

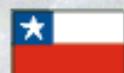


CALIDAD GENETICA y SANITARIA



*Un instrumento para la competitividad de
la cadena agroindustrial*

PROGRAMA COOPERATIVO PARA EL DESARROLLO TECNOLÓGICO AGROPASTORIL DEL CONO SUR





PROGRAMA COOPERATIVO PARA EL DESARROLLO TECNOLÓGICO AGROPECUARIO DEL CONO SUR
PROCISUR

Subprograma Biotecnología
*Proyecto "Desarrollo de la Capacidad Regional para la Producción de
Plantas de Alta Calidad Genético-Sanitaria"*

CALIDAD GENÉTICA y SANITARIA

*Un instrumento para la competitividad de
la cadena agroindustrial*

Coordinador: *Ing. Daniel Pagliano*

Montevideo, Uruguay
Mayo, 1999

ARGENTINA - BOLIVIA - BRASIL - CHILE - PARAGUAY - URUGUAY

IICA  Instituto Interamericano de
Cooperación para la Agricultura

1ª Edición: Mayo 1999

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Este libro no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del PROCISUR.

Pagliano, Daniel coord.

Calidad genética y sanitaria: un instrumento para la competitividad de la cadena agroindustrial / Coord. Daniel Pagliano. -- Montevideo : IICA-PROCISUR, 1999.
100 p.

ISBN 92-9039-400 5

/BIOTECNOLOGIA VEGETAL/ /GENETICA/ /MANUAL//CONTROL DE CALIDAD/
/CERTIFICACION DE PLANTAS//PROTECCION DE LAS PLANTAS//AGROINDUSTRIA/
/COMPETITIVIDAD

AGRIS F30

CDD 581.15

Las ideas y planteamientos contenidos en este documento son propios de los autores y no representan necesariamente el criterio de las instituciones integrantes del PROCISUR.

El Proyecto Desarrollo de la Capacidad Regional para la Producción de Plantas de Alta Calidad Genético-Sanitaria, se ejecutó en el marco del Subprograma Biotecnología del PROCISUR, durante el período 24/02/95 al 24/02/99, contando con el financiamiento del Banco Interamericano de Desarrollo (BID).

INDICE

Prólogo , por <i>Daniel Pagliano</i>	i
Capítulo I. Biotecnología y Agricultura	
Novos desenvolvimentos na biotecnología vegetal por <i>A.C. Torres</i> y <i>J. Amauri Buso</i>	3
Potencial, demandas e modalidades para a produção de plantas de alta qualidade genética e sanitária por <i>J. A. Peters</i>	13
Capítulo II. Calidad Sanitaria	
Aspectos técnicos de la producción de materiales de sanidad controlada por <i>S.F. Nome</i>	21
Capítulo III. Calidad Genética	
Disponibilidade de técnicas moleculares para la identificação varietal por <i>S.C. Kothe Milach</i>	31
Identificación genética de frutales de propagación agámica: El caso de las vides en Chile por <i>P. Hinrichsen</i>	39
Capítulo IV. Certificación de materiales vegetales	
La certificación de plantas como instrumento de calidad por <i>J. Borde</i> y <i>A. Fossali</i>	49
Certificación de variedades: la visión de UPOV por <i>Y. Jadue</i>	53
Situación actual sobre la identificación y certificación de variedades en Bolivia por <i>C. L. Villarroel Vogt</i>	61
Capítulo V. Organización	
La calidad genético sanitaria como instrumento de la cadena agroindustrial por <i>D. Pagliano</i>	67
Anexo. Estándar. Certificación de materiales de propagación. Cítricos	
Introducción por <i>D. Pagliano</i>	

PRÓLOGO

En el Taller sobre Cultivos de Tejidos Vegetales *in vitro*, organizado por el Subprograma Biotecnología de PROCISUR en la ciudad de Asunción del 4 al 6 de octubre de 1993, los Institutos de Investigación de la región, acordaron como línea prioritaria el desarrollo de acciones que tiendan a hacer disponibles plantas de las especies de propagación agámica con alta calidad genético sanitaria así como también definir los criterios que componen esta calidad.

En todos los países existen iniciativas tendientes a mejorar la capacidad y la competitividad de los productores. Hay procesos de reconversión productiva, de diversificación o distintos incentivos, pero, sin embargo, uno de los insumos estratégicos como lo son las plantas que se usan en la siembra no siempre están disponibles en forma suficiente o no hay garantías de calidad de las mismas.

En este sentido, PROCISUR presentó al Banco Interamericano de Desarrollo (BID) una iniciativa que fue apoyada y que desde 1996 ha realizado actividades en los seis países del Cono Sur. Estas actividades incluyeron cursos, desarrollo de investigación y productos como kits de diagnóstico, seminarios internacionales y otras (<http://www.procisur.org>).

El proyecto contribuyó a incrementar la oferta de plantas, vinculó a los participantes de la cadena de calidad, desarrolló tecnología de diagnóstico, estableció colecciones de referencia y capacitó a recursos humanos.

Algunos de los aspectos relevados en este proyecto se presentan en esta publicación, pero, sin perjuicio de esto, es de nuestro interés subrayar algunos temas que han sido identificados como importantes en términos de oportunidades:

1. La región aún es deficitaria en plantas de alta calidad que son utilizadas en la siembra o instalación de cultivos de propagación agámica. Cuando se analiza la evolución de los distintos rubros hay una permanente señal de que es necesario aumentar la producción y las referencias para evaluar la calidad de las mismas.

Daniel Pagliano*
INIA Las Brujas, Uruguay

* Líder del Proyecto
"Desarrollo de la Capacidad Regional
para la Producción de Plantas de Alta
Calidad Genético-Sanitaria"

2. Todos los países a través de sus instituciones y empresas se encuentran abocados a mejorar sus capacidades para la producción y el uso de plantas. Hay una masa crítica importante y una necesidad de establecer alianzas, interacciones y proyectos conjuntos.
3. El nivel de la investigación y desarrollo no es homogéneo entre zonas de la región, pero sí es de buen nivel y llega en algunos casos a la excelencia medida en el ámbito internacional. Esto significa que hay capacidad regional para la innovación y la investigación.
4. Existe un creciente relacionamiento y por tanto de conocimiento, entre los integrantes de la cadena de producción de plantas de calidad. Esto se observa tanto al nivel de la producción física como también en las Instituciones que se encargan del control de la calidad. La necesidad de armonizar la visión a nivel regional fue señalada como una oportunidad para construir sistemas de alcance regional.
5. Los esquemas de propiedad intelectual en los países son similares o compatibles, por lo que rápidamente se alcanzarían acuerdos en este tema.

En definitiva existe una producción intensiva en aumento, alta demanda de plantas comerciales y baja disponibilidad de materiales. La demanda así como las tecnologías de producción y evaluación de la calidad están disponibles, por lo que existe una oportunidad para el desarrollo.

Los problemas detectados incluyen falta de coordinación, escasa difusión de los avances y disponibilidades ya existentes, escasos materiales iniciales de referencia para iniciar la cadena, escasos estándares de producción y evaluación de calidad, y desconfianzas entre institutos y productores.

Los conceptos señalados como de proyección al futuro incluirían:

1. La necesidad de capacitación de las interfases en la cadena de calidad. Esto quiere decir que el usuario que recibe el producto del eslabón anterior, debe saber exactamente cómo continuar la calidad para poder pasarla al usuario siguiente. Para poder recibir y dar una calidad, debe haber una capacidad, que permita mantener la misma y detectar las posibles desviaciones.
2. El fortalecimiento de la cadena es uno de los aspectos principales. A través de mecanismos de participación y de organización, la región puede encontrar una mejora importante en la capacidad de producción de plantas y así contribuir eficientemente a las iniciativas de producción de los distintos rubros.
3. La transferencia horizontal y vertical del conocimiento es una de las herramientas más importantes en este sistema. En todos los países hay

una experiencia acumulada de alto valor y por tanto deberían mejorarse los canales que permitan que la misma pueda compartirse.

4. Se debe incrementar el desarrollo de tecnología necesaria para evaluar la calidad. A través de actividades de investigación y en acuerdo con la cadena de calidad, se debe fortalecer la información técnica necesaria para el proceso y los estándares.

Por lo expuesto, las condiciones son propicias para establecer las cadenas de calidad en los países, como también avanzar para que las cadenas se conviertan en una Red de Calidad Regional en una visión de sistema. La Real Academia Española expresa que un “sistema” es un “conjunto de cosas que ordenadamente relacionadas entre sí contribuyen a un determinado objeto”. Un sistema regional para la producción de plantas puede ser un elemento importante que contribuya a las políticas nacionales de incentivo a la producción y las regionales de integración.

Los nuevos paradigmas exigen una visión compartida. No se avanzaría si existen compartimentos estancos, no relacionados y sin evaluación. A través de modelos donde el planeamiento entre los participantes se convierta en herramienta, podremos dar los pasos inteligentes necesarios para que la producción de la región sea más competitiva.

Quiero por último expresar mi gratitud a la Comisión Directiva del PROCISUR, a todos los colegas Enlaces Nacionales –ellos tienen el mérito!-, a todos los asesores que participaron, a la Secretaría Ejecutiva del PROCISUR –un grupo excelente–, a mis compañeros de la Unidad de Biotecnología y a todos aquellos que de una u otra forma hicieron realidad este proyecto.

*“LA CASUALIDAD SÓLO
FAVORECE A LOS ESPÍRITUS
PREPARADOS.”*
Luis Pasteur



CAPÍTULO I

BIOTECNOLOGÍA Y AGRICULTURA

NOVOS DESENVOLVIMENTOS NA BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Os avanços na biotecnologia se baseiam em descobertas que ocorreram nos últimos 40 anos (Quadro 1). Na década de cinquenta, Miller *et al.* (1955, 1956) descobriram a cinetina (primeira citocinina). O isolamento e a caracterização desse composto

Quadro 1. Retrospectiva dos principais eventos na área de cultura de tecidos de plantas.

Años	Eventos
1902	Haberlandt foi o pioneiro da cultura de tecidos, baseando-se na teoria da totipotencialidade das células de plantas.
1904	Hanning cultivou de embriões de várias espécies de crucíferas.
1922	Knudson obteve plantas de orquídeas in vitro via cultura de embriões .
1925	Laibach recuperou híbridos do cruzamento entre <i>Linum austriacum</i> x <i>L. perene</i> via cultura de embrião.
1934	White desenvolveu a técnica de cultura de raízes.
1952	More & Martin pela primeira vez obtiveram dália livre de vírus.
1955	Morel & Martin obtiveram batata livre de vírus.
1955	56 Miller <i>et al.</i> demonstraram o controle químico da organogênese in vitro pelo balanço entre auxina e citocinina.
1958	Steward <i>et al.</i> e Reinert <i>et al.</i> , independentemente, desenvolveram a técnica de embriogênese somática.
1960	Morel obteve plantas de orquídeas livre de vírus, via cultura de ápices caulinares. Assim, iniciou-se a aplicação comercial dessa técnica.
1960	Cocking obteve protoplastos utilizando enzimas de degradação da parede celular.
1962	Murashige & Skoog desenvolveram a formulação salina do meio MS.
1962	Kanta <i>et al.</i> Obtiveram as primeiras plantas pela técnica da polinização in vitro.
1972	Murashige <i>et al.</i> desenvolveram a técnica de microenxertia em citrus.
1973	Expressão da insulina humana em <i>E. coli.</i>
1974	Zaenen <i>et al.</i> e Larebek <i>et al.</i> , independentemente, demonstraram que o plasmídeo Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> era o princípio indutor de tumor em planta.
1983	Foram obtidos os primeiros Kits de diagnóstico.
1985	Horsch <i>et al.</i> obtiveram plantas transgênicas de fumo via transformação genética de explantes de discos foliares.
1994	Comercialização de plantas transgênicas.

Antonio Carlos Torres*
Investigador responsable de
Biotecnología
José Amauri Buso*
Director Científico

*EMBRAPA Hortaliças, Brasil

possibilitaram a substituição de misturas complexas do meio nutritivo, como o leite de coco, por substâncias simples que promoviam a divisão celular. Foi demonstrado que a diferenciação de parte aérea, raiz e calo era regulada pelo balanço auxina/citocinina. Concentrações relativamente elevadas de auxinas favorecem a formação de raízes, enquanto que a relação inversa induz a regeneração de parte aérea (Miller *et al.*, 1955; Skoog & Miller 1957). Esse resultado serviu de base para trabalhos subseqüentes em laboratórios de todo o mundo no desenvolvimento das técnicas de propagação em larga escala de material *in vitro*. Em 1960, quando Morel utilizou a cultura de ápices caulinares para recuperar plantas de orquídea livre de vírus, iniciou-se a aplicação comercial dessa técnica com a produção de plantas de alta qualidade fitossanitária. Hoje, a manipulação de células, tecidos e órgãos de plantas *in vitro* tornou-se uma realidade na produção de haplóides, na obtenção de variantes somaclonais, na recuperação de híbridos interespecíficos de cruzamentos incompatíveis, na produção de substâncias farmacológicas, no uso de biorreatores e na regeneração de células transformadas de espécies de interesse agrônomo.

Em 1973, a engenharia genética iniciou-se com a expressão da insulina humana em *E. coli*. Nesse curto período essa tecnologia evoluiu rapidamente, possibilitando o isolamento e clonagem de genes, a transferência e expressão de genes entre espécies incompatíveis e a engenharia de proteínas para otimização de suas funções.

Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética em seqüências de DNA, permitindo a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Estas técnicas podem ser usadas na determinação da qualidade genética de genótipos micropropagados, bem como na indexação de materiais provenientes da cultura de tecidos.

Esses avanços são conseqüências de alocações de recursos financeiros de dezenas de bilhões de dólares, principalmente, da iniciativa privada pelos países desenvolvidos. Tais investimentos propiciaram o estabelecimento de centenas de companhias particulares e governamentais, especializadas no desenvolvimento e utilização de um conjunto de técnicas avançadas de biologia celular e molecular, visando aplicação na agroindústria, saúde humana e agropecuária.

No Brasil, a partir do final da década de setenta, o governo também investiu pesados recursos para formação de massa crítica no setor biotecnológico e hoje, há mais de uma centena de laboratórios governamentais e alguns da iniciativa privada que atuam nessa área.

RECUPERAÇÃO DE PLANTAS LIVRES DE VÍRUS

Limasset *et al.* (1949) observaram que plantas de fumo infectadas com TMV possuíam, na parte aérea, um gradiente de concentração decrescente desse vírus em direção ao ápice, sendo, na maioria dos casos, nula no ápice. Esses conhecimentos foram utilizados por Morel & Martin (1952) para produzirem plantas de dália livres de vírus. Desde então a cultura de ápices caulinares tem sido empregada para produzir plantas com alta qualidade fitossanitária, em todo o mundo.

Na EMBRAPA Hortaliças, plantas de alho livre de vírus apresentaram aumento de produtividade de massa seca dos bulbos de até 120% e excelente desenvolvimento vegetativo durante o ciclo da cultura, quando comparadas com plantas infectadas. Batata-semente pré-básica com alta qualidade fitossanitária também tem sido produzida, desde o início da década de oitenta.

Essa metodologia continua em franca expansão, nos países do Cone Sul, pelos excelentes resultados no aumento da produtividade nas culturas da batata, alho, batata-doce, cana de açúcar, ornamentais e frutíferas.

MICROPROPAGAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO EM LARGA ESCALA

A micropropagação é a propagação vegetativa *in vitro*. Essa é a aplicação mais empregada da cultura de tecidos. Foi usado pela primeira vez por Morel (1960) para multiplicar orquídeas via cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos que davam origem a novas plantas. A sucessiva divisão desses protocormos acelera a propagação de orquídeas. A multiplicação rápida de genótipos de interesse mediante as técnicas de cultura *in vitro*, em âmbito comercial, foi uma das linhas de maior desenvolvimento em todo o mundo. Os laboratórios comerciais surgiram agregados aos viveiros como demanda das próprias companhias produtoras de mudas.

No caso do Brasil, o país conta com mais de vinte laboratórios comerciais que se destinam a micropropagação de hortaliças (batata e alho), fruteiras (principalmente, morango, banana e abacaxi), espécies florestais (eucalipto), cana de açúcar e ornamentais.

Em Cuba, 15 biofábricas então em franca expansão e cujo potencial alcança 60 milhões de vitroplantas. Em 1997, a produção planejada foi de 39,7 milhões, dos quais 27 milhões correspondiam a banana, 11,2 milhões a cana de açúcar, 0,5 milhões a ornamentais, e o restante com abacaxi, manga e inhame.

Com relação ao controle da qualidade genética desses materiais provenientes da cultura *in vitro* pouco tem sido feito. Não há ainda aplicação prática dos conhecimentos de genética molecular nesse segmento, embora alguns laboratórios começaram a se preocupar sobre essa necessidade.

QUEBRA DE BARREIRA DE INCOMPATIBILIDADE

A introdução de genes de interesse em espécies cultivadas, muitas vezes, é limitada em virtude de barreiras que podem ocorrer antes da fertilização (barreiras pré-zigóticas) ou após a fertilização (barreiras pós-zigóticas) (Zenkteler, 1990).

As barreiras pré-zigóticas de ocorrência mais freqüentes são: a) inabilidade de os grãos de pólen germinarem em estigmas não compatíveis; b) crescimento lento do tubo polínico, não alcançando o óvulo em tempo hábil; c) estilete demasiado longo; d) abscisão precoce da flor antes de o tubo polínico alcançar o óvulo; e) não ocorrer fusão dos gametas masculino e feminino, mesmo estando eles próximos (Kanta, 1960; Kanta & Maheshwari, 1963; Maheshwari & Kanta, 1964; Bhojwani & Razdan, 1983). No caso das barreiras pós-zigóticas, a fertilização pode ocorrer, mas o embrião híbrido aborta antes da maturidade por causa da degeneração, ou do desenvolvimento anormal do endosperma (Shivanna, 1982; Bhojwani & Razdan, 1983).

