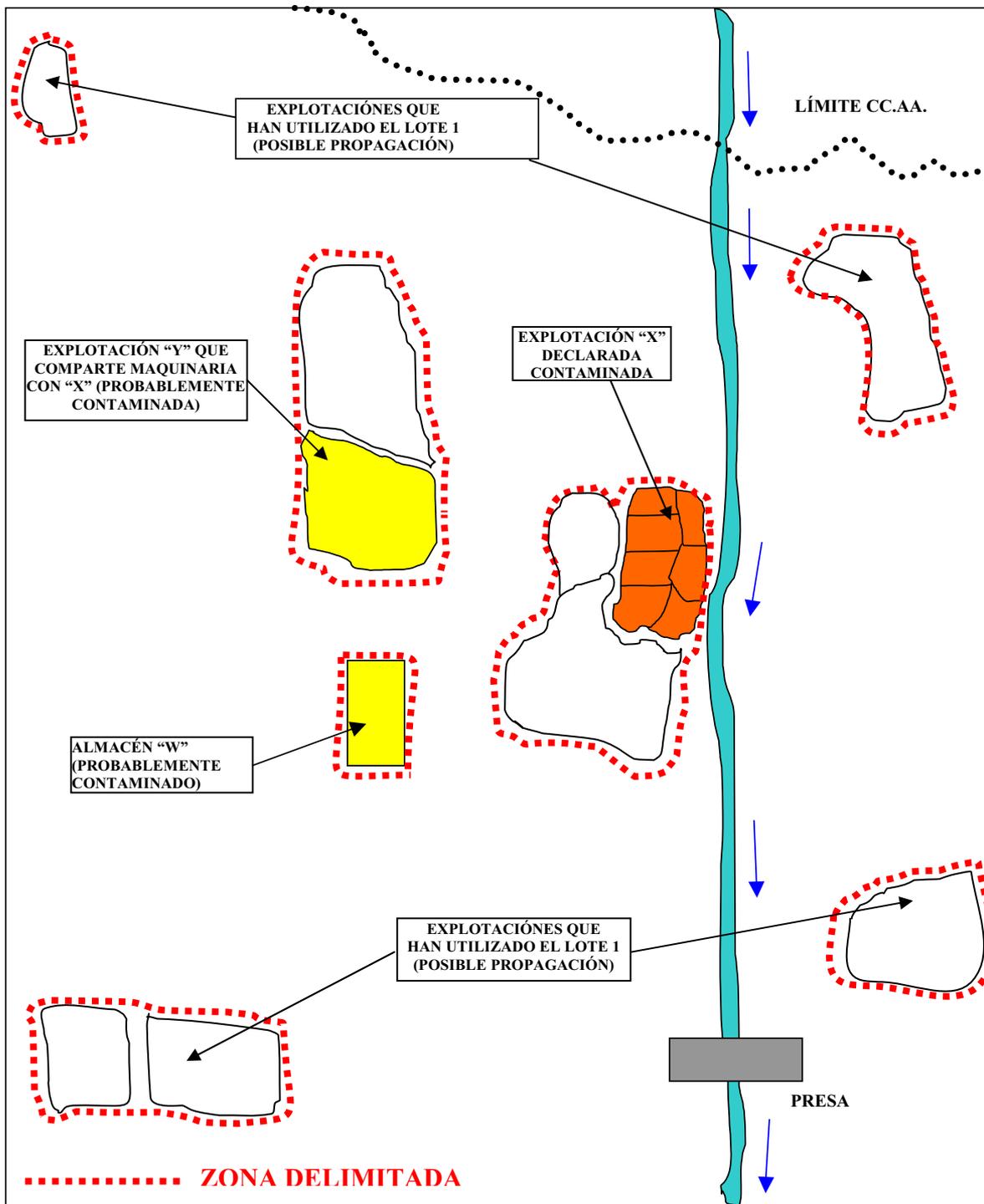
- Determinadas explotaciones contiguas a la explotación X (declarada contaminada), o a la explotación Y (probablemente contaminada), dado que se determinó que podía existir algún riesgo de dispersión del patógeno.
- Una explotación contigua a la declarada contaminada, que se riega con un pozo que se considera que podría estar infectado debido a la escorrentía del agua procedente de la explotación declarada contaminada.
- Las explotaciones que hayan utilizado el lote 1

Además de las medidas de cuarentena adoptadas sobre el lugar de producción, mencionadas con anterioridad, sobre la Zona delimitada, así como sobre la maquinaria y almacenes que se encuentran en la misma, se establecerán las medidas de cuarentena establecidas en el apartado 2 del Anexo nº 14.d.

### **CONCLUSIONES**

Tras las investigaciones realizadas, no ha sido posible establecer la fuente de la contaminación detectada en las dos parcelas del agricultor X. No obstante, se han tomado todas las medidas oportunas, estableciendo la ***extensión de la contaminación, el alcance de la probable contaminación, la posible propagación***, y por lo tanto la ***Zona delimitada***.

Mientras que no sea encontrada la fuente de contaminación, la ***investigación quedará abierta***, de tal forma que durante la aplicación de las medidas de cuarentena mencionadas con anterioridad, se prestará especial atención a cualquier nuevo foco o indicio de contaminación que permita encontrar la fuente de contaminación.





## Anexo nº 16: Caso práctico nº 3

### SITUACIÓN INICIAL

Un almacenista W de la Comunidad Autónoma “A” se abastece de patata de siembra de una cooperativa de otra Comunidad Autónoma “B”, la cual importa patata de siembra de un país perteneciente a la UE. Dicho almacenista W distribuye la patata de siembra entre los agricultores de su Comunidad Autónoma “A”.

El almacenista W abastece, entre otros, a un agricultor X, de la variedad A a través de tres lotes (1, 2 y 3), destinada a producir patata de consumo. Los lotes 1, 2 y 3 proceden de un mismo parental y, por lo tanto, se consideran lotes hermanos. Este agricultor X tiene una explotación (lugar de producción), en la Comunidad Autónoma “A”, que cuenta con 7 parcelas (campos), de las cuales siembra 3 de patata de consumo (2 de ellas con la variedad A\*), 2 de patata de siembra, 1 de maíz y 1 de alfalfa. Las 5 parcelas de patata proceden de los siguientes lotes:

VARIEDAD	LOTE	Nº DE PARCELAS	DESTINO
A*	1, 2 y 3	2	Consumo
B	4	1	Consumo
C	5	2	Siembra

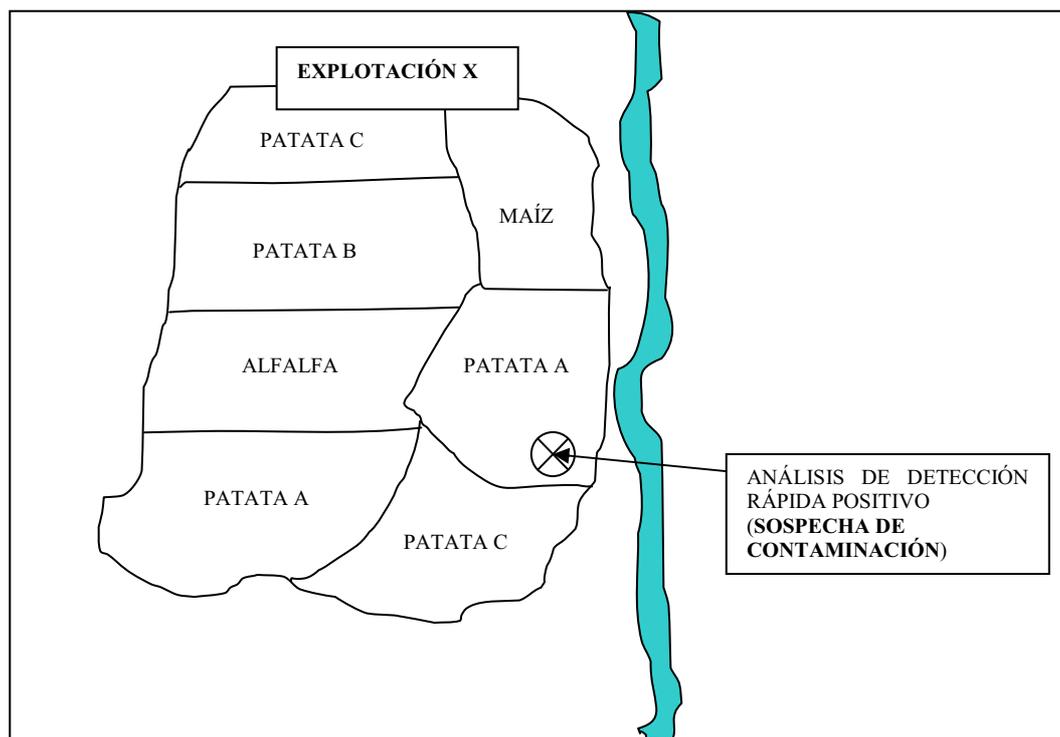
Por otra parte, el agricultor X comparte maquinaria de cultivo con los agricultores de las explotaciones M, P e Y, y todos ellos entregan las patatas al almacenista W.

(\*) Aunque, desde el 1 de enero de 2005, se debe aplicar el Reglamento (CE) nº 178/2002 sobre trazabilidad, en la práctica los lotes de una misma variedad son mezclados para la siembra.

### SOSPECHA DE CONTAMINACIÓN

Siguiendo las directrices establecidas por la legislación vigente, los inspectores de Sanidad Vegetal de la Comunidad Autónoma llevaron a cabo una inspección en la explotación X, en la segunda mitad del ciclo productivo de las patatas, realizando

inspección visual y toma de muestras de todas las parcelas de patata de siembra de la misma, así como de una parcela por cada variedad de patata de consumo. Como resultado de los análisis de detección rápida realizados sobre las muestras recogidas, aparece un resultado positivo para *Ralstonia solanacearum* en una de las parcelas de patatas de la variedad A. Este positivo constituye la **sospecha de contaminación**.



### MEDIDAS CAUTELARES

Hasta que se produce la confirmación o desmentido de contaminación, se adoptan las siguientes medidas cautelares destinadas a tratar de evitar la dispersión de la enfermedad:

- Prohibición de los movimientos de plantas y tubérculos de patata, tractores y maquinaria, desde o hacia la parcela (campo) bajo sospecha de contaminación.
- Control oficial de cualquier circulación de patatas desde o hacia el resto de parcelas de patata del agricultor X, y de los agricultores M, P e Y (debido al peligro que supone el hecho de compartir maquinaria). Si se considera necesario,

una vez estudiado el nivel de riesgo de propagación de la sospecha de contaminación, también podrá prohibirse la citada circulación. No obstante, en caso de permitirse la circulación, si durante los controles se detectan síntomas, se prohibirá el movimiento de patatas y se tomarán inmediatamente muestras para su análisis.

- Realización de un estudio para determinar la fuente o fuentes de la sospecha de contaminación. Este estudio es preliminar y se desarrollará más exhaustivamente en caso de que se confirme la contaminación. No obstante, el estudio se irá intensificando si, durante su desarrollo, comienzan a aparecer más puntos de sospecha de contaminación. Se procede de la siguiente manera:
  - Inspección visual, muestreo y análisis de todas las **parcelas de patata de la explotación del agricultor X**. Tras comprobar que comparte maquinaria con los agricultores **M, P e Y**, se hace lo mismo con las parcelas de patata de su explotación. Durante los análisis de detección rápida aparecen resultados positivos en la otra parcela de la variedad A del agricultor **X**, y en otra parcela de la variedad A del agricultor **Y**. Estas parcelas pasan a formar parte de la **sospecha de contaminación**, y se prohíbe cualquier movimiento desde o hacia las mismas. A partir de la obtención de estos resultados preliminares, se propone investigar como fuente de la contaminación la variedad A, y el agua de riego, dado que en todos los casos ésta procede de un río próximo. En principio, no parece lógico pensar que la maquinaria sea la fuente de la sospecha de la contaminación, puesto que también es compartida con las explotaciones (M y P), donde los resultados de los análisis preliminares han sido negativos.
  - Se toman **muestras de las aguas de riego** junto a la tomas de las explotaciones X e Y, así como de solanáceas silvestres del margen del cauce en la zona cercana a las mismas. Los análisis de detección rápida arrojan un resultado negativo a la presencia de la enfermedad, por lo que parece que la fuente de la sospecha de contaminación no debería ser el agua.
  - Por otro lado, se investiga cuál es el **origen de los lotes 1, 2 y 3**, de la variedad A. En este sentido, se sabe que dichos lotes proceden del almacenista W. Se realizan inspecciones visuales en las explotaciones que

han plantado patatas procedentes de algunos de los citados lotes, se toman muestras y se envían a analizar. Si el número de explotaciones lo permite, se tomarán muestras de todas ellas; en caso contrario, se elegirá un número representativo de las explotaciones (incluyendo las de mayor superficie sembrada de patata de los lotes 1, 2 y 3 de la variedad A). Los análisis de detección rápida dan resultados dispares que se recogen en el siguiente cuadro:

EXPLOTACIÓN	VARIEDAD "A" (LOTE N°)	N° PARCELAS	SINTOMATOLOGÍA/ ANÁLISIS
H	1	3	-
J	1 y 2	1	-
K	1 y 2	2	-
L	1 y 2	3	-
M	1	3	-
N	1	2	-
X	1, 2 y 3	2	+
Y	1, 2 y 3	1	+
Z	1	2	-
	2 y 3	1	+

Como consecuencia de estos resultados, una nueva parcela de la explotación Z pasa a formar parte de la **sospecha de contaminación**, y se prohíbe cualquier movimiento desde o hacia la misma (en el resto de parcelas de la explotación Z, el movimiento desde o hacia las mismas pasa a estar bajo control oficial).

En el caso de que en el almacén W existieran patatas remanentes, se deberían tomar muestras de existencias de lotes de la variedad A. En nuestro caso, consideramos que quedan patatas de los lotes, 1, 3 y 4. Se toman muestras de todas ellas, así como de otras patatas ubicadas en las citadas instalaciones. Los resultados obtenidos en los análisis de detección rápida, se muestran en el siguiente cuadro:

ALMACÉN W	VARIEDAD (LOTE)	SINTOMATOLOGÍA/ANÁLISIS
	A (1)	-
	A (3)	+
	A (4)	-
	OTRAS VARIEDADES	-

No obstante, aún no ha sido confirmada la presencia de la enfermedad en las parcelas iniciales, en las cuales se obtuvo un resultado positivo en los análisis de detección rápida.

De los resultados obtenidos durante el estudio preliminar, se ha encontrado que la fuente de la sospecha de contaminación parece ser la variedad A y, en concreto, el lote nº 3. Como consecuencia de esto, se continúa con la investigación, realizando inspección visual y toma de muestras de todas las parcelas plantadas con el lote 3 de la totalidad de los agricultores que han recibido patatas del citado lote en la Comunidad Autónoma.

Asimismo, en lo que se refiere al **almacén W**, dado que se ha constatado que las existencias de patatas remanentes se hallan en una estancia separada físicamente del resto de las instalaciones, se decide inmovilizar cautelarmente todas las existencias de los lotes 1, 3 y 4 de la variedad A, así como el resto de existencias remanentes de otras variedades que pudieran estar en contacto con ellas.

Dado que se sabe que el lote 3 (variedad A) procede de una cooperativa localizada en otra Comunidad Autónoma, se comunica de forma inmediata la sospecha de contaminación al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, para que éste a su vez, lo comunique a la autoridad competente de dicha Comunidad Autónoma, con el fin de que pueda seguir con la investigación en su territorio.

### **DECLARACIÓN OFICIAL DE CONTAMINACIÓN**

Una vez que terminan los análisis completos sobre las muestras que dieron resultado positivo en los análisis de detección rápida, correspondientes a las explotaciones X, Y, Z y al almacén W, se concluye que efectivamente las muestras sobre las que existía sospecha de contaminación, están contaminadas.

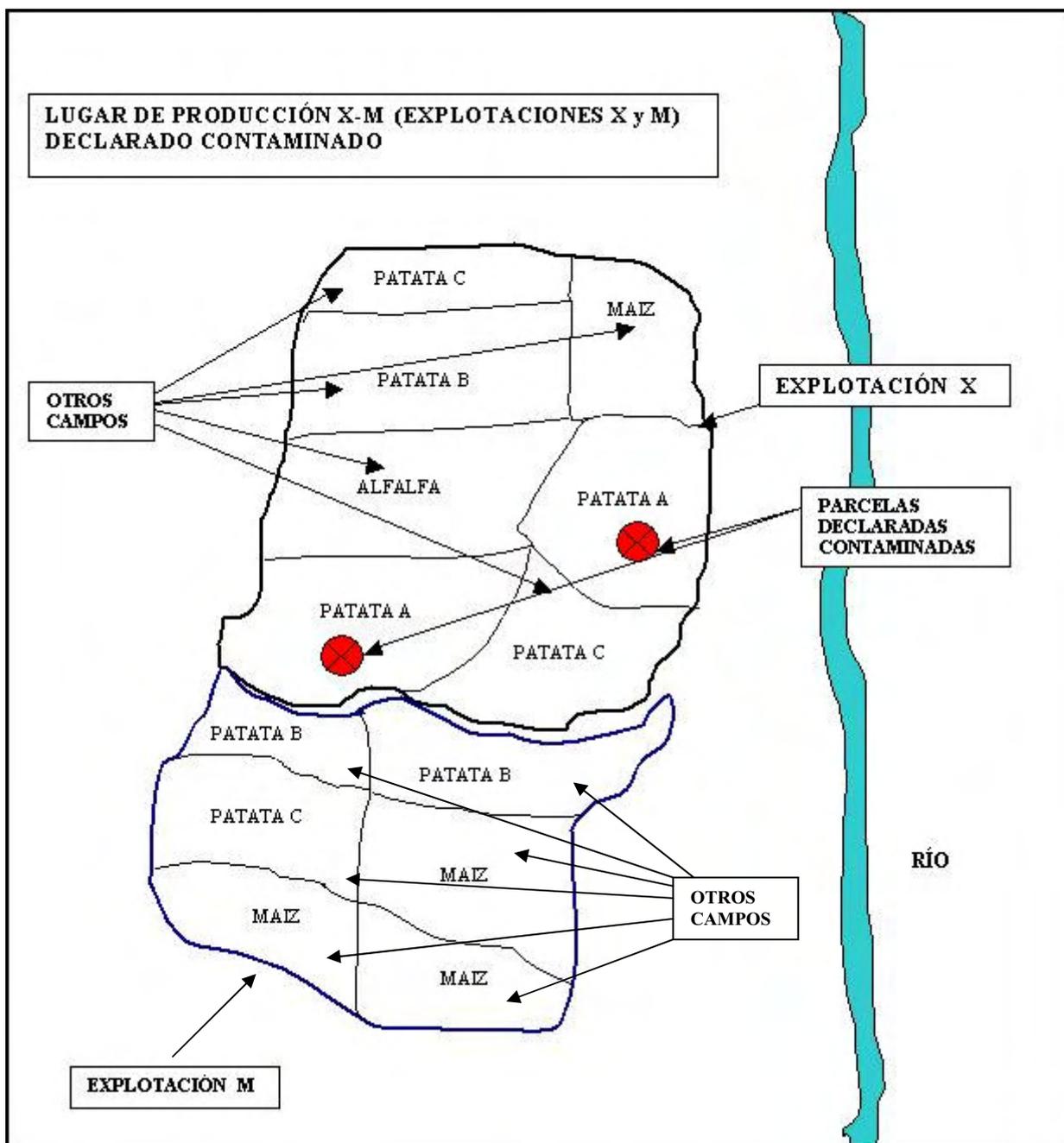
**CONSIDERACIONES GENERALES**

1. Se **declaran contaminadas las parcelas** de patata en que se ha confirmado la presencia de la enfermedad, y también **se declaran contaminadas las explotaciones** donde se encuentran ubicadas dichas parcelas.
2. Las **explotaciones X y M**, colindantes, comparten técnicas y medios de producción. En este caso, ambas explotaciones constituyen un **lugar de producción (X-M)**, que será tratado como tal, a la hora de aplicar las medidas de cuarentena correspondientes.
3. Tras los resultados obtenidos, y una vez analizado el riesgo, con el fin de determinar la contaminación probable y la posible propagación, se han designado los lugares de producción/explotaciones implicados como:

LUGAR DE PRODUCCIÓN /EXPLOTACIÓN	SITUACIÓN	Nº PARCELAS CONTAMINADAS	OBSERVACIONES
H	PROBABLEMENTE CONTAMINADO	0	Sembrado con lote hermano (var. A, lote 1)
J	PROBABLEMENTE CONTAMINADO	0	Sembrado con lote hermano (var. A, lotes 1, 2)
K	PROBABLEMENTE CONTAMINADO	0	Sembrado con lote hermano (var. A, lotes 1, 2)
L	PROBABLEMENTE CONTAMINADO	0	Sembrado con lote hermano (var. A, lotes 1, 2)
<b>M*</b>	<b>DECLARADO CONTAMINADO</b>	<b>0</b>	-
N	PROBABLEMENTE CONTAMINADO	0	Sembrado con lote hermano (var. A, lote 1)
O	DENTRO DEL ÁREA DE POSIBLE PROPAGACIÓN	0	Riesgo de escorrentía desde explot. contaminada
P	PROBABLEMENTE CONTAMINADO	0	Comparte maquinaria con explot. contaminada
Q	DENTRO DEL ÁREA DE POSIBLE PROPAGACIÓN	0	Riesgo de escorrentía desde explot. contaminada
<b>X*</b>	<b>DECLARADO CONTAMINADO</b>	<b>2</b>	-
<b>Y</b>	<b>DECLARADO CONTAMINADO</b>	<b>1</b>	-
<b>Z</b>	<b>DECLARADO CONTAMINADO</b>	<b>1</b>	-

\* En este caso, el lugar de producción está constituido por las explotaciones X y M, colindantes, que además comparten técnicas y medios de producción.

4. Se **declara contaminada la estancia del almacén** donde se acumulan las partidas remanentes. Dado que ha quedado comprobado que se encuentra separada físicamente del resto del almacén, y no existe ningún tipo de contacto con el resto de patatas, el resto del almacén, así como su maquinaria, se consideran probablemente contaminados, puesto que han recibido material vegetal procedente de los lugares de producción probablemente contaminados, y pueden haber estado en contacto con las patatas declaradas contaminadas.



Las autoridades competentes de las Comunidades Autónomas implicadas notificarán inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, a través del cauce correspondiente a los otros Estados Miembros y a la Comisión Europea, cualquier caso de contaminación declarada.

A continuación se comentan las medidas que deben tomarse para los diferentes elementos implicados:

**MEDIDAS A ADOPTAR EN EL LUGAR DE PRODUCCIÓN X-M, y EN LAS EXPLOTACIONES Y y Z**

Se **declaran contaminadas las parcelas** de patata en que se ha confirmado la presencia de la enfermedad (aquellas parcelas de las explotaciones X, Y, Z ), y también **se declaran contaminadas las explotaciones** donde se encuentran ubicadas dichas parcelas. En las parcelas declaradas contaminadas debe seguirse una **cuarentena bastante severa (ver apartado 1.a del Anexo nº 14.d)**. A esta cuarentena también se someten las parcelas de la explotación M que, como se ha indicado en las consideraciones generales, conjuntamente con la explotación X constituyen el lugar de producción X-M (véase croquis en la página siguiente).

Por su parte, las plantas y tubérculos de patata que se encuentran en las parcelas declaradas contaminadas se consideran **material declarado contaminado**, por lo que deben ser incinerados, utilizados como piensos tras un tratamiento térmico, eliminados en un verterdero de eliminación de residuos autorizado oficialmente o destinados a transformación industrial.

En el lugar de producción y en las explotaciones declaradas contaminadas existen parcelas de patatas que no han sido declaradas contaminadas, y parcelas cultivadas de otros vegetales (principalmente maíz y alfalfa). A pesar de que todas estas parcelas pertenecen a explotaciones declaradas contaminadas, las citadas parcelas se consideran **“otros campos”** y no parcelas declaradas contaminadas. Tanto si están cultivadas de patata, como si lo están de otro cultivo, en dichas parcelas se llevará a cabo una **cuarentena (ver apartado 1.b del Anexo nº 14.d)**, que será algo **menos exigente** que la que debe llevarse a cabo en la parcela declarada contaminada.

Por su parte, los tubérculos y plantas de patata que se encuentran en parcelas de la explotación no declaradas contaminadas (en los citados “otros campos”), se consideran **material probablemente contaminado**, por lo que deben ser utilizados como patatas de consumo envasadas y listas para su distribución directa sin re-ensasar, como patatas de consumo destinadas a transformación industrial, o utilizados o destruidos de forma que no exista ningún riesgo identificable de propagación de la

enfermedad. Asimismo, los vegetales de las otras especies cultivadas en los “otros campos” de la explotación (maíz y alfalfa), pueden utilizarse para cualquier otro fin, pues en principio, no existe peligro de dispersión de la enfermedad.

***MEDIDAS A ADOPTAR EN LAS EXPLOTACIONES DE LOS AGRICULTORES H, J, K, L, N y P.***

Las explotaciones H, J, K, L, N y P, forman parte del alcance de la contaminación probable, y por tanto de la Zona delimitada, y deberán someterse a las **condiciones de cuarentena** definidas para la Zona delimitada en el apartado 2 del Anexo 14.d.

Las plantas y tubérculos de patata de estas explotaciones se consideran material probablemente contaminado, por lo que deben ser utilizadas como patatas de consumo envasadas y listas para su distribución directa sin re-ensasar, como patatas de consumo destinadas a transformación industrial, o utilizados o destruidos de forma que no exista ningún riesgo identificable de propagación de la enfermedad.

***MEDIDAS A ADOPTAR SOBRE LA MAQUINARIA Y VEHÍCULOS DEL LUGAR DE PRODUCCIÓN X-M, y DE LAS EXPLOTACIONES P, Y y Z***

La maquinaria y vehículos que han sido utilizados en las parcelas declaradas contaminadas, es decir, la maquinaria y vehículos utilizados en patata en las explotaciones X, M, Y y P deben declararse **material contaminado**, y deben ser descontaminados, tras lo cual, dejarán de considerarse contaminados. Además, deberán ser desinfectados en cada uno de los años de cultivo siguientes, hasta inclusive, la primera temporada de cultivo permisible de patatas o tomates en el campo o campos declarados contaminados.

***MEDIDAS A ADOPTAR EN EL ALMACÉN W***

Las patatas remanentes que se encuentran físicamente separadas del resto del almacén, se consideran material contaminado, por lo que deben ser incineradas,

utilizadas como piensos tras un tratamiento térmico, eliminados en un verteradero de eliminación de residuos autorizado oficialmente o destinadas a transformación industrial.

Por su parte, el resto de las patatas que se encuentran en el almacén W deben ser tratadas como material probablemente contaminado, siempre y cuando se pueda demostrar que no han estado en contacto con las contaminadas, y por tanto, deben ser utilizadas como patatas de consumo envasadas y listas para su distribución directa sin re-ensasar, como patatas de consumo destinadas a transformación industrial, o utilizadas o destruidas de forma que no exista ningún riesgo identificable de propagación de la enfermedad.

El almacén completo debe ser descontaminado, aplicando métodos adecuados. Además, durante un período de al menos tres años de cultivo, se exigirá que se manipulen separadamente las existencias de patatas de siembra y de patatas de consumo.

Durante el tiempo transcurrido desde la entrada en el almacén del lote contaminado hasta la declaración de la contaminación, todas aquellas patatas que hayan estado en el almacén podrían haber estado en contacto con dicho lote contaminado; por lo tanto, esas patatas se consideran probablemente contaminadas. Las citadas patatas deberán ser utilizadas como patatas de consumo envasadas y listas para su distribución directa sin re-ensasar, como patatas de consumo destinadas a transformación industrial, o utilizadas o destruidas de forma que no exista ningún riesgo identificable de propagación de la enfermedad, con independencia del lugar en que se encuentren. Por lo tanto, si han sido enviadas a otras explotaciones no consideradas hasta ahora, deberán ser tratadas in situ como se acaba de explicar.