Dentre os métodos utilizados para transpor as barreiras da fertilização, incluem-se: pulverizar o estigma com produtos químicos; dissolver a cutícula com cutinase; fazer polinização precoce no estágio de botão floral; seccionar uma porção do estilete e polinizar a parte exposta deste; aplicar substâncias reguladoras de crescimento na base da flor, para prevenir abscisão desta (Maheshwari & Kanta, 1964); tratar o estilete com calor (Lewis, 1942); usar mistura de pólen na polinização (Laterrot, 1983); irradiar o pistilo com raios X ou ultravioleta (Arasu, 1968a, b); polinizar dentro do ovário (Kanta, 1960; Maheshwari & Kanta, 1964); e aplicar um potencial elétrico entre o pólen e o estigma durante a polinização (Roggen *et al.*, 1972).

Métodos recentes, que incluem a polinização e fertilização *in vitro* e a fusão de protoplastos, estão sendo usados na recuperação de híbridos raros, que apresentam mecanismos de incompatibilidade sexual impedindo a hibridação natural entre espécies. A polinização *in vitro* envolve a cultura de óvulos isolados, ou juntamente com a placenta, nos quais são depositados os grãos de pólen, em germinação ou não. Essa íntima associação elimina as barreiras de incompatibilidade que, porventura, estejam no estigma, estilete ou ovário. Os gametas masculino e feminino combinam-se para produzir o zigoto (Higgins & Petolino, 1988). A aplicabilidade dessa técnica depende do desenvolvimento do zigoto, desde a fertilização até a maturidade (Collins *et al.*, 1984).

VARIAÇÃO SOMACLONAL

Células não meristemáticas podem ter sua identidade genética alterada. A regeneração de plantas dessas células podem produzir variantes, diferentes do genótipo original. Caso essa modificação seja transmitida via sexual, essa característica constitui uma variação somaclonal. Essa variação também pode ser induzida *in vitro* pela inclusão de reguladores de

crescimento no meio de cultura. A variação somaclonal é indesejável na micropropagação, produção de haplóide, embriogênese somática e transformação genética de plantas. A variação somaclonal em características fenotípicas tem sido observada em *Saintpaulia* (2-10%), *Dianthus* (0,8%), *Dracaena* (10%) e *Chrysanthemum* (60%) (Jain & De Klerk, 1998). Somaclones apresentando diferenças quantitativas tem sido obtido em tomate (Evans & Sharp, 1986), alface (Engler & Grogan, 1984), plantas ornamentais (duração da vida útil ou no número de flores por planta) (Jain & De Klerk, 1998), entre outras. Em plantas de propagação assexual, por exemplo o alho, essa metodologia pode ser utilizada para aumentar a base genética do material (Illg, 1990). Os exemplos de genótipos superiores advindo do uso dessa técnica são restritos.

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

Na última década uma gama de métodos e estratégias para transferência de genes para células de plantas foram publicados (microlaser, microinjeção, macroinjeção, aplicação direta de DNA) com pouco sucesso. Recentemente, Zilberstein *et al.* (1994) obtiveram trigo transgênico aplicando DNA diretamente no estigma, demonstrando a herança do gene introduzido em gerações subsequentes. Se esses resultados forem reproduzíveis esse método será o mais simples e barato para a transformação de plantas (Siemens & Schieder, 1996).

Em geral, a transferência de genes mediante *Agrobacterium* e/ou via biolística continuam as técnicas universalmente usadas na produção de plantas transgênicas. Com esses métodos pode-se introduzir DNA na célula, mas o processo de integração do DNA exógeno é ao acaso. O silenciamento de genes e a interação entre diferentes transgenes resulta em padrões não esperado de expressão dos genes introduzidos. Várias transformações independentes com uma construção específica são necessárias para a obtenção de uma planta transgênica com um padrão de expressão desejável.

Em 1994, o tomate FLAVR SAVR da Calgene foi o primeiro produto oriundo da engenharia genética de plantas a ser comercializado nos EUA. Desde então, houve uma expansão nesta área e até junho de 1996, 15 de um total de 21 produtos de plantas transgênicas estão nos mercados da América do Norte, China, Reino Unido (Quadro 2).

Na América Latina, nos últimos 5 anos ocorreu um aumento considerável do número de laboratórios com pesquisas em plantas transgênicas como pode ser observado na reunião da REDBIO de 1998, em Cuba. Nessa área foram apresentados trabalhos de transformação de plantas dos países: Argentina (batata, girassol, Lupinus, trigo), Brasil (alface, amendoim, batata, cana de açúcar, eucalipto, fumo), Chile (batata, pimentão), Colômbia (arroz, mandioca), Costa Rica (arroz, milho), Cuba (arroz, banana, batata, batata-doce, café, cana de açúcar, fumo, mamão), México (milho), Peru (batata), Trindade (cacao, Anturium), Venezuela (batata) e Uruguai (batata).

Quadro 2. Desregulamentação de produtos transgênicos. (Adaptado de Redenbaugh, 1997).

1994	1996	1998 – 1999 possíveis
Estados Unidos Calgene, tomate FLAVR SAVR	Canada Calgene, tomate FLAVR SAVR	Estados Unidos AgrEvo, milho tolerante ao herbicida glufosinate
China Fumo, resistência a vírus Tomate, resistência a vírus	Monsanto, batata Bt Inglaterra Zeneca, pasta tomate baixo PG	Canada Monsanto, canola tolerante ao herbicida glyphosate
1995	Europa AVEBE, batata com modificação no teor de amido	Europa AgrEvo, milho tolerante ao herbicida glufosinate Ciba-gleigy, milho Bt Mogen, rapeseed baixo fitato
Estados Unidos Asgrow, abóbora com resistência a vírus Calgene, algodão BXN Calgene, canola com maior teor de ácido laurico DNAP, tomate com gene que codifica para a ACC sintase	Monsanto, soja tolerante ao herbicida glyphosate Argentina Monsanto, soja tolerante ao herbicida glyphosate	Monsanto, canola tolerante ao herbicida glyphosate. PGS, canola tolerante ao herbicida glufosinato
Canada AgrEvo, canola tolerante ao herbicida glufosinato	1997 Argentina Monsanto, milho e algodão com gene Bt Monsanto, algodão tolerante ao ghyphosate Monsanto, algodão com tolerância ao bromoximil	Japão Ciba-Gleigy, milho com gene Bt Monsanto, soja tolerante ao herbicida glyphosate
México Calgene, tomate FLAVR SAVR		Australia Florigene, plantas de violeta e cravo com maior período pós-colheita
1996		
Estados Unidos Ciba-Geigy & Micogen, milho Bt Monsanto, milho Bt, batata Bt, Monsanto, soja tolerante ao herbicida glyphosate Pioner, milho, Egg white avidin gene	1998 Brasil* Monsanto, soja tolerante ao herbicida glyphosate	

* **Brasil:** Até 12 de dezembro de 1998, foram solicitadas a CTNBio 299 liberações planejadas de OGM

Como se observa vários países têm em comum pesquisas com transformação de plantas de batata visando resistência a vírus, fungos e bactérias. No Brasil, plantas de batata “Achat” com resistência a PVY foram desenvolvidas em trabalho de parceria entre o EMBRAPA Hortaliças, CENARGEN, Universidade Federal de Pelotas e INGEPI. Essas plantas têm mantido o padrão de resistência em casa de vegetação, em todos os testes, por inoculação mecânica com o vírus. Para que o resultado desse trabalho chegue ao mercado, muitos estudos ainda necessitam ser realizados. O primeiro é a confirmação, em condições de campo, do nível de resistência obtido em casa de vegetação. Assim, caso essas plantas apresentem, em campo, a reação de resistência observada em casa de vegetação, mantendo ao mesmo tempo as características agronômicas da cultivar Achat, a EMBRAPA e seus parceiros terão desenvolvido um produto de interesse para os bataticultores (Torres *et al.*, 1999).

LITERATURA CITADA E CONSULTADA

- ARASU, N. T. 1968a. Self-incompatibility in angiosperm: A review. *Genetica*, v.39, p.1-24.
- . 1968b. Overcoming self-incompatibility by irradiation. Report East Malling Research Station, n.1967, p.109-112.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. 1983. *In vitro* pollination. **In:** BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K., ed. Plant tissue culture: theory and practice. Amsterdam: Elsevier. p.181-198.
- CHILTON, M.D.; DRUMMOND, M.H.; MERLO, D.J.; SCIACKY, D.; MONTOYA, A.L.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells, the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, v.11, p.263-271.
- COCKING, E.C. 1960. A method for isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, v.187. p.962-963.
- COLLINS, G.B.; TAYLOR, N.L.; DE VERNA, J.W. 1984. *In vitro* approaches to interspecific hybridization. **In:** GUSTAFSON, J.P., ed. Gene manipulation in plant improvement. New York: Plenum. p.489-492.
- ENGLER, D.E. & GROGAN, R.G. 1984. Variation in lettuce plants regenerated from protoplasts. *J. Hered.*, v. 75, p.426-430.
- EVANS, D.A. & SHARP, W.R. 1986. Application of somaclonal variation. *Biotechnology*, v.4, p. 528-532.
- GAUTHERET, R.J. 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus tubercules de carrote. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, v.118, p.121-220.
- GUHA, S.; MAHESHWARI, S.C. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*, v.212, p.97-98.
- HANNIG, E. 1904. Zur physiologie pflanzlicher embryonen. I. Ueber die kultur von cruciferen embryonen ausserhalb des embryosacks. *Botanische Zeitung*, v.62, p.45-80.
- HIGGINS, R. K.; PETOLINO, J. F. 1988. *In vitro* pollination fertilization of maize: influence of explant factors on kernel development. *Plant Cell, Tissue and*

- Organ Culture, v.12, p.21-30.
- HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMANN, N.L.; EICHOLTZ, D.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, v.227, p.1229-1231.
- ILLG, R.D. 1990. Variação samaclonal. **In:** TORRES & CALDAS (eds). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília:Imprensa Nacional, p.287-295.
- JAIN, S.M. & De KLERK, G.-J. 1998. Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, v.4, p.63-75.
- KANTA, K.; RANGASWAMY, N.S.; MAHESHWARI, P. 1962. Test-tube fertilization in a flowering plant. *Nature*, v.194, p.1214-1217.
- . 1960. Intraovarian pollination in *Papaver rhoeas* L. *Nature*, v.188, p.683-684.
- ; MAHESHWARI, P. 1963. Intraovarian pollination in some Papaveraceae. *Phytomorphology*, v.13, p.215-229.
- KNUDSON, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, v.73, p.1-25.
- KOGH, F.; HAAGEN-SMIT, A.J.; ERXLEBEN, H. 1934. Über ein neues auxin ('Hetero-auxin') aus harn. *Zeitschrift fuer Physiologische Chemie*, v.228, p.90-103.
- KRIKORIAN, A.D.; BERQUAM, D.L. 1969. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. *Botanical Review*, v.35, p.59-88.
- LAIBACH, F. 1925. Das taubwerden von bastardsamen und die künstliche aufzucht früh absterbender bastardembryonen. *Zeitschrift fuer Botanik*, v.17, p.417-459.
- LATERROT, H. 1983. Use of pollen mixture technique in interespecific cross between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. *Tomato Genetic Cooperative Report*, v.33, p.3-4.
- LEWIS, D. 1942. The physiology of incompatibility in plants. I. The effect of temperature. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, v.131, p.13-26.
- LIMASSET, P.; CARNUET, P.; GENDRON, Y. 1949. Tritage du virus de la Mosaïque de Tabac (*Marmor tabaci* Holmes) dans les organes aeriens de tabacs infectes. *Compte Rendu-Academie des Sciences Paris*, v. 228, p. 1888-1890.
- MAHESHWARI, P.; KANTA, K. 1964. Control of fertilization. **In:** LINSKENS, H.F., ed. *Pollen physiology and fertilization*. Amsterdam: North Holland, p.187-194.
- MARTON, L.; WULLEMS, G.J.; MOLENDIJK, L.; SCHILPEROORT, R.A. 1979. *In vitro* transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, v.277, p.129-131.
- MILLER, C.O.; SKOOG, F.; SALTZA, M.; STRONG, F. M. 1955. Kinetin a cell division factor from desoxyribonucleic acid. *Journal American Chemical Society*, v.77, p.1392.
- SKOOG, F.; OKAMURA, F.S.; VON SALTZA, M.H; STRONG, F.M. 1956. Isolation, structure and synthesis of kinetin: a substance promoting cell

- division. *Journal American Chemical Society*, v.78, p.1375-1380.
- MOREL, G.M.; MARTIN, C. 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences*, v.235, p.1324-1325.
- . 1960. Producing virus-free *Cymbidium*. *American Orchid Society Bulletin*, v.29, p.495-497,
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497.
- ; BITTERS, W.P.; RANGAN, T.S.; NAUER, E.M.; ROISTACHER, C.N.; HOLLIDAY, P.B. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. *HortScience*, v.7, p.118-119.
- NOBÉCOURT, P. 1939. Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *Comptes Rendus des Séances - Societe Biologie*, v.130, p.1270-1271.
- REDENBAUGH, K. 1997. Legal and public aspects of biotechnology. *Acta Horticulturae*, v.447, p.627-636.
- REINERT, J. 1959. Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventive-embryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta*, v.53, p.318-333.
- ROGGEN, H.P.J.R.; VAN DIJK, A.J.; DORSMAN, C. 1972. Electric aided pollination a method of breaking incompatibility in *Brassica oleracea* L. *Euphytica*, v.21, p.181-184.
- SHIVANNA, K.R. Pollen-pistil interaction and control of fertilization. In: JOHRI, B.M., ed. *Experimental embryology of vascular plants*. Berlin: Springer-Verlag, 1982. p.131-174.
- SIEMENS, J. & SCHIEDER, O. 1996. Transgenic plants: genetic transformation – recent developments and the state of art. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, v.2, p.66-75.
- SKOOG, F.; TSUI, C. 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. *American Journal of Botany*, v.35, p.782-787.
- ; MILLER, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, v.11, p.118-130.
- SMITH, R.H.; MURASHIGE, T. 1970. *In vitro* development of the isolated shoot apical meristems of angiosperms. *American Journal of Botany*, v.57, p.562-566.
- STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. 1958. Growth and organized development of culture cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, v.45, p.705-708.
- TAKEBE, I.; LABIB, G.; MELCHERS, G. 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, v.58, p.318-320.
- TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; MELO, P.E.; ROMANO, E.; CAMPOS, M. de A.; PETERS, J.A.; BUSO, J.A.; MONTE, D. de C. 1999. Plantas transgênicas de batata Achat resistentes ao vírus do mosaico (PVY). *Biotechnology Ciência e Desenvolvimento*, 2:74-77.

- VAN LAREBEKE, N.; ENGLER, G.; HOLSTERS, M.; VAN DEN ELSACKER, S.; ZAENEN, I.; SCHILPEROORT, R.A.; SCHELL, J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*, v.252, p.169-170.
- WHITE, P.R. 1937. Vitamin B₁ in the nutrition of excised tomato roots. *Plant Physiology*, v.12, p.803-811.
- . 1934. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *American Journal of Botany*, v.26, p.59-64.
- ZAENEN, I.; Van LAREBEKE, N.; TEUCHY, H.; Van MONTAGU, M.; SCHELL, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* V. 86, p.109-127.
- ZENKTELER, M. 1990. *In vitro* fertilization and wide hybridization in higher plants. *Critical Review in Plant Sciences*, v.9, n°3, p.267-279.
- ZILBERSTEIN, A.; SCHUSTER, S.; FLAISHMAN, M.; PNINI-COHEN, S.; KONCZ, C.; MASS, C.; SCHELL, J.; EYAL, Z. 1994. 4th International Congress on Plant Molecular Biology (abstract 2013).

POTENCIAL, DEMANDAS E MODALIDADES PARA A PRODUÇÃO DE PLANTAS DE ALTA QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA

A biotecnologia moderna pode ter diferentes conotações e estas dependem da tecnologia do país na qual esta sendo empregada. No Brasil, visando englobar diferentes campos da ciência e tecnologia, a biotecnologia foi definida como a utilização de técnicas de biologia molecular e celular visando a manipulação de organismos superiores, microrganismos e produtos de sua atividade metabólica, para aplicação na agropecuária e agroindústria. De todas as técnicas biotecnológicas, a cultura de células e tecidos de plantas é a que tem, efetivamente, produzido uma resposta positiva à nível de produtor, colocando a disposição dos mesmos plantas com maior capacidade produtiva e/ou qualidade. Tal fato deve-se a utilização da técnica da cultura de meristemas, que acoplada à micropropagação, possibilita a eliminação de doenças e a multiplicação rápida de clones ou plantas selecionadas.

No Brasil, a biotecnologia começou a ser utilizada com mais intensidade na década de setenta, quando da instalação dos primeiros laboratórios de micropropagação nas Universidades e Institutos de Pesquisa. De 1980 a 1989, surgiram grandes laboratórios (multinacionais), que pretendiam suprir o mercado agrícola com plantas com alta qualidade genética e sanitária. No entanto, a instabilidade da economia brasileira, impossibilitou tal objetivo, vindo as mesmas a fecharem suas portas, devido, principalmente, aos altos investimentos em infraestrutura e mão de obra. De 1990 até a época atual, formaram-se inúmeras empresas de pequeno ou médio porte, especializadas em algumas espécies vegetais, com pequena infraestrutura e baixa mão de obra. Paralelamente às empresas privadas, os laboratórios de cultura de tecidos de plantas se multiplicaram nas Universidades e Empresas Públicas de Pesquisa (ex.: EMBRAPA, no âmbito Federal e Instituições Estaduais). Outro aspecto a salientar é que as técnicas utilizadas também mudaram, passando do nível celular, nos primeiros vinte anos, para o nível celular e molecular, na última década. O primeiro programa de Biotecnologia, no Brasil, foi elaborado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em 1988.

José Antonio Peters
Pro-Rector de la Universidade
Federal de Pelotas, Brasil

A potencialidade para produtos biotecnológicos, no Brasil, é enorme, devido as características agrícolas e extensão do país e do número

expressivo da população brasileira. Só para a exploração de fruteiras de clima temperado dispõe de mais de 2.000.000 ha, possibilitando o plantio de diferentes espécies, como macieira, pereira, ameixeira, pessegueiro, morangueiro, kiwi, amora-preta, videira, mirtilo (blueberry), através do emprego de variedades adaptadas às condições climáticas (máximo de 900 horas de frio, igual ou inferior a 7,2°C). Isto sem contar a área disponível para o plantio de espécies tropicais ou sub-tropicais, como banana, abacaxi, citros e nativas lenhosas. Além das espécies citadas acima, a biotecnologia pode contribuir expressivamente para o aumento da produtividade de olerícolas, ornamentais e florestais, através da eliminação de viroses, bactérias, fungos e doenças de raízes ou da multiplicação rápida de novas variedades ou clones. No entanto, atualmente, o Brasil importa mais de 70.000 t de frutas temperadas (noz, pêra, ameixa, maçã, cereja, framboesa, etc), representando um gasto de 150 milhões de US\$ anuais.