#### ***MEDIDAS A ADOPTAR EN LA ZONA DELIMITADA***

Como resultado de todo lo anterior, ha quedado establecida una **Zona delimitada** dentro de la cual quedan incluidas:

- las explotaciones X, M (lugar de producción X-M), Y y Z, declaradas contaminadas
- las explotaciones H, J, K, L y P consideradas probablemente contaminadas
- el almacén W

También se incluirán en la Zona delimitada otras explotaciones que se determinen, una vez valorados los elementos recogidos en el Anexo nº 12.b. Estas explotaciones constituyen la **posible propagación**. En este caso, se establecieron como explotaciones consideradas dentro de la posible propagación:

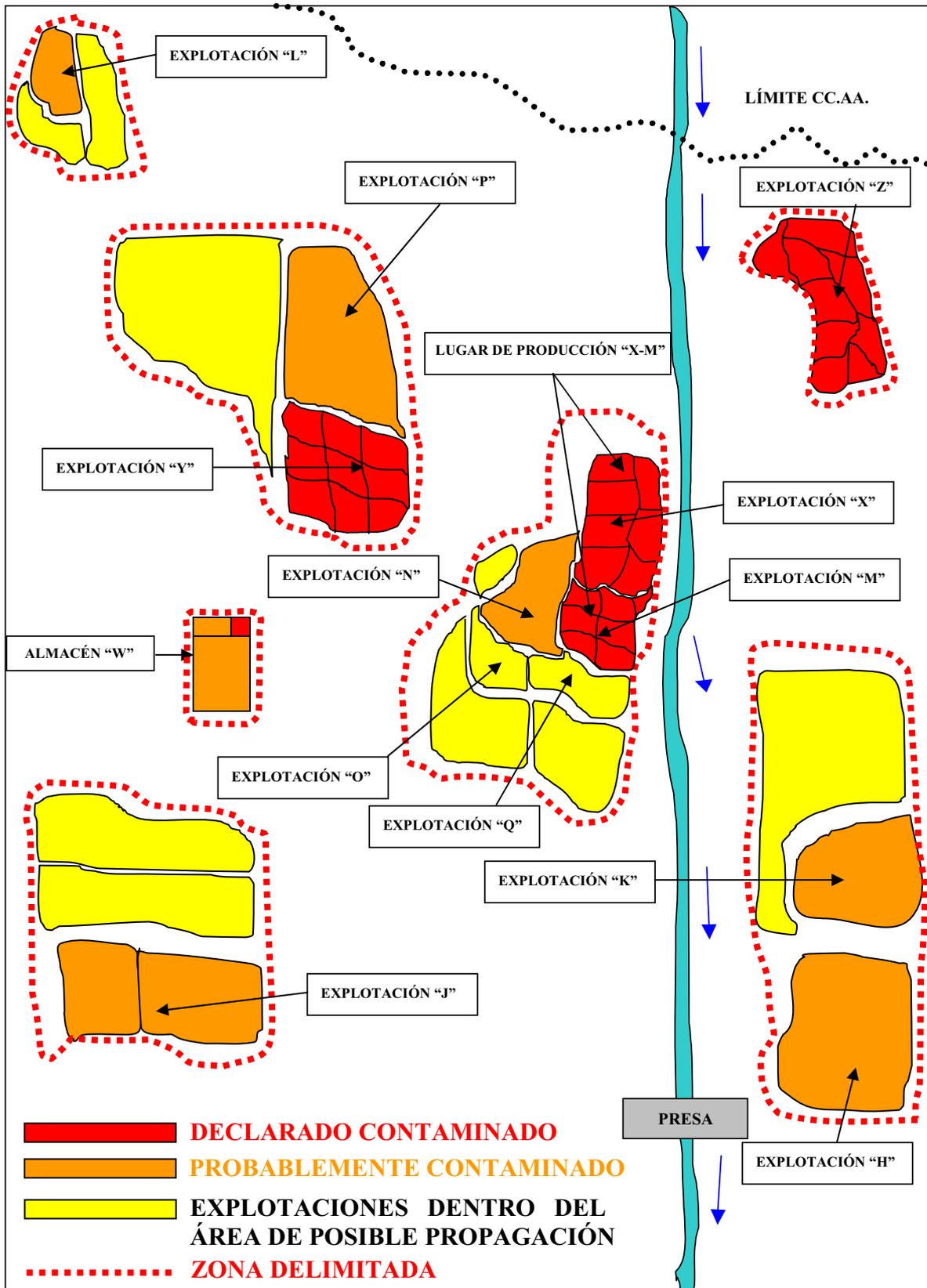
- Las explotaciones O y Q, próximas al lugar de producción X-M declarado contaminado, que se riegan con un pozo que se considera que podría estar infectado debido a la escorrentía del agua procedente de las explotaciones declaradas contaminadas.
- Otras explotaciones, próximas a explotaciones contaminadas o probablemente contaminadas, dado que se determinó que podía existir algún riesgo de dispersión del patógeno.
- Todas aquellas explotaciones que recibieron patata del almacén W, pues pudieron haber tenido contacto con el lote contaminado. En este caso, dichas explotaciones se incluyen dentro del área de posible propagación

Además de las medidas de cuarentena adoptadas sobre el lugar de producción, mencionadas con anterioridad, sobre la Zona delimitada, así como sobre la maquinaria y almacenes que se encuentran en la misma, se establecerán las medidas de cuarentena establecidas en el apartado 2 del Anexo nº 14.d.

## **CONCLUSIONES**

Tras las investigaciones realizadas, se ha sido establecido que la fuente de la contaminación es el lote nº 3 de la variedad A de patata. Se han tomado todas las medidas oportunas, estableciendo la *extensión de la contaminación, el alcance de la probable contaminación, la posible propagación*, y por lo tanto la *Zona delimitada*.

En algunos casos, y según los criterios de las autoridades competentes de la Comunidad Autónoma correspondiente, podría considerarse la posibilidad de establecer como Zona delimitada un término municipal, una comarca, una provincia, o cualquier área que, por la dispersión del material contaminado, pudiera definirse.





# ***PROGRAMA NACIONAL DE INSPECCIÓN FITOSANITARIA***

## ***PROGRAMA PARA LA APLICACIÓN DE LA NORMATIVA FITOSANITARIA RELATIVA A LA PODREDUMBRE ANULAR DE LA PATATA (Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus)***

***Plan de contingencia***

## **PLAN DE CONTINGENCIA – PODREDUMBRE ANULAR DE LA PATATA**

### **1. INTRODUCCIÓN Y ALCANCE**

En el presente documento se recogen las medidas que deben adoptarse contra la necrosis bacteriana o podredumbre anular (*Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*), enfermedad de cuarentena en patata, con el fin de impedir su aparición, y en caso de que aparezca, determinar su distribución y combatirla con el fin de erradicarla.

Las medidas que se describen a continuación de acuerdo a la legislación vigente son de aplicación en todo el territorio nacional. En tanto la Comisión de las Comunidades Europeas no se pronuncie al respecto, la duración del programa se prevé ilimitada. En todo momento y como consecuencia de la situación de la enfermedad, el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino podrá introducir las modificaciones que se consideren necesarias o determinar su conclusión.

Este documento será revisado y actualizado siempre que sea necesario.

### **2. RESPONSABILIDADES**

#### **Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria)**

- Responsabilidad en la política general para la aplicación de las Directivas europeas sobre Sanidad Vegetal y su cumplimiento en el Reino de España.
- Comunicaciones con los Organismos de Sanidad Vegetal interesados
- Envío de informes a la Comisión Europea y otros estados miembros

#### **Comunidades Autónomas (Organismos competentes en Sanidad Vegetal)**

- Responsabilidad en la aplicación en campo de las Directivas europeas sobre Sanidad Vegetal
- Detección de focos y medidas de erradicación
- Envío de información al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino y a otras Comunidades Autónomas que puedan verse afectadas.

### 3. SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD

#### 3.1.- Antecedentes

La Directiva 2000/29/CEE, del Consejo de 8 de mayo, regula las medidas de protección contra la introducción en la Unión Europea de organismos nocivos para los vegetales y productos vegetales, y contra su propagación en el interior de la misma. Esta Directiva contempla la bacteriosis de cuarentena *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* (necrosis bacteriana o podredumbre anular de la patata). En la legislación española, dicha Directiva quedó transpuesta mediante el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero.

Como consecuencia de la aparición de algún foco en España de *C. michiganensis ssp. sepedonicus*, se estableció un programa de erradicación y control para este organismo. Se trata de una adaptación a las particularidades españolas de la Directiva 93/85/CEE, incorporada a la legislación española mediante la Orden Ministerial de 22 de marzo de 1994.

En los últimos años el conocimiento de esta enfermedad y sus métodos de detección e identificación han avanzado considerablemente, y la experiencia adquirida en el seguimiento y lucha contra este organismo ha provocado una revisión de determinadas disposiciones técnicas relacionadas con las medidas de control. En consecuencia se modificaron los anexos I al V de la mencionada Directiva mediante la Directiva 2006/56/CE de la Comisión, de 12 de junio de 2006, transpuesta a la legislación nacional en la Orden APA/718/2007.

En España, *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* (necrosis bacteriana o podredumbre anular) se detectó por primera vez en Castilla y León en 1994, concretamente en una plantación de patata de siembra ubicada en la provincia de Burgos. Desde entonces han ido apareciendo nuevos focos localizados, principalmente, en las provincias de Burgos y Palencia, así como casos aislados en otras Comunidades Autónomas, tales como Aragón, Cantabria, Extremadura, Galicia, La Rioja y País Vasco.

#### 3.2.- Sintomatología

Los síntomas de esta enfermedad no se suelen manifestar en las plantas hasta el final del ciclo de cultivo aunque éstas pueden estar infectadas sin presentar sintomatología alguna. A continuación se describen los síntomas en función de los órganos afectados:

- **HOJAS Y TALLOS:**

Los síntomas empiezan con marchitamiento de hojas y tallos. Generalmente son las hojas inferiores las primeras en marchitarse, enrollándose hacia arriba ligeramente en los márgenes y adquiriendo un color verde pálido. Después aparecen una manchas amarillentas en los espacios internervales. A menudo sólo uno o dos tallos de la planta manifiestan los síntomas, continuando el resto con una apariencia normal. Al cortar transversalmente un tallo afectado, se observa que los tejidos de la zona vascular son de color marrón, pudiendo aparecer un exudado blanco lechoso si se comprime.

Esta muerte que se produce al final del ciclo de cultivo, más que a la obstrucción de los vasos, se suele deber al deterioro de las raíces, que no son capaces de alimentar a la planta.

La observación de los síntomas en plantas es difícil, tanto por su variabilidad como por su manifestación tardía, pudiendo quedar enmascarados o ser confundidos con síntomas de pie negro (*Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*), mildiu (*Phytophthora infestans*), verticilosis (*Verticillium albo-atrum*), rizoctonia (*Rhizoctonia solani*) o, incluso, de sequía.

#### - TUBÉRCULOS:

La infección de los tubérculos se produce a través de los estolones, comenzando por el ombligo y avanzando por el tejido vascular. De esta forma, la podredumbre afecta en un principio a la zona que está inmediatamente debajo de la piel, dando lugar a lo que se conoce como “podredumbre anular”, y que presenta forma de anillo. Este tejido se puede desmenuzarse fácilmente.

En los tubérculos, la enfermedad se manifiesta por una coloración amarillo pálido o vítrea de los tejidos que rodean el anillo vascular (especialmente cerca del ombligo), y un oscurecimiento del propio anillo vascular, lo que se observa al realizar un corte transversal. También se pueden observar oquedades entre el anillo vascular y los tejidos colindantes. Cuando se comprime el tubérculo afectado abierto por la mitad, expele un exudado bacteriano inodoro, cremoso, dejando definida la separación entre los tejidos adyacentes y el anillo vascular. En el exterior, los tubérculos, presentan deformaciones, fisuras y decoloración castaño-rojiza.

En el caso de los tubérculos, los síntomas pueden ser confundidos con los producidos por *Ralstonia solanacearum*, pero en el caso de *Clavibacter michiganensis*, es típica la aparición de hinchamientos, hendiduras y fisuras en la zona de los “ojos”.

### 3.3.- Hospedantes

El único hospedante cultivado es la patata (*Solanum tuberosum*), aunque de forma secundaria puede afectar a los cultivos de remolacha y acelga (especie *Beta vulgaris*). De forma artificial, pueden ser inoculadas otras especies de solanáceas, entre ellas el tomate (*Lycopersicon lycopersicum*) y la berenjena (*Solanum melongena*).

### 3.4.- Formas de dispersión

El organismo sobrevive de una campaña a otra en tubérculos infectados, ya sea de almacén o en los que han quedado en el campo después de la recolección (bortas o bordas). La infección se produce a través de heridas en los tubérculos provocadas por la maquinaria de recolección y siembra, o por los cuchillos o máquinas que se usan para partir la semilla.

La principal vía de dispersión de la enfermedad es la utilización de tubérculos enfermos al efectuar la siembra.

La dispersión en campo es prácticamente nula, aunque existen evidencias experimentales de que algunos insectos, como el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) y algunos áfidos, pueden transmitir la enfermedad.

### 3.5.- Métodos de prevención y control

La capacidad de infección a partir de tubérculos infectados disminuye a medida que las temperaturas son más elevadas.

El único medio de control es la utilización de semilla libre de bacteria, acompañado de fuertes medidas sanitarias tales como:

- Utilizar patata de siembra controlada oficialmente
- Sembrar tubérculos enteros, sin trocear
- Eliminar la vegetación espontánea de los bordes de parcelas y caminos
- Eliminar las “bortas” (rebrotos de patatas del año anterior) de las fincas, evitando dejar plantas o tubérculos aislados después de la recolección.
- Establecer rotaciones amplias en las que la patata tarde en volver a cultivarse en la misma finca
- Limpieza y desinfección de aperos, almacenes y maquinaria de cualquier tipo utilizados en la siembra, cultivo, recolección y almacenaje de patata en los que se sospeche que hay restos de tubérculos afectados, utilizando productos químicos adecuados (amidas, alcoholes, lejía, etc.).
- En caso de aparición de la enfermedad, aplicar, tanto a los tubérculos como a las fincas donde se han producido, las medidas de cuarentena que establece la legislación.

## 4. PUBLICIDAD

La autoridad competente en Sanidad Vegetal de las diferentes Comunidades Autónomas debe informar puntualmente (utilizando los métodos que estime adecuados) a las personas y entidades implicadas en la producción de patatas, de la aparición en su territorio de cualquier brote infeccioso provocado por la necrosis bacteriana o podredumbre anular (*Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*). En este sentido, en el **Anexo nº 1**, se adjuntan un ejemplo de boletín de prensa, que puede ser utilizado para el caso de aparición confirmada de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*.

## 5. MEDIDAS CAUTELARES A ADOPTAR EN CASO DE SOSPECHA DE CONTAMINACIÓN

Cuando en una Comunidad Autónoma se tenga sospecha de la presencia de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, a través de los exámenes oficiales, de las notificaciones pertinentes, o de cualquier otro medio, deben adoptarse una serie de medidas cautelares orientadas a confirmar o desmentir la presencia de la enfermedad y a evitar su extensión mientras se define la situación. Estas medidas son las siguientes:

- Confirmación o desmentido de la presencia del organismo nocivo en el foco bajo sospecha de contaminación.
- Hasta tanto no se haya confirmado ni desmentido la presencia del organismo nocivo, prohibición de la circulación de las plantas y tubérculos de todos los cultivos, lotes o partidas de los que se hayan tomado las muestras, excepto bajo control oficial, y siempre que se compruebe que no existe ningún riesgo identificable de propagación del organismo. En este sentido, en el *Anexo nº 2* se adjunta un modelo de aviso al propietario y/o cultivador de la explotación o explotaciones bajo sospecha de contaminación (“aviso de medidas provisionales”).
- Determinación del origen de la sospecha de contaminación
- Establecimiento de medidas complementarias adecuadas basadas en el nivel de riesgo estimado, para evitar cualquier propagación del organismo nocivo. Estas medidas podrán incluir el control oficial de la circulación del resto del “material vegetal indicado” dentro o fuera de las instalaciones relacionadas con la sospecha de contaminación.
- Si existe riesgo de contaminación del “material vegetal indicado”, la Comunidad Autónoma en la que se haya observado la sospecha de contaminación debe informar inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino del nivel de riesgo identificado, para que éste a su vez informe a los Estados Miembros afectados. Las Comunidades Autónomas a las que se informe aplicarán las medidas preventivas que se consideren oportunas. Asimismo, en su caso, se informará al Organismo Oficial de Certificación. Para este fin se puede utilizar el modelo de comunicación recogido en el *Anexo nº 3*.

Para la consecución de estos objetivos, los representantes de los Servicios de Sanidad Vegetal y de Certificación de Patatas deben realizar una visita a la explotación o explotaciones bajo sospecha de contaminación, con el fin llevar a cabo los siguientes cometidos:

- Obtener tanta información como sea posible, incluyendo la historia del cultivo, el o los orígenes de la semilla, cualquier uso compartido de la maquinaria y detalles de cualquier movimiento de patatas en la explotación. En este sentido, se solicitarán los pasaportes y etiquetas de la semilla certificada utilizada en la siembra <sup>1</sup>
- Localizar los cultivos cercanos de patata
- Realizar un muestreo completo de todas las existencias de patata en la explotación. Las muestras que sean recogidas durante los muestreos indicados deben ser analizadas en laboratorios oficiales o bajo supervisión oficial, con el fin confirmar o desmentir la presencia del organismo. Preparar un informe detallado de la visita

Con posterioridad a la visita a la explotación o explotaciones bajo sospecha de contaminación, debe concertarse una reunión de seguimiento, en la que podrán participar, según la organización de la Comunidad Autónoma, el organismo de Sanidad Vegetal, el

---

<sup>1</sup> A fin de poder ofrecer información completa a los Organismos oficiales responsables, se conservarán registros de los vegetales, productos vegetales u otros objetos (que hayan adquirido para almacenar o plantar en las instalaciones, que estén produciendo, y que hayan enviado a terceros). Asimismo, se conservarán los documentos correspondientes durante, al menos, un año. (*Orden de 17 de mayo de 1993, publicada en el BOE de 20 de mayo de 1993*)

laboratorio de diagnóstico y el servicio de certificación de patata correspondiente. Los puntos a tratar deben ser los siguientes:

1. Discusión del informe de la visita a la explotación o explotaciones bajo sospecha de contaminación
2. Recomendaciones para la ejecución de procedimientos de control
3. Recomendaciones sobre los recursos requeridos
4. Asignación de las siguientes responsabilidades:
  - Determinación de lugares seguros de enterramiento profundo o identificación de otros medios seguros de eliminación
  - Localización en planos de los cultivos de patata cercanos
  - Obtención de un listado de las explotaciones con relación clonal con las patatas bajo sospecha
  - Obtención de un listado de explotaciones con patata de siembra que haya estado en contacto con las patatas bajo sospecha
  - Obtención de un listado de las explotaciones que hayan empleado maquinaria en común con la explotación bajo sospecha
  - Obtención de un listado de los lotes de tubérculos trasladados desde la explotación y de los lotes con los cuales es posible que hayan tenido contacto
5. Informe al Director General de la Comunidad Autónoma y al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino.

## **6. MEDIDAS A ADOPTAR EN CASO DE CONFIRMACIÓN**

### **6.1. Medidas generales para el caso de confirmación del diagnóstico**

Si la presencia de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, en una muestra tomada en cumplimiento de la legislación vigente, fuera confirmada mediante análisis de laboratorios oficiales o bajo supervisión oficial, los Organismos Oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma deberán adoptar las siguientes medidas generales:

1. Se emprenderá una investigación para determinar la extensión y la fuente o fuentes primarias de la contaminación, con arreglo a las disposiciones del **Anexo nº 4** efectuando nuevos análisis en laboratorios oficiales o bajo supervisión oficial, como mínimo, en todas las existencias de patata de siembra relacionadas de forma clonal con las muestras cuyo diagnóstico positivo ha sido confirmado.
2. Se declararán contaminados la partida o el lote del “material vegetal indicado” de los que se haya tomado la muestra, así como la maquinaria, vehículos, almacenes, y cualesquiera otros objetos (incluido el material de embalaje) que hayan estado en contacto con el mismo. Asimismo, se declararán contaminados, en su caso, el lugar o lugares de producción en los que se haya cosechado el “material vegetal indicado”, de los que proceda la muestra.
3. Se determinará, con arreglo a las disposiciones del **Anexo nº 5**, el alcance de la contaminación probable, producida por contactos anteriores o posteriores a la

cosecha, por nexos de la producción o por relaciones clonales con la contaminación declarada.

4. Se establecerá una Zona delimitada en función de la declaración de contaminación, del alcance de la contaminación probable y, con arreglo a las disposiciones del *Anexo nº 6*, de la posible propagación del organismo nocivo.

Las Comunidades Autónomas notificarán inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, a través del cauce correspondiente a los otros Estados Miembros y a la Comisión Europea, cualquier caso de contaminación declarada. La notificación referida incluirá los datos que se detallan en el *Anexo nº 7*.

Cuando el Estado español sea mencionado en la notificación de contaminación confirmada por otros Estados miembros, la autoridad competente deberá declarar la contaminación, declarar la extensión de la probable contaminación y establecer una Zona delimitada acorde a lo ya mencionado en los párrafos anteriores.

El Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino debe registrar las explotaciones, los almacenes colectivos y los centros de explotación afectados.

## **6.2. Medidas fitosanitarias a adoptar sobre el material contaminado**

Cuando exista material, vegetal o no, que haya sido declarado contaminado, los Organismos Oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma deberán adoptar las siguientes medidas:

- Cuando se trate de “material vegetal indicado” declarado contaminado, prohibir su plantación y someterlo a alguna de las medidas recogidas en el *Anexo nº 8*.
- Cuando se trate de “material vegetal indicado” considerado probablemente contaminado, prohibir su plantación y someterlo a alguna de las medidas recogidas en el *Anexo nº 9*.
- Cuando se trate de maquinaria, vehículos, naves, almacenes o unidades de éstos, y cualesquiera otros objetos, incluido el material de embalaje, declarados contaminados o considerados probablemente contaminados, serán destruidos o descontaminados, aplicando métodos apropiados conformes a lo expuesto en los *Anexos nº 8 y 9*. Tras su descontaminación, todos estos objetos dejarán de considerarse contaminados.
- En la Zona delimitada, sin perjuicio de las medidas señaladas con anterioridad, se aplicarán una serie de medidas acordes con lo dispuesto en el *Anexo nº 10*.

Las medidas fitosanitarias, ordenadas por los Organismos oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma, deben ser llevadas a cabo por el propietario del material afectado, bajo control oficial, para lo cual serán comunicadas al mismo mediante un “aviso de medidas para prevenir la enfermedad” (ver modelo en *Anexo nº 11*) En el caso de que los afectados no ejecuten, en tiempo y forma, dichas medidas, la Comunidad Autónoma correspondiente procederá a ejecutarlas, con sus propios medios o empleando servicios ajenos,

cargando los gastos correspondientes a los interesados, cuyo importe podrá ser exigido por vía de apremio, con independencia de las sanciones a que hubiere lugar.

Las Comunidades Autónomas notificarán, anualmente, los detalles de las medidas adoptadas sobre el material contaminado, al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, a través del cauce correspondiente a los otros Estados Miembros y a la Comisión Europea.

### **6.3. Medidas aplicables para evitar la contaminación mediante patata de siembra**

Las patatas de siembra deben reunir los requisitos contemplados en el Real Decreto 58/2005 y proceder, en línea directa, de patatas que, habiéndose obtenido en el marco de un programa oficialmente aprobado, hayan dado resultados negativos en cuanto a la presencia del organismo nocivo objeto del presente Plan, en análisis oficiales u oficialmente supervisados.

Los análisis mencionados deben ser realizados de acuerdo a los siguientes criterios:

- Cuando se haya confirmado la presencia del organismo nocivo objeto del presente Plan en la producción propia de patata de siembra, se debe analizar:
  - el material propagado anteriormente, incluida la selección clonal inicial y, sistemáticamente, los clones de patatas de siembra de base, o
  - cuando se haya demostrado que no existe relación clonal, el material propagado anteriormente, incluida la selección clonal inicial, o todos los clones de patatas de siembra de base.
- En el resto de casos, se deben analizar muestras representativas del material propagado anteriormente o de las patatas de siembra de base o cada una de las plantas de la selección clonal inicial.



# **ANEXOS**



## **Anexo nº 1: Proyecto de boletín de prensa (Podredumbre anular de la patata)**

### **Podredumbre anular de la patata**

Ha habido un brote de podredumbre anular de la patata en una parcela de la Comunidad Autónoma/provincia/comarca/localidad de.....

Se han recogido muestras oficiales de los tubérculos / plantas sospechosos en .....y éstas han sido confirmadas positivas en .....

La explotación en la que el brote ha aparecido ha sido delimitada de acuerdo con lo previsto en el artículo 5 de la Directiva 93/85/CEE (Artículo 5 de la Orden de 22 de marzo de 1994), sobre el control de la podredumbre anular de la patata y las demás medidas especificadas en dicha Directiva (por ejemplo, desinfección de la maquinaria, equipos y almacenes, restricciones de cultivo, dispositivo de seguridad con el material infectado, etc) han sido ejecutadas o están en curso de ejecución.

### **ENFERMEDAD DE LA PODREDUMBRE ANULAR DE LA PATATA**

La causa de la podredumbre anular de la patata es la bacteria *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp.sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.

La enfermedad no plantea riesgo alguno para la salud humana.

La confirmación del laboratorio de la presencia del organismo es esencial.

Los primeros síntomas, que aparecen generalmente tarde en el período de cultivo, pueden ser variables y consisten normalmente en marchitamientos de hojas y tallos, siendo a veces sólo unas pocas plantas en un surco infectado las

que muestran síntomas. Las hojas más bajas son las que normalmente primero se marchitan y comienzan a enrollarse levemente (hacia arriba y hacia adentro) en los márgenes y se vuelven verde pálido. Cuando la enfermedad se manifiesta se desarrollan áreas amarillentas entre los nervios de las hojas y éstas finalmente se vuelven pardas y se necrosan. Un exudado blanco lechoso se puede exprimir del anillo vascular de tubérculos y tallos cuando se seccionan transversalmente en la base por encima de cualquier decoloración (de aquí, el nombre de la enfermedad). Al exprimir los tubérculos, especialmente aquellos almacenados, segregan un exudado similar a queso cremoso o cintas desmenuzables de exudado bacteriano inodoro, dejando una separación clara de los tejidos adyacentes al tejido vascular. La bacteria puede distribuirse hacia fuera de la región vascular y provocar el que la piel se vuelva pardo rojiza y se agriete. El agrietamiento de los tubérculos facilita la invasión de organismos nocivos secundarios que incrementan el agrietamiento, enmascarando los síntomas de la podredumbre anular. Las infecciones latentes son una característica de esta enfermedad y los tubérculos de las cosechas posteriores pueden infectarse sin que aparezcan síntomas de la enfermedad en el follaje. Los tubérculos almacenados pueden permanecer sin síntomas durante largos períodos de tiempo. Los organismos nocivos invernan fundamentalmente en los tubérculos infectados, bien en los almacenados o bien en aquellos que sobreviven al invierno en el campo. Pueden también ser transportados como restos desecados en el envasado, contenedores, vehículos, maquinaria, paredes y otras superficies de almacén, etc, y pueden seguir siendo infecciosos de esta manera durante muchos meses. La infección se produce a través de las heridas, especialmente las causadas por la maquinaria y los contenedores contaminados. Las superficies de tubérculos recién cortados proporcionan un medio ideal para la transmisión de la enfermedad. En el cultivo en desarrollo, la bacteria pasa del tubérculo madre infectado a los tubérculos hijos a través del sistema vascular de los estolones.

Los aspectos importantes del control del organismo están en el empleo de patatas de siembra sanas, la detección rápida de los primeros síntomas sospechosos, la aplicación de medidas de cuarentena en parcelas y explotaciones infectadas, una rotación de cultivos adecuada y el control de bortas o rebrotes.

## Anexo n° 2: Aviso de medidas provisionales para prevenir la enfermedad

Directiva 2000/29/CE del Consejo de la Comunidad Europea, incorporada a la normativa jurídica interna por el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero (Introducción de organismos nocivos de vegetales o productos vegetales) (Prohibición). Directiva 93/85/CEE del Consejo, incorporada por Orden de 22 de marzo de 1994 relativa a la lucha contra la necrosis bacteriana de la patata.

A D/D<sup>a</sup> (Propietario/Cultivador) .....  
Dirección .....

Respecto al brote sospechoso de podredumbre anular de la patata (*Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*) en la parcela de su propiedad / cultivada por usted, e identificada con polígono catastral ....., parcela catastral ....., situada en la localidad de ....., municipio ....., provincia de .....; la parcela en cuestión está señalada en el plano adjunto.

La presente es para confirmarle la notificación verbal que le dio a Ud. D. ...., de esta Unidad o Departamento, el día ..... de ..... de ....., que de conformidad con la legislación arriba mencionada le emplaza a asegurar que todos los movimientos de plantas de patata, tubérculos y plantas para trasplante de patata, así como la entrada o salida de equipos de la explotación (tractores, maquinaria, etc) en la parcela identificada en el plano mencionado anteriormente, se suspenden de inmediato a partir de esta notificación, hasta nuevo aviso.

Firmado .....  
(Oficial/inspector/funcionario autorizado para los fines de insp.fitosanitaria)

Fecha .....

**Aviso: Cualquier persona que incumpla esta notificación será sancionada**



### Anexo nº 3: Comunicación al Organismo Oficial que certificó la patata de siembra ante la sospecha de contaminación de un lote

Directiva 2000/29/CE del Consejo de la Comunidad Europea, incorporada a la normativa jurídica interna por el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero (Introducción de organismos nocivos de vegetales o productos vegetales) (Prohibición). Directiva 93/85/CEE del Consejo, incorporada por la Orden de 22 de marzo de 1994 sobre el control de la podredumbre anular (o necrosis bacteriana) de la patata (*Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*)

A (Organismo Oficial) .....  
Dirección .....

Se ha detectado un brote sospechoso en la parcela situada en .....  
.....  
o en el almacén situado en .....

La presente es para comunicarle los datos del lote (o lotes) afectados que fueron Certificados por ese Organismo Oficial de Control:

- País de origen:
- Organismo de Control:
- Especie: *Solanum tuberosum*
- Variedad:
- Categoría
- Productor:
- Zona de producción:
- Nº de lote:
- Año de precintado:
- Cantidad:
- Pasaporte fitosanitario nº:

De acuerdo con la legislación arriba indicada, lo ponemos en su conocimiento para que comprueben el estado sanitario del citado lote (o lotes), a fin de determinar el posible origen de la contaminación.

Firmado .....  
(El Responsable Fitosanitario del Organismo Oficial de la Comunidad Autónoma)

Nota.- Si se trata de un productor y Organismo de control español, esta comunicación se hará entre los Organismos de Control Responsables de las CC.AA. afectadas. Si se trata de un productor y Organismo de control extranjero, se hará a través de la S.G.S.V. del MAPA.



## **Anexo nº 4: Elementos de investigación para determinar la extensión y la fuente/s primaria/s de la contaminación**

Los elementos de la investigación serán, cuando proceda, los siguientes lugares de producción:

- En los que se estén cultivando o se hayan cultivado patatas que estén relacionadas clónicamente con aquellas en las que se haya comprobado la infección por *Clavibacter michiganensis ssp.sepedonicus*.
- En los que se estén cultivando o se hayan cultivado patatas que se hayan puesto bajo control oficial por sospecharse la presencia de *Clavibacter michiganensis ssp.sepedonicus*.
- En los que se estén cultivando o se hayan cultivado patatas que estén relacionadas clónicamente con las que hayan sido cultivadas en lugares de producción de los que se sospeche la infección por el organismo.
- En los que se cultiven patatas que estén localizadas en las proximidades de los lugares de producción infectados, incluidos aquellos en los que se compartan equipos e instalaciones de producción directamente o por intervención de un contratista común.



## **Anexo nº 5: Elementos a tener en cuenta para la determinación del alcance de la contaminación probable por *Clavibacter michiganensis ssp.sepedonicus***

Los elementos para la determinación de la probable extensión de la contaminación, incluirán:

- El “material vegetal indicado” obtenido en un lugar de producción que haya sido declarado contaminado por *Clavibacter michiganensis ssp.sepedonicus*.
- El lugar o lugares de producción que tengan una relación de producción con el “material vegetal indicado” que haya sido declarado contaminado, incluidos aquellos lugares que compartan equipos e instalaciones de producción directamente o por intervención de un contratista común.
- El “material vegetal indicado” que se haya producido en el lugar o lugares de producción contemplados en el guión anterior o que estuviera presente en tales lugares durante el tiempo en que el “material vegetal indicado” declarado contaminado se hallara presente en los lugares de producción mencionados en el primer guión.
- Los locales que manipulen el “material vegetal indicado” procedente de los lugares de producción a los que se refieren los guiones anteriores.
- Cualquier maquinaria, vehículo, buque, almacén o unidades de éstos, y cualesquiera otros objetos (incluido el material de embalaje), que puedan haber estado en contacto con el “material vegetal indicado” declarado contaminado por alguno de los dos organismos citados, durante los doce meses anteriores a la contaminación (o durante el periodo que se considere oportuno).

- Cualquier “material vegetal indicado” que haya sido almacenado o haya estado en contacto con cualquiera de las estructuras y los objetos mencionados en el guión anterior antes de la limpieza y desinfección de éstos.
  
- Como resultado de la investigación y de los análisis que se efectúen, en el caso de las patatas, aquellos tubérculos o plantas que tengan una relación clonal fraterna o parental con el “material vegetal indicado” declarado contaminado, y con respecto a los cuales parezca probable la contaminación a través de un vínculo clonal, aunque las pruebas de detección del organismo hayan arrojado resultados negativos; pueden llevarse a cabo pruebas de variedades para verificar la identidad de los tubérculos o plantas contaminados y clonalmente relacionados.
  
- El lugar o lugares de producción del “material vegetal indicado” a que se refiere el guión anterior.

**Anexo nº 6: Elementos a tener en cuenta para la  
determinación de la posible propagación de *Clavibacter  
michiganensis ssp.sepedonicus***

Los elementos para la determinación de la posible propagación, incluirán:

- La proximidad de otros lugares de producción en los que se cultive el “material vegetal indicado”.
- La producción y utilización comunes de existencias de patatas de siembra



## **Anexo nº 7: Notificación de contaminación**

La notificación se efectuará de manera inmediata una vez que la presencia haya sido confirmada por las pruebas de laboratorio e incluirá los datos siguientes:

- El nombre de la variedad del lote de patatas
- El tipo (de consumo, de siembra, etc.) y, en su caso, la categoría de patata de siembra.

### **Requisitos de la notificación en situaciones particulares:**

- Cuando exista riesgo de contaminación del “material vegetal indicado” hacia otra u otras Comunidades Autónomas, la Comunidad Autónoma en la que se haya confirmado la presencia del organismo transmitirá inmediatamente a las Comunidades Autónomas afectadas la siguiente información:
  - Nombre de la variedad del lote de patatas
  - Nombre y dirección del expedidor y del destinatario
  - Fecha de entrega del lote de patatas
  - Tamaño del lote de patatas
  - Copia del pasaporte fitosanitario o, como mínimo, el número de pasaporte fitosanitario, cuando sea apropiado, o en su caso, el número de registro del ROPCIV y una copia del aviso de entrega.
- Cuando exista riesgo de contaminación del “material vegetal indicado” hacia otro u otros Estados Miembros, la comunidad Autónoma en la que se haya confirmado la presencia del organismo transmitirá inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino y este a su vez, a través del cauce correspondiente a los Estados Miembros afectados la siguiente información:
  - Nombre de la variedad del lote de patatas
  - Nombre y dirección del expedidor y del destinatario
  - Fecha de entrega del lote de patatas
  - Tamaño del lote de patatas

- Copia del pasaporte fitosanitario o, como mínimo, el número de pasaporte fitosanitario, cuando sea apropiado, o en su caso, el número de registro del ROPCIV y una copia del aviso de entrega.
- Cuando exista riesgo de contaminación del “material vegetal indicado” procedente de otro u otros Estados Miembros a raíz de la correspondiente notificación o notificaciones de los mismos, el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino comunicará la información recibida a las Comunidades Autónomas interesadas.

Una vez finalizadas todas las investigaciones, las Comunidades Autónomas facilitarán la siguiente información con objeto de posibilitar la notificación adicional (complementaria):

- Fecha en la que se confirmó la contaminación
- Breve descripción de la investigación llevada a cabo para identificar la fuente y la posible propagación de la contaminación, incluido el alcance del muestreo efectuado
- Información sobre la fuente o fuentes de contaminación determinada o presunta
- Detalles relativos a la extensión de la contaminación declarada, incluido el número de lugares de producción y el número de lotes, con la indicación de la variedad y, en el caso de la patatas de siembra, la categoría
- Detalles relativos a la delimitación de la zona, incluido el número de lugares de producción no declarados contaminados pero incluidos en la zona,
- Cualesquiera otros datos que requieran el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino o, en su caso, la Comisión relativos al brote o brotes confirmados.

## **Anexo n° 8: Medidas de aplicación sobre el material contaminado**

Cuando el “material vegetal indicado” se haya declarado contaminado, además de prohibirse su plantación, y con el fin de poder establecer que no exista ningún riesgo identificable de propagación de *Clavibacter michiganensis ssp.sepedonicus*, debe ser sometido alguna de las siguientes medidas:

- Incineración
- Utilización como piensos, previo tratamiento térmico adecuado, de forma que no haya riesgo alguno de supervivencia del organismo nocivo.
- Eliminación en un verterdero de eliminación de residuos autorizado oficialmente en donde no exista ningún riesgo identificable de escape del organismo al medio ambiente, por ejemplo, a través de filtración a tierras agrícolas.
- Transformación industrial mediante entrega directa e inmediata a una planta de transformación dotada de instalaciones de eliminación de residuos autorizadas oficialmente, para las que se establezca la ausencia de riesgos detectables de propagación del organismo, y de un sistema de limpieza y desinfección de los vehículos de transporte, al menos.
- Otras medidas, siempre que se haya establecido que no existe ningún riesgo identificable de propagación del organismo citado, y a condición de que tales medidas sean notificadas inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino y éste a su vez, a través del cauce correspondiente, a la Comisión y a los demás Estados miembros.

Toda maquinaria, vehículos, naves, almacenes o unidades de éstos, y cualesquiera otros objetos, incluido el material de embalaje, declarados contaminados deben ser destruidos o descontaminados. En este último caso, los métodos adecuados consistirán en una limpieza y, en su caso, una desinfección que permitan descartar todo riesgo identificable de propagación del organismo citado. Tras su descontaminación, todos estos objetos dejarán de considerarse contaminados.

Cualquier medida fitosanitaria a adoptar sobre el material contaminado debe ser realizada bajo el control y la aprobación de los Organismos oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma.

## **Anexo n° 9: Medidas de aplicación sobre el material probablemente contaminado**

Cuando el “material vegetal indicado” se haya considerado probablemente contaminado por *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, además de prohibirse su plantación, y con el fin de poder establecer que no exista ningún riesgo identificable de propagación del organismo nocivo, debe ser destinado a un uso adecuado o a su eliminación de acuerdo a alguna de las siguientes medidas:

- En el caso de los tubérculos de patata:
  - El uso como patatas de consumo destinadas al consumo, envasadas para su distribución y venta directa sin cambio de envase, en un lugar dotado de instalaciones de eliminación de residuos adecuadas. Las patatas destinadas a la siembra sólo pueden manipularse en el mismo lugar si esto se realiza separadamente o tras la limpieza y desinfección.
  - El uso como patatas de consumo para la transformación industrial, y destinadas a la entrega directa e inmediata a una planta de transformación dotada de instalaciones de eliminación de residuos adecuadas y de un sistema de limpieza y desinfección de vehículos de transporte, al menos.
  - Algún otro tipo de uso o eliminación, siempre que se establezca que no existe ningún riesgo identificable de propagación del organismo, y previa aprobación de los Organismos oficiales responsables.
  
- En el caso de las otras partes de las plantas, incluidos los detritos del tallo y de las hojas:
  - Destrucción
  - Algún otro tipo de uso o eliminación, a condición de que se garantice que no existe riesgo identificable de dispersar el organismo, y previa aprobación de los citados organismos oficiales responsables.

Toda maquinaria, vehículos, naves, almacenes o unidades de éstos, y cualesquiera otros objetos, incluido el material de embalaje, considerados

probablemente contaminados, deben ser destruidos o descontaminados. En este último caso, los métodos adecuados consistirán en una limpieza y, en su caso, una desinfección que permitan descartar todo riesgo identificable de propagación del organismo citado. Tras su descontaminación, todos estos objetos dejarán de considerarse probablemente contaminados.

Cualquier medida fitosanitaria a adoptar sobre el material considerado contaminado debe ser efectuada bajo el control de los Organismos oficiales responsables interesados, así como como con la oportuna comunicación entre estos Organismos para garantizar en todo momento dicho control, y con la aprobación del Organismo oficial de cada Comunidad Autónoma donde vayan a envasarse o transformarse las patatas, en lo que se refiere a los vertederos citados.

## **Anexo nº 10: Medidas de aplicación en las zonas delimitadas debido a la contaminación por *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus***

La serie de medidas que se deben aplicar dentro de las zonas delimitadas que se hayan establecido por causa de la contaminación por *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, serán las siguientes:

### **1. En los casos en se hayan declarado contaminados lugares de producción, las medidas consistirán en lo siguiente:**

- a) En los campos que se hayan declarado contaminados en virtud de esa misma disposición, se debe aplicar uno de los dos grupos de medidas que se exponen a continuación:

1º Durante al menos los tres años de cultivo siguientes a la declaración de la contaminación:

- Se deben adoptar medidas para eliminar las patatas espontáneas, así como otras plantas hospedantes de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*.

- No se plantarán:

- Tubérculos, plantas ni semillas propiamente dichas de patata,
- Ninguna otra planta que pueda contener naturalmente al organismo,
- Ningún cultivo que presente un cierto riesgo de supervivencia o propagación del organismo, mientras el campo no haya estado exento de plantas espontáneas de patata durante al menos dos años consecutivos.

- En la primera temporada de cultivo de patatas siguiente al período indicado en el guión anterior y, siempre que en las inspecciones oficiales se haya comprobado que, durante al menos los dos años de vegetación inmediatamente anteriores a la plantación, el campo estuvo libre de plantas de patata espontáneas y otras plantas que puedan contener naturalmente el organismo, sólo se permitirá la producción de patatas de consumo y los tubérculos recolectados se someterán a pruebas adecuadas.

- En la temporada de cultivo de patatas siguiente a la indicada en el guión anterior, y tras un ciclo de rotación adecuado, se procederá, en el caso de las patatas, a la plantación de patatas de siembra certificadas oficialmente para

la producción de patatas de siembra o de consumo, y a la realización del examen oficial preceptivo.

2º Durante los cuatro años de cultivo siguientes al de la declaración de la contaminación:

- Se adoptarán medidas para eliminar las plantas espontáneas de patata, así como otras plantas que puedan ser hospedantes de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, y
- Se dejará y mantendrá el campo, o bien en barbecho completo, o bien como pasto permanente, con siega intensa y frecuente o pastoreo intensivo.
- En la primera temporada de cultivo de patatas siguiente al período indicado en el guión anterior y, siempre que en las inspecciones oficiales se haya comprobado que, durante al menos los dos años de vegetación inmediatamente anteriores a la plantación, el campo estuvo libre de plantas de patata espontáneas y otras plantas que puedan contener naturalmente el organismo, sólo se permitirá la producción de patatas de consumo y los tubérculos recolectados se someterán a prueba conforme al procedimiento preceptivo.

b) En el resto de los campos del lugar de producción contaminado, y a condición de que los organismos oficiales competentes tengan la certeza de que se ha eliminado el riesgo de plantas de patata espontáneas y de cualquier otra planta que pueda contener naturalmente el organismo, las medidas consistirán en lo siguiente:

➤ Durante el año de cultivo siguiente a la declaración de la contaminación:

- No se plantarán tubérculos, plantas ni semillas (en sentido estricto) de patata ni otras plantas que puedan ser hospedantes de *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* o se podrán plantar exclusivamente patatas de siembra certificadas oficialmente, para la producción de patatas de consumo, y se adoptarán medidas para eliminar las plantas espontáneas de patata del modo que se considere necesario.

➤ Durante el segundo año de cultivo siguiente al de declaración de contaminación sólo se podrán plantar patatas de siembra certificadas o patatas de siembra que hayan sido sometidas a pruebas oficiales para determinar la ausencia de necrosis bacteriana y cultivadas bajo control oficial en lugares de producción no contaminados por el organismo, ya sea para la producción de siembra o de consumo.

➤ Durante el tercer año de cultivo siguiente al de declaración de contaminación, al menos, sólo se podrán plantar patatas de siembra certificadas o patatas de siembra cultivadas bajo control oficial a partir de patatas de siembra certificadas, ya sea para la producción de siembra o de consumo.

- En cada uno de los dos años de cultivo indicados en los guiones anteriores, se adoptarán medidas para eliminar las plantas espontáneas de patata, así como otras plantas que puedan ser hospedantes del organismo nocivo; además, se efectuará el examen oficial preceptivo.
- c) Inmediatamente después de haberse declarado la contaminación, y en cada uno de los años de cultivo siguientes, hasta inclusive, la primera temporada de cultivo permisible de patatas en el campo o campos declarados contaminados que se contemplan en la letra a) anterior:
  - Toda la maquinaria e instalaciones de almacenamiento del lugar de producción que se utilicen en la producción de patatas, se limpiarán, y en su caso se desinfectarán, utilizando métodos adecuados, y
- d) En el caso de las unidades de producción de cultivos protegidos que hayan sido declaradas contaminadas, y en las que sea posible una sustitución total de los medios de cultivo:
  - No se plantarán tubérculos, plantas ni semillas (en sentido estricto), a menos que, por una parte, dichas unidades se hayan sometido a medidas oficialmente supervisadas que, teniendo por objeto la eliminación del organismo nocivo y la retirada de todas las patatas y otras solanáceas, incluyendo como mínimo, un cambio completo de los medios de cultivo y una limpieza, y en su caso, una desinfección de tales unidades y de todo el equipo y que, por otra parte, los Organismos oficiales responsables hayan dado subsiguientemente su autorización para la producción de patatas.
  - La producción de patatas procederá de patatas de siembra certificadas oficialmente o de microtubérculos o microplantas obtenidos de fuentes analizadas.

**2. Dentro de la Zona delimitada, los Organismos oficiales responsables de las Comunidades Autónomas deben adoptar las siguientes medidas:**

- a) Inmediatamente después de la declaración de contaminación, velarán para que toda la maquinaria e instalaciones de almacenamiento de la explotación que hayan intervenido en la producción de patatas se limpien y desinfecten como resulte adecuado y con los métodos apropiados.
- b) Inmediatamente y durante al menos tres temporadas de cultivo después de la declaración de contaminación:
  - Controlarán a través de sus Organismos Oficiales responsables las explotaciones que cultiven, almacenen o manipulen tubérculos de patata, además de las explotaciones que contraten máquinas para este cultivo.
  - Requerirán que, para todos los cultivos de patata dentro de la zona delimitada, se planten exclusivamente semillas certificadas o semillas

cultivadas bajo control oficial, y se efectúe un análisis después de recolectar los cultivos de patatas de siembra en lugares de producción declarados probablemente contaminados.

- Exigirán que se manipulen por separado las existencias de patatas de siembra y de patatas de consumo recolectadas en todas las explotaciones de la zona, o que se establezca un sistema de limpieza y desinfección entre el manejo de las existencias de patatas de siembra y el de las de consumo.
  - Llevarán a cabo el examen oficial preceptivo.
- c) Establecerán un programa, según corresponda, para la sustitución de todas las existencias de patatas de siembra por un período de tiempo conveniente

## Anexo nº 11: Aviso de medidas para prevenir la enfermedad

Directiva 2000/29/CE del Consejo de la Comunidad Europea, incorporada a la normativa jurídica interna por el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero (Introducción de organismos nocivos de vegetales o productos vegetales) (Prohibición). Directiva 93/85/CEE del Consejo, incorporada por Orden de 22 de marzo de 1994 relativa a la lucha contra la necrosis bacteriana de la patata.

A D/D<sup>a</sup> (Propietario/Cultivador) .....  
Dirección .....

Las muestras de plantas de patata / tubérculos, recogidas en la parcela / almacén de su propiedad / cultivada / utilizado por usted, e identificada con polígono catastral ....., parcela catastral ....., situada en la localidad de ....., municipio ....., provincia de ....., han sido encontradas infectadas por podredumbre anular de la patata (*Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*) en los análisis de laboratorio. La parcela en cuestión está marcada en el plano adjunto.

Debo informarle de que en cumplimiento de la normativa citada, ahora se le requiere lo siguiente:

- 1.-
- 2.-
- 3.-
- 4.-
- 5.-
- 6.-

Firmado .....  
(Oficial/inspector/funcionario autorizado para los fines de insp.fitosanitaria)

Fecha .....

**Aviso: Cualquier persona que incumpla esta notificación será sancionada**



# ***PROGRAMA NACIONAL DE INSPECCIÓN FITOSANITARIA***

## ***PROGRAMA PARA LA APLICACIÓN DE LA NORMATIVA FITOSANITARIA RELATIVA A LA PODREDUMBRE PARDA DE LA PATATA (*Ralstonia solanacearum*)***

***Plan de contingencia***



## **PLAN DE CONTINGENCIA – PODREDUMBRE ANULAR DE LA PATATA**

### **1. INTRODUCCIÓN Y ALCANCE**

En el presente documento se recogen las medidas que deben adoptarse contra el marchitamiento bacteriano o podredumbre parda (*Ralstonia solanacearum*), enfermedad de cuarentena en patata, con el fin de impedir su aparición, y en caso de que aparezca, determinar su distribución y combatirla con el fin de erradicarla.

Las medidas que se describen a continuación de acuerdo a la legislación vigente son de aplicación en todo el territorio nacional. En tanto la Comisión de las Comunidades Europeas no se pronuncie al respecto, la duración del programa se prevé ilimitada. En todo momento y como consecuencia de la situación de la enfermedad, el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino podrá introducir las modificaciones que se consideren necesarias o determinar su conclusión.

Este documento será revisado y actualizado siempre que sea necesario.

### **2. RESPONSABILIDADES**

#### **Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria)**

- Responsabilidad en la política general para la aplicación de las Directivas europeas sobre Sanidad Vegetal y su cumplimiento en el Reino de España.
- Comunicaciones con los Organismos de Sanidad Vegetal interesados
- Envío de informes a la Comisión Europea y otros estados miembros

#### **Comunidades Autónomas (Organismos de Sanidad Vegetal)**

- Responsabilidad en la aplicación en campo de las Directivas europeas sobre Sanidad Vegetal
- Detección de focos y medidas de erradicación
- Envío de información al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino y a otras Comunidades Autónomas que puedan verse afectadas.

### 3. SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD

#### 3.1.- Antecedentes

La Directiva 2000/29/CEE, del Consejo de 8 de mayo, regula las medidas de protección contra la introducción en la Unión Europea de organismos nocivos para los vegetales y productos vegetales, y contra su propagación en el interior de la misma. Esta Directiva contempla la bacteriosis de cuarentena en el cultivo de la patata, *Ralstonia solanacearum* (marchitamiento bacteriano o podredumbre parda). En la legislación española, dicha Directiva quedó transpuesta mediante el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero.

Como consecuencia de la aparición de algún foco en España de *Ralstonia solanacearum*, se estableció un programa de erradicación y control para este organismo. Este programa de erradicación aparece reflejado en el Real Decreto 1644/1999, de 22 de octubre, que es una transposición, de la Directiva 98/57/CEE.

En los últimos años el conocimiento de esta enfermedad y sus métodos de detección e identificación han avanzado considerablemente, y la experiencia adquirida en el seguimiento y lucha contra este organismo ha provocado una revisión de determinadas disposiciones técnicas relacionadas con las medidas de control. En consecuencia se han modificado los anexos II a VII de la mencionada Directiva mediante la Directiva 2006/63/CE, transpuesta a la legislación nacional en la Orden APA/719/2007.

La bacteria *Ralstonia solanacearum* (marchitamiento bacteriano o podredumbre parda) se describió por primera vez en España en la isla de La Palma. Desde 1996, hasta la actualidad, se han detectado nuevos focos muy localizados, en las Comunidades Autónomas de Castilla y León, Galicia y País Vasco.

#### 3.2.- Sintomatología

Las infecciones sobre patata en la UE parecen estar asociadas a la raza 3 de *Ralstonia solanacearum*. El proceso infeccioso que se produce en la planta comienza con la llegada del inóculo a la raíz. La bacteria penetra desde el parénquima cortical hasta el cilindro central de la raíz, multiplicándose abundantemente. Posteriormente migra hacia el tallo, y comienza a producir abundante mucus en los vasos del xilema. La presencia de productos de degradación impide el paso de savia bruta, lo que motiva que la planta no se alimente adecuadamente. Esto provoca el marchitamiento de la planta, que puede llegar a ser irreversible, acabando con la muerte de la misma.

Las plantas afectadas muestran síntomas parecidos a los del stress hídrico. Las hojas superiores, de una o varias ramas, languidecen durante las horas de más calor, y al principio del ataque, vuelven a enderezarse por la noche. Además pueden aparecer estrías pardas en el tallo, que se extienden a partir del cuello. Si se hace un corte transversal, de los haces vasculares se libera un exudado bacteriano blanco y pegajoso. Otros síntomas en vegetación son el bronceado de las hojas, el oscurecimiento del interior de los tallos, y finalmente, la necrosis de tallos y hojas, con muerte total de la planta.

En tomate, se produce un amarilleo más o menos rápido de la planta. En el tallo se desarrollan numerosas raíces adventicias, el tejido vascular presenta decoloraciones pardas, y al cortarlo transversalmente, libera un exudado bacteriano blanco o amarillento.

El tubérculo de patata exuda de los “ojos” un mucus blanquecino cremoso, y al cortarlo transversalmente, se observa una zona parda o necrótica en el anillo vascular. Es típico que el exudado bacteriano se mezcle con la tierra y se seque, quedando adherida la mezcla a la superficie del tubérculo. La analogía de síntomas podría generar confusión con la pudrición anular originada por *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*. No obstante, un síntoma distintivo de *Clavibacter* es la aparición de hinchamientos, cráteres y/o grietas cerca de los “ojos” del tubérculo.

Los tubérculos que se forman en plantas enfermas pueden o no estar infectados. Los tubérculos infectados, a su vez, pueden o no presentar síntomas externos, dependiendo del estado de desarrollo de la enfermedad en el momento del arranque de los tubérculos.

### 3.3.- Hospedantes

Afecta principalmente a patata (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Lycopersicon lycopersicum*), pero también, aunque con menor virulencia, a otros cultivos de la familia Solanaceae, como la berenjena (*Solanum melongena*), el pimiento (*Capsicum annum*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*). Otros posibles hospedantes son las plantas espontáneas de la familia Solanaceae, como *Solanum dulcamara*, *Solanum nigrum*, la ornamental *Pelargonium hortorum*, etc. Hay que destacar por su importancia a la especie *Solanum dulcamara*, especie presente en las inmediaciones de canales y cauces fluviales, y que puede actuar como reservorio de bacterias en zonas donde el agua ha resultado contaminada.

### 3.4.- Formas de dispersión

Las vías más importantes de transmisión de la enfermedad son los tubérculos infectados leve o latentemente, así como el agua de riego contaminada; la bacteria puede permanecer en campo sobre malas hierbas (sobre todo *Solanum dulcamara*, que aparece asociada a los cauces de agua), y probablemente en lesiones de raíces de plantas no huéspedes. Otros medios de transmisión de menor importancia pueden ser la maquinaria, aperos, calzado, animales, insectos o nematodos.

### 3.5.- Métodos de prevención y control

La enfermedad es favorecida por las temperaturas elevadas, así como por los suelos deficientes en nitrógeno o en potasio, y con excesiva humedad.

Para prevenir la enfermedad se recomienda:

- Usar semilla libre de *Ralstonia*, y a ser posible, sembrar tubérculos enteros; en caso de usar semilla troceada, desinfectar los utensilios de corte.

- Hacer rotación de cultivos lo más amplia posible, no poniendo otras solanáceas en la alternativa y eliminando las malas hierbas que pueden servir de hospedantes.
- Eliminar la vegetación espontánea y malas hierbas de los bordes de parcelas y caminos.
- Eliminar las “bortas” (rebrotos de patatas del año anterior) de las fincas, evitando dejar plantas o tubérculos aislados después de la recolección.
- Limpiar y desinfectar aperos, maquinaria y almacenes con lejía, amonio cuaternario, con una solución al 10% de formaldehído o con otros bactericidas específicos.
- En caso de aparición de la enfermedad, aplicar, tanto a los tubérculos como a las fincas donde se han producido, las medidas de cuarentena que establece la legislación.

#### **4. PUBLICIDAD**

La autoridad competente en Sanidad Vegetal de las diferentes Comunidades Autónomas debe informar puntualmente (utilizando los métodos que estime adecuados) a las personas y entidades implicadas en la producción de patatas, de la aparición en su territorio de cualquier brote infeccioso provocado por el marchitamiento bacteriano o podredumbre parda (*Ralstonia solanacearum*). En este sentido, en el *Anexo nº 1*, se adjuntan un ejemplo de boletín de prensa, que puede ser utilizado para el caso de aparición confirmada de *Ralstonia solanacearum*.

#### **5. MEDIDAS CAUTELARES A ADOPTAR EN CASO DE SOSPECHA DE CONTAMINACIÓN**

Cuando en una Comunidad Autónoma se tenga sospecha de la presencia de *Ralstonia solanacearum*, a través de los exámenes oficiales, de las notificaciones pertinentes, o de cualquier otro medio, deben adoptarse una serie de medidas cautelares orientadas a confirmar o desmentir la presencia de la enfermedad y a evitar su extensión mientras se define la situación. Estas medidas son las siguientes:

- Confirmación o desmentido de la presencia del organismo nocivo en el foco bajo sospecha de contaminación.
- Hasta tanto no se haya confirmado ni desmentido la presencia del organismo nocivo, prohibición de la circulación de las plantas y tubérculos de todos los cultivos, lotes o partidas de los que se hayan tomado las muestras, excepto bajo control oficial, y siempre que se compruebe que no existe ningún riesgo identificable de propagación del organismo. En este sentido, en el *Anexo nº 2* se adjunta un modelo de aviso al propietario y/o cultivador de la explotación o explotaciones bajo sospecha de contaminación (“aviso de medidas provisionales”).
- Determinación del origen de la sospecha de contaminación
- Establecimiento de medidas complementarias adecuadas basadas en el nivel de riesgo estimado, para evitar cualquier propagación del organismo nocivo. Estas

medidas podrán incluir el control oficial de la circulación del resto del “material vegetal indicado” dentro o fuera de las instalaciones relacionadas con la sospecha de contaminación.

- Si existe riesgo de contaminación del “material vegetal indicado”, o de las aguas de superficie que procedan o se dirigen a otra Comunidad Autónoma o Estado Miembro, la Comunidad Autónoma en la que se haya observado la sospecha de contaminación debe informar inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino del nivel de riesgo identificado, para que éste a su vez informe a los Estados Miembros afectados. Las Comunidades Autónomas a las que se informe aplicarán las medidas preventivas que se consideren oportunas. Para este fin se puede utilizar el modelo de comunicación recogido en el *Anexo nº 3*.