Da área plantada com morangueiro (cerca de 1300 ha), em 90% da mesma são utilizadas plantas micropropagadas ou multiplicadas a partir destas (Quadro 1), possibilitando uma produtividade média de 500 g/planta, 400% superior a obtida em algumas variedades, antes da utilização de técnicas biotecnológicas para a produção de plantas matrizes (madres). Embora o preço de uma planta matriz, obtida através da cultura de meristemas, seja mais elevado, os produtores de fruta, obtêm um retorno financeiro 23% superior ao conseguido com a utilização de plantas infectadas.

A cultura da macieira, no Brasil, teve seu maior desenvolvimento a partir da década de 1970, passando de 5.600, em 1976, para 25.327 ha cultivadas, em 1990, sendo que a produção elevou-se de 38.900 t, em 1979, para 373.133 t, em 1990. Atualmente a área plantada e a produção com esta fruteira são, respectivamente, de 27.572 ha e 570.000 t, representando 80% do consumo interno (Quadro 1). O aumento da participação da maçã produzida internamente, no consumo da população brasileira, representou um economia de divisas de 300 milhões de US\$ nos últimos quinze anos. Além disso, as exportações brasileiras já alcançam 12.085 t. A cultura da macieira, atualmente, visa o aumento da produtividade, necessitando, anualmente, de cerca de 2.000.000 de plantas novas, sendo a maioria utilizadas para a reposição em pomares velhos. A biotecnologia pode ser utilizada para a obtenção de variedades de porta-enxerto e copas, isentas de doenças, diminuindo a importação das mesmas.

As mesmas considerações podem ser estendidas para outras fruteiras de clima temperado, como pereira, ameixeira e videira. No caso específico da pereira, o aumento da área plantada está alicerçada na utilização de variedades copa mais adaptadas ao clima e, principalmente, de porta enxertos de origem asiática, como *Pyrus calleryana*. A maioria dos laboratórios de micropropagação detém toda a tecnologia de multiplicação destes porta-enxertos, eliminando a necessidade de importação dos mesmos. Em ameixeira, a doença causada pela bactéria *Xillella fastidiosa*

Quadro 1.
Potencialidades para produtos
biotecnológicos de algumas
espécies vegetais, no Brasil.

⇒ **Morangueiro**

Área Plantada: 1.300 hectares

Necessidade de plantas/ano: 78.000.000

Necessidades de plantas matrizes/ano: 250.000 – 300.000

⇒ **Macieira**

Área plantada: 27.572 hectares

Produção: 570.000 t

Necessidades de plantas/ano: 2.000.000

Importação: 25.000-35.000 porta enxertos/ano

⇒ **Pereira**

Área plantada: 2.500 hectares

Produção: 30.000 t

Consumo interno: 280.000 t/ano

Aumento da área plantada: Utilização de *Pyrus Calleryana*

⇒ **Ameixeira**

Área plantada: 3.800 hectares

Produção: 9.500 ton

Importação de fruta: 25.000 t

Problemas da cultura: *Xilella fastidiosa*

Xanthomonas pruni

⇒ **Batata**

Área plantada: 181.833 hectares

Produção: 2.321.128 t (1 bilhão dolares)

Área plantada no RS: 56.000 hectares

Área plantada com batata-semente: 20%

Importação de sementes: 90.000 caixas de 30 kg

praticamente dizimou com os pomares desta fruteira. A cultura de meristemas, acoplada à micropropagação tem possibilitado a eliminação desta e outras doenças que causam sérios danos a esta espécie. Em videira, 90% do vinhedos apresentam-se viróticos, representando uma diminuição de 60% na produção. A cultura de meristemas, tem possibilitado não só a eliminação de doenças como também a multiplicação massal de variedades de porta enxertos e copas.

Os pomares localizados do Estado de São Paulo representam 87% da citricultura brasileira, contribuindo com um faturamento de exportação anual de 1,5 bilhão de US\$, principalmente em suco concentrado e subprodutos como pectina, farelo e óleo. Pomares de citros ocupam uma área de 940,3 mil hectares, 230 milhões de plantas e 23.000 produtores. Embora as condições edafo-climáticas favoreçam a cultura dos citros em várias regiões do Brasil, a produtividade média é ainda extremamente baixa, quando comparada com outros países (2,0 caixas/planta/ano, contra 6,0 na Flórida, a principal região competidora do Brasil). O aumento de produção nos últimos anos deve-se essencialmente ao aumento de novas áreas de plantio. Atualmente, a taxa anual de plantios novos está em torno de 8 milhões de plantas/ano. Mais que expansão de área de plantio, esses números refletem a reposição em áreas de replantio, como aquelas afetadas por declínio, clorose variegada, gomose, entre vários outros problemas que afetam a produtividade do pomar. Um dos elementos mais importantes da cadeia produtiva dos citros é a produção de borbulhas, sementes e mudas (plantas matrizes), que pode ser incrementada pela utilização de técnica de microenxertia.

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma das principais hortaliças em área cultivada no Brasil (181.832 ha), detendo também expressivo volume de produção (2,3 milhões de t), com um rendimento médio de 17 t/ha e movimentando cerca de 1 bilhão de US\$. Por Estado, Minas Gerais, Distrito Federal e São Paulo têm produtividade média em torno de 23 t/ha, enquanto os estados de Santa Catarina, Paraíba e Rio Grande do Sul apresentam médias menores que 11 t/ha. As principais cultivares plantadas, no Brasil, são Bintje, Baronesa, Achat, Baraka e Monalisa.

O Estado do Rio Grande do Sul, embora ocupe o primeiro lugar em área plantada (51.856 ha), apresenta uma produtividade baixa (cerca de 7.000 kg/ha). Vários fatores contribuem para que isto ocorra, como o uso de variedades suscetíveis a moléstias, principalmente viroses e bactérias, o uso inadequado de técnicas agronômicas e a não adoção de tecnologias modernas. O Rio Grande do Sul é o único estado brasileiro que não importa tubérculos sementes, utilizando variedades produzidas nos Centros de Pesquisa. Mesmo assim, o valor das sementes certificadas destas variedades é responsável por mais de 50% do custo de produção.

A cultivar Baronesa é a mais plantada no Sul do Brasil, com cerca de 35.000 ha. Esta variedade foi liberada em 1952, sendo produzida pelo CPACT/EMBRAPA, e possui tubérculos de película rosa e polpa creme. É uma cultivar rústica, com alta estabilidade de produção em diferentes condições agro-climáticas, mas que apresenta suscetibilidade as principais viroses, como PLRV, PVY e PVX, que podem representar uma redução de 50% na produção total de tubérculos comerciáveis. A área plantada com batata-semente, no Estado do Rio Grande do Sul, representa apenas 20% da área total. Assim, a obtenção de matrizes livres das principais viroses para os programas de certificação de sementes básica e certificada

dos Estados brasileiros, é uma das principais atividades dos laboratórios de micropropagação. Através deste processo, a partir de 6.000 plantas matrizes podem ser obtidos 24.000 tubérculos pré-básicos. Cada 3.500 tubérculos pré-básicos possibilita a obtenção de 30 t de sementes básicas ou 130 t de sementes certificadas, no período de dois anos e meio (considerando dois plantios anuais).

No entanto, existem vários problemas relacionados à micropropagação, quando o objetivo é a obtenção de plantas matrizes com alta qualidade genética e sanitária. Entre estes podemos citar: disponibilidade de matrizes, padrões das plantas micropropagadas aptas à comercialização, testes de indexação e de pureza, variação somaclonal e, finalmente a desconfiança dos produtores em relação a este tipo de plantas. Estes problemas tornam-se maiores, quando objetivamos a comercialização de plantas micropropagadas entre os países do MERCOSUL ou do âmbito do PROCISUR. Deve-se então determinar que doenças são realmente importantes em cada país e quais os seus graus de injúrias ou prejuízos sobre a produtividade das espécies que serão comercializadas. Além disso, deve-se estabelecer quais testes de indexação e de pureza que devem ser realizados nas plantas, que comprovem efetivamente a sua qualidade sanitária e pureza genética.

No Brasil, as principais frutíferas de clima temperado e olerícolas, são atacadas por diferentes agentes patogênicos, alguns dos quais causam sérios danos às plantas afetando consequentemente a produção. Para algumas destas espécies, existem testes de indexação, que são usados rotineiramente nos laboratórios comerciais (Quadro 2). Em macieira, o vírus da mancha clorótica da macieira (ACLSV) foi encontrado em 45% das plantas de um lote de 116 amostras, enquanto que o vírus do

Quadro 2.
Principais doenças e testes de indexação para algumas espécies de importância econômica no Brasil

Espécie	Agentes patogênicos	Testes de indexação
Morangueiro	Complexo de vírus	Plantas indicadoras (<i>Fragaria vesca</i>)
Macieira	Apple chlorotic leaf spot virus Apple stem grooving virus	Sorologia (ELISA) e Plantas indicadoras
Pereira	Apple chlorotic leaf spot virus	-----
Ameixeira	<i>Xylella fastidiosa</i> <i>Xanthomonas pruni</i>	Sorologia (ELISA) -----
Pessegueiro	Prunus necrotic ring spot virus Prunus dwarf virus	----- -----
Batata	PVS; PVX; PVY; PLRV; PVA	Sorologia (ELISA e LATEX SENSIBILIZADO)
Alho	Garlic common latent virus Leek yellow stripe virus Onion yellow dwarf virus	Sorologia (ELISA) Sorologia (ELISA) Sorologia (ELISA)

acanalamento do lenho (ASGV) apareceu em 70% das plantas indexadas. O CPACT/EMBRAPA, localizado no Sul do Brasil, desenvolveu tecnologia para detectar estes vírus através do teste de ELISA.

Outro aspecto importante para a comercialização de plantas micropropagadas é a determinação da identidade genética do material vegetal. Atualmente, as tecnologias de marcadores moleculares possibilitam a análise e a detecção das diferenças ou identidades entre indivíduos ao nível de DNA. Os marcadores moleculares, como os descritores morfológicos, nada mais são do que uma nova categoria de descritores, com a diferença fundamental de que possuem um poder de resolução significativamente superior, pois permitem analisar o DNA de um indivíduo. Dentre os principais marcadores genéticos utilizados na análise genética de plantas, temos: isoenzimas, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); RAPD (Random Amplified polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism e microsátélites. Estes mesmos marcadores moleculares podem, também, ser utilizados para verificar possíveis variações somaclonais nos materiais micropropagados. No Brasil, a utilização destas técnicas moleculares, no processo de micropropagação, é ainda muito pequeno, estando restrita aos Institutos de Pesquisa.

Conforme pode ser observado, muito deve ser realizado no âmbito dos países do PROCISUR, visando a utilização plena e segura de plantas micropropagadas.

LITERATURA CONSULTADA

- BITTENCOURT, C.; REIFSHNEIDER, F.J.B.; MAGALHÃES, J.R.; FURUMOTO, O.; FEDALTO, A.A.; MARQUELLI, W.A.; DA SILVA, H.R.; FRANÇA, F.H.; AVILA, A.C.; GIORDANO, L.B. 1985. Cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.). Instruções Técnicas do CNPHortaliças (EMBRAPA). Nº. 8.
- BISOGNIN, D.A. 1996. Recomendações técnicas para o cultivo da batata no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 64p.
- COSTA, D.M.; CASTRO, L.A.S.; PETERS, J.A. 1989. Batata: A busca de maior produtividade. Horti Sul, (EMBRAPA) 1: 40-42.
- FERNANDES, M.S. 1998. A cadeia produtiva da fruticultura. **In:** Agronegócio Brasileiro - Ciência Tecnologia e Competitividade./ Editado por Ruy de Araújo Caldas et al., - Brasília; CNPq, 275p.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 1997. Banco de dados agregados e estruturas territoriais. Internet homepage: <http://www.sidra.org.br>. Dez.
- MACHADO, M.A. & SOBRINHO, J.T. 1998. A cadeia produtiva da citricultura. **In:** Agronegócio Brasileiro - Ciência Tecnologia e Competitividade./ Editado por Ruy de Araújo Caldas et al., Brasília: CNPq, 275p.



CAPÍTULO II

CALIDAD SANITARIA

ASPECTOS TÉCNICOS DE LA PRODUCCIÓN DE MATERIALES DE SANIDAD CONTROLADA

Si uno analiza las etapas que debe enfrentar al comenzar un trabajo de propagación genético sanitario, sin duda tiene que enfrentarse con la selección del material inicial, su procesamiento y la verificación final del estado sanitario.

ETAPAS CRITICAS EN EL CONTROL SANITARIO

- Selección del material inicial
- Constatación del estado sanitario inicial
- Liberación de patógenos
- Cultivo *in vitro*
- Verificación del estado sanitario

Selección del material inicial

Una buena selección del material inicial condiciona el éxito del programa de producción de plantas con control genético y sanitario. Cuando la iniciativa parte de fitopatólogos, este último punto suele ser prioritario y sucede a la inversa cuando el que lo inicia es un fitotecnista. Obviamente lo ideal es el trabajo en equipo y aplicar criterios equilibrados: elegir las mejores plantas del tipo genético deseado y de mayor productividad, con el mejor estándar de sanidad posible.

La calidad genética puede ser constatada por descriptores o por medios moleculares y la sanitaria por la variedad de métodos de diagnóstico aplicables a distintas especies. En ajo, por ejemplo, actualmente sólo trabajamos con material seleccionado por los especialistas en los cultivos respectivos en base a descripciones registradas que consignan peso y diámetro del bulbo, número de bulbillos/bulbo, color, forma de la planta, número de hojas fértiles, número de hojas por planta, peso de bulbillos, días a madurez, rendimientos, etc.

*presentado por S.F. Nome,
Director del Instituto de
Fitopatología Fisiología
Vegetal (IFFIVE), Instituto
Nacional de Tecnología
Agropecuaria, Argentina.*

*En base a trabajos de
Dra. Vilma Conci; Biól. Pablo
Lunello; Biól. Ana Canavelli e
Ing. Agr. Eva Cafrune*

Constatación del estado sanitario inicial

Al verificar la sanidad del material inicial se suelen cometer errores que se agravan con el avance de las tareas de multiplicación. La definición de patógenos a excluir, los métodos de detección a emplear y el tipo de tejido y época para la toma de muestras, son de capital importancia. Si tenemos la certeza que la planta inicial está libre de los patógenos determinados, nos ahorramos las etapas mas costosas de todo el procedimiento y podemos proceder a su multiplicación.

Emplearé el ejemplo de ajo y batata para demostrar su importancia.

Ajo

En ajo consideramos los siguientes virus: onion yellow dwarf(OYDV), leak yellow stripe (LYSV), carnation latent virus de ajo (CLV), un virus no asignado transmitido por ácaros (GAR VA), y garlic yellow streak (GYSV)

La concentración de virus varía según la época y el virus. La concentración relativa (valores de absorbencia de la muestra enferma sobre el promedio de 6 testigos sanos más 2 desvíos estándar) permite comparaciones de mediciones en diferentes épocas y laboratorios. Así por ejemplo, en ajo Blanco, OYDV puede ser verificado durante todo el año, pero con mayor seguridad en octubre. CLV da valores bajos durante todo el año. En ajo Colorado la situación es semejante pero el pico de máxima se da en Octubre (Figuras 1 y 2).

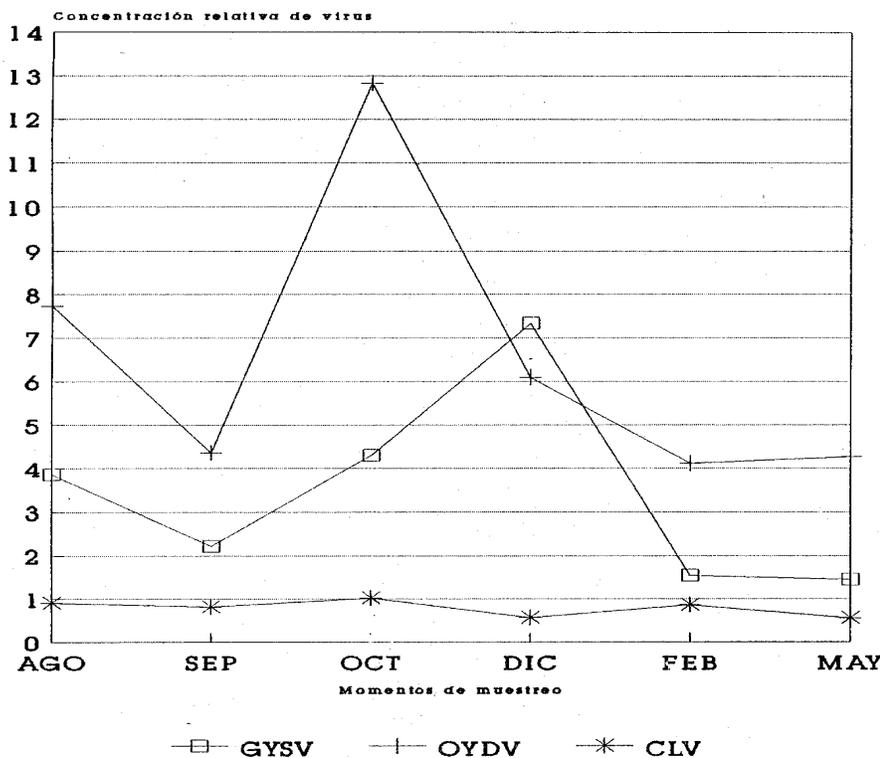
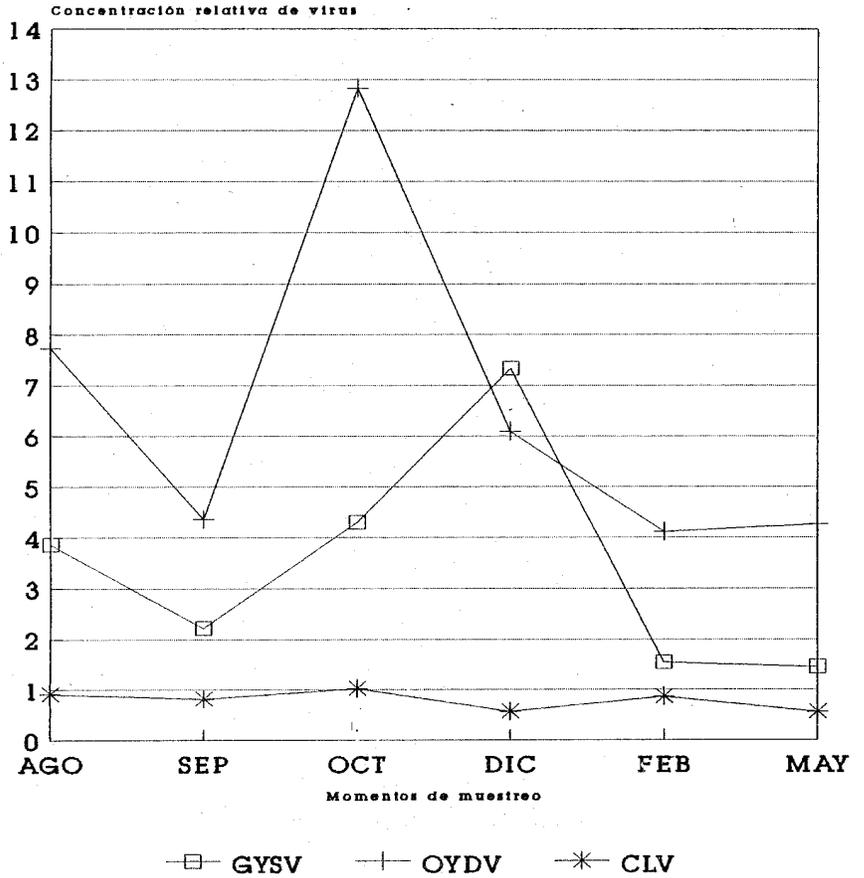
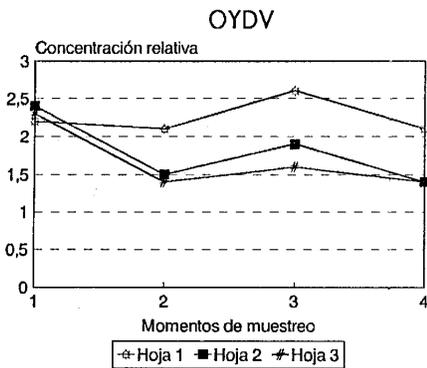


Figura 1.
Curvas de concentración de virus en ajo Blanco según época

Figura 2. Curvas de concentración de virus en ajo Colorado según época.



Asimismo, si consideramos el tipo de hoja que se toma como muestra (apical, media o basal), observamos diferencias en concentración de virus según posición de la hoja y cultivar. Como ejemplo se muestra en Figura 3 los resultados en ajo Blanco.



Ajo Blanco

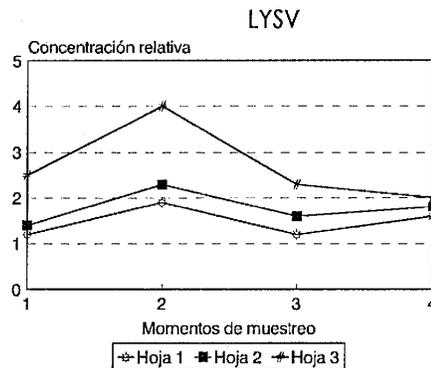


Figura 3. Curvas de concentración por tipo de tejido en ajo Blanco.

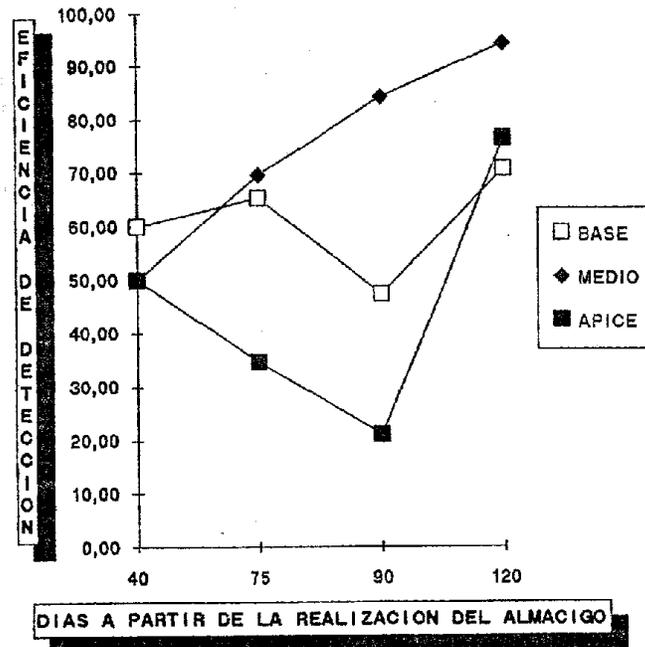
Cuando se intenta propagar material con control sanitario, es de interés saber si en ajo, el análisis de un diente es representativo de la cabeza entera. Al respecto hemos podido observar que, en plantas crónicamente infectadas, un diente es representativo del estado sanitario de toda la cabeza de ajo. En infecciones del año los resultados son erráticos. Además, los dientes internos concentran más a todos los virus probados.

Batata

En batata la concentración de virus es muy variable según el tipo de tejido y la época de muestreo. En general ninguna muestra aislada (hojas del extremo medio o base de las guías) garantiza en forma aislada un 100% de efectividad en el diagnóstico. En la Figura 4 se observa que los valores más altos corresponden a muestras del ápice y que se acentúan al llegar a la madurez de la planta.

La concentración en raíces tuberosas (camotes) es baja después de la cosecha, pero se acentúa notablemente después de 180 días, en la etapa previa al almácigo, de modo que ése sería el momento indicado para detectar virus y constatar la sanidad del material a emplear como propágulos (Figura 4).

Figura 4.
Porcentaje de detección de SFMV en batata a través de la prueba ELISA según diferentes posiciones de muestreo



Liberación de patógenos

Si determinamos que las plantas que vamos a emplear para propagar están infectadas y no podemos conseguir sanas de otra fuente (o es más difícil hacerlo que seguir los pasos posteriores), la termoterapia y el cultivo de meristemas, separadamente o en combinación, son las técnicas más empleadas para iniciar el proceso de liberación de patógenos.

Los principales inconvenientes de la termoterapia son la extrema sensibilidad de algunas especies al tratamiento y el incremento de contaminaciones cuando va seguida de cultivo *in vitro*.

La respuesta a termoterapia varía en ajo según cultivar y el virus considerado. Los ensayos que se están realizando muestran un comportamiento extraño, que en algunos casos se traduce en una disminución inicial de la concentración de virus medida en hojas, seguida de un posterior aumento (Figura. 4). En base a ellos se están recomendando tiempos de termoterapia para distintos cultivares (Figura 5 y 6). Los resultados comparativos de la sanidad de los meristemas obtenidos de las mismas plantas aún no están terminados, ellos permitirán afinar adecuadamente estas recomendaciones.

	OYDV	LYSV	GarV-A
Nieve	45 días	30 días	45 días
Perla	15 días	15 días	30 días
Unión	15 días	30 días	30 días
Fuego	45 días	30 días	30 días
Likan	45 días	45 días	30 días
Castaño	45 días	60 días	---
Col. Precoz	30 días	30 días	15 días

Figura 5.
Tiempos recomendados de termoterapia a 37 ° C en diversos Cvs. de ajo

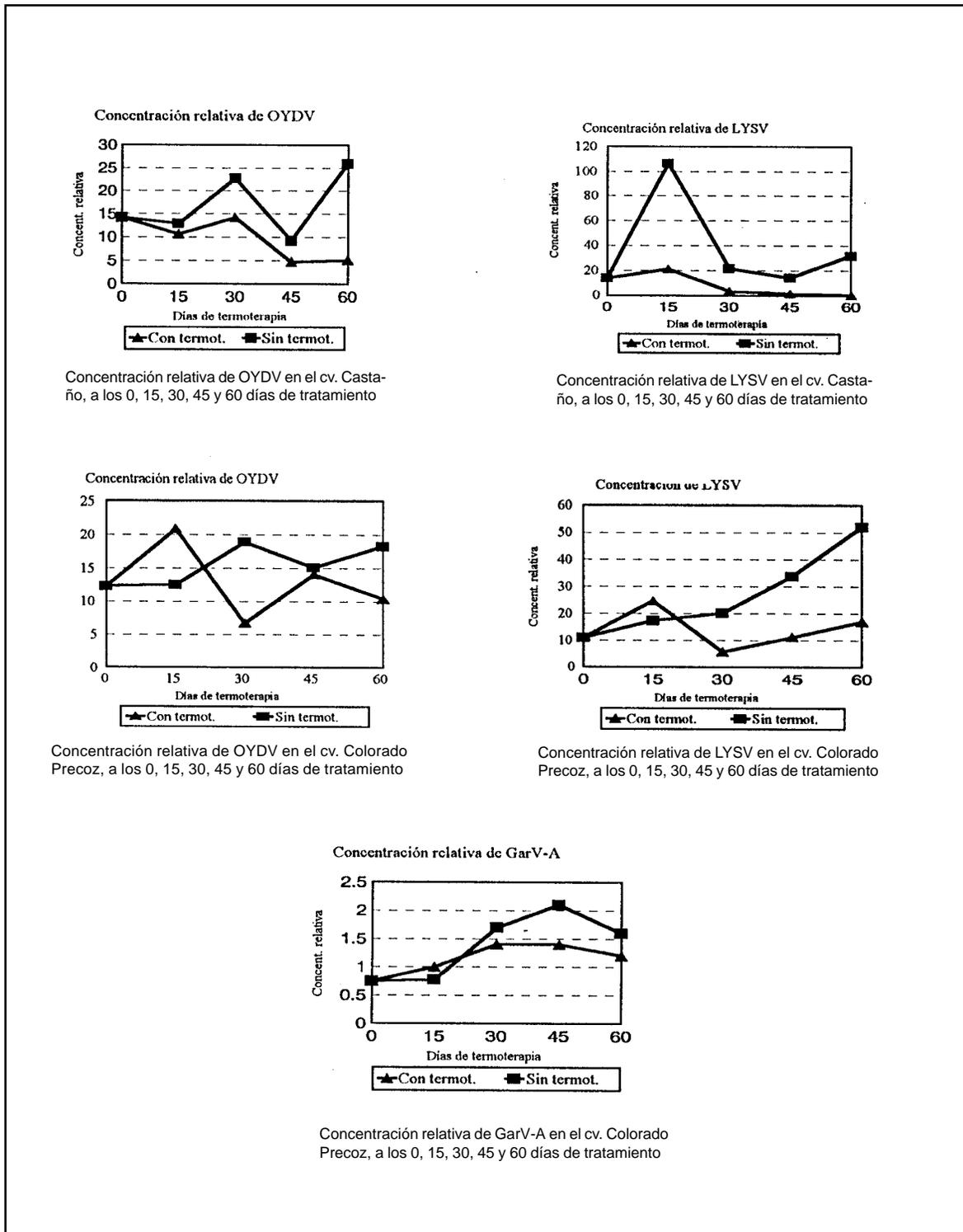


Figura 6. Concentración de OYDV, LYSV y GarV-A en brotes de dientes sometidos a termoterapia (37 ° C) de algunos cultivares de ajo.

Cultivo *in vitro*

Las técnicas de cultivo *in vitro*, en buena parte están descriptas para la mayoría de las especies cultivadas de propagación agámica, no así para cultivares. A pesar de ello es ampliamente conocido que los métodos descriptos deben ser ajustados a las condiciones de cada laboratorio y eso lleva tiempo y gastos que no siempre son reconocidos por los organismos que otorgan subsidios. Otro aspecto importante son las contaminaciones iniciales que obligan en algunos casos a tratamientos previos a las plantas iniciadoras (bactericidas, fungicidas sistémicos)

Verificación del estado sanitario

Los métodos de detección empleados en IFFIVE para los diversos cultivos en estudio (ajo, batata, tomate, frutales de carozo, papa, etc.) incluyen:

- ✓ Plantas indicadoras
- ✓ ELISA (DAS ELISA, NC ELISA, PTA ELISA)
- ✓ PCR
- ✓ ISEM

Es importante que la verificación de la condición sanitaria de la planta que va a iniciar una progenie sea constatada rigurosamente por diversos métodos. Así por ejemplo, en ajo las plantas que han sido tratadas por termoterapia seguida de cultivo de meristema son revisadas por ELISA, las que dan valores positivos son descartadas y las negativas son nuevamente analizadas por inmunomicroscopía electrónica (ISEM con decoración). ELISA por si solo no es un método suficientemente sensible para detectar virus en plantas *in vitro* de ajo. En cambio ISEM es ideal pues no tiene falsos positivos, pero es engorroso y caro de aplicar.

La descendencia de las plantas negativas mantenidas en condiciones que prevengan las contaminaciones, es muestreada periódicamente y si se constatan infecciones en alguna línea, es eliminada por completo.

En camote, el ejemplo que se esquematiza a continuación funcionó con gran éxito durante varios años. Consistía en entregar un número de plantas libres de virus a grupos asociados de agricultores, quienes se encargaban de hacer multiplicaciones sucesivas, primero en jaulas anti-áfidos y luego a campo en regiones aisladas de contaminaciones (Figura 7).

Posteriormente no fue necesaria su aplicación, dada la alta tolerancia al virus prevalente en la región, del cultivar Morada INTA. Cabe destacar que en Córdoba los productores de camote son de mediana a gran magnitud, es decir plantan superficies de 5 a 200 ha.

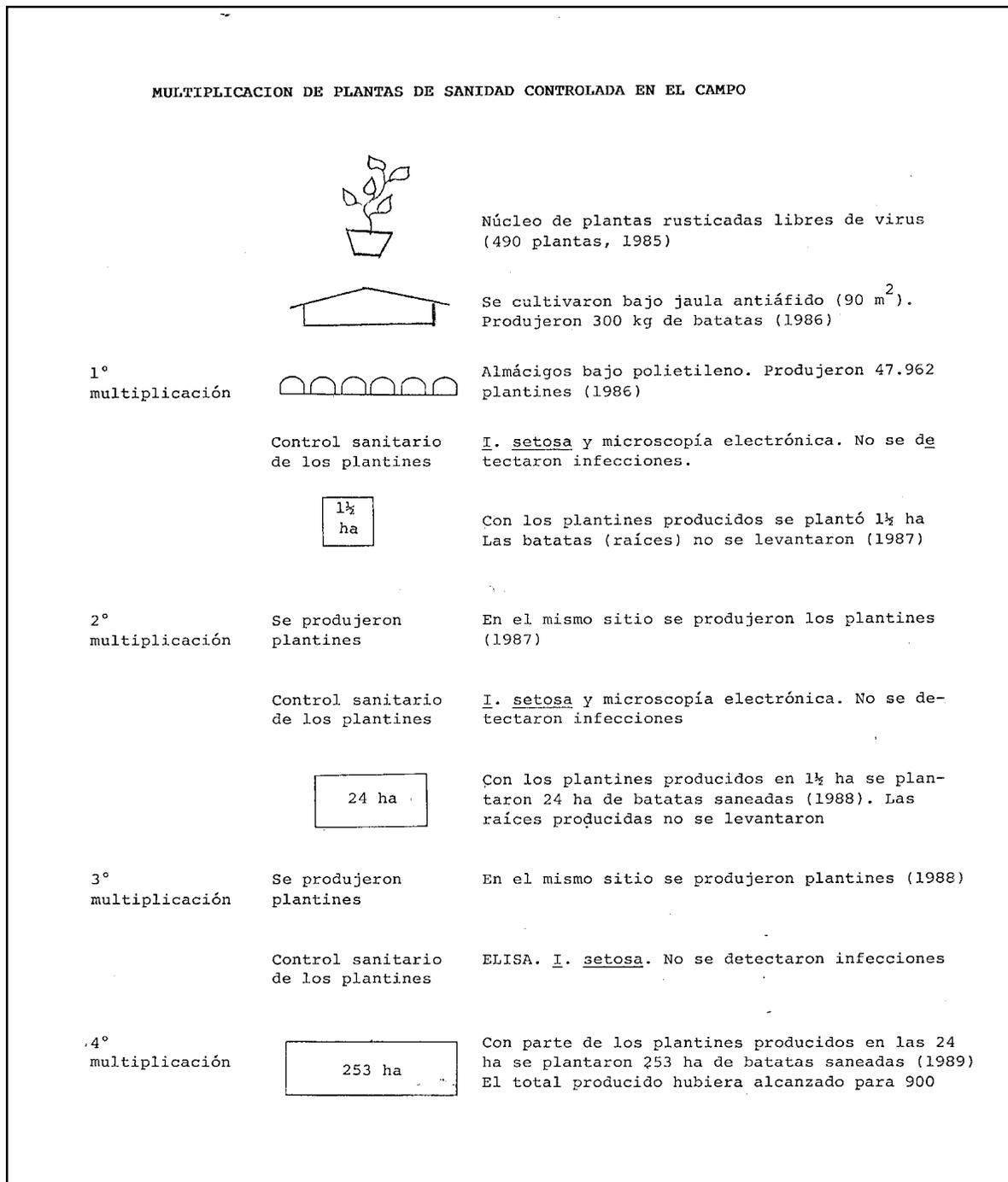


Figura 7. Esquema de producción de plantas de camote libres de virus en la región de Jesús María, Córdoba.



CAPÍTULO III

CALIDAD GENÉTICA

DISPONIBILIDADE DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA A IDENTIFICAÇÃO VARIETAL

INTRODUÇÃO

O interesse pela caracterização de variedades tem aumentado significativamente no mundo inteiro nas últimas décadas. O motivo principal para isso tem sido a crescente necessidade de proteção de variedades comerciais em mercados econômicos cada vez mais competitivos.