Para la consecución de estos objetivos, los representantes de los Servicios de Sanidad Vegetal y de Certificación de Patatas deben realizar una visita a la explotación o explotaciones bajo sospecha de contaminación, con el fin llevar a cabo los siguientes cometidos:

- Obtener tanta información como sea posible, incluyendo la historia del cultivo, el o los orígenes de la semilla, cualquier uso compartido de la maquinaria y detalles de cualquier movimiento de patatas en la explotación. En este sentido, se solicitarán los pasaportes y etiquetas de la semilla certificada utilizada en la siembra <sup>1</sup>
- Localizar los cultivos cercanos de patata
- Realizar un muestreo completo de todas las existencias de patata en la explotación, y si se considera oportuno, de aguas y de solanáceas silvestres hospedantes. Las muestras que sean recogidas durante los muestreos indicados deben ser analizadas en laboratorios oficiales o bajo supervisión oficial, con el fin confirmar o desmentir la presencia del organismo. Los citados análisis de laboratorio deberán realizarse conforme a los métodos pertinentes establecidos.
- Preparar un informe detallado de la visita

Con posterioridad a la visita a la explotación o explotaciones bajo sospecha de contaminación, debe concertarse una reunión de seguimiento, en la que podrán participar, según la organización de la Comunidad Autónoma, el organismo de Sanidad Vegetal, el laboratorio de diagnóstico y el servicio de certificación de patata correspondientes. Los puntos a tratar deben ser los siguientes:

1. Discusión del informe de la visita a la explotación o explotaciones bajo sospecha de contaminación
2. Recomendaciones para la ejecución de procedimientos de control
3. Recomendaciones sobre los recursos requeridos
4. Asignación de las siguientes responsabilidades

---

<sup>1</sup> A fin de poder ofrecer información completa a los Organismos oficiales responsables, se conservarán registros de los vegetales, productos vegetales u otros objetos (que hayan adquirido para almacenar o plantar en las instalaciones, que estén produciendo, y que hayan enviado a terceros). Asimismo, se conservarán los documentos correspondientes durante, al menos, un año. (*Orden de 17 de mayo de 1993, publicada en el BOE de 20 de mayo de 1993*)

- Determinación de lugares seguros de enterramiento profundo o identificación de otros medios seguros de eliminación
- Localización en planos de los cultivos de patata cercanos
- Obtención de un listado de las explotaciones con relación clonal con las patatas bajo sospecha
- Obtención de un listado de explotaciones con patata de siembra que haya estado en contacto con las patatas bajo sospecha
- Obtención de un listado de las explotaciones que hayan empleado maquinaria en común con la explotación bajo sospecha
- Obtención de un listado de las explotaciones que empleen aguas del mismo origen
- Obtención de un listado de los lotes de tubérculos trasladados desde la explotación y de los lotes con los cuales es posible que hayan tenido contacto

5. Informe al Director General de la Comunidad Autónoma y al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

## 6. MEDIDAS A ADOPTAR EN CASO DE CONFIRMACIÓN

### 6.1. Confirmación del diagnóstico

Si la presencia de cualquiera de los organismos nocivos, objeto del presente Manual, en una muestra tomada en cumplimiento de la legislación vigente, fuera confirmada mediante análisis de laboratorios oficiales o bajo supervisión oficial, los Organismos Oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma deberán adoptar las siguientes medidas:

- a) En el caso del “material vegetal indicado”:
1. Se emprenderá una investigación para determinar la extensión y la fuente o fuentes primarias de la contaminación, con arreglo a las disposiciones del **Anexo nº 4** efectuando nuevos análisis en laboratorios oficiales o bajo supervisión oficial, como mínimo, en todas las existencias de patata de siembra relacionadas de forma clonal con las muestras cuyo diagnóstico positivo ha sido confirmado.
  2. Se declararán contaminados la partida o el lote del “material vegetal indicado” de los que se haya tomado la muestra, así como la maquinaria, vehículos, almacenes, y cualesquiera otros objetos (incluido el material de embalaje) que hayan estado en contacto con el mismo. Asimismo, se declararán contaminados, en su caso, el lugar o lugares de producción en los que se haya cosechado el “material vegetal indicado”, de los que proceda la muestra.
  3. Se determinará, con arreglo a las disposiciones del **Anexo nº 5**, el alcance de la contaminación probable, producida por contactos anteriores o posteriores a la cosecha, por nexos de la producción, riego o por relaciones clonales con la contaminación declarada.

4. Se establecerá una Zona delimitada en función de la declaración de contaminación, del alcance de la contaminación probable y, con arreglo a las disposiciones del *Anexo nº 6*, de la posible propagación de los organismos nocivos.
- b) En el caso de los cultivos de plantas hospedantes de *Ralstonia solanacearum* distintas del “material vegetal indicado”, en los que se haya identificado un riesgo para la producción de este último:
1. Se emprenderá una investigación para determinar la extensión y la fuente o fuentes primarias de la contaminación, efectuando (si procede) análisis de laboratorio oficiales o bajo supervisión oficial.
  2. Se declararán contaminadas las plantas de las que se hayan tomado muestras, y los análisis hayan arrojado un resultado positivo.
  3. Con respecto al “material vegetal indicado”, se determinará el alcance de la contaminación probable, y se delimitará una zona conforme a lo explicado en los puntos 3 y 4 del apartado a).
- c) En el caso de las aguas de superficie (incluidos los vertidos de residuos líquidos procedentes de instalaciones industriales de transformación o envasado en las que se manipule el “material vegetal indicado”) y en el de las solanáceas silvestres hospedantes de *Ralstonia solanacearum*, en las que por causa del riego (aspersión o inundación con dichas aguas), se haya identificado un riesgo para la producción del “material vegetal indicado”:
1. Se emprenderá una investigación para determinar la extensión de la contaminación, realizando en los momentos oportunos un examen oficial de muestras de las aguas de superficie, y en su caso, de las solanáceas silvestres hospedantes del organismo.
  2. Se declararán, en la medida que sea pertinente, contaminadas las aguas de superficie de las que se hayan tomado muestras.
  3. Se determinará el alcance de la contaminación probable, y se delimitará una zona en función de la declaración de contaminación, y con arreglo a las disposiciones del *Anexo nº 6*, de la posible propagación de los organismos nocivos.

Las Comunidades Autónomas notificarán inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, a través del cauce correspondiente a los otros Estados Miembros y a la Comisión Europea, cualquier caso de contaminación declarada. La notificación referida incluirá los datos que se detallan en el *Anexo nº 7*.

Cuando el Estado español sea mencionado en la notificación de contaminación confirmada por otros Estados miembros, la autoridad competente deberá declarar la contaminación, declarar la extensión de la probable contaminación y establecer una Zona delimitada acorde a lo ya mencionado en los párrafos anteriores.

El Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino debe registrar las explotaciones, los almacenes colectivos y los centros de explotación afectados.

## 6.2. Medidas fitosanitarias a adoptar sobre el material contaminado

Cuando exista material, vegetal o no, que haya sido declarado contaminado, los Organismos Oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma deberán adoptar las siguientes medidas:

- Cuando se trate de “material vegetal indicado” declarado contaminado, prohibir su plantación y someterlo a alguna de las medidas recogidas en el *Anexo nº 8*.
- Cuando se trate de “material vegetal indicado” considerado probablemente contaminado, prohibir su plantación y someterlo a alguna de las medidas recogidas en el *Anexo nº 9*.
- Cuando se trate de maquinaria, vehículos, naves, almacenes o unidades de éstos, y cualesquiera otros objetos, incluido el material de embalaje, declarados contaminados o considerados probablemente contaminados, serán destruidos o descontaminados, aplicando métodos apropiados conformes a lo expuesto en los *Anexos nº 8 y 9*. Tras su descontaminación, todos estos objetos dejarán de considerarse contaminados.
- En la Zona delimitada, sin perjuicio de las medidas señaladas con anterioridad, se aplicarán una serie de medidas acordes con lo dispuesto en el *Anexo nº 10*.

Las medidas fitosanitarias, ordenadas por los Organismos oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma, deben ser llevadas a cabo por el propietario del material afectado, bajo control oficial, para lo cual serán comunicadas al mismo mediante un “aviso de medidas para prevenir la enfermedad” (ver modelo en *Anexo nº 11*). En el caso de que los afectados no ejecuten, en tiempo y forma, dichas medidas, la Comunidad Autónoma correspondiente procederá a ejecutarlas, con sus propios medios o empleando servicios ajenos, cargando los gastos correspondientes a los interesados, cuyo importe podrá ser exigido por vía de apremio, con independencia de las sanciones a que hubiere lugar.

Las Comunidades Autónomas notificarán, anualmente, los detalles de las medidas adoptadas sobre el material contaminado, al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, a través del cauce correspondiente a los otros Estados Miembros y a la Comisión Europea.

## 6.3. Medidas aplicables para evitar la contaminación mediante patata de siembra

Las patatas de siembra deben reunir los requisitos contemplados en el Real Decreto 58/2005 y proceder, en línea directa, de patatas que, habiéndose obtenido en el marco de un programa oficialmente aprobado, hayan dado resultados negativos en cuanto a la presencia de los organismos nocivos objeto del presente Manual, en análisis oficiales u oficialmente supervisados en los que se haya utilizado el método pertinente.

Los análisis mencionados deben ser realizados de acuerdo a los siguientes criterios:

- Cuando se haya confirmado la presencia de alguno de los organismos nocivos objeto del presente Manual en la producción propia de patata de siembra, se debe analizar:
  - el material propagado anteriormente, incluida la selección clonal inicial y, sistemáticamente, los clones de patatas de siembra de base, o
  - cuando se haya demostrado que no existe relación clonal, el material propagado anteriormente, incluida la selección clonal inicial, o todos los clones de patatas de siembra de base.
  
- En el resto de casos, se deben analizar muestras representativas del material propagado anteriormente o de las patatas de siembra de base o cada una de las plantas de la selección clonal inicial.



## *Anexos*



## **Anexo nº 1: Proyecto de boletín de prensa (Podredumbre parda de la patata)**

### **Podredumbre parda de la patata.**

Ha habido un brote de podredumbre parda de la patata en una parcela de cultivo de la Comunidad Autónoma/provincia/comarca/localidad de.....

Se han recogido muestras oficiales de los tubérculos / plantas sospechosos en ..... y éstas han sido confirmadas positivas en .....

La explotación en la que ha aparecido el brote ha sido delimitada de acuerdo con lo previsto en el artículo 5 de la Directiva 98/57/CEE (Artículo 6 del Real Decreto 1644/1999), sobre el control de la podredumbre parda de la patata y las demás medidas especificadas en dicha Directiva (por ejemplo, desinfección de la maquinaria, equipos y almacenes, restricciones de cultivo, eliminación segura del material infectado, etc.) han sido ejecutadas o están en curso de ejecución.

### **ENFERMEDAD DE LA PODREDUMBRE PARDA DE LA PATATA**

La causa de la podredumbre parda de la patata es la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi.

La raza de la bacteria que esta presente en Europa y que tiene potencial para extenderse por ella tiene un limitado espectro de hospedantes, pero entre ellos se incluyen las patatas, los tomates y ls semillas de *Solanum dulcamara* (amaradulce o uva de zorro) y *Solanum nigrum* (hierba mora o tomatera del diablo).

La enfermedad no plantea riesgo alguno para la salud humana.

La bacteria puede dispersarse por el suelo y por el agua de riego. *Solanum dulcamara* es un importante hospedante alternativo ya que se le encuentra creciendo en las riberas de

los ríos y la baja tasa de crecimiento de la bacteria en las semillas le permite resistir la infección y mantener la bacteria entre los cultivos.

El primer síntoma visible de la enfermedad en los cultivos de patatas es el marchitamiento de hojas al final de los tallos durante los días calurosos con recuperación por la noche. Una decoloración parda veteada de los tallos a dos o tres centímetros por encima del nivel del suelo puede observarse cuando la enfermedad se desarrolla y las hojas tienen un tono bronceado.

La sintomatología externa puede o no ser visible en los tubérculos, dependiendo del estado de desarrollo de la enfermedad. Exudados de la bacteria a menudo emergen de los ojos y de los estolones de los tubérculos infectados. Cuando el exudado se seca, la tierra se adhiere a los tubérculos en la zona de los ojos.

La confirmación por parte del Laboratorio de la presencia del organismo es esencial.

Los aspectos importantes del control del organismo están en el empleo de patatas de siembra controladas oficialmente y sanas, la detección rápida de los primeros síntomas sospechosos, la aplicación de medidas de cuarentena en parcelas y explotaciones afectadas, una rotación de cultivos adecuada y el control de las malas hierbas y bortas hospedantes y el empleo de aguas no infectadas para el riego y pulverizaciones.

## Anexo nº 2: Aviso de medidas provisionales para prevenir la enfermedad

Directiva 2000/29/CE del Consejo de la Comunidad Europea, incorporada a la normativa jurídica interna por el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero (Introducción de organismos nocivos de vegetales o productos vegetales) (Prohibición). Directiva 98/57/CE del Consejo, incorporada por Real Decreto 1644/1999 sobre el control de *Ralstonia solanacearum*.

A D/D<sup>a</sup> (Propietario/Cultivador) .....  
Dirección .....

Respecto al brote sospechoso de podredumbre parda de la patata (*Ralstonia solanacearum*) en la parcela de su propiedad / cultivada por usted, e identificada con polígono catastral ....., parcela catastral ....., situada en la localidad de ....., municipio ....., provincia de .....; la parcela en cuestión está señalada en el plano adjunto.

La presente es para confirmarle la notificación verbal que le dio a Ud. D. ...., de esta Unidad o Departamento, el día ..... de ..... de ....., que de conformidad con la legislación arriba mencionada le emplaza a asegurar que todos los movimientos de plantas de patata, tubérculos y plantas para trasplante de patata, así como la entrada o salida de equipos de la explotación (tractores, maquinaria, etc) en la parcela identificada en el plano mencionado anteriormente, se suspenden de inmediato a partir de esta notificación, hasta nuevo aviso.

Firmado .....  
(Oficial/inspector/funcionario autorizado para los fines de insp.fitosanitaria)

Fecha .....

**Aviso: Cualquier persona que incumpla esta notificación será sancionada**



### Anexo nº 3: Comunicación al Organismo Oficial que certificó la patata de siembra ante la sospecha de contaminación de un lote

Directiva 2000/29/CE del Consejo de la Comunidad Europea, incorporada a la normativa jurídica interna por el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero (Introducción de organismos nocivos de vegetales o productos vegetales) (Prohibición). Directiva 98/57/CE del Consejo, incorporada por Real Decreto 1644/1999 sobre el control de la podredumbre parda (o marchitez bacteriana) de la patata (*Ralstonia solanacearum*)

A (Organismo Oficial) .....  
Dirección .....

Se ha detectado un brote sospechoso en la parcela situada en .....  
.....  
o en el almacén situado en .....

La presente es para comunicarle los datos del lote (o lotes) afectados que fueron Certificados por ese Organismo Oficial de Control:

- País de origen:
- Organismo de Control:
- Especie: *Solanum tuberosum*
- Variedad:
- Categoría
- Productor:
- Zona de producción:
- Nº de lote:
- Año de precintado:
- Cantidad:
- Pasaporte fitosanitario nº:

De acuerdo con la legislación arriba indicada, lo ponemos en su conocimiento para que comprueben el estado sanitario del citado lote (o lotes), a fin de determinar el posible origen de la contaminación.

Firmado .....  
(El Responsable Fitosanitario del Organismo Oficial de la Comunidad Autónoma)

Nota.- Si se trata de un productor y Organismo de control español, esta comunicación se hará entre los Organismos de Control Responsables de las CC.AA. afectadas. Si se trata de un productor y Organismo de control extranjero, se hará a través de la S.G.S.V. del MAPA.



## **Anexo nº 4: Elementos de investigación para determinar la extensión y la fuente/s primaria/s de la contaminación**

Los elementos de la investigación serán, cuando proceda, los siguientes:

### 1. Lugares de producción:

- En los que se estén cultivando o se hayan cultivado patatas que estén relacionadas clónicamente con aquellas en las que se haya comprobado la infección por *Ralstonia solanacearum*.
- En los que se estén cultivando o se hayan cultivado tomates que procedan de las mismas fuentes que aquellos en los que se haya comprobado la infección por *Ralstonia solanacearum*.
- En los que se estén cultivando o se hayan cultivado patatas o tomates, que se hayan puesto bajo control oficial por sospecharse la presencia de alguno de los organismos.
- En los que se estén cultivando o se hayan cultivado patatas que estén relacionadas clónicamente con las que hayan sido cultivadas en lugares de producción de los que se sospeche la infección por el organismo.
- En los que se cultiven patatas o tomates, que estén localizados en las proximidades de los lugares de producción infectados, incluidos aquellos en los que se compartan equipos e instalaciones de producción directamente o por intervención de un contratista común.
- En los que se utilicen, para las labores de riego o rociamiento, aguas de superficie de cualquier fuente en la que se haya confirmado o de la que se sospeche la infección por *Ralstonia solanacearum*.
- En los que se utilicen para las labores de riego o rociamiento aguas de superficie de una fuente explotada en común con lugares de producción en los que se haya confirmado o de los que se sospeche la infección por *Ralstonia solanacearum*.
- Que estén o hayan sido anegados con aguas de superficie en las que se haya confirmado o de las que se sospeche la infección por *Ralstonia solanacearum*.

### 2. Las aguas de superficie que se utilicen para el riego o rociamiento, o para la anegación, de un campo o campos, o de un lugar o lugares de producción en los que se haya confirmado la infección por *R. solanacearum*.



## **Anexo nº 5: Elementos a tener en cuenta para la determinación del alcance de la contaminación probable por *Ralstonia solanacearum***

Los elementos para la determinación de la probable extensión de la contaminación, incluirán:

- El “material vegetal indicado” obtenido en un lugar de producción que haya sido declarado contaminado por *Ralstonia solanacearum*.
- El lugar o lugares de producción que tengan una relación de producción con el “material vegetal indicado” que haya sido declarado contaminado, incluidos aquellos lugares que compartan equipos e instalaciones de producción directamente o por intervención de un contratista común.
- El “material vegetal indicado” que se haya producido en el lugar o lugares de producción contemplados en el guión anterior o que estuviera presente en tales lugares durante el tiempo en que el “material vegetal indicado” declarado contaminado se hallara presente en los lugares de producción mencionados en el primer guión.
- Las instalaciones que hayan manipulado el “material vegetal indicado” procedente de los lugares de producción a los que se refieren los guiones anteriores.
- Cualquier maquinaria, vehículo, buque, almacén o unidades de éstos y cualesquiera otros objetos (incluido el material de embalaje), que puedan haber estado en contacto con el “material vegetal indicado” declarado contaminado, durante los doce meses anteriores a la contaminación (o durante el periodo que se considere oportuno).

- Cualquier “material vegetal indicado” que haya sido almacenado o haya estado en contacto con cualquiera de las estructuras y los objetos mencionados en el guión anterior, antes de la limpieza y desinfección de éstos.
- Como resultado de la investigación y de los análisis que deben llevarse a cabo, en el caso de las patatas, aquellos tubérculos o plantas que tengan una relación clonal fraterna o parental y, en el caso del tomate, aquellas plantas que procedan de las mismas fuentes que el “material vegetal indicado” declarado contaminado, y para las cuales, aunque las pruebas de detección del organismo hayan sido negativas, parezca probable la contaminación a través de un vínculo clonal. Puede efectuarse una prueba de variedades para verificar la identidad de los tubérculos o plantas contaminados que estén relacionados clónicamente.
- El lugar o lugares de producción del “material vegetal indicado” a que se refiere el guión anterior.
- El lugar o lugares de producción del “material vegetal indicado” en los que se utilicen para las labores de riego o rociamiento, aguas que hayan sido declaradas contaminadas por *Ralstonia solanacearum*.
- El “material vegetal indicado” producido en campos anegados con aguas de superficie en las que se haya confirmado la infección por *Ralstonia solanacearum*.

## **Anexo nº 6: Elementos a tener en cuenta para la determinación de la posible propagación de *Ralstonia solanacearum***

Los elementos para la determinación de la posible propagación, incluirán:

- La proximidad de otros lugares de producción en los que se cultive el “material vegetal indicado”.
- La producción y utilización comunes de existencias de patatas de siembra
- Los lugares de producción en los que se utilicen aguas de superficie para el riego o rociamiento del “material vegetal indicado” cuando exista o haya existido el riesgo de escorrentía, o de anegamiento, de aguas superficiales procedentes de un lugar o lugares de producción que hayan sido declarados contaminados por *Ralstonia solanacearum*.
- En los casos en que se hayan declarado contaminadas aguas de superficie por *Ralstonia solanacearum*:
  - El lugar o lugares productores del “material vegetal indicado” contiguos a las aguas superficiales declaradas contaminadas, o que corran el riesgo de ser anegados con esta agua.
  - Cualquier fuente de riego separada que se comuniquen de alguna forma con las aguas superficiales declaradas contaminadas.
  - Masas de agua conectadas con el agua superficial declarada contaminada, teniendo en cuenta:
    - La dirección y el nivel de flujo del agua declarada contaminada
    - La presencia de solanáceas silvestres huésped



## **Anexo nº 7: Notificación de contaminación**

La notificación incluirá como mínimo los siguientes datos:

### **Para las patatas:**

- Nombre de la variedad del lote
- Tipo (patata de consumo, patata de siembra, etc.) y, en su caso, la categoría de la siembra

### **Para las tomatas:**

- Nombre de la variedad del lote y, en su caso, la categoría

### **Requisitos de la notificación en situaciones particulares:**

- Cuando exista riesgo de contaminación del “material vegetal indicado” hacia otra u otras Comunidades Autónomas, la Comunidad Autónoma en la que se haya confirmado la presencia del organismo transmitirá inmediatamente a las Comunidades Autónomas afectadas la siguiente información:
  - Nombre de la variedad del lote de patatas o tomatas
  - Nombre y dirección del expedidor y del destinatario
  - Fecha de entrega del lote de patatas o tomatas
  - Tamaño del lote de patatas o tomates entregados
  - Copia del pasaporte fitosanitario o, como mínimo, el número de pasaporte fitosanitario, cuando sea apropiado, o en su caso, el número de registro del ROPCIV y una copia del aviso de entrega.
- Cuando exista riesgo de contaminación del “material vegetal indicado” hacia otro u otros Estados Miembros, la comunidad Autónoma en la que se haya confirmado la presencia del organismo transmitirá inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino y este a su vez, a través del cauce correspondiente a los Estados Miembros afectados la siguiente información:
  - Nombre de la variedad del lote de patatas o tomatas
  - Nombre y dirección del expedidor y del destinatario
  - Fecha de entrega del lote de patatas o tomatas

- Tamaño del lote de patatas o tomates entregados
- Copia del pasaporte fitosanitario o, como mínimo, el número de pasaporte fitosanitario, cuando sea apropiado, o en su caso, el número de registro del ROPCIV y una copia del aviso de entrega.
- Cuando exista riesgo de contaminación del “material vegetal indicado” procedente de otro u otros Estados Miembros a raíz de la correspondiente notificación o notificaciones de los mismos, el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino comunicará la información recibida a las Comunidades Autónomas interesadas.

Una vez finalizadas todas las investigaciones, las Comunidades Autónomas facilitarán la siguiente información con objeto de posibilitar la notificación adicional (complementaria):

- Fecha en la que se confirmó la contaminación
- Breve descripción de la investigación llevada a cabo para identificar la fuente y posible propagación de la contaminación, incluido el nivel de muestreo efectuado
- Información sobre la fuente o fuentes de contaminación determinadas o presuntas
- Detalles relativos al alcance de la contaminación declarada, incluido el número de lugares de producción y, en el caso de las patatas, el número de lotes, con la indicación de la variedad y, en el caso de las patatas de siembra, la categoría
- Detalles relativos a la delimitación de la zona, incluido el número de lugares de producción no declarados contaminados pero incluidos en la zona
- Detalles relativos a la designación del agua, incluido el nombre y la ubicación de la masa de agua y el alcance de la prohibición de riego/designación
- En el caso de cualquier partida o lote de tomatas declarado contaminado, los certificados prescritos en el artículo 10, apartado 1, letra a), del Real Decreto 58/2005, y el número de pasaporte, de acuerdo con la lista que se recoge en el Anexo V, parte A, sección I, punto 2.2, del Real Decreto 58/2005.
- Cualesquiera otros datos que requiera el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino o, en su caso, la Comisión relativos al brote o los brotes confirmados.

## **Anexo n° 8: Medidas de aplicación sobre el material contaminado**

Cuando el “material vegetal indicado” se haya declarado contaminado, además de prohibirse su plantación, y con el fin de poder establecer que no exista ningún riesgo identificable de propagación de *Ralstonia solanacearum*, debe ser sometido a una de las siguientes medidas:

- Incineración
- Utilización como piensos, previo tratamiento térmico adecuado, de forma que no haya riesgo alguno de supervivencia del organismo nocivo.
- Eliminación en un verterdero de eliminación de residuos autorizado oficialmente en donde no exista ningún riesgo identificable de escape del organismo al medio ambiente, por ejemplo, a través de filtración a tierras agrícolas ni de contacto con fuentes de agua que puedan utilizarse para el riego de dichas tierras
- Transformación industrial mediante entrega directa e inmediata a una planta de transformación dotada de instalaciones de eliminación de residuos autorizadas oficialmente, para las que se establezca la ausencia de riestos detectables de propagación del organismo, y de un sistema de limpieza y desinfección de los vehículos de transporte, al menos.
- Otras medidas, siempre que se descarte el posible riesgo de propagación del organismo nocivo; dichas medidas y su justificación se notificarán inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino y este a su vez, a través del cauce correspondiente, a la Comisión y a los demás Estados Miembros.

Toda maquinaria, vehículos, naves, almacenes o unidades de éstos, y cualesquiera otros objetos, incluido el material de embalaje, declarados contaminados deben ser destruidos o descontaminados. En este último caso, los métodos adecuados consistirán en una limpieza y, en su caso, una desinfección que permitan descartar todo riesgo identificable de propagación del organismo nocivo. Tras su descontaminación, todos estos objetos dejarán de considerarse contaminados.

Cualquier medida fitosanitaria a adoptar sobre el material contaminado debe ser realizada bajo el control y la aprobación de los Organismos oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma.

## **Anexo nº 9: Medidas de aplicación sobre el material probablemente contaminado**

Cuando el “material vegetal indicado” se haya considerado probablemente contaminado por *Ralstonia solanacearum*, además de prohibirse su plantación, y con el fin de poder establecer que no exista ningún riesgo identificable de propagación del citado organismo nocivo, debe ser destinado a un uso adecuado o a su eliminación de acuerdo a alguna de las siguientes medidas:

- En el caso de los tubérculos de patata:
  - El uso como patatas de consumo destinadas al consumo, envasadas para su distribución y venta directa sin cambio de envase, en un lugar dotado de instalaciones de eliminación de residuos adecuadas. Las patatas destinadas a la siembra sólo pueden manipularse en el mismo lugar si esto se realiza separadamente o tras la limpieza y desinfección.
  - El uso como patatas de consumo para la transformación industrial, y destinadas a la entrega directa e inmediata a una planta de transformación dotada de instalaciones de eliminación de residuos adecuadas y de un sistema de limpieza y desinfección de vehículos de transporte, al menos.
  - Algún otro tipo de uso o eliminación, siempre que se establezca que no existe ningún riesgo identificable de propagación del organismo, y previa aprobación de los Organismos oficiales responsables.
  
- En el caso de las otras partes de las plantas, incluidos los detritos del tallo y de las hojas:
  - Destrucción
  - Algún otro tipo de uso o eliminación, a condición de que se garantice que no existe riesgo identificable de dispersar el organismo, y previa aprobación de los citados organismos oficiales responsables.

Toda maquinaria, vehículos, naves, almacenes o unidades de éstos, y cualesquiera otros objetos, incluido el material de embalaje, considerados

probablemente contaminados, deben ser destruidos o descontaminados. En este último caso, los métodos adecuados consistirán en una limpieza y, en su caso, una desinfección que permitan descartar todo riesgo identificable de propagación del organismo citado. Tras su descontaminación, todos estos objetos dejarán de considerarse probablemente contaminados.

Cualquier medida fitosanitaria a adoptar sobre el material considerado contaminado debe ser efectuada bajo el control de los Organismos oficiales responsables interesados, así como como con la oportuna comunicación entre estos Organismos para garantizar en todo momento dicho control, y con la aprobación del Organismo oficial de cada Comunidad Autónoma donde vayan a envasarse o transformarse las patatas, en lo que se refiere a los vertederos citados.

## **Anexo nº 10: Medidas de aplicación en las zonas delimitadas debido a la contaminación por *Ralstonia solanacearum***

La serie de medidas que se deben aplicar dentro de las zonas delimitadas que se hayan establecido por causa de la contaminación por *Ralstonia solanacearum*, serán las siguientes:

### **1. En los casos en se hayan declarado contaminados lugares de producción, las medidas consistirán en lo siguiente:**

- a) En los campos o unidades de producción de cultivos protegidos que se hayan declarado contaminados, se debe aplicar uno de los dos grupos de medidas que se exponen a continuación:

1º Durante al menos los cuatro años de cultivo siguientes a la declaración de la contaminación:

- Se deben adoptar medidas para eliminar las patatas y tomatas espontáneas así como otras plantas hospedantes de *Ralstonia solanacearum*, incluidas las malas hierbas solanáceas.

- No se plantarán:

- Tubérculos, plantas ni semillas propiamente dichas de patata
- Tomateras y semillas de tomatas

Y teniendo en cuenta la biología del organismo nocivo:

- Otras plantas hospedantes
- Plantas de especies de *Brassica* para las que exista un riesgo identificado de supervivencia del organismo nocivo.
- Otros cultivos para los que exista un riesgo identificado de propagación del organismo nocivo.

- En la primera temporada de cultivo de patatas o tomates siguiente al período indicado y, siempre que se haya comprobado que durante al menos los dos años de vegetación inmediatamente anteriores a la plantación, el campo estuvo libre de patatas y tomatas espontáneas y de otras plantas hospedantes del organismo nocivo, incluidas las malas hierbas solanáceas:

- En el caso de las patatas, solamente se autorizará la producción de patatas de consumo

- En el caso de las patatas y los tomates, los tubérculos de patata cosechados, o las tomateras, según corresponda, serán analizados.

- En la temporada de cultivo de patatas o tomates siguiente a la indicada en el guión anterior y tras un ciclo de rotación adecuado, que será de un mínimo de dos años si se cultivan patatas de siembra, se efectuará un examen oficial

2º Durante los cinco años de cultivo siguientes al de la declaración de la contaminación:

- Se adoptarán medidas para eliminar las patatas y tomateras espontáneas, así como otras plantas que puedan contener naturalmente al organismo, incluidas las malas hierbas solanáceas.