Tradicionalmente os melhoristas têm utilizado descritores morfológicos para o registro e lançamento de nova variedade. Ainda que a identificação de variedades feita desta forma continue sendo predominante e importante, as limitações deste tipo de descritor têm gerado a necessidade de busca de outras alternativas. No primeiro momento surgiram os descritores de proteína que, em culturas como o trigo, têm sido de grande utilidade. Mais recentemente, os descritores de DNA, baseados no genótipo do indivíduo, têm recebido maior atenção, especialmente pelo seu potencial de distinção de genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados. O termo “fingerprinting” ou impressão digital tem sido utilizado para descrever o padrão molecular de um genótipo.

O objetivo desse trabalho é o de revisar os princípios básicos, as potencialidades e as limitações do uso de marcadores moleculares na identificação de variedades, comparando-os com outros tipos de descritores.

TIPOS DE DESCRITORES

Os três principais tipos de descritores hoje disponíveis ao melhoramento de plantas são: os morfológicos, os de proteínas e enzimas, e os de DNA. Os descritores morfológicos são ainda hoje o “cartão de apresentação” de uma nova variedade. Estes têm tido papel fundamental na divulgação das características agronômicas de novos materiais genéticos e podem influenciar decisivamente na escolha de variedades por parte de agricultores e outros interessados. Quando se trata da distinguibilidade exigida pela lei de proteção de variedades, contudo, os descritores morfológicos apresentam limitações, especialmente na distinção de genótipos elites, aparentados. Em culturas de base genética estreita, eles

Sandra Cristina Kothe Milach
*PhD., Professora Departamento
de Plantas de Lavoura, Fac.
Agronomia, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brasil*

podem muitas vezes não distinguir adequadamente variedades comerciais (Smith & Smith, 1992). Além disso, características morfológicas são baseadas no fenótipo de indivíduos e esse é o resultado do genótipo em interação com o ambiente onde se encontra (Falconer, 1960). Devido aos efeitos da interação genótipo x ambiente, é certamente difícil comparar variedades com dados morfológicos obtidos de ambientes (locais e anos) distintos. Os melhoristas têm buscado contornar este problema através do uso de variedades testemunhas nos diferentes ambientes. Em muitos casos, contudo, esse procedimento não é suficiente para que a caracterização de um genótipo possa considerá-lo distinto (Higgins et al., 1988).

Descritores baseados em proteínas e enzimas passaram a ser efetivamente utilizados em caracterização de variedades na década de 70. O uso desses representou um avanço para o melhoramento de plantas, não apenas na caracterização de variedades, mas também porque possibilitou a obtenção de estimativas de distância genética entre genótipos e, assim, o acesso à variabilidade existente. Smith & Smith (1992) apresentam uma extensa lista de trabalhos de caracterização de variedades feitos com base nesses descritores, e o maior número está registrado para as culturas do trigo e milho.

Dez anos após os primeiros trabalhos com descritores de proteínas e enzimas, surgiram os de DNA, com capacidade de detectar variação genética adicional. O avanço principal que essas técnicas trazem é a possibilidade de acessar diretamente o genótipo de um indivíduo, evitando, assim, a expressão do fenótipo e a influência do ambiente sobre este. Também, enquanto os descritores de proteína amostram apenas as regiões ativas na expressão gênica, os de DNA permitem uma ampla amostragem do genoma de um indivíduo. Mutações que ocorrem em regiões não codificadoras de genes podem ser identificadas com análise de DNA, mas não com a análise morfológica ou de proteínas. O fato de haver um número quase ilimitado de descritores de DNA disponíveis e esses possibilitarem o amplo acesso da variabilidade genética em diversas espécies vegetais, faz dessa uma classe de descritores de crescente importância para caracterização de variedades.

MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE VARIEDADES

Várias técnicas que permitem revelar variabilidade a nível de DNA estão disponíveis. Características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente são conhecidas como marcadores moleculares.

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e Minissatélites ou locos VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”). Já aqueles revelados por amplificação incluem os

marcadores do tipo: RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”); SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions”) ou ASA (Amplified Specific Amplicon); Microsatélite (ou SSR - “Simple Sequence Repeats”); e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e modificações já existem para algumas das técnicas acima mencionadas. Contudo, os tipos de marcadores aqui listados são os que ainda estão sendo utilizados para caracterização de variedades. O detalhamento de cada um dos tipos de marcadores acima citados pode ser encontrado em Milach (1998a) e Ferreira & Grattapaglia (1995).

A técnica de RFLP é elaborada; mais demorada que as outras técnicas para obtenção de resultados; de custo relativamente alto; e tem revelado um grau de polimorfismo de intermediário a baixo, conforme a espécie. Mesmo assim, os RFLPs têm sido utilizados em um grande número de estudos de caracterização de variedades (Gebhardt et al., 1989; O’Donoghue et al., 1994; Autrique et al., 1996). Isso tem sido devido principalmente a sua alta consistência e repetibilidade na obtenção dos resultados.

Os minissatélites ou locos VTNR são seqüências repetitivas de DNA, adjacentes e em número variável (Jeffreys et al., 1985). Essa técnica é similar a de RFLP, variando basicamente o tipo de sonda utilizado, e apresentado as vantagens e desvantagens já apresentadas para a técnica anterior. Uma vantagem adicional dos minissatélites é o alto grau de polimorfismo apresentado, decorrente da variação na distribuição dos sítios de restrição, das sondas utilizadas, e do número e tipos das seqüências repetitivas. De fato, utilizando apenas uma sonda de minissatélite, Nybom et al. (1990) caracterizaram quatro variedades de *Malus* sp., quatro de *Prunus serotina* e oito de *Rubus* sp.

A técnica de RAPD, dentre as apresentadas, é a de menor custo, número de etapas, e tempo para obter os resultados; e é fácil de implementar. Essa, contudo, tem a desvantagem de ser de repetibilidade baixa e pouco consistente de um laboratório para o outro, o que dificulta a comparação de dados obtidos em diferentes locais. Assim, cuidados devem ser tomados na padronização da técnica no laboratório para a caracterização de variedades. O nível de polimorfismo obtido com RAPDs varia grandemente com a espécie em questão, e tem sido utilizada com sucesso na caracterização de variedades de cevada (Tinker et al., 1993; Penner et al., 1998), e arroz (MacKill, 1995), entre outras.

Marcadores SCAR são amplificados com *primers* específicos, desenvolvidos com base em seqüências já mapeadas ou caracterizadas (Paran & Michelmore, 1993). Muitos desses *primers* são obtidos da conversão de marcadores RAPD em SCAR. Essa conversão em geral resulta na diminuição do nível de polimorfismo obtido por SCAR. Contudo, isso pode ser amenizado com a digestão com enzimas de restrição dos produtos amplificados; e com o sequenciamento das bandas monomórficas e subsequente desenvolvimento de *primers* que amplificam seqüências mais variáveis entre os genótipos. A técnica de SCAR é muito

semelhante a de RAPD, com a vantagem de ser mais consistente e desvantagem de envolver o desenvolvimento de *primers*, o que eleva o custo.

Os Microssatélites envolvem o desenvolvimento de *primers* específicos, que é um processo elaborado e caro. Mas uma vez que estes estejam disponíveis, o custo da técnica assemelha-se a de RAPD, com exceção de que os géis para resolver os fragmentos de DNA devem ser de policrilamida e esses são de custo mais elevado. A maior vantagem dessa técnica é o elevado polimorfismo revelado, o que a torna uma das melhores opções para uso na caracterização de variedades, especialmente em germoplasma aparentado e de baixa variabilidade.

Por fim, a técnica de AFLP possui grande capacidade para detecção de variabilidade genética e uso em caracterização de variedades. De fato, tem sido utilizado com sucesso em girassol para essa finalidade (Hongtrakul et al, 1997). Entre as vantagens do uso desta estão o alto grau de polimorfismo e o mais alto número de marcadores obtidos por gel analisado. AFLP é a mais elaborada das técnicas de PCR, necessita gel de policrilamida para resolução dos fragmentos e é protegida por patente.

ASPECTOS IMPORTANTES NA CARACTERIZAÇÃO POR MARCADORES MOLECULARES

Várias questões devem ser consideradas na caracterização de variedades com marcadores moleculares para um determinada espécie. Entre elas estão: Que tipo de marcador utilizar? Qual é o número mínimo de marcadores necessários para caracterizar um grupo de variedades? Quanto tempo será necessário para obter a caracterização de uma nova variedade?

As respostas para essas perguntas dependem de uma série de considerações. Em primeiro lugar, o nível de polimorfismo varia muito de uma espécie para outra. Em espécies em que os níveis de polimorfismo são relativamente altos, como é o caso da aveia hexaplóide cultivada (Milach et al., 1997), um número menor de um tipo de marcador como RFLP (que não é o sistema mais polimórfico existente) é suficiente para a caracterização de variedades. De fato, utilizando apenas 18 sondas de RFLP com uma enzima de restrição, O'Donoghue et al. (1994) conseguiram distinguir, em 100%, 83 variedades Norte-americanas de aveia. As 18 sondas revelaram 205 locos genéticos polimórficos entre as variedades analisadas, evidenciando o alto nível de polimorfismo. No caso da soja, para distinguir 10 variedades, foram necessários utilizar seis clones de RFLP (com três enzimas de restrição) e sete *primers* de RAPD (Prabhu et al., 1997). Mesmos assim apenas 36 locos polimórficos foram identificados. Também o número de variedades a serem caracterizadas

é importante. Quanto maior o número de variedades, maior deve ser o número de locos polimórficos para diferencia-las.

O polimorfismo detectado para uma espécie varia muito com o tipo de marcador utilizado. Por exemplo, em arroz, o número de locos polimórficos detectados por uma sonda de minisatélite (Zhou & Gustafson, 1995) foi superior que aquele obtido por *primer* de RAPD (Cao & Oard, 1997). A diferença entre esses tipos de marcadores ocorre em outras espécies vegetais.

O tempo para caracterizar uma nova variedade depende basicamente do: tipo de marcador a ser utilizado (enquanto que a análise de RFLP pode levar até 3 semanas, a de RAPD leva apenas um dia); número de pessoas envolvidas; e número de variedades a serem caracterizadas.

PROTEÇÃO DE VARIEDADES

Conforme já mencionado, para uma variedade ser registrada e protegida no Brasil, ela deve alcançar os critérios de distinção, uniformidade e estabilidade. Os mesmos critérios são utilizados internacionalmente (Bayle, 1983).

O potencial de uso de marcadores moleculares para a caracterização de variedades com fins de proteção é enorme, como têm revelado trabalhos com diversas espécies vegetais (Milach, 1998b).

Segundo Smith & Smith (1992), na Europa, onde a proteção de variedades é feita a mais tempo, até a data da publicação daquele artigo, os descritores morfológicos ainda eram a base da caracterização de variedades para a maioria das espécies. Contudo, na Inglaterra, os padrões eletroforéticos de gliadinas têm sido utilizados junto com os descritores morfológicos para distinção de variedades de trigo; e novas variedades com padrões idênticos de gliadinas não são recomendadas. Na França, desde 1990 os dados de padrões isoenzimáticos são requeridos para a identificação e registro de novas linhagens de milho, havendo planos de solicitar os padrões de marcadores de DNA. Mesmo assim, o uso de marcadores moleculares para registro de novas variedades ainda é limitado, mesmo em países onde a proteção de variedades já é praticada a bastante tempo. No entanto, com a recente disponibilidade de técnicas de DNA que revelam alto nível de polimorfismo e consistência nos resultados, é provável que os marcadores moleculares passem a ser incluídos no registro de novos genótipos.

Cabe ainda salientar que a padronização das técnicas moleculares será passo fundamental para a comparação de genótipos dentro de cada espécie, pois variações nos resultados de caracterização molecular podem ocorrer em função de ajustes nas mesmas. De fato, em países com tradição na proteção de variedades, os protocolos de análise de laboratório têm sido padronizados (Draper, 1987).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A demanda pela caracterização molecular ou o “fingerprinting” de genótipos tende a crescer nos próximos anos no Brasil, especialmente em decorrência da Lei de Proteção de Variedades. Devido a necessidade de técnicas padronizadas e técnicos treinados para conduzir a caracterização molecular, é provável que a maioria dos programas e empresas de melhoramento de plantas do país busquem a contratação do serviço de laboratórios especializados. Vários desses laboratórios já existem em instituições públicas e privadas no Brasil e poderão satisfazer essa demanda. O importante, contudo, é que sejam estabelecidos padrões mínimos para condução das análises laboratoriais para cada espécie e tipo de marcador utilizado. O ideal seria que para a mesma espécie e marcador em questão, esses padrões fossem nacionais. Na impossibilidade disto ocorrer, haverá necessidade do “fingerprint” de uma variedade vir acompanhado dos procedimentos utilizados na sua determinação.

Além de obter a caracterização de variedades, os programas de melhoramento que adotarem o uso de descritores de DNA serão beneficiados com informações adicionais sobre o nível de diversidade e a constituição genética do germoplasma existente.

LITERATURA CITADA Y CONSULTADA

AUTRIQUE, E.; NACHIT, M.M., MONNEVEUX, P.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. 1996. Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphological traits and coefficient of parentage. *Crop Sci.*, 36:735-742.

BAYLE, D.C. 1983. Isozymic variation and plant breeders rights. **In:** S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, pp.425-440. Elsevier, Amsterdam.

CAO, D.; OARD, J.H. 1997. Pedigree and RAPD-based DNA analysis of commercial U.S. rice cultivars. *Crop Sci.*, 37:1630-1635.

DRAPER, S.R. 1987. ISTA variety committee report of the working group of biochemical tests for cultivar identification. *Seed Sci. Technol.* 15:328-338

FALCONER, D.S. 1960. *Introduction to quantitative genetics*, Longman Inc., New York.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20, 220p.

GEBHARDT, C.; BLOMENDAHL, C.; SCHACHTSCHABEL, U.; DEBENER, T.; SALAMINI, F.; RITTER, E. 1989. Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum*, ssp. *tuberosum*) with RFLP-fingerprints. *Theor. Appl. Genet.* 78:16-22.

HIGGINS, J.; EVANS, J.L.; LAW, J.R. 1988. A revised classification and description of Faba bean cultivars (*Vicia faba* L.) *Plant Varieties Seeds*, 1:27-35.

HONGTRAKUL, V.; HUESTIS, G.M.; KNAPP, S.J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genet.*, 95:400-407.

- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 316:76-79.
- MACKILL, D.J. 1995. Classifying *japonica* rice cultivars with RAPD markers. *Crop Sci.*, 35:889-894.
- MILACH, S.C.K.; RINES, H.W.; PHILLIPS, R.L. 1997. Molecular genetic mapping of dwarfing genes in oat. *Theor. Appl. Genet.*, 95:783-790.
- . 1998a. Marcadores de DNA em plantas. UFRGS, Porto Alegre, 14 p.
- . 1998b. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: Borém, Giudice, Sakiyama, Sedyama, Moreira, Portugal (eds.) *Biossegurança, Proteção de Cultivares, Acesso aos Recursos Genéticos e Propriedade Industrial na Agropecuária*. Viçosa, 182p.
- NYBOM, H.; ROGSTAD, S.H.; SCHAAL, B.A. 1990. Genetic variation detected by use of the M13 "DNA fingerprint" probe in *Malus*, *Prunus*, and *Rubus* (Rosaceae). *Theor. Appl. Genet.* 79:153-156.
- O'DONOUGHUE, L.S.; SOUZA, E.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. 1994. Relationships among North American oat cultivars based on restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci.*, 34:1251-1258.
- PENNER, G.A.; ZHENG, Y.; BAUM, B. 1998. Identification of DNA fingerprints for two-row barley cultivars registered in Canada. *Genome*. No Prelo.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 85:985-993.
- PRABHU, R.R.; WEBB, D.; JESSEN, H.; LUK, S.; SMITH, S.; GRESSHOFF, P.M. 1997. Genetic relatedness among soybean genotypes using DNA amplification fingerprinting (DAF), RFLP, and Pedigree. *Crop Sci.*, 37:1590-1595.
- SMITH, J.S.C.; SMITTH, O.S. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy*, 47:85-140.
- TINKER, N.A.; FORTIN, M.G.; MATHER, D.E. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.*, 85:976-984.
- ZHOU, Z.; GUSTAFSON, J.P. 1995. Genetic variation detected by DNA fingerprinting with a rice minisatellite probe in *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.*, 91:481-488.

IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE FRUTALES DE PROPAGACIÓN AGÁMICA: EL CASO DE LAS VIDES EN CHILE

La identificación genética de cultivares ha adquirido gran relevancia en las últimas décadas, en buena medida debido al interés de los obtentores de cultivares, quienes necesitan proteger o patentar estos materiales (Staub y Meglic, 1993) y en parte debido a las demandas propias de un mercado internacional, que entre otros aspectos exige que se certifique la identidad y pureza de los productos expendidos (Meredith, 1996).

La identificación de cultivares requiere de una metodología rápida, precisa, reproducible y de un costo razonable (Morell et al., 1995). Tradicionalmente, se ha recurrido a distintos tipos de marcadores genéticos para este propósito, partiendo por los ya clásicos descriptores de características morfológicas de las plantas (tamaño, formas y colores de diferentes tejidos), hasta otras formas más sutiles de expresión génica, como análisis citogenéticos, análisis de metabolitos secundarios, o identificación de los patrones de proteínas o isoenzimas. El último y más reciente eslabón en esta cadena corresponde a los marcadores genéticos basados en la identificación de polimorfismos de ADN, conducentes a obtener un *fingerprinting* o patrón genético propio de cada cultivar (Staub et al., 1996). Cabe destacarse aquí que estos marcadores tienen una serie de otras aplicaciones, además del *fingerprinting*, como la caracterización de la diversidad genética de germoplasma, la preparación de mapas de ligamiento genético y el apoyo al mejoramiento genético mediante el seguimiento de alelos de loci asociados a caracteres de interés.

Patricio Hinrichsen
Laboratorio de Biotecnología
INIA - La Platina

En esta ocasión, se describirán algunos trabajos relacionados al uso de marcadores moleculares basados en la reacción de PCR para la caracterización genética de especies frutales, específicamente para diferenciar los cultivares de vid más importantes en Chile, así como la diferenciación de clones de uno de estos cultivares (Cabernet Sauvignon), seleccionados por presentar diferencias en la estructura del racimo. En particular, se discutirá la eficiencia de dos métodos

“masivos” que recurren a partidores de PCR de diseño aleatorio, como son RAPD (random amplified polymorphic DNA; Williams et al., 1990) y AFLP (amplified fragment length polymorphism; Vos et al., 1995), y se comparará con los resultados obtenidos con microsatélites o SSR (Tautz, 1989; Thomas et al., 1993).

Antecedentes ampelográficos han indicado que existirían errores en la identificación de ciertos grupos de cultivares. De estos grupos, los más importantes son algunos cultivares usados para vino tinto, como Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Carmenere, Pinot Noir, etc., cultivares para vino blanco como Sauvignon Blanc, Chardonnay, Riesling, Chenin Blanc, Gewurstraminer, etc., y cultivares de uva de mesa, tales como Thompson Seedless (Sultanina), Black Seedless, Superior, Perlette, Flame Seedless, Ruby Seedless, etc. Incluidos los genotipos mencionados, se han caracterizado cerca de 60 cultivares usando los tres métodos mencionados.

DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE CULTIVARES DE VID

Al realizar un trabajo de esta índole, hay una serie de etapas iniciales que se deben optimizar, entre las cuales se debe desarrollar un protocolo de preparación de ADN en cantidad y calidad apropiados. Además, es deseable que se pueda usar cualquier tejido de la planta, dado que usualmente se usan hojas en desarrollo, sólo presentes durante la primavera y el verano. En nuestro laboratorio fue adaptado un protocolo descrito por Lodhi et al. (1994) que entrega ADN que permite hacer cualquiera de las reacciones enzimáticas propias de los protocolos de marcadores, no sólo la reacción de PCR que es común a todas estas metodologías, sino también digestiones con enzimas de restricción y ligaciones, en el caso del AFLP.

Por otra parte, los métodos basados en la amplificación de secuencias anónimas (RAPD y AFLP) requieren de una etapa de selección de aquellos partidores de PCR que sean más informativos en cada especie, bajo condiciones experimentales específicas. En el caso de RAPD se encontraron numerosos partidores que ni siquiera mostraron productos de amplificación bajo las condiciones ensayadas. Dieciocho partidores de RAPD (de 80 ensayados inicialmente sobre tres genotipos elegidos aleatoriamente) fueron apropiados para vid. En el caso de AFLP, esta etapa de “preselección de partidores” no fue considerada dado que en cada reacción se genera un número muy alto de productos de amplificación; de haberlo hecho, sus valores de heterocigocidad podrían haber sido aún mayores que lo detectado (Cuadro 1).

Las Figuras 1, 2 y 3 ilustran la separación electroforética de fragmentos de ADN usando RAPD, AFLP y SSR, respectivamente. Dado que la vid es una especie muy heterocigota, se constató que no era difícil detectar polimorfismos entre los diferentes genotipos, usando cualquiera de los

	RAPD	AFLP	SSR
Número de (combinaciones de) partidores	18	4	11
Número de loci estudiados	-	-	11
Bandas observadas totales (BO)	344	290	88
Bandas polimórficas (BP)	103	86	88
BP/BO (%)	29.94	29.66	100
RM	19.1	72.5	1
Hp	0.61	0.25	-
Hav	0.19	0.07	0.74
E	5.72	21.5	1
MI	1.09	1.60	0.74

Cuadro 1.
Comparación entre RAPD, AFLP y SSR como métodos para diferenciar genéticamente cultivares de vid.

tres métodos. De esta manera, cualquier cultivar puede ser diferenciado de todos los otros 60 genotipos considerados en este estudio, ya sea usando RAPD, AFLP o SSR.

PERFILES DE RAPD DE CULTIVARES DE VID

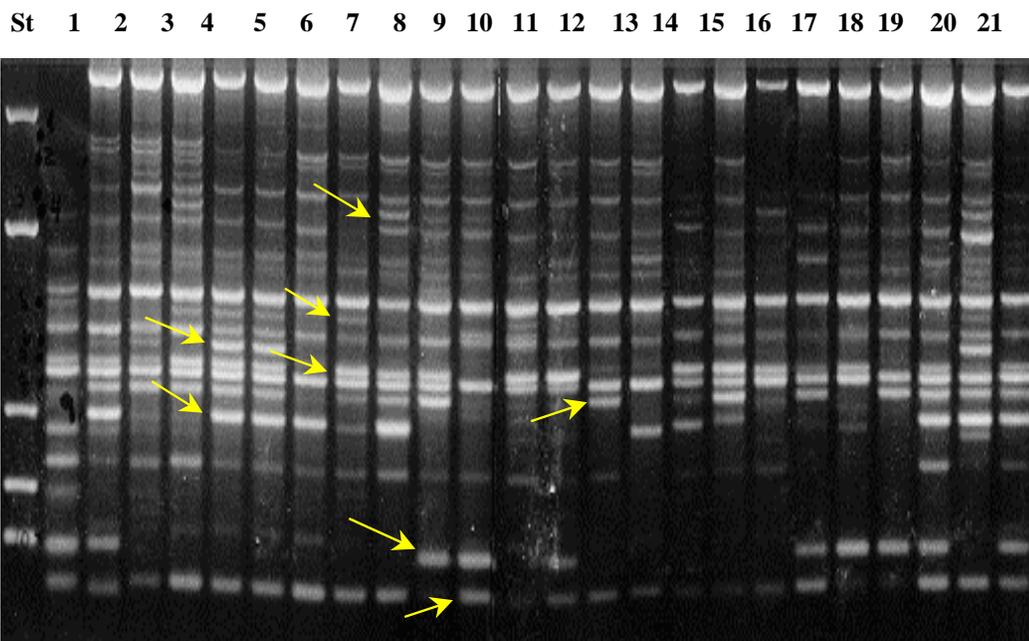


Figura 1. Patrones de RAPD de 21 genotipos obtenido con el partidior OPB-04 (5'-GGACTGGAGT-3'). Se destacan ocho bandas polimórficas (flechas amarillas) sobre un total de más de 20 bandas totales, separadas en un gel de agarosa al 1,5% y teñidas con bromuro de etidio.

AFLP DE CULTIVARES DE VID

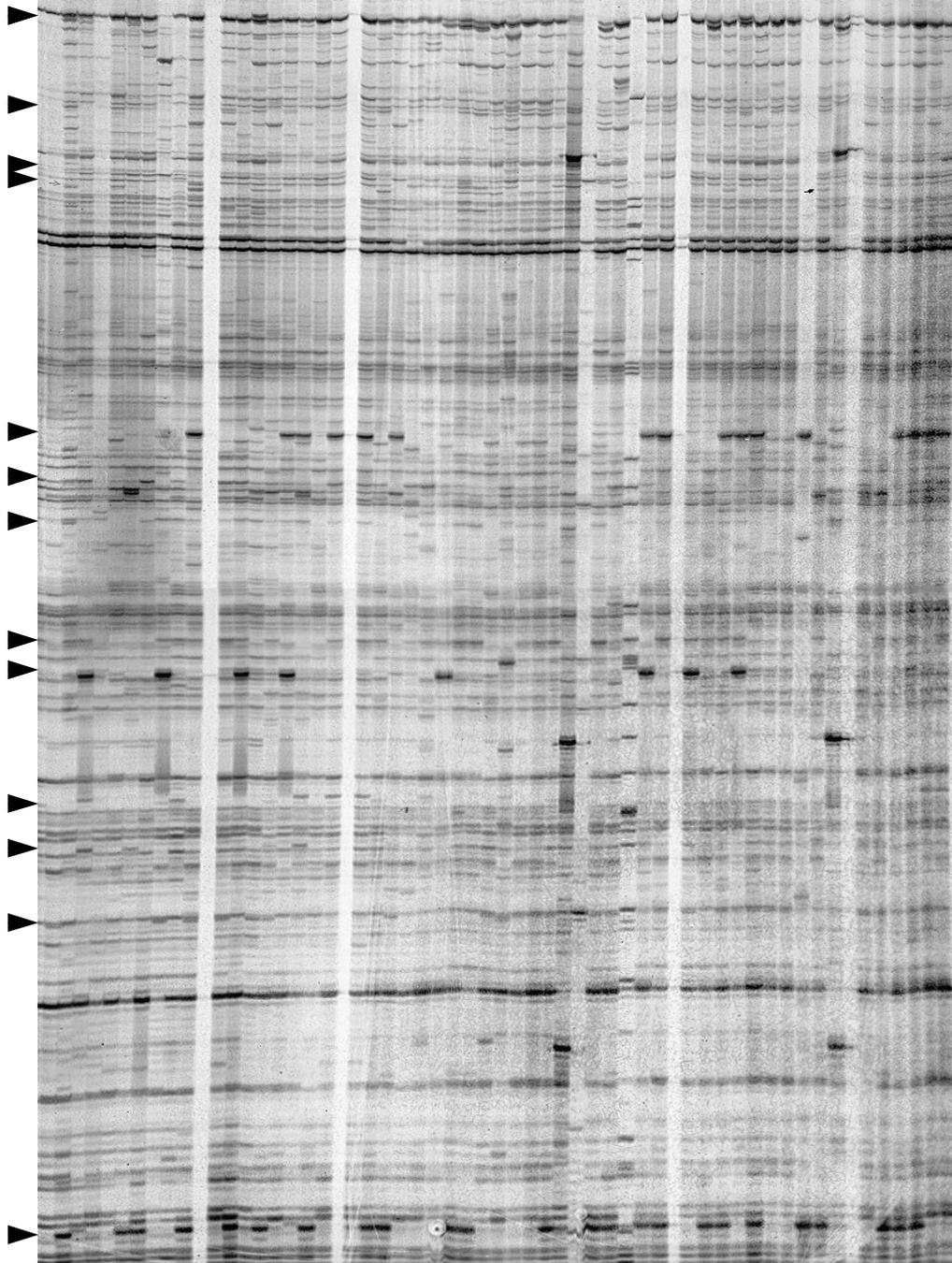


Figura 2. Patrón de amplificación de AFLP de 51 genotipos de vid con la combinación de AFLP PE1C/PM1D (AGT/GGT). A la izquierda están indicadas 16 bandas polimórficas separadas en un gel de poliacrilamida al 6% y teñidas con plata.

PATRONES DE MICROSATELITES DE CULTIVARES DE VID

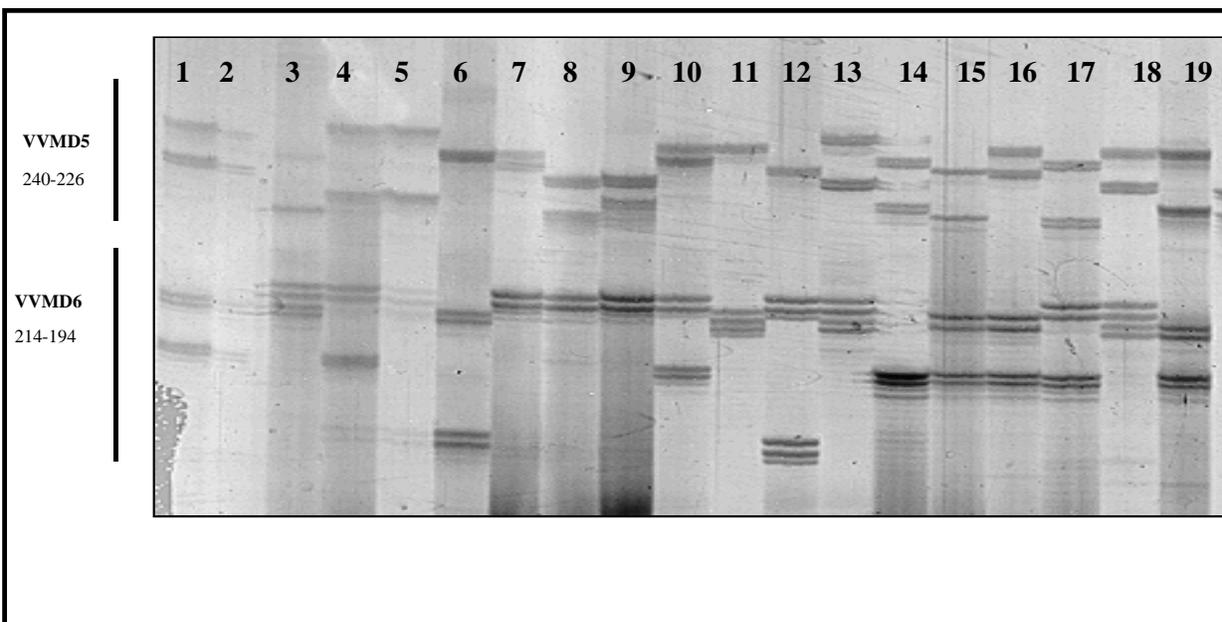


Figura 3. Patrón de amplificación de vides usando microsatélites. Los productos de dos reacciones de PCR (VVMD-5 y VVMD-6; “duplex”) se separaron en un gel de poliacrilamida al 6% y se tiñeron con plata. El rango de tamaños de los alelos de cada locus se indica a la izquierda.

**SELECCIÓN DE UNA
METODOLOGÍA DE
TIPIFICACIÓN GENÉTICA
EN VIDES**

A pesar de que todas las metodologías fueron capaces de diferenciar los cultivares, los métodos de naturaleza aleatoria (particularmente RAPD) carecen de una característica importante: un apropiado grado de reproducibilidad que permita el intercambio de información entre laboratorios. Esta condición es propia de los microsatélites (SSR), por lo que debiera transformarse en el método de referencia, en tanto se disponga en la especie en cuestión de suficientes marcadores para resolver un número importante de cultivares, como sucede en vides. AFLP ha demostrado también ser de utilidad, aunque por las dificultades inherentes a la técnica, su uso debiera quedar reservado sólo para casos de consanguinidad muy estrecha, como es el caso de la diferenciación de cultivares derivados por mutaciones somaclonales (como los diferentes Pinot) o la identificación de clones de un mismo cultivar.

Además de estas consideraciones generales, se han definido una serie de parámetros que permiten comparar los diferentes marcadores (Powell et al., 1996), como el número de polimorfismos que se pueden tener en promedio en una reacción (valor E), la proporción de bandas polimórficas sobre el total observado o “Razón múltiple” (RM), o la frecuencia de polimorfismos para cada locus estudiado (BP/BO), relacionado a la heterocigocidad observada (Hav). El índice que resume estos factores es

denominado “Índice de un Marcador” (MI), y es propio para cada especie. De acuerdo a Powell et al. (1996), éste debiera ser el factor a considerar cuando se quiere elegir un método de análisis genómico, sin embargo este concepto es estrictamente aplicable cuando se trata de estudios de diversidad genética. En el caso de la identificación genética de cultivares, el tema que nos preocupa en esta ocasión, la situación es diferente y aunque sugerentes, estos valores deben ser complementados con los otros factores detallados más arriba. El cuadro siguiente resume esta información. Este análisis comparativo consideró 103 polimorfismos obtenidos con 18 partidores de RAPD, 86 bandas informativas obtenidas con cuatro combinaciones de partidores de AFLP y el análisis de 11 loci polimórficos de SSR, los que en conjunto generaron 88 alelos diferentes. Cabe destacarse que en el caso de los microsátélites (SSR), bastaron sólo dos de estos marcadores para diferenciar todos los genotipos estudiados (n=60).

LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA APLICADA A PROBLEMAS PRODUCTIVOS

Como se mencionó en las primeras líneas, aplicando criterios ampelográficos (esencialmente por la forma de las hojas) se ha sugerido que ciertos cuarteles de parrones comerciales tendrían un porcentaje de mezclas de genotipos, muchas veces no identificados. Para estudiar esta situación desde un punto de vista genético, se analizó un número de plantas de estos huertos, básicamente de cepas para vinos tintos y principalmente del cultivar Merlot. Los resultados han demostrado que efectivamente existe un porcentaje de plantas que está mal indexado. Por ejemplo, fue corriente detectar plantas con el patrón de alelos correspondiente al raro cultivar Carmenere, casi no existente a nivel comercial (en Francia se cultivan unas cinco ha en total). También se encontró en una ocasión plantas que, habiendo sido importadas desde California, EEUU, como Merlot (información aportada por los productores), se trataba de una mezcla de Cabernet Franc y Cabernet Sauvignon. Estos antecedentes son interesantes por cuanto indican que el problema de la identificación de los cultivares parece ser global y no exclusivo de un determinado país, región o viverista, y por otra parte, queda abierta la posibilidad de que usando estos marcadores moleculares se puede (i) estimar si los huertos son “genéticamente homogéneos”, o de lo contrario calcular la incidencia de cada genotipo en cada viñedo, y (ii) desarrollar nuevos viveros a partir de plantas que estén genéticamente certificadas. Esta última opción está siendo actualmente implementada por viveristas chilenos.

Otra aplicación interesante ha sido la determinación de patrones genéticos con el propósito de caracterizar un cultivar usado desde mucho tiempo, y en este sentido protegerlo de ser patentado (nótese que este es el caso opuesto a lo que se observa más corrientemente, es decir, que el obtentor o quien ha licenciado un cultivar requiere del patrón molecular del mismo para su protección). En este contexto, se realizó la caracterización del cultivar Black Seedless, de origen desconocido, y que es cultivado casi exclusivamente en Chile desde hace bastantes años. El patrón de alelos de microsatélites resultó diferente de todos los cultivares tipificados a la fecha, coincidiendo con resultados independientes de investigadores españoles (J.L. Cenis, comunicación personal) en tres loci. Esta evidencia permitirá a los productores nacionales contar con un elemento de juicio que les permita defender sus derechos a nivel internacional, dado que la probabilidad de que dos cultivares compartan todos sus alelos en 12 loci diferentes es bajísima, en el orden de 1:500 a $1:10^{-11}$ (Bowers y Meredith, 1997).

DIFERENCIACIÓN DE CLONES

Dado que actualmente numerosos cultivares son comercializados como clones específicos, diferenciados por una o más características productivas, se propuso también desarrollar la capacidad de diferenciar estos genotipos particulares. En este caso, sí es importante disponer de un método que permita encontrar una gran cantidad de información en cada reacción, característica que es propia de AFLP.