- Durante los tres primeros años, se dejará y mantendrá el campo, bien en barbecho completo, bien para el cultivo de cereales, con arreglo al riesgo que se haya determinado, bien como pasto permanente, con siega intensa y frecuente o pastoreo intensivo, o bien como pastizal para la producción de semillas y, a continuación, en los dos años subsiguientes, se plantarán plantas que no sean hospedantes del organismo nocivo para las que no exista ningún riesgo identificado de supervivencia o propagación de éste.

- En la primera temporada de cultivo de patatas o tomates siguiente al período indicado y, siempre que se haya comprobado que, durante al menos los dos años de vegetación inmediatamente anteriores a la plantación, el campo estuvo libre de patatas y tomateras espontáneas y de otras plantas huésped del organismo, incluidas las malas hierbas solanáceas:

- En el caso de las patatas, se autorizará la producción de patatas de siembra y de consumos
- Los tubérculos de patata cosechados, o las tomateras, según corresponda, serán analizados.

b) En el resto de los campos del lugar de producción contaminado, y a condición de que los organismos oficiales competentes tengan la certeza de que se ha eliminado adecuadamente el riesgo de plantas de patata y de tomate espontáneas, y de cualquier otra planta que pueda contener naturalmente el organismo, incluidas las malas hierbas solanáceas, las medidas consistirán en lo siguiente:

➤ Durante el año de cultivo siguiente a la declaración de la contaminación:

No se plantarán tubérculos, plantas ni semillas propiamente dichas de patata, ni de cualquier otra planta que pueda contener naturalmente *Ralstonia solanacearum*, o bien

- En el caso de los tubérculos de patata, se podrán plantar patata de siembra oficialmente certificada, pero sólo para la producción de patata de consumo,
  - En el caso de las tomatas, solamente se plantarán tomatas para la producción de fruto obtenidas de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, de 8 de mayo de 2000, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad.
- Durante el segundo año de cultivo siguiente al de declaración de contaminación:
- En el caso de las patatas, solamente se plantarán, para la producción de patatas de siembra o de consumo, patatas de siembra certificadas o patatas de siembra analizadas para determinar la inexistencia de podredumbre parda, y cultivadas bajo control oficial en lugares de producción diferentes a los declarados contaminados.
  - En el caso de los tomates, solamente se plantarán tomatas para la producción de plantas o fruto obtenidas de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, o si se han propagado vegetativamente, de tomatas producidas a partir de esas semillas y cultivadas bajo control oficial en lugares de producción diferentes de los mencionados.
- Durante al menos los tres años de cultivo siguientes al de declaración de contaminación:
- En el caso de las patatas, se plantarán para la producción de patatas de siembra o de consumo exclusivamente patatas de siembra certificadas o patatas de siembra que se hayan cultivado bajo control oficial a partir de patatas de siembra certificadas
  - En el caso de los tomates, solamente se plantarán tomatas para la producción de plantas o fruto, obtenidas de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/CE o tomatas cultivadas bajo control oficial a partir de estas plantas
  - En cada uno de los años de cultivo indicados en los guiones anteriores, se tomarán medidas para eliminar las plantas de patata espontáneas y otras plantas que puedan contener naturalmente al organismo, si existen, y se efectuarán una inspección oficial del cultivo en crecimiento en los momentos pertinentes y, en cada campo de patatas, se efectuarán pruebas oficiales de las patatas cosechadas
- c) Inmediatamente después de haberse declarado la contaminación, y tras el primer año de cultivo siguiente:
- Toda la maquinaria e instalaciones de almacenamiento del lugar de producción que se utilicen en la producción de patatas o tomates se limpiarán y, en su caso, desinfectarán utilizando métodos adecuados consistentes en una limpieza, y en su caso, una desinfección que permitan descartar todo riesgo identificable de propagación del organismo. Estas operaciones se efectuarán

bajo la supervisión de los organismos oficiales responsables de las Comunidades Autónomas.

- Con el fin de impedir la propagación del organismo nocivo, se efectuarán controles oficiales de los planes de riego y rociamiento, y en caso necesario, se prohibirán los mismos.
- d) En el caso de las unidades de producción de cultivos protegidos que hayan sido declaradas contaminadas, y en las que sea posible una sustitución total de los medios de cultivo:
- No se plantarán tubérculos, plantas ni semillas propiamente dichas de patata, ni otras plantas que puedan ser hésped del organismo, incluidas tomateras y semillas de tomate, a menos que, por una parte, la unidad de producción se haya sometido a medidas oficialmente supervisadas que, teniendo por objeto la eliminación del organismo nocivo y la retirada de todo el material vegetal hospedante, incluyan, como mínimo, un cambio completo de los medios de cultivo y una limpieza, y en su caso, una desinfección de tales unidades y de todo el equipo y que, por otra parte, los Organismos oficiales responsables hayan dado subsiguientemente su autorización para la producción de patatas o tomates
  - La producción procederá, en el caso de la patata, de patatas de siembra certificadas o de minitubérculos o microplantas obtenidos de fuentes analizadas.
  - En cuanto a la producción de tomates, la producción deberá proceder de semillas que cumplan los requisitos de la Directiva 2000/29/Ce, si se han propagado vegetativamente, de tomateras producidas a partir de estas semillas y cultivadas bajo control oficial
  - Asimismo, con el fin de impedir la propagación del organismo nocivo, se efectuarán controles oficiales de los planes de riego y rociamiento, y en su caso, se prohibirán los mismos.

**2. Dentro de la Zona delimitada y sin perjuicio de las medidas dispuestas en el punto 1 del presente Anexo, las Comunidades Autónomas deben adoptar las siguientes medidas:**

- a) Inmediatamente después de la declaración de contaminación, garantizarán que se limpie y desinfecte toda la maquinaria e instalaciones de almacenamiento de la explotación que se hayan utilizado para la producción de patatas y tomates, como resulte adecuado y con los métodos apropiados consistentes en una limpieza, y en su caso, una desinfección que permitan descartar todo riesgo identificable de propagación del organismo. Estas operaciones se efectuarán bajo la supervisión de los organismos oficiales responsables de las Comunidades Autónomas.
- b) Inmediatamente y durante al menos tres años de cultivo después de la declaración de contaminación:

- En los casos en que la delimitación de la Zona haya sido efectuada:
  - Se garantizará que sus organismos oficiales responsables supervisen las instalaciones que cultiven, almacenen o manipulen tubérculos de patata o tomates, así como aquellas otras instalaciones que utilicen en el marco de un contrato, maquinaria para la producción de patatas o tomates.
  - Se requerirá que, para todos los cultivos de patata dentro de la Zona delimitada, se planten exclusivamente semillas certificadas o semillas cultivadas bajo control oficial, y se efectúe un análisis después de cosechar los cultivos de patatas de siembra en lugares de producción determinados como probablemente contaminados.
  - Se exigirá que se manipulen por separado las existencias de patatas de siembra y de patatas de consumo recolectadas en todas las explotaciones de la zona o, cuando sea adecuado, que se efectúe una desinfección entre la manipulación de las existencias de patatas de siembra y de patatas de consumo.
  - Se exigirá que, para todos los cultivos de tomate de la zona, solamente se planten tomateras obtenidas de semillas que cumplan con los requisitos de la Directiva 2000/29/CE o, si se han propagado vegetativamente, de tomateras producidas a partir de estas semillas y cultivadas bajo control oficial.
  - Se efectuará el examen oficial preceptivo.
- En los casos en que se hayan declarado contaminadas aguas de superficie o en que se hayan incluido dichas aguas entre los factores de la posible propagación del organismo nocivo:
  - Se realizará un examen anual, en los momentos oportunos, con una toma de muestras de las aguas de superficie y, cuando sea oportuno, de las plantas hospedantes solanáceas presentes en las fuentes hídricas pertinentes, así como análisis con arreglo a los métodos pertinentes establecidos para el “material vegetal indicado” y para otros casos.
  - Con el fin de impedir la propagación del organismo nocivo, se deben establecer controles oficiales de los planes de riego y rociamiento, así como una prohibición del uso de las aguas declaradas contaminadas para el riego y rociamiento del “material vegetal indicado”, y en su caso, de otras plantas hospedantes. Esta prohibición podrá reexaminarse en función de los resultados obtenidos en el examen anual mencionado, y podrán revocarse las declaraciones cuando los organismos oficiales responsables tengan la certeza de que las aguas superficiales ya no están contaminadas. Podrá autorizarse el uso del agua sometida a prohibición, bajo control oficial, para el riego y el rociamiento de las plantas huéspedes, cuando se utilicen técnicas aprobadas oficialmente que eliminen el organismo y eviten su propagación.

- En los casos en que se hayan contaminado por vertidos de residuos líquidos, se deben establecer controles oficiales de la eliminación de los residuos sólidos o líquidos procedentes de las instalaciones industriales de transformación o envasado que manipulen el “material vegetal indicado”.
- c) Se establecerá, cuando sea pertinente, un programa para la sustitución en un plazo adecuado de todas las existencias de patatas de siembra.

## Anexo nº 11: Aviso de medidas para prevenir la enfermedad

Directiva 2000/29/CE del Consejo de la Comunidad Europea, incorporada a la normativa jurídica interna por el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero (Introducción de organismos nocivos de vegetales o productos vegetales) (Prohibición). Directiva 98/57/CE del Consejo, incorporada por Real Decreto 1644/1999 sobre el control de *Ralstonia solanacearum*.

A D/D<sup>a</sup> (Propietario/Cultivador) .....  
Dirección .....

Las muestras de plantas de patata / tubérculos, recogidas en la parcela / almacén de su propiedad / cultivada / utilizado por usted, e identificada con polígono catastral ....., parcela catastral ....., situada en la localidad de ....., municipio ....., provincia de ....., han sido encontradas infectadas por podredumbre parda de la patata (*Ralstonia solanacearum*) en los análisis de laboratorio. La parcela en cuestión está marcada en el plano adjunto.

Debo informarle de que en cumplimiento de la normativa citada, ahora se le requiere lo siguiente:

- 1.-
- 2.-
- 3.-
- 4.-
- 5.-
- 6.-

Firmado .....  
(Oficial/inspector/funcionario autorizado para los fines de insp.fitosanitaria)

Fecha .....

**Aviso: Cualquier persona que incumpla esta notificación será sancionada**



# **PROGRAMA NACIONAL DE INSPECCIÓN FITOSANITARIA**

## **PROGRAMA PARA LA APLICACIÓN DE LA NORMATIVA FITOSANITARIA DE LA PATATA**

***Manual de Procedimiento de Inspección  
para el control de los nematodos del quiste de la patata***

**BORRADOR**

**Diciembre 2010**



# ÍNDICE

**Pág.**

## **I. PROCEDIMIENTO GENERAL**

<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>2.- ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
<b>3.- CONTENIDO DE LA DIRECTIVA 2007/33/CE.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1- Objeto y definiciones .....</b>	<b>4</b>
<b>3.2- Elementos clave de la nueva Directiva del PCN .....</b>	<b>5</b>
<b>4.- PARCELAS OBJETO DEL PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LOS NEMATODOS DEL QUISTE DE LA PATATA.....</b>	<b>7</b>
<b>5.- MUESTREO.....</b>	<b>8</b>
<i>PERÍODO DE REALIZACIÓN DE LOS EXÁMENES OFICIALES.....</i>	<i>9</i>
<i>ACTAS DE INSPECCIÓN FITOSANITARIA.....</i>	<i>9</i>
<b>6.- ENVÍO DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO.....</b>	<b>10</b>
<b>7.- REGISTROS OFICIALES.....</b>	<b>10</b>
<b>7.1.- Notificación de resultados.....</b>	<b>10</b>
<b>8.- DECLARACIÓN DE CONTAMINACIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>9.- MEDIDAS DE CONTROL .....</b>	<b>11</b>
<b>9.1.- Restricciones en la parcela registrada oficialmente como infestada .....</b>	<b>11</b>
<i>PROGRAMA DE CONTROL OFICIAL.....</i>	<i>12</i>
<b>9.2.- Restricciones para el material contaminado .....</b>	<b>14</b>
<b>10.- LEVANTAMIENTO DE RESTRICCIONES .....</b>	<b>15</b>
<b>11.- EXCEPCIONES CON FINES CIENTÍFICOS.....</b>	<b>15</b>
<b>12.- MEDIDAS ADICIONALES .....</b>	<b>15</b>

## II. ANEXOS DEL PROCEDIMIENTO GENERAL

- Anexo n° 1: Definiciones**
- Anexo n° 2: Relación de vegetales y productos vegetales objeto de los exámenes oficiales**
- Anexo n° 3: Exenciones examen oficial**
- Anexo n° 4: Ejemplo de procedimiento de selección de parcelas en los estudios oficiales y establecimiento de criterios de riesgo**
- Anexo n° 5: Procedimiento de muestreo en los exámenes y estudios oficiales**
- Anexo n° 6: Actas de Inspección Fitosanitaria**
- Anexos n° 7: Ficha para el envío de muestras al Laboratorio de diagnóstico**
- Anexos n° 8: Notificación de los resultados de los estudios oficiales (Modelo para la presentación de los resultados)**
- Anexo n° 9: Declaración de contaminación**
- Anexo n° 10: Grados de resistencia a nematodos del quiste de la patata**
- Anexo n° 11: Protocolo para el ensayo de resistencia a nematodos del quiste de la patata**
- Anexo n° 12: Notificación del listado de variedades resistentes**
- Anexo n° 13: Notificación modificación de la resistencia**
- Anexo n° 14: Guía para la elaboración de un Programa de Control Oficial**
- Anexo n° 15: Acta de levantamiento de las restricciones**
- Anexo n° 16: Caso práctico 1**
- Anexo n° 17: Caso práctico 2**
- Anexo n° 18: Caso práctico 3**

### DOCUMENTACIÓN ADICIONAL

- Plan de contingencia de *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*

# **I. PROCEDIMIENTO GENERAL**



## 1.- INTRODUCCIÓN

*Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* son las dos especies del género *Globodera* denominadas como “nematodos del quiste de la patata” (PCN), y tienen como principal hospedante al cultivo de la patata, aunque también afectan a otras especies de solanáceas, como el pimiento, el tomate y la berenjena.

La presencia de PCN en una parcela de producción puede generar grandes pérdidas económicas llegando a reducir el rendimiento del cultivo considerablemente. La principal vía de propagación del PCN es a través del movimiento de patatas de siembra o vegetales hospedantes infectadas, replantación de vegetales procedentes de parcelas contaminadas, y contaminación del suelo a través de la maquinaria o aperos de labranza. Los nematodos también pueden ser transportados por el agua, así que existe riesgo de contaminación por agua de lavado, además de por otros residuos existentes en el suelo. Los nematodos se multiplican rápidamente en presencia de plantas huésped, en ausencia de hospedantes, las poblaciones descienden, pero más lentamente. Esta facilidad de propagación, unida además a la propia biología del organismo (los quistes que forma le otorgan gran resistencia para sobrevivir sin hospedador durante largos periodos de tiempo), hacen que el control de este organismo en campo se complique y exija una combinación de diferentes medidas de lucha, así como acciones preventivas.

La publicación de la Directiva 2007/33/CE del Consejo que deroga la anterior Directiva de Control y que obliga a adoptar disposiciones más completas, ha originado un nuevo procedimiento de control del PCN. Estas disposiciones, no sólo hacen referencia a los tubérculos de patata, sino que se han ampliado a otros vegetales hospedantes destinados a la plantación y a vegetales no hospedantes del nematodo pero que pueden propagarlo, obligándoles a la realización de inspecciones (exámenes o estudios) que garanticen la ausencia del mismo.

En el presente Manual de Procedimiento se pretenden recoger las medidas de control que deben adoptarse y aplicar en todos los Estados miembros de la Unión Europea (UE) desde el 1 de julio de 2010.

## **2.- ANTECEDENTES**

El nematodo del quiste de la patata, inicialmente identificado como el nematodo dorado (*Heterodera rostochiensis* Wollenweber), fue uno de los primeros agentes patógenos vegetales en ser objeto de una Directiva de control mediante la publicación de la Directiva 69/465/CEE del Consejo.

La Directiva exigía una investigación oficial, para garantizar que los plantones de patata destinados a la comercialización, sólo podían producirse en parcelas en las que se había comprobado que no estaban contaminadas por el nematodo dorado. En las parcelas contaminadas, las patatas o vegetales cosechados no se podían destinar a replantación, aunque se permitían excepciones para fines científicos, pruebas y trabajos de selección, así como la posible utilización de patatas de consumo en determinadas circunstancias. Además, se permitía la plantación de patata cuando se utilizaban variedades de patata totalmente resistentes, el cultivo de patata era recolectado antes de que los quistes llegaran a su madurez, el cultivo se realizaba después de la desinfección del suelo. La Orden de 28 de febrero de 1986 incorporó a la legislación española dichas medidas.

El PCN también está regulado en la Directiva 2000/29/CE, la cual reglamenta las medidas de protección contra la introducción y propagación de organismos nocivos en la Comunidad Europea. Al figurar como un organismo de cuarentena en el Anexo I AII, su introducción y propagación en la UE está prohibida. El Anexo IV de dicha Directiva exige que las patatas y las plantas con raíces destinados a la plantación, introducidos o transportados dentro de la UE, procedan de un campo o lugar de producción exento de los nematodos del quiste de la patata. Esta Directiva se incorporó al ordenamiento jurídico interno mediante el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero.

Por otro lado, la comercialización de patatas de siembra está regulada por la Directiva 2002/56/CE, que también establece requisitos fitosanitarios obligando a que, tanto el campo de producción de patatas de siembra, como los lotes de patatas de siembra clasificados, estén libres de PCN.

Desde la adopción de la Directiva 69/465/CEE se ha avanzado considerablemente en lo que respecta a la nomenclatura, la biología y la epidemiología de las especies y poblaciones de nematodos del quiste de la patata así como su patrón de distribución. En consecuencia la Directiva 2007/33/CE, relativa al control de los nematodos del quiste de la patata y por la que se deroga la Directiva 69/465/CEE fue aprobada por el Parlamento Europeo el 11 de junio 2007 y entrará en vigor el 1 de julio de 2010. El objeto de las medidas establecidas en la Directiva es determinar la distribución y evitar la propagación de los mencionados organismos nocivos, manteniéndolos bajo control. La Directiva 2007/33/CE se ha traspuesto a la legislación española mediante el Real Decreto 920/2010, de 16 de julio, por el que se establece el Programa Nacional de Control de los nematodos del quiste de la patata.

### **3.- CONTENIDO DE LA DIRECTIVA 2007/33/CE**

#### **3.1- Objeto y definiciones**

A la hora de analizar el contenido de la Directiva 2007/33/CE relativa al control de los nematodos del quiste de la patata, se debe tener en cuenta en primer lugar que las medidas planteadas contemplan diferentes niveles de riesgo en función de los distintos cultivos contemplados en la legislación. Las medidas más restrictivas se han establecido para el cultivo de la patata y los vegetales hospedantes (pimiento, tomate y berenjena) dado que aquellos vegetales que tienen un mayor riesgo de introducción y propagación del nematodo. Este material vegetal exige un control muy riguroso puesto que además de multiplicar el patógeno, lo puede transportar en replantación, extendiendo el problema.

En otro nivel de riesgo, se encuentran aquellos vegetales con raíces destinados a plantación (puerro, remolacha, repollo, fresa y espárrago), y

los bulbos, tubérculos y rizomas también destinados a plantación (chalota, cebolla, dalia, gladiolo, jacinto, lirio, azucena, narciso y tulipán). Este grupo de vegetales no son hospedantes del PCN, por lo que el nematodo no se multiplica en su presencia, sin embargo sí pueden propagarlo si han sido producidos en parcelas contaminadas y su destino es la plantación. En principio, este material está sujeto a un control y restricciones similares al anterior, pero dado que el riesgo es menor, en determinadas situaciones la legislación es menos exigente.

Una vez situado el contexto sobre el que se desarrolla el cumplimiento de las medidas, la Directiva plantea una serie de definiciones que debido a su continua utilización durante el texto necesitan de una explicación previa. En el **Anexo nº 1** son definidos una serie de conceptos de interés para la mejor comprensión de la Directiva 2007/33/CE.

### **3.2- Elementos clave de la nueva Directiva del PCN**

- **Capacita a los Estados Miembros** a definir lo que constituye una **parcela** a efectos de la Directiva 2007/33/CE. Este concepto es de suma importancia, puesto que la parcela se corresponde con la unidad de suelo en la que se va a tomar la muestra de suelo. En caso de detectar la presencia de PCN, las restricciones establecidas en la legislación se aplican a toda la parcela y al material procedente de ella. Por ello es muy importante, en aquellos casos en que se considere conveniente reducir el tamaño de la parcela, tener en cuenta que además de los criterios puramente catastrales en la definición de la parcela, es fundamental, para justificar técnicamente esta decisión, la aplicación de criterios técnicos que permitan distinguir unas parcelas de otras. Por último, el tamaño de la parcela influye en los porcentajes de muestreo de suelo que se van a aplicar, en parcelas de gran tamaño se permite utilizar porcentajes de suelo reducidos.
- Introduce el concepto de **zona definida oficialmente** en la que no existe riesgo de propagación de nematodos y en la cual se puede **eximir** de la realización de **exámenes oficiales** (ver Definición en **Anejo nº1**).
- **Armonización** en todos los Estados Miembros del **porcentaje de muestreo** en el análisis de suelo previo a la plantación. El

procedimiento permite la reducción del porcentaje de suelo en determinadas situaciones.

- **Obliga** a la realización de un análisis previo a la plantación (**exámenes oficiales**) para patatas de siembra el resto de vegetales recogidos en la Directiva, para garantizar que la parcela está libre del nematodo. Este análisis puede eximirse en condiciones de poco riesgo (**zona definida oficialmente**) o, para determinados vegetales, si existe una verificación para por parte del Organismo Oficial de ausencia de organismo.
- Realización de un **estudio oficial** anual en las parcelas de patata de consumo (al menos un 0,5%) que sirva para conocer la distribución geográfica del organismo.
- Obligación de **registrar oficialmente** los resultados de las parcelas infestadas.
- **Restricciones en parcelas contaminadas** y sobre el **material contaminado**.
  - No cultivar patatas de siembra ni vegetales hospedantes del PCN
  - Las patatas de consumo sólo se podrán cultivar en las parcelas infestadas bajo un **programa de control oficial** que suprima la población del nematodo
  - Las patatas destinadas a la industria solo se podrán cultivar si se garantiza su correcto procesado en una planta con una adecuada eliminación de residuos.
  - El resto de vegetales con raíces y los bulbos, tubérculos y rizomas con intención de transplante sólo se podrán cultivar si han sido desinfectados, lavados o cepillados mediante métodos adecuados, de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación del PCN

## 4.- PARCELAS OBJETO DEL PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LOS NEMATODOS DEL QUISTE DE LA PATATA

La Directiva 2007/33/CE establece la obligación de realizar **exámenes oficiales** en todas las parcelas en las que se vayan a plantar o almacenar:

- **Patatas de siembra** destinadas a la producción de patatas de siembra
- **Plantas hospedadoras** con raíces destinadas a plantación. Estas plantas tienen un riesgo de propagación muy alto debido a que pueden multiplicar el patógeno y a su vez propagarlo al ser vegetales destinados a plantación, por lo que están sujetas a restricciones muy similares a las de la patata de siembra
- **Vegetales con raíces, bulbos, tubérculos y rizomas destinados a plantación.** Este grupo de vegetales y productos vegetales no son plantas hospedadoras, pero tienen un riesgo potencial de propagación del nematodo dado que son cultivos que entran en rotación con el cultivo de la patata, y pueden transmitir el patógeno a otras parcelas si se producen en parcelas contaminadas. Las restricciones a las que están sujetos pueden presentar excepciones si el material vegetal es desinfectado o sometido a medidas de retirada del suelo de tal manera que no exista riesgo de propagación del nematodo.

En el **Anexo nº2** se presenta la relación detallada de géneros y especies de vegetales y productos vegetales que son objeto de exámenes oficiales relativos al nematodo del quiste de la patata.

En el **Anexo nº3** se exponen las situaciones contempladas en la legislación en las que se puede eximir de la realización de los exámenes oficiales.

Asimismo, la legislación establece que se deben realizar **estudios oficiales** en al menos un 0,5% de la superficie utilizada en el año de que se trate para la producción de **patatas que no sean las utilizadas para la producción de patata de siembra (patata de consumo)**. El objeto de

los estudios oficiales es determinar la distribución del nematodo del quiste de la patata.

El dato de la superficie de cultivo de patata del año se obtendrá de la declaración de cultivo de las ayudas de la PAC en cada Comunidad Autónoma. Para la selección de parcelas se recomienda utilizar criterios que tengan en cuenta el riesgo de propagación del nematodo, estableciendo una muestra resultante con un componente aleatorio y otro componente dirigido según criterios de riesgo de dispersión de la plaga.

En el **Anexo nº4** se detalla un ejemplo de procedimiento de selección de parcelas y establecimiento de criterios de riesgo.

## **5.- MUESTREO**

Los exámenes y estudios oficiales consistirán en un muestreo de suelo obligatorio y posterior envío al correspondiente laboratorio de diagnóstico en el que se realizarán ensayos para detectar la presencia de los nematodos del quiste de la patata.

La legislación establece unos porcentajes de muestreo de suelo que pueden ser de dos tipos: porcentaje estándar o porcentaje reducido.

En los **exámenes oficiales**, el porcentaje estándar fijado se puede reducir en parcelas con un historial de ausencia de nematodos del quiste de la patata o ausencia de plantas hospedadoras. Además, tanto si se aplica el porcentaje estándar o el porcentaje reducido, se pueden aplicar reducciones en el porcentaje de suelo recogido en parcelas de gran tamaño. Por último, se puede aplicar un porcentaje de suelo reducido en zonas declaradas libres de nematodos, diferentes de las zonas definidas oficialmente, y que deben establecerse según los criterios recogidos en la norma NIMF nº4.

Para la realización de **estudios oficiales**, se establece un porcentaje estándar que se puede reducir aplicando un muestreo selectivo de suelo si se encuentran raíces que presentan síntomas de presencia del nematodo, o en el caso de tomar suelo que haya estado en contacto con las patatas, tras la cosecha, siempre que se pueda determinar la parcela en la que se cultivaron dichas patatas.

En el **Anexo nº5** se recoge toda la información relativa al muestreo para la realización de los exámenes y estudios oficiales, en particular, en lo relativo a las condiciones de aplicación de cada porcentaje de muestreo.

### **PERÍODO DE REALIZACIÓN DE LOS EXÁMENES OFICIALES**

El **examen oficial** en las parcelas se llevará a cabo **entre la recolección de la última cosecha y la plantación de los vegetales** que son objeto del citado examen (patatas de siembra destinadas a la producción de patatas de siembra, plantas hospedadoras con raíces, otros vegetales con raíces y los bulbos, tubérculos y rizomas).

Sólo podrá llevarse a cabo con anterioridad si, en el momento del examen, no hay presencia de patatas ni de plantas hospedadoras con raíces (*Capsicum spp*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Solanum melongena*), ni se han cultivado desde entonces. Además, deben estar disponibles las pruebas documentales de los resultados del examen que confirmen que no se han detectado nematodos del quiste de la patata. Podrán considerarse pruebas documentales los resultados de los exámenes oficiales anteriores al 1 de julio de 2010 (fecha de entrada en vigor del RD /2010).

Los **estudios oficiales** se pueden realizar tanto con el terreno libre de cultivo como con presencia del mismo.

### **ACTAS DE INSPECCIÓN FITOSANITARIA**

Los Organismos Oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma deben dejar constancia de la realización de los exámenes y estudios oficiales a través de las correspondientes actas de inspección fitosanitaria. En el **Anexo nº6** se muestra un modelo de acta de inspección fitosanitaria adaptada a una inspección de parcela objeto del Programa Nacional de Control de los nematodos del quiste de la patata.

## 6.- ENVÍO DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO

Las muestras tomadas durante los exámenes y estudios oficiales que se acaban de describir deben ser enviadas al correspondiente Laboratorio de diagnóstico. Para el envío de dichas muestras al laboratorio de diagnóstico, se debe utilizar el modelo recogido en el **Anexo nº7**. Los análisis de laboratorio deben realizarse conforme a los métodos para la extracción de los nematodos del quiste de la patata descritos en los correspondientes Procedimientos fitosanitarios o Protocolos de Diagnóstico para la *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis*: normas EPPO.

Para la realización de los exámenes complementarios, a saber, extracción de quistes, identificación de especies y, si procede, determinación del patotipo/grupo de virulencia, se utilizará la totalidad de la muestra.

## 7.- REGISTROS OFICIALES

Las comunidades autónomas deben **registrar oficialmente** la información de los **resultados** (presencia o ausencia de nematodos) de las **parcelas** sometidas a **exámenes oficiales**, así como la información de las **parcelas** en las que se ha **detectado presencia** de nematodos como consecuencia de la realización de los **estudios oficiales**. Los resultados de los exámenes oficiales realizados antes del 1 de julio de 2010 (fecha de entrada en vigor del RD 920/2010) también serán objeto de este registro.

### 7.1.- Notificación de resultados

Los **resultados** de los **estudios oficiales** del período previo de 12 meses se notificarán por escrito al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, los notificará a través del cauce correspondiente, a la Comisión Europea antes del 1 de abril de cada año. En el **Anexo nº8** se establece un modelo de notificación

## 8.- DECLARACIÓN DE CONTAMINACIÓN

Cuando en una parcela se haya detectado presencia de nematodos del quiste de la patata como consecuencia de la realización del examen o estudio oficial, el organismo oficial responsable de la Comunidad Autónoma debe registrar esa información. Las **patatas** (destinadas o no a la producción de patata de siembra) o los **vegetales** objeto del programa nacional de control del quiste de la patata (ver Anexo nº1) que procedan de esa parcela o que hayan estado en contacto con suelo en el que se hayan detectado nematodos del quiste de la patata se **declararán oficialmente contaminados**.