Para verificar esta hipótesis, se comparó la capacidad discriminativa de los tres métodos (RAPD, AFLP y SSR) sobre una colección de clones de Cabernet Sauvignon, cuya principal diferencia (aparte del origen geográfico, distintos valles de la región central de Chile) radicaba en la estructura del racimo, un carácter de gran interés productivo. Los 12 microsatélites ensayados mostraron una perfecta homogeneidad entre los clones; algo similar fue encontrado al usar algunos partidores de RAPD para analizar las mismas muestras. Sin embargo, con una serie de partidores de AFLP fue posible detectar bandas que discriminaron un tipo de clon de los otros (resultados no mostrados). Antes de establecer esta metodología como la forma de identificación genética para clones de un cultivar, se debe dejar establecida la combinación de partidores de AFLP a usar en cada cultivar y/o grupo de clones, o alternativamente, se puede caracterizar mediante secuenciación la banda de interés, para diseñar partidores de PCR que reconozcan clones específicos.

LITERATURA CONSULTADA Y CITADA

- BOWERS, J.E. & MEREDITH, C.P. 1997. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nature Genetics* 16:84-87.
- LODHI, M.A., YE, G.-N., WEEDEN, N.F. & REISCH, B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molec. Biol. Rep.* 12:6-13.
- MEREDITH, C.P. 1996. What is Petite Sirah? *Practical Win. Vineyard March/April*:1-2
- MORELL, M.K., PEAKALL, R., APPELS, R., PRESTON, L.R. & LLOYD, H.L. 1995. DNA profiling techniques for plant variety identification. *Aust. J. Exp. Agric.* 35:807-819.
- POWELL, W., MORGANTE, M., ANDRE, C., HANAFEY, M., VOGEL, J., TINGEY, S. y RAFALSKI, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germoplasm analysis. *Molec. Breed.* 2:255-263.
- STAUB, J.E. & MEGLIC, V. 1993. Molecular genetic markers and their legal relevance for cultivar discrimination: A case study in cucumber. *HortTechnology* 3:291-300.
- STAUB, J.E., SERQUEN, F.C. y GUPTA, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* 31:729-741
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17:6463-6471.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., van de LEE, T., HORNES, M., FRITJERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. Y ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. y TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

NOTA: Algunos de los resultados y conceptos vertidos en este manuscrito son parte de las siguientes publicaciones (en prensa o sometidas):

- Hinrichsen, P., Narváez, C., Valenzuela, J., Muñoz, C., Bowers, J.E. & Meredith, C.P. (1999). Fingerprinting of grape cultivars grown in Chile: Comparison of methods based on anonymous sequences and a set of microsatellite *loci*. *Acta Horticulturae*, en prensa.
- Narváez, C., Valenzuela, J., Muñoz, C. e Hinrichsen, P. (1999). Comparación de RAPD y AFLP como métodos de identificación genética de vid basada en el estudio de fragmentos genómicos anónimos. *Agricultura Técnica*, sometido.



CAPÍTULO IV

CERTIFICACIÓN DE MATERIALES VEGETALES

LA CERTIFICACIÓN DE PLANTAS COMO INSTRUMENTO DE CALIDAD

Una de las estrategias que se ha desarrollado en forma muy importante en la agricultura contemporánea, a los efectos de lograr alcanzar los máximos niveles de productividad y competitividad, pasa por lograr la disponibilidad de materiales de propagación que cumplan con niveles adecuados de **calidad**.

Dentro de este concepto de calidad se incluyen **aspectos fitosanitarios** dado que existen plagas que afectan directamente la posibilidad de expresión del potencial productivo de un cultivo y su longevidad, y de **identidad genética** que permitan contar con la certeza en cuanto a que el producto que se pretende obtener sea efectivamente el deseado.

Estos dos aspectos que hacen a la calidad de los materiales de propagación cobran particular importancia en aquellos cultivos que se propagan vegetativamente, es decir, que a partir de una fuente conocida tanto en cuanto a su condición sanitaria como a su identidad varietal, pueden obtenerse millones de individuos que mantengan las condiciones del material original o inicial.

Para dar adecuadas garantías en cuanto a la calidad de los materiales de propagación, es necesario desarrollar e implementar **Programas de Certificación** que, respondiendo a una Norma Técnica (Estándar), establecen las condiciones que se deben cumplir para obtener los materiales de propagación requeridos.

En términos generales, los Programas de Certificación consisten en definir las condiciones que, a partir de un Material Inicial, se establecen etapas de multiplicación del mismo a los efectos de obtener los volúmenes requeridos cumpliendo con las condiciones establecidas.

El Material Inicial puede obtenerse a partir de materiales locales seleccionados sobre la base de sus características productivas y comportamiento agronómico o a partir de materiales introducidos.

Frecuentemente los materiales locales deben ser sometidos a **Programas de Saneamiento** de forma tal de eliminar aquellas plagas que afectan su calidad.

Jacques Borde
*INASE - Materiales de
Propagación Vegetativa
DGSA - Departamento de
Mejora Fitosanitaria
Alfredo Fossali*
*DGSA - Programa Nacional de
Certificación de Cítricos.*

En el caso de materiales foráneos a introducirse, deben ser sometidos a **Programas de Cuarentena** que, además, garanticen la no introducción de plagas inexistentes en un país o región y que pueden comprometer la viabilidad de un cultivo.

Al material candidato a ser incluido en un Programa de Certificación como Material Inicial se le debe establecer su condición fitosanitaria de manera de corroborar si cumple con los requerimientos establecidos.

La condición fitosanitaria del Material candidato se establece aplicando las metodologías de diagnóstico más adecuadas. En algunos casos se dispone de metodologías rápidas, fiables y económicas (Serología, sPAGE, etc.) y en otros se debe recurrir a metodologías que, manteniendo su fiabilidad, implican un mayor tiempo y mayores costos (diagnóstico en plantas indicadoras) o son difícilmente rutinizables (Ej.:PCR).

En función de estos diagnósticos puede requerirse la aplicación de técnicas que permitan liberar de las plagas detectadas a ese material de interés. Normalmente se recurre al cultivo de tejidos, quimioterapia y termoterapia, ya sea en forma individual o combinándolas.

Salvados todos estos requisitos que aseguran la **calidad fitosanitaria** de los materiales, se conforman los Bloques Fundacionales, los que dan origen a las futuras multiplicaciones, con el objetivo de incrementar su disponibilidad.



Los Bloques de incremento deberán cumplir con requisitos específicos que minimicen los riesgos de contaminación y serán sometidos a controles periódicos que den garantías del mantenimiento de la calidad deseada a lo largo de todo el proceso.

En cuanto a la Identidad Genética del material, el propio proceso de multiplicación clonal a partir de una fuente conocida, proporciona un importante nivel de garantía en cuanto al mantenimiento de la identidad genética de dichos materiales. Las permanentes inspecciones a los Bloques de Fundación y a los de Incrementos, así como la posibilidad de realizar post-controles (instalación de parcelas, cambio de copa) permiten reunir las garantías de calidad genéticas requeridas.

En resumen, los **Programas de Certificación** permiten poner a disposición de los sectores productivos materiales de propagación que cumplan con estándares de calidad establecidos, ya sea, recurriendo a materiales locales así como posibilitando la introducción segura de material foráneo y permitiendo alcanzar niveles de productividad y adecuación a las exigencias de los mercados que garanticen su competitividad y sostenibilidad.

CERTIFICACIÓN DE VARIEDADES: LA VISIÓN DE UPOV

EVOLUCIÓN HISTÓRICA

La protección de las obtenciones vegetales es un concepto que se ha desarrollado en este último siglo, como necesidad social de incentivar la actividad creadora del fitomejorador a través de un reconocimiento de dicha actividad como beneficiosa para el conjunto social, que se traduce en la concesión de un monopolio temporal de explotación de su creación vegetal.

La tradición atribuye a los estados papales la función de vanguardia. Sin embargo, el edicto de 1833 relativo a las declaraciones de nuevas invenciones y descubrimientos en materia de arte (tecnología) y agricultura era de naturaleza general y nunca fue aplicado.

A principios de siglo en los Estados Unidos de América y en Europa en 1904 y en 1911 la industria presentó las primeras solicitudes de variedades vegetales. Así, en E.U.A. se presentaron diversos proyectos de ley en 1906, 1907, 1908 y 1910 sin éxito, hasta que en 1930 culminaron los esfuerzos por colocar al obtentor de variedades vegetales en pie de igualdad con el inventor o el autor, con la aprobación de la Ley de patentes de plantas, la que fue modificada en 1952 y 1954. Este es un sistema *sui generis* que anticipa en muchos aspectos el Convenio de la UPOV.

LA UPOV

Es una organización intergubernamental con sede en Ginebra, que fue establecida por el Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales que se firmó en París en 1961 y entró en vigor en 1968. El Convenio se revisó en 1972, 1978 y en 1991. Sus estados miembros se han comprometido a otorgar derechos a los obtentores de nuevas variedades vegetales de acuerdo a los principios establecidos en el Convenio, y por tanto sobre una base armonizada.

Yael Jadue Díaz
Departamento de Semillas,
Servicio Agrícola Ganadero,
Chile

Cualquier estado con una legislación de protección de variedades vegetales apropiada tiene la oportunidad, siendo miembro de la UPOV, de compartir y de beneficiarse de la experiencia combinada de los estados miembros y de contribuir a la promoción mundial de la mejora vegetal.

El Convenio contiene disposiciones sobre las condiciones básicas que deben incluirse en la legislación para la protección de las variedades de aquellos países que deseen adherirse a la Unión, lo que lleva, en sí mismo, hacia un cierto nivel de armonía en las leyes de los Estados miembros.

La cooperación de los Estados miembros es fundamental, particularmente para el examen de la distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE), traduciéndose en una función armonizadora en la preparación de directrices del DHE para cada especie.

Para llevar a cabo sus funciones la UPOV establece los siguientes órganos:

El Consejo

Está constituido por representantes de los países miembros de la Unión y al que también asisten países no miembros así como organizaciones no gubernamentales en calidad de observadores. Cada miembro que es un Estado tiene un voto en el Consejo. En virtud del Acta de 1991, también existe la posibilidad de que algunas organizaciones intergubernamentales pasen a ser miembros de la Unión. El Consejo, que se reúne de forma ordinaria una vez al año da su opinión sobre la conformidad de las legislaciones nacionales sobre protección con el Convenio de la UPOV, aprueba el programa de trabajo y el presupuesto anual.

Comité consultivo

Sólo asisten los representantes de los Estados miembros, quedando excluidos los observadores y cuyo papel fundamental es analizar la compatibilidad de las legislaciones de los países que desean ser miembros de la UPOV con el Convenio.

Comité jurídico y administrativo

Se reúne cuando es necesario interpretar alguna norma o disposición del Convenio.

Comité técnico

Encargado de la adopción de las directrices para la realización del examen DHE de las nuevas variedades. Este comité tiene además los

siguientes Grupos de trabajo técnicos encargados de discutir la elaboración o revisión de Directrices de examen en campos específicos:

- Grupo de trabajo sobre plantas agrícolas.
- Grupo de trabajo técnico sobre sistemas de automatización y programas de computación.
- Grupo de trabajo técnico sobre plantas frutales.
- Grupo de trabajo técnico sobre plantas ornamentales y árboles forestales.
- Grupo de trabajo técnico sobre hortalizas.
- Grupo de trabajo técnico sobre técnicas moleculares y bioquímicas.

LA PROTECCIÓN DE LAS OBTENCIONES VEGETALES EN VIRTUD DE LA UPOV Y DEL ACTA DE 1991

La protección de las obtenciones vegetales, también denominada “el derecho del obtentor” es el derecho que se concede al obtentor de una nueva variedad a explotarla en exclusiva, lo que se traduce en el incentivo al desarrollo de la agricultura, horticultura y silvicultura. Es así, que estadísticas recientes demuestran que el 40% del incremento general de la productividad agrícola se debe a la utilización de variedades mejoradas, variedades que son el resultado de programas de mejora vegetal que requieren cuantiosas inversiones en personal especializado, instalaciones adecuadas y aportación de dinero líquido, a lo largo de varios años.

Requisitos para la protección

La variedad ha de ser **nueva (novedad), distinta, homogénea y estable** y deberá disponer de una **denominación adecuada**:

Novedad

En la fecha de presentación de la solicitud de protección en un Estado de la Unión, el material de reproducción o de multiplicación vegetativa o un producto de cosecha de la variedad protegida no deberá haber sido ofrecida en venta o comercializada, con el consentimiento del obtentor, en el territorio de dicho estado por más de un año, o por más de seis años en el caso de vides, árboles forestales, frutales y ornamentales, con inclusión, en cada caso, de sus portainjertos, o por un período anterior superior a cuatro años en el caso de otras plantas.

Distinción

Sea cual sea el origen, artificial o natural, de la variación inicial que ha dado lugar a la variedad, ésta debe poder distinguirse claramente por uno o varios caracteres importantes de cualquier otra variedad, cuya existencia sea notoriamente conocida en el momento en que se solicite la protección.

Homogeneidad

Se considera homogénea la variedad si es suficientemente uniforme en sus caracteres pertinentes, a reserva de la variación previsible habida cuenta de las particularidades de su reproducción sexual o de su multiplicación vegetativa.

Estabilidad

Se considera estable la variedad si sus caracteres pertinentes se mantienen inalterados después de reproducciones o multiplicaciones sucesivas, en caso de un ciclo particular de reproducción o de multiplicaciones, al final de cada ciclo.

Denominación de la Variedad

Una variedad debe recibir una denominación que se deberá inscribir en el registro al mismo tiempo que se produzca la concesión del título. Esta deberá ser genérica, debe permanecer libremente utilizable, debe permitir identificar la variedad y ser la misma para todos los países miembros de la UPOV.

Diferentes formas de examen DHE

Es condición obligatoria que previo a la concesión de la protección, exista un examen para verificar que se cumplan los requisitos de **Distinción, Homogeneidad y Estabilidad**. Existen tres formas aprobadas de examen DHE:

- Cuando la Oficina u Organismo oficial realiza los ensayos y pruebas a campo tendientes a obtener la información sobre la variedad. Se diseñan y evalúan los ensayos, comparando la nueva variedad con la “Colección de referencia”.
- Cuando la Oficina u Organismo oficial realiza el examen con la información suministrada por otros, generalmente por el solicitante. Los ensayos son conducidos por el solicitante de acuerdo a las directrices establecidas oficialmente, luego las evaluaciones se realizan en oficina con el apoyo muchas veces de programas computacionales en los cuales se tiene toda la información para comparar la nueva variedad con la “Colección de referencia”.
- Sistema mixto (combinación de los anteriores).

Ambito de protección

El poseedor de un título de propiedad, tiene el derecho de impedir que terceros, sin su consentimiento puedan, respecto del material de multiplicación o reproducción de la variedad protegida:

- Producir o reproducir.
- Preparar a los fines de producción o multiplicación.
- Ofrecer en venta.
- Vender o comercializar de cualquier forma.
- Exportar.
- Importar.
- Poseer para cualquiera de los fines mencionados.

Se requerirá autorización para los actos anteriores con respecto del material de la cosecha si se cumplen los siguiente supuestos:

- Obtención por utilización no autorizada de la variedad.
- Cuando el obtentor no pudo ejercer razonablemente su derecho con respecto a dicho material de multiplicación.

Estos derechos del titular se extenderán a:

- La variedad protegida.
- La variedad que no se distinga claramente de ella.
- Variedades cuya producción se requiera el uso repetido de la variedad protegida.
- Variedades esencialmente derivadas.

Excepciones al derecho del obtentor

No se requerirá la autorización del obtentor para los siguientes actos:

- Actos realizados en el ámbito privado y con fines comerciales.
- Actos realizados con fines experimentales.
- Actos con fines de creación de una nueva variedad y su comercialización, a menos que la variedad sea **esencialmente derivada** de la variedad protegida.
- Reservar y utilizar para sí mismo el producto del cultivo de la variedad, **“privilegio del agricultor”**.

LAS VARIEDADES ESENCIALMENTE DERIVADAS

Las nociones de “variedad esencialmente derivada” y “dependencia” se introdujeron en el Acta de 1991 con el objetivo fundamental de mantener la capacidad del sistema de protección de las obtenciones vegetales de promover las actividades de mejora de las plantas, creando una relación equitativa entre obtentores y entre titulares de derecho de obtentor y titulares de patentes.

Una variedad (en forma muy breve) es un conjunto vegetal distinto, homogéneo y estable. La distinción se establece sobre la base de caracteres que tienen o no una relación con el valor agronómico o tecnológico de la variedad, o un interés económico. Basta la diferencia relativa a un carácter calificado como importante para llegar a la conclusión de que hay distinción de una variedad en relación con otra.

A manera de ejemplo se pueden citar las siguientes situaciones de variedades esencialmente derivadas:

- Un obtentor ha creado, luego de un largo trabajo de mejoramiento, una variedad nueva de clavel rojo que es atractiva comercialmente. Los competidores pueden obtener variantes de esta variedad con una inversión nula o limitada, buscando o provocando mutaciones dentro de la variedad. Si esta mutación provocara el cambio de color rojo a blanco de las flores, esta correspondería a una nueva variedad y podría competir con la inicial sin pagar nada a su obtentor, ejerciendo una actividad susceptible de asimilarse a la competencia desleal.
- Un obtentor ha creado una línea de maíz que resulta ser excelente pariente para la creación de variedades híbridas. Los competidores podrían producir variantes con una inversión limitada, “convirtiendo” la descendencia mediante un programa de retrocruzamiento, con una planta que presente un carácter de herencia simple (por ejemplo: filamentos que salen de la espiga rojos y no amarillos), obteniendo una descendencia idéntica a la inicial, salvo para el color de las sedas.

El concepto de “ Variedad esencialmente Derivada” establece que:

- La exención del obtentor se mantiene en su integridad.
- Una “ Variedad esencialmente Derivada”, puede ser sometido a la autorización del obtentor de la variedad inicial; en otras palabras el derecho del obtentor relativo a la variedad inicial se extiende a las variedades esencialmente Derivadas y éstas son dependientes de la variedad inicial.

UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN EL REGISTRO DE VARIEDADES PROTEGIDAS

Los principales tipos de marcadores son: morfológicos, citogenéticos, peptídicos, isoenzimáticos, RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) y los derivados de la aplicación de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Cada tipo de marcador tiene sus características específicas que lo hacen adecuado para unas aplicaciones y no tanto para otras.