En el **Anexo nº9** se adjunta un modelo de Declaración de contaminación del material vegetal.

## 9.- MEDIDAS DE CONTROL

La confirmación de presencia de nematodos del quiste de la patata en una parcela como consecuencia de la realización del examen o estudio oficial, obliga a tomar una serie de medidas, con el fin de evitar la dispersión de la enfermedad y mantenerlos bajo control.

Estas medidas implican restricciones tanto en la parcela registrada oficialmente como infestada, como en el destino del material vegetal declarado contaminado.

### 9.1.- Restricciones en la parcela registrada oficialmente como infestada

Cuando en una parcela que se haya registrado oficialmente como infestada como consecuencia de la realización de un examen o estudio oficial relativo al nematodo del quiste de la patata, las comunidades autónomas prescribirán las siguientes medidas preventivas:

- **No** se podrán **plantar** en la parcela **patatas de siembra** destinadas a la producción de patatas de siembra
- **No** se podrán **plantar** ni **almacenar** en la parcela los **vegetales o productos** vegetales objeto del Programa Nacional de Control del nematodo del quiste de la patata (ver Anexo nº2) destinados a **replantación**, salvo que sean desinfectados y se haya retirado el suelo, de tal forma que no exista riesgo de propagación del nematodo.

En concreto, se permitirá la plantación de aquellos vegetales con raíces, bulbos, tubérculos y rizomas de los géneros y especies: *Allium porrum*, *Beta vulgaris*, *Brassica.*, *Fragaria spp.*, *Asparagus officinalis*, *Allium ascalonicum*, *Allium cepa*, *Dahlia spp.*, *Hyacinthus spp.*, *Gladiolus Toven*, *Iris spp.*, *Lilium spp.*, *Narcissus spp.*, *Tulipa spp.* destinados a la producción de vegetales para plantar, siempre que estén sujetos a las siguientes medidas autorizadas oficialmente para eliminar el riesgo de propagación del nematodo del quiste de la patata :

- **Desinfectación** mediante los métodos adecuados de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata.
  - **Retirada del suelo** mediante lavado o cepillado hasta eliminarlo prácticamente por completo, de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata.
- Para **plantar patatas distintas de las destinadas a la producción de patatas de siembra**, los organismos oficiales responsables de las comunidades autónomas prescribirán la obligación de **someter** dichas **parcelas** a un **programa de control oficial** que tenga por objeto como mínimo la supresión de los nematodos del quiste de la patata.

### **PROGRAMA DE CONTROL OFICIAL**

Las parcelas registradas oficialmente como infestadas por el nematodo del quiste de la patata, y en las que se vayan a plantar patatas distintas de las destinadas a la producción de patatas de siembra, se deberán someter a un programa de control oficial que se notificará por escrito al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y este a su vez, lo notificará a

través del cauce correspondiente, a la Comisión Europea y a los demás Estados Miembros.

El objetivo del programa de control oficial es, como mínimo, la supresión de la población de nematodos del quiste de la patata, y tendrá en cuenta los siguientes aspectos:

- El **nivel de infestación** del nematodo.
- Las particularidades del **sistema de producción y comercialización** de las plantas hospedadoras de nematodos del quiste de la patata en la comunidad autónoma pertinente.
- Las **características** de la **población de nematodos** del quiste de la patata presente en la comunidad autónoma.
- La utilización de **variedades resistentes** que ofrezcan los niveles de resistencia más elevados de que se disponga. El grado de resistencia al nematodo del quiste de la patata se cuantificará de acuerdo con el baremo de puntuación estándar que figura en el **Anexo nº10**, y los ensayos de resistencia se efectuarán según el protocolo detallado en el **Anexo nº11**. El listado de nuevas variedades resistentes deberá ser remitido por las Comunidades Autónomas al MARM antes del 16 de enero de cada año según el modelo establecido en el **Anexo nº12**. En caso de confirmarse una degradación o variación de la eficacia de una variedad de patata resistente, se deberá notificar (**Anexo nº13**) por escrito al MARM cada año antes del 15 de diciembre.
- La aplicación de **nematicidas** autorizados en el Registro de Productos Fitosanitarios.
- La **superficie afectada** por el nematodo.
- **Otra medidas**, como por ejemplo el establecimiento de una **rotación** de cultivos (se ha comprobado que la prohibición del cultivo de patata y vegetales hospedantes disminuye la población de nematodos del quiste de la patata aproximadamente en un 20% cada año), la **utilización de cultivos trampa, lucha biológica**, etc.

En el **Anexo nº14** se presenta una guía para la elaboración de un Programa de control oficial.

## 9.2.- Restricciones para el material contaminado

En el material vegetal contaminado, las comunidades autónomas deben tomar las siguientes medidas en función del tipo de material vegetal:

- **No se plantarán** las **patatas de siembra** destinadas a la producción de patatas de siembra ni las **plantas hospedadoras con raíces** destinadas a la producción de vegetales para la plantación: *Capsicum* spp., *Lycopersicon lycopersicum* y *Solanum melongena*
  
- Las **patatas destinadas a la transformación industrial o al calibrado** estarán sujetas a medidas autorizadas oficialmente consistentes en la **entrega a una planta de transformación o calibrado** dotada de **procedimientos de eliminación de residuos** adecuadas y autorizadas oficialmente, con respecto a la cual se haya establecido la ausencia de riesgo de propagación de nematodos del quiste de la patata.
  
- Los **vegetales con raíces** *Allium porrum* L., *Beta vulgaris* L., *Brassica* spp., *Fragaria* L., *Asparagus officinalis* L.; y los **bulbos, tubérculos y rizomas** de: *Allium ascalonicum* L., *Allium cepa* L., *Dahlia* spp., *Gladiolus* Toven ex L., *Hyacinthus* spp., *Iris* spp., *Lilium* spp., *Narcissus* L., *Tulipa* L., no se plantarán a menos que se hayan sometido a las siguientes medidas aprobadas oficialmente, de tal manera que dejen de estar contaminados:
  - **Desinfectación** mediante los métodos adecuados de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata
  - **Retirada del suelo** mediante lavado o cepillado hasta eliminarlo prácticamente por completo, de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata.

## 10.- LEVANTAMIENTO DE RESTRICCIONES

En una parcela oficialmente registrada como infestada se contempla la realización de un nuevo muestreo oficial según el protocolo de muestreo descrito, tras un **período mínimo de seis años** a partir de la confirmación positiva de los nematodos del quiste de la patata o a partir del cultivo de la última cosecha de patatas. Este nuevo muestreo se debe realizar con un porcentaje estándar de muestra de suelo o con porcentaje reducido en caso de tratarse de una parcela de gran tamaño (>8 ha, ver Anexo nº5).

Si una vez llevada a cabo esta medida, no se confirma la presencia de nematodos del quiste de la patata, el organismo oficial responsable de la comunidad autónoma debe **actualizar el registro oficial** y **revocar** toda **restricción** impuesta a la parcela en cuestión (ver **Anexo nº15** Modelo de acta de levantamiento de restricciones). Este período podrá reducirse a un mínimo de tres años en el caso de que se hayan tomado medidas de control autorizadas oficialmente.

## 11.- EXCEPCIONES CON FINES CIENTÍFICOS

Sin perjuicio de las disposiciones del Real Decreto 58/2005, se podrán autorizar excepciones a lo dispuesto en el *apartado 8* del presente Manual, de conformidad con las normas establecidas para la realización de pruebas e investigaciones científicas o de estudios en materia de selección de variedades en el Real Decreto 401/1996, de 1 de marzo, y en el Real Decreto 39/1998, de 16 enero, por los que se establecen las condiciones para la introducción en el territorio nacional de determinados organismos nocivos, vegetales, productos vegetales y otros objetos, con fines de ensayo, científicos y para la actividad de selección de variedades.

## 12.- MEDIDAS ADICIONALES

Los Organismos oficiales responsables de cada Comunidad Autónoma podrán adoptar las medidas complementarias o más rigurosas que sean

necesarias para mantener los nematodos del quiste de la patata bajo control o evitar su propagación, siempre y cuando se ajusten a las disposiciones del Real Decreto 58/2005.

Las Comunidades Autónomas notificarán los detalles de las medidas adicionales adoptadas, al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, a través del cauce correspondiente, a los otros Estados Miembros y a la Comisión Europea.



## **II. ANEXOS DEL PROCEDIMIENTO GENERAL**



## Anexo nº1: Definiciones de interés

**Parcela:** porción continua de terreno perteneciente a una misma parcela o recinto, según se definen en el artículo 4 del Real Decreto 2128/2004 de 29 de octubre, por el que se regula el Sistema de Información Geográfica de las Parcelas Agrícolas que reúne las siguientes características:

- Que se destine a la plantación o almacenamiento de especies agrícolas del anexo I, patatas de siembra o patatas que no sean destinadas a la producción de patatas de siembra.
- Que sean objeto de cultivo o almacenamiento siguiendo unos mismos métodos y técnicas.
- Que esté definida espacialmente por un croquis acotado de la superficie a sembrar o almacenar. No será necesario este requisito cuando la superficie de la parcela coincida con la de parcela o recinto definidos en el artículo 4 del Real Decreto 2128/2004.

### Artículo 4 del RD 2128/2004:

a) Parcela: una superficie continua del terreno con una referencia alfanumérica única representada gráficamente en el SIGPAC.

b) Recinto: una superficie continua de terreno dentro de una parcela con un uso agrícola único de los definidos en el RD 2128/2004.

**Oficial u oficialmente:** establecido, autorizado o ejecutado por los organismos oficiales responsables de un Estado miembro, tal como se definen en el artículo 2-1.g) del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros.

Organismos oficiales responsables (Artículo 2.1.g del RD 58/2005)

1.º El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, respecto a los intercambios con terceros países y respecto de las funciones que se indican en el artículo 1.5 de este real decreto y lo dispuesto en el capítulo II del título II de la Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal.

2.º Los órganos competentes de las comunidades autónomas en los restantes casos.

Los organismos referidos podrán delegar sus funciones, que deberán realizarse bajo su responsabilidad y control, en toda persona jurídica de derecho público que, con arreglo a sus estatutos oficialmente aprobados, sea responsable exclusivamente de funciones públicas específicas.

Las comunidades autónomas comunicarán al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación los organismos competentes y las posibles delegaciones de funciones en otros entes públicos, para su comunicación a la Comisión.

**Variedad de patata resistente:** variedad que al ser cultivada inhibe notablemente el desarrollo de una población determinada de nematodos del quiste de la patata.

**Examen:** procedimiento metódico cuyo objeto es determinar la presencia de nematodos del quiste de la patata en una parcela.

**Estudio:** procedimiento metódico efectuado durante un periodo de tiempo definido cuyo objeto es determinar la distribución de nematodos del quiste de la patata en el territorio de una comunidad autónoma.

**Verificación:**

- Ausencia de historial de nematodos del quiste de la patata en la parcela durante los últimos 12 años, basada en los resultados de ensayos pertinentes autorizados oficialmente.

- Historial conocido de cultivos en el que conste que en la parcela no se han cultivado patatas ni otras plantas hospedadoras con raíces: *Capsicum spp.*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Solanum melongena*; en los últimos 12 años.

**Zona definida oficialmente:** área que ha sido determinada por los Organismos Oficiales de un Estado Miembro. En el contexto en el que nos encontramos es un lugar en el que no existe riesgo de propagación de los nematodos del quiste de la patata y en el que si se planta patata de siembra o vegetales enumerados en el Anexo I de la Directiva 2007/33/CE para su uso en el mismo lugar de producción, el examen oficial no será exigido.

Criterios utilizados para definir una zona oficialmente:

- Los vegetales producidos en esa zona se van a plantar en el mismo lugar de producción.
- El movimiento de patatas y vegetales recogidos en el Anexo I de la Directiva 2007/33/CE debe estar controlado, de tal manera que se pueda asegurar que no sean plantados en otras zonas.



## **Anexo nº 2: Relación de vegetales objeto de exámenes y medidas oficiales**

### **a) Patata de siembra destinada a la producción de patata de siembra**

### **b) Plantas hospedadoras con raíces** destinadas a la producción de vegetales para la plantación:

- *Capsicum* spp. (pimiento)
- *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karst. ex Farw. (tomate)
- *Solanum melongena* L. (berenjena)

### **c) Otros vegetales con raíces** destinados a la producción de vegetales para la plantación:

- *Allium porrum* L. (puerro)
- *Beta vulgaris* L. (remolacha y acelga)
- *Brassica* spp. (nabo, colza, col, berza, nabo gallego, etc)
- *Fragaria* L. (fresa, fresón)
- *Asparagus officinalis* L. (espárrago)

### **d) Bulbos, tubérculos y rizomas**, cultivados en suelo y destinados a la plantación, excepto aquellos ejemplares cuyo envase u otros elementos demuestren que se destinan a la venta a consumidores finales no dedicados a la producción profesional de vegetales o flores cortadas, de:

- *Allium ascalonicum* L. (chalote o chalota)
- *Allium cepa* L. (cebolla)
- *Dahlia* spp. (dalia)
- *Gladiolus* Toven ex L. (gladiolos)
- *Hyacinthus* spp. (jacintos)
- *Iris* spp. (lirios)
- *Lilium* spp. (azucenas o lirios)

- *Narcissus* L. (narciso)
- *Tulipa* L. (tulipanes)

No serán objeto de los exámenes oficiales los bulbos, tubérculos y rizomas, de los géneros y especies citados anteriormente cuando se hayan sometido a las siguientes medidas:

- **Desinfectación** mediante los métodos adecuados de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata
- **Retirada del suelo** mediante lavado o cepillado hasta eliminarlo prácticamente por completo, de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata.

### Anexo nº 3: Exenciones del examen oficial

En el caso de que los organismos oficiales responsables de las comunidades autónomas hayan establecido que no existe riesgo de propagación de los nematodos del quiste de la patata, el examen oficial no se exigirá para:

- **Plantar las plantas hospedadoras con raíces:** *Capsicum* spp. (pimiento), *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karst. ex Farw. (tomate), *Solanum melongena* L. (berenjena), **otras plantas con raíces:** *Allium porrum*, *Beta vulgaris*, *Brassica.*, *Fragaria* spp., *Asparagus officinalis*, **y los bulbos, tubérculos y rizomas:** *Allium ascalonicum*, *Allium cepa*, *Dahlia* spp., *Hyacinthus* spp., *Gladiolus Toven*, *Iris* spp., *Lilium* spp., *Narcissus* spp., *Tulipa* spp.; destinados a la producción de vegetales para la plantación para su uso en el mismo lugar de producción situado en una **zona definida oficialmente**.
- **Plantar patatas de siembra**, destinadas a la producción de patatas de siembra para su uso en el mismo lugar de producción situado en una **zona definida oficialmente**.
- Plantar los **vegetales con raíces:** *Allium porrum*, *Beta vulgaris*, *Brassica.*, *Fragaria* spp., *Asparagus officinalis*, **y los bulbos, tubérculos y rizomas:** *Allium ascalonicum*, *Allium cepa*, *Dahlia* spp., *Hyacinthus* spp., *Gladiolus Toven*, *Iris* spp., *Lilium* spp., *Narcissus* spp., *Tulipa* spp.; destinados a la producción de vegetales para plantación, cuando los vegetales cosechados se sometan a las siguientes medidas autorizadas oficialmente:
  - **Desinfestación** mediante los métodos adecuados de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata.

- **Retirada del suelo mediante lavado o cepillado hasta eliminarlo** prácticamente por completo, de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata.

La **zona definida oficialmente** es aquella en la que los organismos oficiales responsables de las comunidades autónomas puedan establecer que no existe riesgo de propagación del quiste de la patata (Mirar definición en Anexo nº1 Definiciones).

En aquellas parcelas en las que se vayan a plantar o almacenar **vegetales con raíces**: *Allium porrum*, *Beta vulgaris*, *Brassica.*, *Fragaria spp.*, *Asparagus officinalis*, **y los bulbos, tubérculos y rizomas**: *Allium ascalonicum*, *Allium cepa*, *Dahlia spp.*, *Hyacinthus spp.*, *Gladiolus Toven*, *Iris spp.*, *Lilium spp.*, *Narcissus spp.*, *Tulipa spp.*, destinados a la producción de vegetales para la plantación, el examen oficial podrá consistir en una **verificación** de que en el momento de la misma se cumple uno de los siguientes criterios:

- Ausencia de historial de nematodos del quiste de la patata en la parcela durante los últimos 12 años, basada en los resultados de ensayos pertinentes autorizados oficialmente.
- Historial conocido de cultivos en el que conste que en la parcela no se han cultivado patatas ni otras plantas hospedadoras con raíces: *Capsicum spp.*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Solanum melongena*; en los últimos 12 años.

## **Anexo nº 4: Ejemplo de procedimiento de selección de parcelas objeto de los estudios oficiales**

Los estudios oficiales se van a realizar como mínimo en el 0,5% de la superficie destinada al cultivo de la patata de consumo en cada Comunidad Autónoma. Se puede utilizar como dato de superficie del cultivo en el año, las declaraciones de las ayudas de la PAC de los productores de patata de la Comunidad Autónoma en cuestión. Para la selección de la muestra se partirá de las siguientes consideraciones:

- Excluir de la muestra aquellas parcelas destinadas a la producción de patata de consumo que el año anterior se han destinado a la producción de patata de siembra. La realización de un estudio oficial en dicha parcela supondría la duplicación de los controles ya realizados el año anterior.
- Excluir de la muestra aquellos productores de patata de consumo con una superficie total del cultivo inferior a 0,5 ha (en una o varias parcelas).

La muestra resultante tendrá un componente aleatorio y dirigido con los coeficientes que se indican a continuación:

MUESTRA ALEATORIA: 70% de los expedientes a controlar

MUESTRA DIRIGIDA: 30% de los expedientes a controlar

Para la muestra dirigida se pueden utilizar criterios de riesgo de propagación del nematodo del quiste de la patata en la selección de las parcelas. A continuación se describen algunos criterios de riesgo y ejemplos de ponderación de valores según el criterio para la selección de la muestra:

- Productores de patata de consumo que tengan parcelas en varias zonas productoras. Por ejemplo asignando un valor ponderal de 10 puntos a los expedientes con parcelas

cultivadas de patata en dos o más municipios, 5 puntos a las parcelas que tengan en el mismo municipio dos o más parcelas cultivadas de patata, y 1 punto a las que tengan una sola parcela cultivada de patata.

- Productores con parcelas de gran tamaño. Por ejemplo se puede asignar un valor ponderal de 5 puntos a las explotaciones con más de 10 ha de patata, 3 puntos a las que tengan entre 2 y 10 ha, y 1 punto a las que tengan entre 0,5 y 2 ha.
- Productores con focos declarados o pertenecientes a zonas sospechosas de contaminación. Por ejemplo se asignará un valor ponderal de 5 puntos a las explotaciones con más de tres focos de organismos de cuarentena, 3 puntos a las que tengan entre 2 y 3 focos y 1 punto a las que tengan un foco
- Productores de los que se tenga constancia de la existencia de falsedad de las declaraciones de cultivos en la declaración PAC. Por ejemplo asignando 5 puntos a las explotaciones con más de 10 ha de patata, 3 puntos a las que tengan entre 2 y 10 ha, y 1 punto a las que tengan entre 0,5 y 2 ha.

Posteriormente una vez asignados los valores por cada criterio, se obtendrá un valor ponderal total para cada expediente, como suma de los valores ponderados asignados a cada criterio, y se procederá a la selección de los expedientes dividiendo la muestra en 3 estratos en función de dicho valor ponderado. En el primer estrato se incluirán los expedientes con puntuación de 15 a 25 puntos, en el segundo estrato se incluirán los expedientes con puntuación de 10 a 15 puntos, y en el tercer estrato estarán los expedientes con una puntuación de 1 a 10 puntos.

En cada uno de los estratos se incluya aproximadamente 1/3 del número total de expedientes seleccionados, estando formada la muestra por un 60% de los expedientes del primer estrato (constituido por los expedientes con mayor valor ponderal), seleccionando el 30% de los expedientes del segundo estrato y el 10% de los expedientes del tercer

estrato. Una vez seleccionada la muestra dirigida, se procederá la selección de la muestra aleatoria.



## **Anexo nº 5: Muestreo de suelo**

Los exámenes y estudios oficiales consistirán en un muestreo de suelo obligatorio y posterior envío al correspondiente laboratorio de diagnósticos en el que se realizarán ensayos para detectar la presencia de los nematodos del quiste de la patata.

La legislación establece unos porcentajes de muestreo de suelo que pueden ser de dos tipos: porcentaje estándar o porcentaje reducido que se aplicarán en diferentes condiciones según se trate de toma de muestras para la realización de exámenes o estudios oficiales.

### **Exámenes oficiales**

#### *Porcentaje estándar*

El muestreo se realizará con una muestra de suelo de un porcentaje estándar de **1500 ml de suelo/ha** como mínimo, recogida a partir de 100 calas/ha al menos, preferiblemente en una malla rectangular de 5 metros de ancho como mínimo y 20 metros de largo como máximo entre puntos de muestreo que cubran la totalidad de la parcela.

#### *Porcentaje reducido*

El índice estándar de la muestra se podrá reducir en las siguientes situaciones:

#### ***Reducciones de la muestra por ausencia de nemátodos del quiste o ausencia de plantas hospedadoras***

El índice estándar de la muestra de suelo se podrá reducir a **400 ml de suelo/ha** como mínimo, cuando se dé alguna de las siguientes situaciones:

- Existan pruebas documentales de que no se han cultivado patatas u otras plantas hospedadoras con raíces: *Capsicum spp.*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Solanum melongena*; ni se ha constatado su presencia en la parcela durante los **seis años anteriores** al examen oficial.
- No se hayan detectado nematodos del quiste de la patata durante los **dos últimos exámenes oficiales** sucesivos en muestras de 1500 ml de suelo/ha y no se hayan cultivado patatas o plantas hospedadoras con raíces: *Capsicum spp.*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Solanum melongena*; tras el primero de los exámenes oficiales (los resultados de otros exámenes oficiales efectuados antes del 1 de julio de 2010 podrán considerarse exámenes oficiales).
- No se hayan detectado nematodos del quiste de la patata o quistes de nematodos del quiste de la patata sin contenido vivo en el **último examen oficial**, en el que se habrá tenido en cuenta una muestra de un tamaño mínimo de 1500 ml de suelo/ha, y no se hayan cultivado patatas o plantas hospedadoras con raíces: *Capsicum spp.*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Solanum melongena*; desde el último examen oficial (los resultados de otros exámenes oficiales efectuados antes del 1 de julio de 2010 podrán considerarse exámenes oficiales).

Se podrá seguir utilizando la muestra reducida mientras no se detecten nematodos del quiste de la patata en la parcela en cuestión.

### **Reducciones de la muestra en parcelas de gran tamaño**

- En parcelas con una **superficie mayor a 8 ha**, en las primeras 8 ha la muestra será la estándar de 1500 ml de suelo/ha; pero para cada hectárea adicional se podrá reducir a **400 ml de suelo/ha** como mínimo.
- En parcelas en las que se han aplicado las reducciones por ausencia de nemátodos del quiste o ausencia de plantas hospedadoras descritas en el apartado anterior y con una **superficie mayor a 4**

**ha**, en las primeras 4 ha la muestra será de 400 ml de suelo/ha; pero para cada hectárea adicional se podrá reducir a **200 ml de suelo/ha** como mínimo.

Se podrá seguir utilizando la muestra reducida mientras no se detecten nematodos del quiste de la patata en la parcela en cuestión.

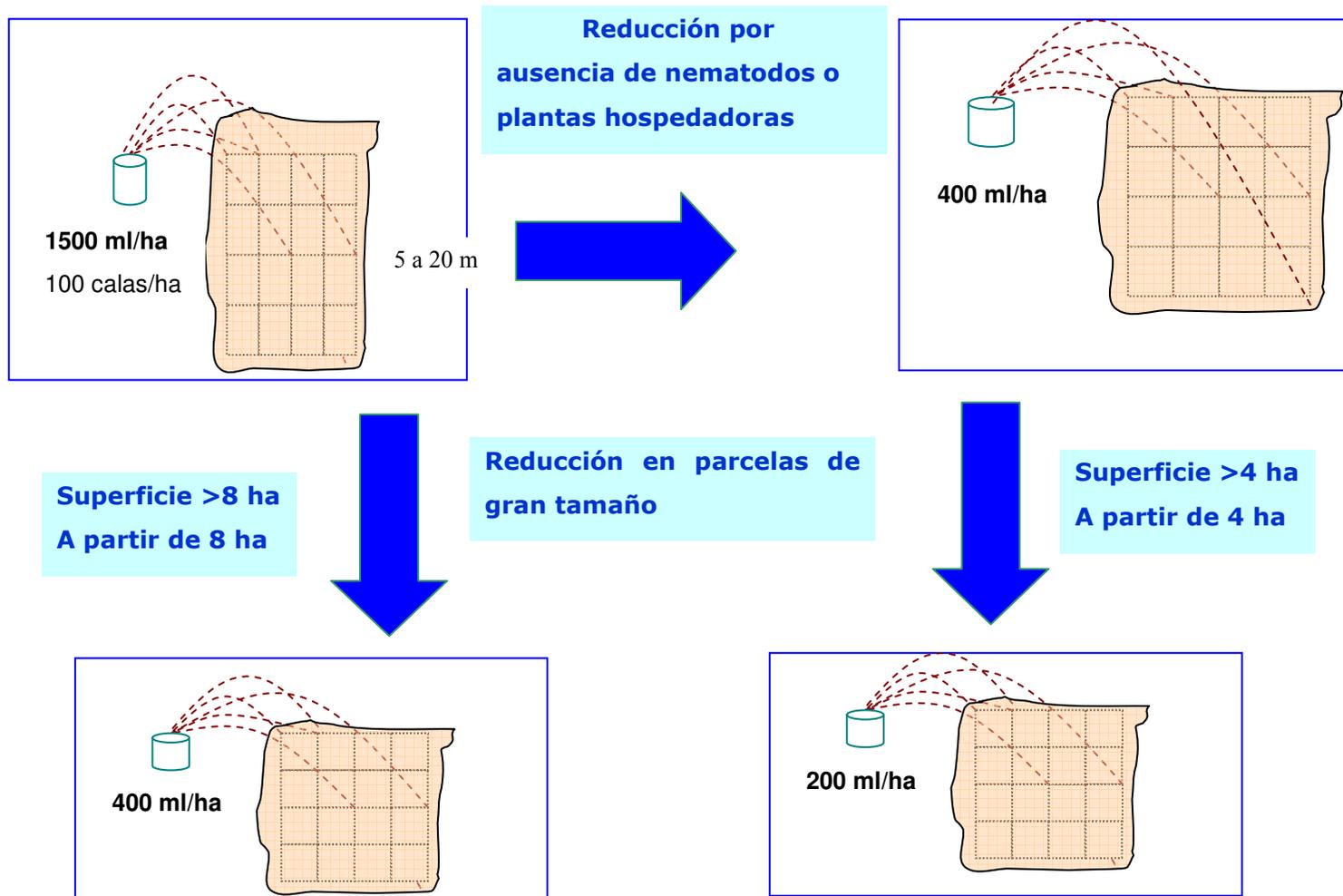
### ***Reducciones de la muestra en zonas declaradas libres de nemátodos***

El tamaño estándar de la muestra de suelo podrá reducirse hasta un mínimo de **200 ml de suelo/ha** siempre que la parcela esté localizada en una zona declarada libre de nematodos del quiste de la patata, y designada, mantenida y vigilada con arreglo a las correspondientes Normas internacionales para las medidas fitosanitarias (NIMF). Los detalles de dichas zonas serán notificadas oficialmente por escrito a la Comisión y a los demás Estados miembros por el Estado español.

### ***Tamaño mínimo de la muestra***

El tamaño mínimo de la muestra de suelo será en todos los casos de **100 ml de suelo por parcela**

## Muestreo de suelo (Exámenes oficiales)



## Estudios oficiales

### *Porcentaje estándar*

El muestreo se realizará con una muestra de suelo de un porcentaje estándar de **400 ml de suelo/ha** como mínimo, recogida a partir de 100 calas/ha al menos, **preferiblemente en una malla rectangular de 5 metros de ancho como mínimo y 20 metros de largo como máximo entre puntos de muestreo que cubran la totalidad de la parcela**. Para la realización de exámenes complementarios, como extracción de quistes, identificación de especies y, si procede, determinación del patotipo/grupo de virulencia, se utilizará la totalidad de la muestra.

El índice estándar de la muestra se podrá reducir de forma selectiva en las siguientes situaciones:

### **Muestreo selectivo**

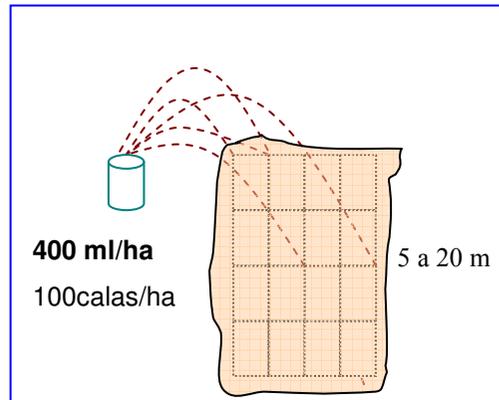
- Si el muestreo se realiza con presencia del cultivo de patatas, se realizará un examen visual de las raíces de aquellas plantas que presenten síntomas visibles de presencia de nematodos del quiste de la patata. La muestra debe contener al menos **400 ml de suelo**.
- Si el muestreo se realiza con posterioridad a la cosecha, la muestra debe constar al menos **400 ml de suelo** que haya estado en contacto con las patatas, siempre que se pueda determinar la parcela en la que se cultivaron las patatas.

### **Reducciones máximas de la muestra**

El tamaño mínimo de la muestra de suelo será en todos los casos de **100 ml de suelo por parcela**.

## Muestreo de suelo (Estudios oficiales)

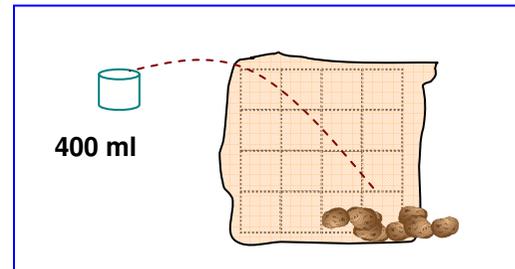
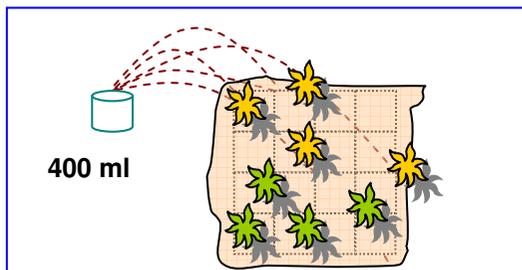
Porcentaje estándar



Porcentaje reducido  
Muestreo selectivo

Suelo procedente de raíces que presenten síntomas

Suelo que haya estado en contacto con las patatas



**CUADRO RESUMEN DEL MUESTREO PARA EL CONTROL DE LOS NEMATODOS DEL QUISTE DE LA PATATA**

	Porcentaje estándar	Porcentaje reducido			
		Ausencia de nematodos o plantas hospedadoras	Parcelas de gran tamaño	Zonas libres del nematodo	Muestreo selectivo
<b>Exámenes oficiales</b>	1500 ml/ha	400 ml/ha	<p>➤ <b>Superficie &gt; 8 ha</b> Las primeras 8 ha: porcentaje estándar Cada ha adicional 400 ml/ha</p>	200 ml/ha	
			<p>➤ <b>Superficie &gt; 4ha</b> y reducción por ausencia de nematodos o plantas hospedadoras Las primeras 4 ha: porcentaje reducido 400 ml/ha Cada ha adicional 200 ml/ha</p>		
<b>Estudios oficiales</b>	400 ml/ha				400 ml de suelo



**Anexo nº 6: Acta de inspección fitosanitaria**

A las \_\_\_\_\_ horas del día \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_, en la localidad de \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ ), el Inspector Fitosanitario D. \_\_\_\_\_ en presencia de D. \_\_\_\_\_ en calidad de \_\_\_\_\_, procede al examen oficial / estudio oficial de la explotación \_\_\_\_\_ con Dirección \_\_\_\_\_ en la Localidad \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ ) llevando a cabo las siguientes actuaciones:

<b>DATOS GENERALES DE LA PARCELA</b>		
Superficie total (ha): _____		
Paraje	Polígono SIGPAC	
Municipio	Parcela SIGPAC	
Provincia	Recinto SIGPAC	
Otros datos de localización: _____		
<b>TOMA DE MUESTRAS</b>		
<input type="checkbox"/> sí <input type="checkbox"/> no		
<b>MATERIAL INSPECCIONADO</b>		
<b>PARCELA SIN CULTIVO:</b> <input type="checkbox"/> Cultivo que se va a plantar _____		
<b>PARCELA CON CULTIVO DE<sup>1</sup>:</b>		
<b>PATATA</b> ( <i>Solanum tuberosum</i> ):	<input type="checkbox"/> tubérculo <input type="checkbox"/> siembra <input type="checkbox"/> cultivo en crecimiento <input type="checkbox"/> consumo	
<b>PLANTAS HOSPEDADORAS DESTINADAS A PLANTACIÓN:</b>		
TOMATE ( <i>Lycopersicon lycopersicum</i> ): <input type="checkbox"/>	PIMIENTO ( <i>Capsicum spp.</i> ): <input type="checkbox"/>	BERENJENA ( <i>Solanum melongena</i> ): <input type="checkbox"/>
<b>OTRAS VEGETALES CON RAÍCES:</b>		
<i>Allium porrum</i> L. (puerro) <input type="checkbox"/>	<i>Beta vulgaris</i> L. (remolacha y acelga) <input type="checkbox"/>	
<i>Brassica spp.</i> (nabo, colza, col, berza, nabo gallego, etc) <input type="checkbox"/>	<i>Fragaria</i> L. (fresa, fresón) <input type="checkbox"/>	
<i>Asparagus officinalis</i> L. (espárrago) <input type="checkbox"/>		
<b>BULBOS, TUBERCULOS Y RIZOMAS:</b>		
<i>Allium ascalonicum</i> L. (chalote o chalota) <input type="checkbox"/>	<i>Allium cepa</i> L. (cebolla) <input type="checkbox"/>	
<i>Dahlia spp.</i> (dalia) <input type="checkbox"/>	<i>Gladiolus Toven ex L.</i> (gladiolos) <input type="checkbox"/>	
<i>Hyacinthus spp.</i> (jacintos) <input type="checkbox"/>	<i>Iris spp.</i> (lirios) <input type="checkbox"/>	
<i>Lilium spp.</i> (azucenas o lirios) <input type="checkbox"/>	<i>Narcissus</i> L. (narciso) <input type="checkbox"/>	
<i>Tulipa</i> L. (tulipanes) <input type="checkbox"/>		
<b>TIERRA QUE HA ESTADO EN CONTACTO CON LAS PATATAS<sup>2</sup>:</b> <input type="checkbox"/>		

<sup>1</sup> Sólo en caso de sospecha de presencia de nematodos del quiste de la patata durante el cultivo

<sup>2</sup> En los estudios oficiales, se podrá tomar muestra de suelo después de la cosecha, tierra que ha estado en contacto con las patatas, siempre y cuando se pueda determinar la parcela en la que se cultivaron



**A. TOMA DE MUESTRAS (FICHA)<sup>3</sup>:**

Parcela/Polígono/Recinto	Código asignado a la muestra
Motivo de la toma de muestra:	
Muestras Reglamentarias <input type="checkbox"/>	Confirmación de síntomas visuales <input type="checkbox"/>
Muestra de suelo	
Volumen de la muestra (ml) _____	
Análisis requeridos:	
Nombre del inspector _____	
Fecha de la toma de muestra _____	
Punto de la toma de muestra:	
- Término municipal _____	
- Provincia _____	
Datos del productor/comerciante:	
- Explotación _____	
- Número de Registro __ __/__ __ __ __	
- Dirección _____	
- Localidad _____	
- Provincia _____	
Laboratorio donde se remite:	
Fecha de remisión:	
Observaciones:	

(Se rellenará el número de hojas necesarias)

\_\_\_\_\_

<sup>3</sup> La toma de muestras de suelo es obligatoria cuando se realiza un examen/estudio oficial como consecuencia del Programa de control de los nematodos del quiste de la patata



## Anexo nº 7: Ficha para el envío de muestras al Laboratorio de diagnóstico

<b>NOMBRE DEL LABORATORIO:</b>	
<b>Persona de contacto:</b>	
<b>Dirección:</b>	
<b>Tfno.:</b>	<b>Fax:</b>
<b>E-MAIL:</b>	
* Nº Registro	
* Fecha llegada al laboratorio	
* Fecha informe resultados	
<b><u>DATOS DE LA MUESTRA</u></b>	
Fecha de toma de muestras .....	
Volumen de la muestra (ml):	
Porcentaje de suelo (ml/ha) :	<input type="checkbox"/> 1.500 <input type="checkbox"/> 400 <input type="checkbox"/> 200 <input type="checkbox"/> Otros _____
<b><u>SITUACIÓN DE LA PARCELA</u></b>	
Nombre: .....	Paraje: .....
Polígono: .....	Parcela SIGPAC: .....
Municipio .....	Recinto SIGPAC .....
Provincia: .....	Otros datos de localización .....
<b><u>DATOS DE LA PARCELA</u></b>	
-Cultivo anterior: .....	
-Cultivo que se va plantar: .....	
-Variedad/Categoría/Clase: .....	
-Fecha prevista de siembra: .....	
-Tipo de riego: Pie ..... Aspersión ..... Goteo .....	
-Tratamientos fitosanitarios realizados (especificar productos, dosis y fechas):	
Nematicidas: .....	Insecticidas .....
Herbicidas .....	Otros .....
- Presencia de malas hierbas en la parcela .....	
<b><u>LOCALIZACIÓN, DESCRIPCIÓN E IMPORTANCIA DE LOS SÍNTOMAS</u></b> (Cumplimentar sólo si hay presencia de síntomas)	
-Descripción de síntomas (desarrollo anormal, amarilleamiento, necrosis y nódulos en raíz, etc.) .....	
-Fecha de aparición de síntomas: .....	
-Evaluación aproximada de los daños:	
% de material afectado .....	% Pérdida de cosecha .....
-Tipo de repercusión en la parcela: Foco ..... Corros ..... Plantas aisladas .....	
Generalizado .....	Raíz .....
Otros (especificar) .....	
-Fenómenos meteorológicos a destacar	
.....	
<b>DATOS DEL REMITENTE</b>	
D. ....	Tfno: .....
Domicilio: .....	
Población: .....	D. P: .....

\* A rellenar por el Laboratorio

**NOTA:** Se rellenarán tantas hojas protocolarias como muestras enviadas. (Normas al dorso)

## NORMAS PARA LA RECOLECCIÓN MUESTRAS DE SUELO Y SU ENVÍO AL LABORATORIO

1. Se tomará una muestra de suelo por parcela compuesta por varias submuestras siguiendo el protocolo establecido. El porcentaje de suelo por ha podrá ser el estándar o reducido en caso de cumplirse los requisitos establecidos en la legislación y recogidos en el Anexo nº5.
2. Las muestras se tomarán en las zonas donde se concentra el crecimiento radicular que es entre los 5 y los 30 cm de profundidad.
3. La muestra se introducirá en una bolsa de plástico cerrada para prevenir su secado y se mantendrá a temperatura fresca (10-15°C) durante el transporte.
4. Identificar la muestra en el exterior de la bolsa.
5. Se rellenarán tantas hojas protocolarias como muestras de suelo distintas se vayan a enviar.
6. Las muestras se enviarán al Laboratorio dentro de una caja de cartón por mensajería urgente, procurando no coincidir con el fin de semana.

### Anexo nº 8: Notificación de los resultados de los estudios oficiales

#### Estudios oficiales para detectar la presencia de nematodos del quiste de la patata

CCAA:

Año:

Superficie de patata de consumo en la CCAA (ha)	Superficie en la que se han realizado los estudios oficiales* (ha)	Nº de parcelas muestreadas	Nº de muestras tomadas	Nº de muestras positivas

\*Los estudios oficiales se realizarán en al menos el 0,5% de la superficie utilizada en el año para patatas de consumo



## **Anexo nº9: Declaración de la contaminación**

Cuando los resultados del laboratorio confirman la presencia de nematodos del quiste de la patata en una parcela, esta información se debe transmitir al propietario de la parcela, al agricultor arrendado, y otros implicados en caso de considerarse necesario, como a la entidad productora de la que el agricultor es colaborador. Asimismo, las CCAA deben registrar oficialmente esa información. En esa parcela se llevarán a cabo una serie de medidas preventivas, entre las que se encuentra el establecimiento de cuarentenas.

Las patatas o los vegetales recogidos en el Anexo nº1 que procedan de esa parcela se declararán oficialmente contaminados. La notificación de la contaminación se realizará inmediatamente una vez que se han obtenido los resultados del laboratorio.



## Anexo nº 10: Grado de resistencia

El grado de susceptibilidad de las patatas a los nematodos del quiste de la patata se cuantificará de acuerdo con el baremo de puntuación estándar que se indica a continuación:

La puntuación 9 indica el nivel máximo de resistencia.

Susceptibilidad relativa (%)	Puntuación
< 1	9
1,1-3	8
3,1-	7
5,1-10	6
10,1-15	5
15,1-25	4
25,1-50	3
50,1-100	2
> 100	1

Las variedades de patata cuyo grado de resistencia ha sido cuantificado con anterioridad a la entrada en vigor de la Directiva 2007/33/CE (1 de julio de 2010), se ajustarán a los dispuesto en el artículo 10, apartado 1, de la Directiva 69/465/CEE.



## **Anexo nº11: Protocolo para el ensayo de resistencia**

1. El ensayo se efectuará en una instalación de cuarentena, ya sea en el exterior, en invernaderos o en cámaras acondicionadas.
2. El ensayo se realizará en macetas que contengan, como mínimo, un litro de suelo (o de sustrato adecuado).
3. La temperatura del suelo durante el ensayo deberá ser inferior a 25 °C y deberá aportarse el riego necesario.
4. Al plantar la variedad de control o la de ensayo, se utilizará un fragmento de patata con un ojo de cada variedad de control o de ensayo. Se recomienda quitar todos los tallos excepto uno.
5. La variedad de patata «Desirée» se utilizará como variedad de control susceptible estándar en todos los ensayos. Para las comprobaciones internas se podrán añadir otras variedades de control de importancia local que sean completamente susceptibles. La variedad de control susceptible estándar podrá cambiarse en el caso de que el examen indique que otras variedades son más pertinentes o accesibles.
6. Para los patotipos Ro1, Ro5, Pa1 y Pa3 se utilizarán las siguientes poblaciones estándar de nematodos del quiste de la patata:  
  
Ro1: población Ecosse  
  
Ro5: población Harmerz  
  
Pa1: población Scottish  
  
Pa3: población Chavornay  
  
Se podrán añadir otras poblaciones de nematodos del quiste de la patata de importancia local.
7. La identidad de la población estándar utilizada se verificará mediante métodos adecuados. En los experimentos de ensayo, se recomienda utilizar al menos dos variedades resistentes o dos clones estándar diferenciales con capacidad de resistencia conocida.
8. El inóculo de nematodos del quiste de la patata (población inicial o Pi) consistirá en un total de cinco huevos y juveniles infectivos por ml de suelo. Se recomienda determinar el número de nematodos del quiste de la patata que deben inocularse por ml de suelo en los experimentos de eclosión. Los nematodos del quiste de la patata pueden inocularse como quistes o combinados como huevos y juveniles en una suspensión.

9. La viabilidad del contenido del quiste de nematodos del quiste de la patata utilizado como fuente del inóculo será como mínimo del 70 %. Se recomienda que los quistes tengan entre 6 y 24 meses y se mantengan durante al menos cuatro meses a 4 °C inmediatamente antes de ser utilizados.

10. Se deberá disponer de al menos cuatro réplicas (macetas) por cada combinación de población de nematodos del quiste de la patata y variedad de patata sometida a ensayo. Para la variedad de control susceptible estándar se recomienda utilizar diez réplicas como mínimo.

11. La duración de los ensayos será como mínimo de tres meses y deberá verificarse la madurez de las hembras en desarrollo antes de interrumpir el experimento.

12. Los quistes de nematodos del quiste de la patata de las cuatro réplicas se extraerán y contarán por separado para cada maceta.

13. La población final (Pf) existente en la variedad de control susceptible estándar al final del ensayo de resistencia se determinará contando todos los quistes de todas las réplicas y los huevos y juveniles de al menos cuatro réplicas.

14. Se deberá lograr una tasa de multiplicación de al menos  $20 \times (Pf/Pi)$  en la variedad de control susceptible estándar.

15. El coeficiente de variación (CV) en la variedad de control susceptible estándar no deberá superar el 35 %.

16. La susceptibilidad relativa de la variedad de patata sometida a ensayo con respecto a la variedad de control susceptible estándar se determinará y expresará como porcentaje, de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\frac{Pf_{\text{variedad sometida a ensayo}}}{Pf_{\text{variedad de control susceptible estándar}}} \times 100 \%$$

17. En el caso de que la variedad de patata sometida a ensayo tenga una susceptibilidad relativa superior al 3 %, bastará con contar los quistes. En los casos en los que la susceptibilidad relativa sea inferior al 3 %, habrá que contar los huevos y los juveniles, además de los quistes.

18. En el caso de que los resultados de los ensayos realizados en el primer año indiquen que una variedad es completamente susceptible a un patotipo, no será necesario repetir dichos ensayos en el segundo año.

19. Los resultados de los ensayos se confirmarán mediante al menos otra prueba realizada en otro año. La media aritmética de la susceptibilidad relativa en los dos años se utilizará para obtener la puntuación, de acuerdo con el baremo de puntuación estándar.

## **Anexo nº12: Notificación listado variedades resistentes**

Las **comunidades autónomas** elaborarán anualmente, **antes del 16 de enero de cada año**, la lista de las nuevas variedades de patatas con respecto a las cuales se haya constatado mediante una verificación oficial su resistencia a los nematodos del quiste de la patata. En la información se detallará la especie, los patotipos, los grupos de virulencia o las poblaciones de nematodos del quiste de la patata a los que sean resistentes las variedades, su grado de resistencia y el año de su determinación.

Estos datos se **notificarán por escrito al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino** según el modelo orientativo que se presenta a continuación, y éste a su vez, notificará, a través del cauce correspondiente, a la Comisión Europea y a los demás Estados Miembros cada año, a 31 de enero a más tardar.

**Anexo nº12: Notificación listado variedades resistentes****Comunidad autónoma:****Año:**

<b>Nombre variedad</b>	<b>Especie de Globodera a la que es resistente</b>	<b>Año de determinación de la resistencia</b>	<b>Grado de resistencia <sup>1</sup></b>	<b>Patotipo/Patotipos<sup>2</sup>, poblaciones o grupos de virulencia a los que es resistente</b>	<b>Observaciones</b>

<sup>1</sup> El grado de resistencia se cuantificará con una puntuación del 1 al 9 según el grado de susceptibilidad indicado en el Anexo nº11.

<sup>2</sup> Para la especie *Globodera rostochiensis* existen cinco patotipos denominados Ro1, Ro2, Ro3, Ro4 y Ro5; en la especie *Globodera pallida* existen tres patotipos denominados Pa1, Pa2, y Pa3.

## **Anexo nº13: Notificación de degradación o variación de la resistencia**

Los agricultores de patata, productores de patata de siembra y demás operadores del sector tienen la obligación de notificar a los organismos oficiales responsables de las comunidades autónomas toda sospecha de presencia o presencia confirmada de nematodos del quiste de la patata en su territorio, como consecuencia de una degradación o variación de la eficacia de una variedad de patata resistente que esté relacionada con una modificación excepcional de la composición de una especie de nematodos, un patotipo o un grupo de virulencia.

La **comunidad autónoma** dispondrá que la especie de nematodos del quiste de la patata y, cuando proceda, el patotipo o grupo de virulencia en cuestión sean investigados y confirmados mediante los métodos adecuados. Los **datos de las confirmaciones** se enviarán por **escrito** cada año el **15 de diciembre a más tardar**, al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y este a su vez, los notificará el 31 de diciembre a más tardar, a través del cauce correspondiente, a la Comisión Europea y a los demás Estados Miembros.



## **Anexo nº14: Guía para la elaboración de un programa de control oficial**

La Directiva 2007/33/CE permite plantar patatas destinadas a la producción de patatas distintas de las de siembra (patata de consumo) en parcelas registradas oficialmente como infestadas del nematodo del quiste de la patata, siempre que la parcela se someta a un programa de control oficial que tenga por objeto, como mínimo, la supresión de la población de nematodos para evitar su propagación.

Con este fin se ha elaborado el presente documento, en el que se pretenden recoger todas las opciones existentes en la actualidad para reducir la población de nematodos con el tiempo y evitar su propagación, garantizando así el cumplimiento de la legislación vigente. Los productores de patata pueden adaptar el programa de control oficial a sus circunstancias particulares, teniendo flexibilidad para elegir una combinación de las opciones planteadas en este Anexo pero siempre cumpliendo con el objetivo de suprimir del nematodo del quiste de la patata.

El programa de control oficial deberá ser autorizado por el organismo oficial responsable de la Comunidad Autónoma correspondiente, y notificado al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y éste a su vez, lo notificará, a través del cauce correspondiente, a la Comisión Europea y a los demás Estados Miembros con vistas a garantizar niveles comparables de garantía entre los Estados Miembros.

El cumplimiento del programa de control oficial aprobado, podrá ser supervisado por los organismos oficiales responsables de las comunidades autónomas durante las visitas de seguimiento. Asimismo, se podrá realizar una toma de muestras de suelo y posterior análisis antes y después de la plantación de la patata, para comprobar la reducción de los niveles de población y el éxito del programa de control oficial.

## Contenidos del Programa de Control Oficial

Se recomienda que el programa de control oficial contemple los siguientes apartados:

1. **Datos personales** del productor que va aplicar el programa
2. **Identificación de la parcela** registrada oficialmente como infestada: códigos catastrales, planos de situación.
3. **Datos del examen oficial** en el que se detectó la presencia del nematodo del quiste de la patata: fecha de la toma de muestras, fecha en la que se declaró la parcela infestada, nivel de infestación...
4. **Identificación de la especie, patotipo/patotipos y grados de virulencia** de los nematodos del quiste de la patata presentes en la parcela.

La identificación de la especie en la parcela infestada es la base para la posible utilización de variedades resistentes. La biología de ambas especies es diferente, y esto influye en la elección del programa de control oficial más adecuado. Por ejemplo, la especie *Globodera pallida* tiene una eclosión de los huevos más retardada en comparación con *Globodera rostochiensis*, este es el motivo por el que la aplicación de algunos nematicidas con poca permanencia en el suelo no ejercen un buen control sobre esta especie.

El patipo/patotipos y grados de virulencia de la población de nematodos del quiste de la parcela que se han detectado en la parcela infestada determinarán las variedades resistentes que se pueden utilizar en el programa de control oficial, dada la especificidad de la resistencia. Las mezclas de especies e incluso de patotipos en los terrenos de cultivo son posibles y en muchos casos han sido detectadas, pero generalmente uno de ellos impera sobre los restantes denominándose entonces como "especie (o patotipo) mayoritariamente presente".

5. **Año** en el que se tienen intención de realizar la primera **plantación** de patata destinada a consumo.
6. **Variedad/variedades** que se van a plantar.

7. Futura **rotación de cultivos** que se va a aplicar en la parcela.
8. **Control químico y otros métodos de control** que se van a utilizar.  
En relación con los tratamientos nematicidas especificar todos los detalles posibles: producto fitosanitario a utilizar, dosis del tratamiento, número de aplicaciones, época de aplicación...
9. **Métodos de eliminación de residuos** utilizados
10. **Origen de la patata de siembra** utilizada en el plantación
11. **Medidas de higiene** a aplicar en la parcela

A continuación se van a exponer las medidas de control que se pueden aplicar en una parcela registrada oficialmente como infestada por nematodos del quiste de la patata, con el fin de suprimir la población. Asimismo, se van a recoger algunas medidas de higiene y métodos de eliminación de residuos que se pueden aplicar en dicha parcela, con el objeto de evitar la propagación del nematodo.

### **Medidas de control**

La aplicación de una combinación de varios métodos de control, estrategia propia de la lucha integrada, dentro del programa de control oficial, es la estrategia más adecuada para el control del nematodo del quiste de la patata y que proporcionará mejores resultados.

#### ➤ **Utilización de variedades resistentes**

En las variedades resistentes de patata, los juveniles penetran en las raíces, pero no son capaces de inducir la formación de células gigantes, de esta manera la alimentación de los mismos no es posible y consecuentemente el ulterior desarrollo y diferenciación sexual no podrá efectuarse, disminuyendo la población final de nemátodos.

Las variedades resistentes solo presentan tal capacidad frente a un determinado patotipo (o grupo de patotipos) y en el campo se suelen encontrar poblaciones de nemátodos heterogéneas (presencia de diferentes patotipos de una misma especie o especies diferentes). La

mayoría de las variedades resistentes comerciales lo son frente a algunos patotipos de *G. rostochiensis*, mientras que la resistencia respecto de *G. pallida* es de tipo parcial.

Por lo tanto, la base para la selección de variedades resistentes es la identificación de la población mayoritariamente presente en la parcela. Se recomienda la utilización de variedades resistentes a la especie y patotipo presente en la parcela, seleccionando aquellas variedades que ofrezcan los niveles de resistencia más elevados de que se disponga, según el baremo de puntuación recogido en el Anexo nº11.

Si en la parcela existe una combinación de especies/patotipos de *Globodera*, no se recomienda la utilización de variedades resistentes puesto que se selecciona la población respecto a la que la variedad no es resistente; y en el caso de utilizar dichas variedades resistentes, será preferible utilizar variedades de patata de ciclos cortos, evitando así las multiplicaciones altas de la especie o patotipo no controlado.

El uso indiscriminado de variedades resistentes constituye un factor muy importante de riesgo de selección de poblaciones virulentas, así por ejemplo en muchas zonas donde en un principio existía mayoritariamente *G. rostochiensis*, por el empleo de variedades resistentes a la misma se ha desarrollado fuertemente *G. pallida*, que es mucho más perjudicial.

Si el grado de infestación inicial fuera muy elevado, el año en que se va a plantar la variedad de patata resistente, es aconsejable dar algún tipo de tratamiento nematicida al suelo previo a la siembra para evitar el debilitamiento de las plantas en las primeras etapas de su desarrollo vegetativo.

#### ➤ **Tratamientos nematicidas**

Se pueden aplicar productos fitosanitarios con efecto nematicida autorizados para el cultivo de la patata en el Registro de Productos Fitosanitarios.

Existen dos tipos de productos químicos: fumigantes y no fumigantes, los primeros tienen acción nematicida y se aplican en presiembra por su fitotoxicidad, mientras que los segundos tienen efecto nematostático y se aplican a lo largo del cultivo.

#### **a) Fumigantes:**

Son compuestos en general dotados de gran volatilidad, que una vez aplicados al suelo se evaporan y se disuelven en el agua de suelo, difundiendo por esta vía. Para una correcta aplicación de los mismos, es preciso que:

- El terreno presente buenas condiciones de humedad en el momento del tratamiento.

- Según el grado de volatilidad de cada producto y su formulación, habrá que tomar una serie de precauciones para conseguir un correcto "sellado", como por ejemplo unas simples labores de gradeo.

- La temperatura del suelo ha de ser también la idónea, para permitir la volatilización del producto a una temperatura adecuada.

- Tipo de suelo: la mayoría de los nematicidas son menos eficientes en suelos con alto contenido en materia orgánica o en arcilla, ya que ambas fracciones absorben los componentes de los productos empleados y de igual modo los suelos porosos o encharcados impiden la correcta difusión.

La formulación más conveniente es como líquidos inyectables o emulsionables, pero también existen formulaciones: gaseosas, envasadas a presión, granulados y en forma de gel.

#### **b) No fumigantes**

Son productos que se formulan en forma líquida o gránulos, que una vez efectuado el tratamiento se liberan y disuelven en el agua del suelo, siendo este su medio de difusión.

Existe una gama amplia de productos dentro de este grupo, en general organofosforados y carbamatos. Estos productos afectan a la reproducción de los nemátodos al inhibir la actividad muscular, interferir en su movilidad, desarrollo y alimentación, produciendo nematostasis. Muchos de estos productos pueden ser absorbidos por la materia orgánica del suelo, restándoles eficacia.

La efectividad de los tratamientos nematicidas es mayor con niveles de población del nematodo bajos, por lo que se recomienda su aplicación en detecciones tempranas. En muchas ocasiones se utilizan en las primeras etapas del desarrollo vegetativo de la planta, defendiéndola de un ataque temprano y permitiendo un desarrollo inicial normal.

➤ **Rotación de cultivos**

Mantener el terreno libre de patata y del resto de cultivos hospedantes (tomate, berenjena y pimiento) es una medida de control eficaz. Se recomienda utilizar períodos de rotación de al menos seis años para reducir de forma significativa el número de quistes viables en el suelo.

La tasa de disminución varía según la especie de *Globodera* presente en la parcela, tipo de suelo, condiciones ambientales. En concreto, para *G. pallida* la disminución de población es más lenta que para *G. rostochiensis*.

➤ **Utilización de cultivos trampa**

Este método de control consiste en llevar a cabo un cultivo de una planta hospedante del nematodo del quiste de la patata, pero retirándolo del terreno antes de que los nemátodos terminaran su ciclo, con lo cual se evita que quede inóculo en la parcela.

Hay que efectuar una vigilancia exhaustiva del desarrollo de los nemátodos, ya que si se descuida en retirar a tiempo las plantas

trampa del terreno, los nemátodos terminarán su ciclo, con lo cual no habría servido para nada este método de control.

En algunas ocasiones se utiliza el cultivo de la patata como planta trampa, retirando la planta al poco tiempo de su emergencia (con 15-30 cm de altura) intentando llevar consigo el mayor número de raíces. Una estrategia es la utilización de variedades de patata tolerantes al nematodo puesto que la planta es capaz de desarrollar un extenso sistema radicular a pesar del ataque del patógeno, con lo que se proporciona más alimento al nematodo y avivan más las larvas.

En Reino Unido se ha utilizado la especie *Solanum sisymbriifolium* como cultivos trampa, ya que permite la formación de los huevos, pero impide que se complete su ciclo de vida independientemente del tiempo que esté el cultivo en el suelo. También se han utilizado plantas espontáneas que nacen en la parcela, y se retiran poco después de su emergencia intentando llevar consigo el mayor número de raíces posible.

## ➤ **Métodos físicos**

### **a) Solarización**

Consiste en realizar un acolchado de un suelo previamente regado y libre de cultivo, para lo cual se emplea un film de plástico transparente de grosor 25-30  $\mu\text{m}$ , en la época de máxima irradiación solar. Este acolchado, produce una elevación de la temperatura del suelo por encima de los 45 °C, en las capas superiores del mismo. Estas temperaturas resultan ser letales o subletales para los nemátodos y muchos otros fitoparásitos.

Manteniendo el acolchado durante varias semanas, se consigue una elevada reducción de la densidad de inóculo o nivel de población de los mismos.

La incorporación de estiércol y la colocación de una doble lámina de plástico pueden reducir el tiempo de la solarización e incrementar su

efecto, ya que el estiércol fresco al descomponerse desprende una serie de sustancias letales para los nematodos. También con la incorporación de un nematicida previo a la colocación del plástico parecen dar buenos resultados.

Un inconveniente de este método es que en las zonas Centro y Norte peninsular las temperaturas letales no parecen alcanzarse en los suelos acolchados más que en los 10 cm superiores en los meses de máxima insolación y los quistes de *Globodera* se encuentran también a mayores profundidades (al menos hasta 20-30 cm).

### **b) Encharcamiento del suelo**

El encharcamiento del suelo, a ser posible en verano, somete al quiste a un régimen de humedad excesiva por lo que pierde rápidamente su viabilidad y se provoca la muerte de los huevos y larvas que contiene.

Con anterioridad a la siembra, se realiza un laboreo del terreno con una profundidad de unos 25 cm para conseguir una distribución uniforme de los quistes en esa franja de suelo, que es donde se encuentra la mayor concentración del nematodo.

Posteriormente, el suelo se mantiene encharcado una semana, de tal forma que se consigue duplicar el número de quistes en los cinco primeros centímetros del suelo, donde la temperatura de éste es más elevada. Debido a la excesiva humedad, se produce un medio anaerobio, incrementándose las concentraciones de gases orgánicos como el metano, que son tóxicos para los nemátodos.

En la fase quística, los nemátodos son muy sensibles a temperaturas cercanas a los 40 °C, cuando están sumergidos en un medio líquido. Se han hecho ensayos, simulando en estufa el encharcamiento en suelos arenosos durante siete días y resultó ser suficiente para hacer disminuir las poblaciones a niveles no detectables, con lo cual parece

positivo seguir investigando en campo esta técnica. La aplicación de este método está condicionada a la disponibilidad de agua y el coste de la misma, para determinar si es posible llevarlo a cabo y si es viable económicamente.

➤ **Plantas con acción nematicida**

Determinadas plantas contienen sustancia de acción biocida, cultivos como el sorgo o el pasto del Sudán liberan determinadas sustancias que son degradadas en el suelo a ácido cianhídrico, el cual es un potente nematicida. Existen otras plantas como los *Tagetes spp.* que al ser atacadas por los nemátodos sus raíces liberan sustancias que matan a los nemátodos. Las crucíferas del género *Brassica* (rábano, colza, etc.) contienen alcaloides que son liberados en el suelo al descomponerse, los cuales aunque no matan a los nemátodos actúan interfiriendo el ciclo reproductivo del nemátodo.

➤ **Otros métodos**

Control biológico, barbecho del terreno, medidas culturales...

## **Eliminación de residuos**

El movimiento de suelo, plantas y tubérculos cosechados de parcelas infestadas por *G. pallida* o *G. rostochiensis* se llevará a cabo de tal manera que no exista riesgo de propagación. Se recomienda que, siempre que sea posible, el exceso de suelo que acompañe al material vegetal procedente de una parcela contaminada se mantenga en dicha parcela.

## **Buenas prácticas de higiene**

➤ **Utilización de patata de siembra certificada**

Los Reglamentos de control y certificación de la patata de siembra establecen la obligación de que la parcela esté libre del nematodo del quiste de la patata.

- **Limpieza** de los **aperos** de labranza, **maquinaria**, calzado, etc. antes de entrar en una parcela no infestada. Se aconseja trabajar en las parcelas contaminadas en último lugar.
- **Evitar** la entrada de ganado.  
Contribuye al transporte de suelo a otras parcelas y por lo tanto propagación del organismo.
- **Evitar** los **abonados tardíos**, ya que prolongan los ciclos vegetativos de la patata y un ciclo más largo aumenta la población final de nemátodos.
- **Evitar** la presencia de **malas hierbas de la familia de las solanáceas**.
- **Evitar** introducir **cultivos** (no recogidos en el Programa nacional de control de los nematodos del quiste de la patata) en la rotación con la patata cuyo destino sea la **replantación** en otras parcelas. El nematodo se podría propagar en el suelo adherido en las raíces.
- Realizar siembras de patata con **variedades de ciclo corto**, ya que se recolectan antes de que alcancen su madurez. Lo ideal sería recolectar las patatas, a ser posible, a los 80 días, ya que esto multiplica poco las poblaciones.
- **Sembrar** en períodos en los que la **actividad del nemátodo es menor** (épocas de temperaturas más o menos bajas), lo que permite un mejor desarrollo de la planta al principio de su ciclo, cuando es más vulnerable. El ataque tardío de nemátodos es mejor soportado por la planta.

## **Anexo nº15: Acta de levantamiento de las restricciones**



# ***PROGRAMA NACIONAL DE INSPECCIÓN FITOSANITARIA***

## ***PROGRAMA PARA LA APLICACIÓN DE LA NORMATIVA FITOSANITARIA RELATIVA A LOS NEMATODOS DEL QUISTE DE LA PATATA (*Globodera rostochiensis* y *Gloiodera pallida*)***

***Plan de contingencia***



## **PLAN DE CONTINGENCIA – NEMATODOS DEL QUISTE DE LA PATA**

### **1. INTRODUCCIÓN Y ALCANCE**

En el presente documento se recogen las medidas que deben adoptarse contra los nematodos del quiste de la patata (*Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*), con el fin de determinar su distribución, evitar su propagación y mantenerlos bajo control.

Las medidas que se describen a continuación de acuerdo a la legislación vigente son de aplicación en todo el territorio nacional. En tanto la Comisión de las Comunidades Europeas no se pronuncie al respecto, la duración del programa se prevé ilimitada. En todo momento y como consecuencia de la situación de los nematodos, el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino podrá introducir las modificaciones que se consideren necesarias o determinar su conclusión.

Este documento será revisado y actualizado siempre que sea necesario.

### **2. RESPONSABILIDADES**

#### **Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria)**

- Responsabilidad en la política general para la aplicación de las Directivas europeas sobre Sanidad Vegetal y su cumplimiento en el Reino de España.
- Comunicaciones con los Organismos de Sanidad Vegetal interesados
- Envío de informes a la Comisión Europea y otros estados miembros

#### **Comunidades Autónomas (Organismos de Sanidad Vegetal)**

- Responsabilidad en la aplicación en campo de las Directivas europeas sobre Sanidad Vegetal
- Detección de focos y medidas de erradicación
- Envío de información al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino y a otras Comunidades Autónomas que puedan verse afectadas.

### 3. SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD

#### 3.1.- Antecedentes

La Directiva 2000/29/CEE, del Consejo de 8 de mayo, regula las medidas de protección contra la introducción en la Unión Europea de organismos nocivos para los vegetales y productos vegetales, y contra su propagación en el interior de la misma. Esta Directiva contempla los nematodos del quiste de la patata (*Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*). En la legislación española, dicha Directiva quedó transpuesta mediante el Real Decreto 58/2005, de 21 de enero.

La Directiva 69/465/CEE del Consejo, de 8 de diciembre de 1969, relativa a la lucha contra el nematodo dorado, establecía las medidas mínimas que debían tomar los Estados Miembros para combatir el nematodo dorado y evitar su propagación. La Orden de 28 de febrero de 1986 incorporó a la legislación española dichas medidas.

En los últimos años se ha avanzado considerablemente en lo que respecta a la nomenclatura, la biología y la epidemiología de las especies y poblaciones de nematodos del quiste de la patata y su patrón de distribución. En consecuencia se publicó la Directiva 2007/33/CE del Consejo de 11 de junio de 2007, relativa al control de los nematodos del quiste de la patata y por la que se deroga la Directiva 69/465/CEE, cuyo fin es establecer las medidas que deben adoptar los Estados Miembros contra *Globodera pallida* (Stone) Behrens (poblaciones europeas) y *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens (poblaciones europeas). La Directiva 2007/33/CE se ha traspuesto a la legislación española mediante el Real Decreto 920/2010, por el que se establece el Programa Nacional de Control de los nematodos del quiste de la patata.

En España, las dos especies de nematodos formadores de quistes de la patata *G. pallida* y *G. rostochiensis* están ampliamente distribuidas e implantadas en las zonas productoras de patata. A veces es una sola de las especies la que parasita, otras una de las dos especies está presente casi siempre, apareciendo esporádicamente la contraria y, en otras ocasiones ambas especies coexisten.

#### 3.2.- Sintomatología

En campo se observan rodales más o menos extensos con plantas que muestran marchitamiento, enanismo, amarilleo, e incluso muerte prematura. Las raíces tienen aspecto fibroso. Aunque el sistema radicular está menos desarrollado que en los ejemplares sanos, se produce una proliferación de raicillas, que al examinarlas pueden dejar ver (a simple vista o con un microscopio de mano de x10 ó x20) los quistes de las hembras, prendidos fuera de la raíz, del tamaño de un grano de arena de forma globular. Los

quistes son los cuerpos de las hembras, repletos de huevos, que al morir se convierten en cubierta protectora de los mismos. Estos huevos pueden conservar durante años su capacidad reproductiva. El color del quiste variará de acuerdo con la fase de desarrollo y la especie. Cuando las condiciones del medio son adecuadas, las secreciones de las raíces estimulan los quistes, y las larvas nacen dentro de los mismos, de donde salen para atacar de nuevo las raíces, penetrando en ellas (endoparásitos), fijándose en el cilindro central, y comenzando su desarrollo. Posteriormente, tras concluir el cuarto estado larvario, las hembras salen al exterior, quedando unidas por el cuello a la raíz de la planta. Los machos también salen al exterior después de la cuarta muda, para buscar por el suelo a las hembras. Las hembras ya fertilizadas se desprenden de las raíces, mueren y se convierten en la cubierta protectora antes citada. Un solo quiste puede contener de 100 a 500 huevos. Los huevos pueden quedarse en estado latente durante años si no hay huésped cercano. Los nematodos completan el ciclo de vida en unas 5 a 7 semanas, dependiendo de las condiciones de humedad y temperatura del terreno.

Los síntomas pueden ser confundidos con deficiencia de agua o de elementos minerales, así como con el marchitamiento provocado por *Verticillium* spp. o por *Pseudomonas solanacearum*.

El efecto sobre el rendimiento del cultivo depende de la densidad de nematodos presentes en el suelo, llegando en los casos más graves, a ser la causa de que ciertas zonas o fincas no produzcan absolutamente nada. Se estima que estos nematodos pueden reducir de forma directa las cosechas de patata hasta en un 85%. De forma indirecta, también causa prejuicios porque puede transmitir virosis y bacteriosis, como la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*).

### **3.3.- Hospedantes**

El principal hospedante de ambos nematodos es la patata (*Solanum tuberosum*), aunque de forma poco usual, el tomate (*Lycopersicon lycopersicum*) y la berenjena (*Solanum melongena*) también pueden resultar infectados. Otros posibles hospedantes son los vegetales de otras especies del género *Solanum*.

### **3.4.- Formas de dispersión**

La principal forma de dispersión de estos nematodos es a través del propio suelo. Suele aparecer en forma de rodales o zonas más o menos circulares.

Aunque los nematodos no se expanden por el terreno tan rápidamente como los hongos o bacterias patógenos de la patata, una vez que se encuentran en una zona de cultivo, son muy difíciles de erradicar.

### **3.5.- Métodos de prevención y control**

El nematodo se encuentra más frecuentemente en suelos frescos, en zonas bajas del terreno y en suelos sueltos que favorecen la supervivencia y movimiento de las larvas. La lucha contra el nematodo, una vez que se ha implantado, es muy difícil y exige la combinación de diferentes medidas de control:

- Cuarentena (no cultivo de patatas ni solanáceas). La población disminuye aproximadamente un 20% al año.
- Cultivo permanente: implantación de alfalfa, praderas, .etc.
- Nematicidas, que actúen sobre las larvas libres, o contenidas en los quistes.
- Cultivo trampa: tiene que haber un nacimiento rápido y homogéneo, y un crecimiento vegetativo importante.
- Variedades resistentes: bajan las poblaciones del nematodo. Tienen que ser resistentes a la especie y patotipo que tenemos en cada finca.
- Lucha integrada.

Las medidas preventivas que se deben adoptar son:

- No utilizar como semilla, patata procedente de zonas infectadas, o que no esté certificada por algún servicio oficial de control.
- Eliminar los rebrotes del año anterior ("bortas"), pues multiplican las poblaciones de nematodos.
- Hacer una rotación amplia de cultivos, de manera que pase el mayor tiempo posible entre un cultivo de patata y otro.
- Después de hacer un tratamiento nematicida, hay que tener mucho cuidado de no enterrar mucho los aperos, con el fin de no desenterrar los quistes de la zona no tratada con el gas.

#### 4. MEDIDAS PREVENTIVAS

La confirmación de presencia de nematodos del quiste de la patata en una parcela como consecuencia de la realización del examen o estudio oficial, obliga a tomar una serie de medidas, con el fin de evitar la dispersión de la enfermedad y de erradicar el foco localizado. Cuando una parcela se haya registrado oficialmente como infestada, como consecuencia de la realización de un examen o estudio oficial relativo al nematodo del quiste de la patata, las comunidades autónomas prescribirán las siguientes medidas preventivas:

- No se podrán plantar en la parcela patatas de siembra destinadas a la producción de patatas de siembra
- No se podrán plantar ni almacenar en la parcela los vegetales enumerados en el **Anexo nº1**.. Se permitirá la plantación de aquellos vegetales con raíces, bulbos, tubérculos y rizomas del punto 2 de dicho Anexo: *Allium porrum*, *Beta vulgaris*, *Brassica*.,

*Fragaria spp.*, *Asparagus officinalis*, *Allium ascalonicum*, *Allium cepa*, *Dahlia spp.*, *Hyacinthus spp.*, *Gladiolus Toven*, *Iris spp.*, *Lilium spp.*, *Narcissus spp.*, *Tulipa spp.* destinados a la producción de vegetales para plantar, siempre que estén sujetos a las siguientes medidas autorizadas oficialmente para eliminar el riesgo de propagación del nematodo del quiste de la patata :

- **Desinfectación** mediante los métodos adecuados de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata
  - **Retirada del suelo** mediante lavado o cepillado hasta eliminarlo prácticamente por completo, de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata.
- Para plantar patatas distintas de las destinadas a la producción de patatas de siembra, los organismos oficiales responsables de las comunidades autónomas prescribirán la obligación de someter dichas parcelas a un programa de control oficial que tenga por objeto como mínimo la supresión de los nematodos del quiste de la patata.

#### 4.1.- Programa de control oficial

Las Comunidades Autónomas deben elaborar un programa de control oficial para aplicar en aquellas parcelas registradas como infestadas por el nematodo del quiste de la patata y en las que se vayan a plantar patatas distintas de las destinadas a la producción de patatas de siembra. El programa de control oficial se notificará por escrito al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y este a su vez, lo notificará a través del cauce correspondiente, a la Comisión Europea y a los demás Estados Miembros, y tendrá en cuenta los siguientes aspectos:

- Las particularidades del sistema de producción y comercialización de las plantas hospedadoras de nematodos del quiste de la patata en la comunidad autónoma pertinente.
- Las características de la población de nematodos del quiste de la patata presente en la comunidad autónoma.
- La utilización de variedades resistentes que ofrezcan los niveles de resistencia más elevados de que se disponga.
- La aplicación de nematicidas autorizados en el Registro de Productos Fitosanitarios.
- La superficie afectada por el nematodo.
- Otra medidas, como por ejemplo el establecimiento de una rotación de cultivos (se ha comprobado que la prohibición del cultivo de patata y vegetales hospedantes disminuye la población de nematodos del quiste de la patata aproximadamente en un 20% cada año), la utilización de cultivos trampa, lucha biológica, etc.

#### **4.1.1.- Variedades resistentes**

Dentro del programa oficial de control se puede recoger la utilización de variedades resistentes a nematodos del quiste de la patata. El grado de resistencia de las variedades de patata distintas de las ya notificadas con arreglo al artículo 10, apartado 1, de la Directiva 69/465/CEE, se cuantificará de acuerdo con el baremo de puntuación estándar que figura en el **Anexo nº2**. Los ensayos de resistencia se efectuarán de conformidad con el protocolo previsto en el **Anexo nº3**.

#### **Notificación de la relación de variedades resistentes**

Las comunidades autónomas elaborarán anualmente, antes del 16 de enero de cada año, la lista de las nuevas variedades de patatas con respecto a las cuales se haya constatado mediante una verificación oficial su resistencia a los nematodos del quiste de la patata. En la información se detallará la especie, los patotipos, los grupos de virulencia o las poblaciones de nematodos del quiste de la patata a los que sean resistentes las variedades, su grado de resistencia y el año de su determinación.

Estos datos se notificarán por escrito al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino según el modelo orientativo presentado en el **Anexo nº4**, y éste a su vez, notificará, a través del cauce correspondiente, a la Comisión Europea y a los demás Estados Miembros cada año, a 31 de enero a más tardar.

#### **Notificación del cambio de resistencia**

Los agricultores de patata, productores de patata de siembra y demás operadores del sector tienen la obligación de notificar a los organismos oficiales responsables de las comunidades autónomas toda sospecha de presencia o presencia confirmada de nematodos del quiste de la patata en su territorio, como consecuencia de una degradación o variación de la eficacia de una variedad de patata resistente que esté relacionada con una modificación excepcional de la composición de una especie de nematodos, un patotipo o un grupo de virulencia.

La comunidad autónoma dispondrá que la especie de nematodos del quiste de la patata y, cuando proceda, el patotipo o grupo de virulencia en cuestión sean investigados y confirmados mediante los métodos adecuados. Los datos de las confirmaciones se enviarán por escrito cada año (**Anexo nº 5**), el 15 de diciembre a más tardar, al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y este a su vez, los notificará el 31 de diciembre a más tardar, a través del cauce correspondiente, a la Comisión Europea y a los demás Estados Miembros.

## 5. Medidas fitosanitarias a adoptar sobre el material contaminado

En las patatas (destinadas o no a la producción de patatas de siembra) o los vegetales enumerados en los puntos 1 y 2 del Anexo nº1 que hayan sido declarados contaminadas, las comunidades autónomas deben tomar las siguientes medidas en función del tipo de material vegetal:

- Las **patatas de siembra** destinadas a la producción de patatas de siembra y **las plantas hospedadoras con raíces** (punto 1 del Anexo nº1) destinadas a la producción de vegetales para la plantación: *Capsicum spp.*, *Lycopersicon lycopersicum* y *Solanum melongena*, no se plantarán a menos que hayan sido descontaminadas bajo la supervisión de los organismos oficiales responsables de las comunidades autónomas utilizando un método adecuado y que se base en pruebas científicas de la ausencia de riesgo de propagación de los nematodos del quiste de la patata.
- Las **patatas destinadas a la transformación industrial o al calibrado** estarán sujetas a medidas autorizadas oficialmente consistentes en la entrega a una planta de transformación o calibrado dotada de procedimientos de eliminación de residuos adecuadas y autorizadas oficialmente, con respecto a la cual se haya establecido la ausencia de riesgo de propagación de nematodos del quiste de la patata.
- Los vegetales del punto 2 del **Anexo nº1.: vegetales con raíces** *Allium porrum L.*, *Beta vulgaris L.*, *Brassica spp.*, *Fragaria L.*, *Asparagus officinalis L.*; y los **bulbos, tubérculos y rizomas** de: *Allium ascalonicum L.*, *Allium cepa L.*, *Dahlia spp.*, *Gladiolus Toven ex L.*, *Hyacinthus spp.*, *Iris spp.*, *Lilium spp.*, *Narcissus L.*, *Tulipa L.*, no se plantarán a menos que se hayan sometido a las siguientes medidas aprobadas oficialmente, de tal manera que dejen de estar contaminados:
  - **Desinfección** mediante los métodos adecuados de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata
  - **Retirada del suelo** mediante lavado o cepillado hasta eliminarlo prácticamente por completo, de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata.



# ***Anexos***



## **Anexo nº 1: Relación de vegetales objeto de exámenes y medidas oficiales**

### **1. Patata de siembra destinada a la producción de patata de siembra**

### **2. Plantas hospedadoras con raíces** destinadas a la producción de vegetales para la plantación:

- *Capsicum* spp. (pimiento)
- *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karst. ex Farw. (tomate)
- *Solanum melongena* L. (berenjena)

### **3. Otros vegetales con raíces** destinados a la producción de vegetales para la plantación:

- *Allium porrum* L. (puerro)
- *Beta vulgaris* L. (remolacha y acelga)
- *Brassica* spp. (nabo, colza, col, berza, nabo gallego, etc)
- *Fragaria* L. (fresa, fresón)
- *Asparagus officinalis* L. (espárrago)

### **4. Bulbos, tubérculos y rizomas**, cultivados en suelo y destinados a la plantación, excepto aquellos ejemplares cuyo envase u otros elementos demuestren que se destinan a la venta a consumidores finales no dedicados a la producción profesional de vegetales o flores cortadas, de:

- *Allium ascalonicum* L. (chalote o chalota)
- *Allium cepa* L. (cebolla)
- *Dahlia* spp. (dalia)
- *Gladiolus* Toven ex L. (gladiolos)
- *Hyacinthus* spp. (jacintos)
- *Iris* spp. (lirios)
- *Lilium* spp. (azucenas o lirios)

- *Narcissus* L. (narciso)
- *Tulipa* L. (tulipanes)

No serán objeto de los exámenes oficiales los bulbos, tubérculos y rizomas, de los géneros y especies citados anteriormente cuando se hayan sometido a las siguientes medidas:

- **Desinfectación** mediante los métodos adecuados de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata
- **Retirada del suelo** mediante lavado o cepillado hasta eliminarlo prácticamente por completo, de tal manera que no se pueda determinar riesgo alguno de propagación de los nematodos del quiste de la patata.

## Anexo nº 2: Grado de resistencia

El grado de susceptibilidad de las patatas a los nematodos del quiste de la patata se cuantificará de acuerdo con el baremo de puntuación estándar que se indica a continuación:

La puntuación 9 indica el nivel máximo de resistencia.

Susceptibilidad relativa (%)	Puntuación
< 1	9
1,1-3	8
3,1-	7
5,1-10	6
10,1-15	5
15,1-25	4
25,1-50	3
50,1-100	2
> 100	1

Las variedades de patata cuyo grado de resistencia ha sido cuantificado con anterioridad a la entrada en vigor de la Directiva 2007/33/CE (1 de julio de 2010), se ajustarán a los dispuesto en el artículo 10, apartado 1, de la Directiva 69/465/CEE.



### **Anexo nº3: Protocolo para el ensayo de resistencia**

1. El ensayo se efectuará en una instalación de cuarentena, ya sea en el exterior, en invernaderos o en cámaras acondicionadas.
2. El ensayo se realizará en macetas que contengan, como mínimo, un litro de suelo (o de sustrato adecuado).
3. La temperatura del suelo durante el ensayo deberá ser inferior a 25 °C y deberá aportarse el riego necesario.
4. Al plantar la variedad de control o la de ensayo, se utilizará un fragmento de patata con un ojo de cada variedad de control o de ensayo. Se recomienda quitar todos los tallos excepto uno.
5. La variedad de patata «Desirée» se utilizará como variedad de control susceptible estándar en todos los ensayos. Para las comprobaciones internas se podrán añadir otras variedades de control de importancia local que sean completamente susceptibles. La variedad de control susceptible estándar podrá cambiarse en el caso de que el examen indique que otras variedades son más pertinentes o accesibles.
6. Para los patotipos Ro1, Ro5, Pa1 y Pa3 se utilizarán las siguientes poblaciones estándar de nematodos del quiste de la patata:  
  
Ro1: población Ecosse  
  
Ro5: población Harmerz  
  
Pa1: población Scottish  
  
Pa3: población Chavornay  
  
Se podrán añadir otras poblaciones de nematodos del quiste de la patata de importancia local.
7. La identidad de la población estándar utilizada se verificará mediante métodos adecuados. En los experimentos de ensayo, se recomienda utilizar al menos dos variedades resistentes o dos clones estándar diferenciales con capacidad de resistencia conocida.
8. El inóculo de nematodos del quiste de la patata (población inicial o Pi) consistirá en un total de cinco huevos y juveniles infectivos por ml de suelo. Se recomienda determinar el número de nematodos del quiste de la patata que deben inocularse por ml de suelo en los experimentos de eclosión. Los nematodos del quiste de la patata pueden inocularse como quistes o combinados como huevos y juveniles en una suspensión.

9. La viabilidad del contenido del quiste de nematodos del quiste de la patata utilizado como fuente del inóculo será como mínimo del 70 %. Se recomienda que los quistes tengan entre 6 y 24 meses y se mantengan durante al menos cuatro meses a 4 °C inmediatamente antes de ser utilizados.

10. Se deberá disponer de al menos cuatro réplicas (macetas) por cada combinación de población de nematodos del quiste de la patata y variedad de patata sometida a ensayo. Para la variedad de control susceptible estándar se recomienda utilizar diez réplicas como mínimo.

11. La duración de los ensayos será como mínimo de tres meses y deberá verificarse la madurez de las hembras en desarrollo antes de interrumpir el experimento.

12. Los quistes de nematodos del quiste de la patata de las cuatro réplicas se extraerán y contarán por separado para cada maceta.

13. La población final (Pf) existente en la variedad de control susceptible estándar al final del ensayo de resistencia se determinará contando todos los quistes de todas las réplicas y los huevos y juveniles de al menos cuatro réplicas.

14. Se deberá lograr una tasa de multiplicación de al menos  $20 \times (Pf/Pi)$  en la variedad de control susceptible estándar.

15. El coeficiente de variación (CV) en la variedad de control susceptible estándar no deberá superar el 35 %.

16. La susceptibilidad relativa de la variedad de patata sometida a ensayo con respecto a la variedad de control susceptible estándar se determinará y expresará como porcentaje, de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\frac{Pf_{\text{variedad sometida a ensayo}}}{Pf_{\text{variedad de control susceptible estándar}}} \times 100 \%$$

17. En el caso de que la variedad de patata sometida a ensayo tenga una susceptibilidad relativa superior al 3 %, bastará con contar los quistes. En los casos en los que la susceptibilidad relativa sea inferior al 3 %, habrá que contar los huevos y los juveniles, además de los quistes.

18. En el caso de que los resultados de los ensayos realizados en el primer año indiquen que una variedad es completamente susceptible a un patotipo, no será necesario repetir dichos ensayos en el segundo año.

19. Los resultados de los ensayos se confirmarán mediante al menos otra prueba realizada en otro año. La media aritmética de la susceptibilidad relativa en los dos años se utilizará para obtener la puntuación, de acuerdo con el baremo de puntuación estándar.

#### **Anexo n°4: Notificación listado variedades resistentes**

Las **comunidades autónomas** elaborarán anualmente, **antes del 16 de enero de cada año**, la lista de las nuevas variedades de patatas con respecto a las cuales se haya constatado mediante una verificación oficial su resistencia a los nematodos del quiste de la patata. En la información se detallará la especie, los patotipos, los grupos de virulencia o las poblaciones de nematodos del quiste de la patata a los que sean resistentes las variedades, su grado de resistencia y el año de su determinación.

Estos datos se **notificarán por escrito al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino** según el modelo orientativo que se presenta a continuación, y éste a su vez, notificará, a través del cauce correspondiente, a la Comisión Europea y a los demás Estados Miembros cada año, a 31 de enero a más tardar.

**Anexo nº12: Notificación listado variedades resistentes****Comunidad autónoma:****Año:**

<b>Nombre variedad</b>	<b>Especie de Globodera a la que es resistente</b>	<b>Año de determinación de la resistencia</b>	<b>Grado de resistencia <sup>1</sup></b>	<b>Patotipo/Patotipos<sup>2</sup>, poblaciones o grupos de virulencia a los que es resistente</b>	<b>Observaciones</b>

<sup>1</sup> El grado de resistencia se cuantificará con una puntuación del 1 al 9 según el grado de susceptibilidad indicado en el Anexo nº11.

<sup>2</sup> Para la especie *Globodera rostochiensis* existen cinco patotipos denominados Ro1, Ro2, Ro3, Ro4 y Ro5; en la especie *Globodera pallida* existen tres patotipos denominados Pa1, Pa2, y Pa3.

## **Anexo nº5: Notificación de degradación o variación de la resistencia**

Los agricultores de patata, productores de patata de siembra y demás operadores del sector tienen la obligación de notificar a los organismos oficiales responsables de las comunidades autónomas toda sospecha de presencia o presencia confirmada de nematodos del quiste de la patata en su territorio, como consecuencia de una degradación o variación de la eficacia de una variedad de patata resistente que esté relacionada con una modificación excepcional de la composición de una especie de nematodos, un patotipo o un grupo de virulencia.

La **comunidad autónoma** dispondrá que la especie de nematodos del quiste de la patata y, cuando proceda, el patotipo o grupo de virulencia en cuestión sean investigados y confirmados mediante los métodos adecuados. Los **datos de las confirmaciones** se enviarán por **escrito** cada año el **15 de diciembre a más tardar**, al Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y este a su vez, los notificará el 31 de diciembre a más tardar, a través del cauce correspondiente, a la Comisión Europea y a los demás Estados Miembros.

**BORRADOR**