En lo referente a la mejora vegetal los marcadores genéticos han sido ampliamente utilizados para:

- Estudiar la variabilidad presente en las poblaciones, en su estructura genética y las relaciones filogenéticas.
- Estudiar el sistema genético de las especies (tipo de reproducción, proporción de alogamia, grado de consanguinidad, etc.).
- Identificar y seleccionar genotipos deseables.
- Localización de genes que controlan caracteres cualitativos de interés agronómico.
- Clonaje de genes de interés, cuyos productos de expresión son desconocidos, mediante “genética inversa” a partir de la obtención de dos marcadores estrechamente ligados a ambos lados del gen.
- Disección de los caracteres cuantitativos, e identificación de los genes que los controlan.
- El seguimiento en la naturaleza del microorganismo y plantas modificadas genéticamente.
- Patente y protección de los cultivares y variedades. Los marcadores pueden ser usados tanto para la defensa de los derechos del obtentor, como criterios para el control de calidad. Esta herramienta, en primera instancia, tendría una serie de ventajas frente a la descripción morfológica, al no depender de la edad de las plantas, la parcela, estado sanitario, clima, etc. Además, el análisis genético se puede hacer en estadíos muy tempranos de desarrollo, requiriendo de poco material y con resultados rápidos, facilitando la comprobación de la uniformidad de las nuevas variedades, estimando las diferencias genéticas con variedades registradas más cercanas (agrupamiento).

A pesar de todas las ventajas señaladas anteriormente respecto al uso de marcadores moleculares, aún existen una serie de factores que limitan su uso como una herramienta que pudiera reemplazar a la descripción morfológica. Es así, que se ha podido demostrar que si dos variedades difieren a nivel morfológico también difieren a nivel de marcadores. Sin embargo, si estas diferencias son escasas a nivel morfológico también lo serán a nivel molecular, sin considerar la importancia que las características morfológicas pudieran tener desde el punto de vista

agronómico, para ser consideradas como una nueva variedad. Por lo tanto queda por decidir ¿cuán diferente debe ser genéticamente una variedad respecto a las registradas para ser admitida en el Registro? (¿Al menos un gen, un porcentaje de sus genes?).

Finalmente las bases sobre las cuales se debe trabajar para que los marcadores moleculares sean una herramienta útil para defender el derecho del obtentor son:

- Contar con una “Colección de Referencia”.
- Determinar los marcadores más apropiados según la especie.
- Estandarizar la forma de trabajo al aplicar alguna técnica molecular para asegurar la repetibilidad.
- Complementar la descripción morfológica.

PROTECCIÓN DE LAS OBTENCIONES VEGETALES EN EL MUNDO

Actualmente hay 37 Estados miembros de la UPOV:

Alemania, Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Bulgaria, Canadá, Chile, Colombia, Dinamarca, Ecuador, Eslovaquia, España, Estados Unidos de América, Federación de Rusia, Finlandia, Francia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, México, Noruega, Nueva Zelanda, Países Bajos, Paraguay, Polonia, Portugal, República Checa, Reino Unido, Sudáfrica, Suecia, Suiza, Trinidad y Tobago, Ucrania, Uruguay.

Otros 18 Estados tienen legislación en la materia pero no son aún miembros de la UPOV: Belarús, Bolivia, Brasil, China, Croacia, Estonia, Georgia, Kenya, Kasakhstan, Kirguistan, Letonia, Lituania, Moldova, Marruecos, Nicaragua, Perú, Venezuela, Uzbekistán y Zimbabwe.

Finalmente los Estados siguientes están preparando legislación en la materia: Costa Rica, Cuba, Egipto, Filipinas, Grecia, India, Indonesia, Kazajstan, Malasia, Pakistán, República de Corea, Rumania, Tailandia, Tanzania, Turquía, Vietnam y Zambia.

SITUACIÓN ACTUAL SOBRE LA IDENTIFICACIÓN Y CERTIFICACIÓN DE VARIEDADES EN BOLIVIA

ANTECEDENTES

Bolivia por sus variables condiciones topográficas y climáticas, y por las características de su flora natural, constituye un importante centro de diversidad genética vegetal. Ante el riesgo de extinción de las variedades, ecotipos, razas y aún especies locales, conservados tradicionalmente por los agricultores, diferentes Institutos de Investigación han realizado esfuerzos para una adecuada conservación y caracterización. Actualmente se cuenta con unas 10.000 entradas de 50 especies diferentes bajo condiciones de conservación. Gran parte de este material genético ha sido seleccionado por su alto potencial en cuanto a sus características de adaptación, alto rendimiento y tolerancia a factores bióticos y abióticos, con fines de producción de semilla de alta calidad. Asimismo, ha sido utilizado en la generación de nuevas variedades (mejoramiento convencional), como en el caso del maíz, quínuva y papa.

SITUACIÓN ACTUAL DE LOS SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN VARIETAL EN BOLIVIA

Carmen L. Villarroel Vogt
Instituto Boliviano de
Tecnología Agropecuaria,
Bolivia

Caracterizaciones morfológicas

En el caso de tubérculos andinos (papa, oca, papalisa e isaño), PROINPA ha iniciado las caracterizaciones morfológicas con la ayuda de descriptores del IPGRI, con la finalidad de identificar duplicados y conocer la diversidad genética existente. Este tipo de evaluaciones se ha realizado con el objetivo de contar con series de evaluaciones morfológicas sobre el mismo genotipo, lo que permitió verificar eventuales asociaciones para evaluar y conocer las colecciones del germoplasma en función de la variabilidad de algunos genes responsables de transmitir particulares características al fenotipo, indicado por su estabilidad genética. En relación a otras especies de importancia, como el caso de frutales, maíz y quínuva, también se han realizado caracterizaciones morfológicas, para la identificación de variedades.

Caracterizaciones bioquímicas

Se han utilizado técnicas bioquímicas de electroforesis de proteínas y esterazas, para apoyar los resultados de la caracterización morfológica

(grupos morfológicos), de tubérculos andinos. No se cuenta con información en relación a otros cultivos.

Caracterizaciones moleculares

No se dispone de técnicas moleculares para identificación varietal. Sin embargo, a través del Subprograma Biotecnología del PROCISUR, existen fondos para la adquisición de un equipo (termociclador). Actualmente, Bolivia como miembro observador, no se encuentra en condiciones de capacitar personal en esta técnica, debido a la limitación presupuestaria. Asimismo, es necesario definir la técnica molecular a utilizarse, en función a las especies y variedades de interés.

REGISTRO NACIONAL DE VARIEDADES Y LA PROTECCION DE OBTENTORES DE VARIEDADES VEGETALES

El Registro Nacional de Variedades

El Registro Nacional de Variedades (RNV) es obligatorio para todos aquellos que deseen producir semillas, vale decir que el sistema oficial de Certificación de semillas solamente aceptará certificar variedades que se encuentren inscritas y registradas en el RNV. El Registro está establecido mediante el artículo N° 13 de la Resolución Secretarial N° 064/96, y tiene como objetivo establecer un ordenamiento general de variedades cultivadas, variedades en desuso y otras, con la finalidad de proteger la agricultura del país en cuanto al uso de materiales que puedan atentar contra la producción agropecuaria.

La solicitud de registro de una variedad la realiza el obtentor en base a un formulario, efectuando paralelamente una validación agronómica, lo cual otorga un registro provisional.

Los requisitos para el registro de una variedad son los siguientes:

- Solicitud de Registro debidamente llenada.
- La variedad debe ser distinta, estable y homogénea.
- Debe contar con resultados de los ensayos previos a los que fue sometida la variedad para su obtención.
- Descripción de la variedad de acuerdo a un formulario.
- Declaración jurada de la descripción de la variedad ante un notario público, la cual especifique los descriptores.
- Material de reproducción de la variedad.

Los aspectos de descriptores morfológicos, en los procesos de registro y verificación de identidad genética de cultivos, están basados en las “Directrices para la Ejecución del Examen de la Distinción, la Homogeneidad y la Estabilidad de Variedades” de la UPOV.

La Protección de Obtentores de Variedades Vegetales (POV)

En la Resolución antes mencionada (064/96), en el artículo 15, se norma la Protección de Obtentores de Variedades Vegetales (POV), a través de este mecanismo y de resoluciones anteriores que desde 1994 se cuenta con legislación en la materia. Esta resolución se encuentra dentro del marco de la Decisión 345 de la ex Junta del Acuerdo de Cartagena y también está de acuerdo con las distintas actas de la Unión Internacional para la Protección de Obtentores de Variedades Vegetales (UPOV).

Es de interés nacional el pertenecer a la UPOV, y los trámites de anexión se encuentran en su última etapa, se espera que esto se concrete a finales de 1998.

A diferencia del Registro, la Protección no es obligatoria y está destinada a proteger la inversión en investigación, para de esta manera estimular a la iniciativa privada a invertir en investigación y desarrollo de nuevas variedades. Por otro lado buenas variedades resultado de la investigación en países amigos podrán ingresar más fácilmente, si sus obtentores saben que en nuestro país podrán encontrar un retorno justo por su trabajo.

Los requisitos son similares a los del Registro, salvo que la variedad además de ser distinta, estable y homogénea deberá ser nueva.

Adicionalmente a través del Ministerio de Justicia, se están siguiendo las gestiones para contar con una ley de obtención de variedades proyecto que se espera terminar hasta fines del presente año (R. Gallo, Programa Nacional de Semillas, comunicación verbal).

CERTIFICACIÓN DE SEMILLA

Las normas de Certificación de Semillas, se establecen en cumplimiento de las Disposiciones Legales sobre Fiscalización de Semillas en Bolivia, según Decreto Supremo N° 23.069 y Resolución Ministerial N° 433/86, que encargan a las Oficinas Regionales de Semillas, la labor de prestar un Servicio de certificación de Semillas, con el objeto de promover la producción y utilización de semillas de alta calidad (Programa Nacional de Semillas).

Existen normas específicas para la certificación de semilla sexual de diferentes especies como maíz, soya, arroz y algodón entre muchas otras. En relación a especies de propagación agámica, únicamente existen normas específicas para el cultivo de la papa; material de propagación de alta calidad de otras especies como frutales (duraznero y cítricos), son producidos bajo el aval de diferentes Instituciones de Investigación.

La evolución de estas normas es activa y actualmente se están elaborando normas para hortalizas, forestales, ajo, haba y quínuva.



CAPÍTULO V

ORGANIZACIÓN

LA CALIDAD GENÉTICO SANITARIA COMO INSTRUMENTO DE LA CADENA AGROINDUSTRIAL

LA CALIDAD GENÉTICO SANITARIA

La calidad como paradigma

La calidad como paradigma es uno de los aspectos más importantes de la producción del futuro. En materia de producción agrícola, ésta puede definirse de varias formas dependiendo de qué aspecto se está focalizando.

Existe una calidad técnica, definida por estándares que definen procedimientos, descripción de atributos o valores de parámetros, los cuales permiten caracterizar o definir a un determinado material.

Otra calidad es la percibida por el consumidor. En el acto de optar, el consumidor realiza la evaluación de una calidad que tiene más elementos y va más allá de la calidad técnica descrita anteriormente. La calidad percibida tiene canales de expresión los cuales incluyen aspectos de producción, mercado y otros relacionados a la evolución de los patrones culturales de una sociedad. Muchas veces la calidad técnica es generalmente un prerrequisito para una calidad percibida y es difícil entonces de separar. También y como se describe adelante, el consumidor puede influenciarse por determinados atributos del material y que corresponden a la calidad derivada de las propiedades genéticas del mismo.

Daniel Pagliano
Unidad de Biotecnología,
Instituto Nacional de
Investigación Agropecuaria
(INIA), Uruguay

La calidad genético sanitaria

La calidad técnica de un material vegetal tiene dos componentes principales: el genético y el sanitario.

La Calidad Genética puede expresarse en general como la capacidad productiva de un genotipo tanto en sus aspectos cualitativos y cuantitativos. Una determinada variedad incluye en su patrimonio genético un cúmulo de información seleccionada que la hace la opción más apta

para un determinado fin productivo. Una variedad es obtenida luego de varios años de mejoramiento genético, combina información genética precedente y es fuente de nueva variación.

La Calidad Sanitaria es el nivel de salud que determina la expresión de la capacidad productiva de un genotipo. Se trata de prevenir las enfermedades o sanear un material, preservando el nivel óptimo de salud.

A medida que las categorías de plantas se alejan del mayor nivel de salud ya sea por multiplicación o cultivo, se van aumentando las cargas de patógenos y la probabilidad de interacción con la planta hasta llegar a la enfermedad.

La calidad podría expresarse como una función:

$$F(\text{calidad}) = \frac{CG \times CS \times PA}{SB \times SA}$$

Donde:

CG: Calidad genética
 CS: Calidad sanitaria
 PA: Prácticas agronómicas
 SB: Estrés biótico
 SA: Estrés abiótico

La calidad está directamente relacionada a la calidad genético sanitaria y al nivel de la práctica agronómica utilizada en el paquete tecnológico.

Incidan inversamente en la calidad los estrés biótico y abiótico que sufra el cultivo.

Los factores están interaccionando y tienen efectos aditivos.

LA EVOLUCIÓN DE PRODUCCIÓN INTENSIVA

La producción intensiva en los países de América Latina está cambiando. Si bien es importante reconocer los distintos tipos de productores existentes que van desde explotaciones familiares a empresariales de alta inversión, todos convergen o están influidos por algunos elementos de escenario que son comunes.

Entender los factores que afectan este escenario y que están relacionados con la calidad genético sanitaria, puede aportar nuevos elementos al momento de proponer o evaluar un modelo de cadena de calidad. A continuación se muestran algunos.

Nuevas variedades

La aceleración de los procesos de generación de nuevas variedades es un elemento fundamental de los nuevos modelos de producción. Los materiales genéticos nuevos son consecuencia de, o inducen a, las nuevas exigencias de los mercados.

Tienen consecuencias que van desde los aspectos comerciales hasta para constituir nuevos sistemas de liderazgo entre los productores innovadores.

La generación de materiales nuevos, la disponibilidad de germoplasma y la tecnología para evaluarlos o lograrlos; así como la habilidad para introducirlos en el mercado en forma rápida, son elementos que hacen a la competitividad de las empresas o instituciones que desarrollan materiales o servicios nuevos.

Por tanto, se espera incrementos en la oferta de nuevos materiales vegetales y las tecnologías de evaluación de la calidad, como consecuencia de las necesidades de diferenciar productos en el mercado.

Paquetes de producción integrados

Las nuevas variedades se acompañan de recomendaciones o paquetes tecnológicos integrados para sistemas de producción definidos.

Generalmente se busca maximizar la ganancia genética y operacional en un determinado ambiente, por lo que se hace necesario para alcanzar este objetivo, que las mismas variedades se siembren o instalen en condiciones agronómicas definidas.

Cuando más se alejen de las condiciones agronómicas recomendadas, las nuevas variedades van a ir decreciendo su capacidad de expresar las características seleccionadas.

Es de esperar que el material vegetal sea un elemento cada vez más importante del paquete tecnológico para producir y que esté más relacionado al resto de los componentes del mismo.

Postcosecha y agroindustrias

Los aspectos postcosecha son importantes en el momento de determinar la rentabilidad de un cultivo y los proyectos productivos exitosos son aquellos que se ensamblan perfectamente en el paso siguiente.

Las agroindustrias necesitan que se produzca un determinado estándar de calidad como consecuencia también de la ingeniería de la infraestructura de transformación y de la operativa comercial en sí misma, que buscan bajar los costos. En este sentido, la demanda es quién emite la señal de lo

necesario. Estas señales se van a ver incrementadas por lo que aparecerán nuevas relaciones de compromiso entre los productores y los agentes siguientes de transformación o mercadeo.

Propiedad intelectual

Debido a los egresos por producir nuevas variedades y ponerlas a disposición de los productores, es necesario que las inversiones, costos operativos sean recuperados por propiedad intelectual.

Los países que no aseguren un sistema de propiedad intelectual no podrán beneficiarse totalmente de las nuevas oportunidades.

LA CADENA DE CALIDAD

Vectores de calidad

La calidad *per se* es un aspecto en continua evolución, donde elementos dinámicos se ensamblan en una cadena, que va desde la calidad percibida de los consumidores hasta donde se genera la calidad técnica. Esta cadena tiene distintos vectores que buscan satisfacer necesidades distintas.

En un extremo, los consumidores buscan mejores propiedades, precios y facilidad de consumo. La agroindustria busca cumplimiento de negocios, constancia en las calidades acordadas y menores precios. La producción busca elementos de rentabilidad y sostenibilidad de la empresa. Los investigadores tienen que encontrar nuevos o dar mayor valor agregado a los materiales existentes y que los productores conocen.

La calidad tiene tiempos distintos. Los consumidores toman decisiones en el corto plazo. Los productores deben tomar decisiones de mediano plazo. Una decisión de plantar un frutal involucra una expectativa que se ubica en el futuro. Lo que se plante hoy, se cosechará por ejemplo en un plazo de cinco años. Hay un riesgo implícito derivado del tipo de empresa y el tiempo aquí se torna un elemento de consideración.

Los investigadores tienen que anticiparse a los mercados y los productores, para generar u obtener el germoplasma relevante que será luego plantado por los productores. Asimismo, el proceso de mejoramiento genético lleva varios años, muchos más que producir, por lo que siempre se trabaja con una visión de largo plazo.

La consolidación de una cadena de calidad debe armonizar estas visiones para ser eficiente y económicamente sostenible.

Calidad y producción

Un productor enfrentado a la decisión del negocio se realiza preguntas tales como:

¿Qué producir?

La decisión del cultivo y dentro del cultivo, qué variedad o material a usar es una decisión que en el contexto del paquete tecnológico es la más relevante. Lo que se plante hoy es lo que se cosechará mañana.

¿Cómo producir?

El uso del mejor paquete tecnológico adecuado a cada realidad productiva es condición *sine quantum* en el contexto de competitividad de la economía.

¿Cómo comercializar?

La tecnología de comercialización es importante ya que determina el mayor margen neto final.

Estas preguntas muchas veces no están suficientemente contestadas y son elementos de confusión.

El productor recibe señales desde lugares como las agencias estatales de extensión, los Institutos de Investigación, los técnicos o asesores de empresas vendedoras de insumos, extensionistas privados, el sistema bancario, los programas de Desarrollo nacionales, los intermediarios de comercialización, los agentes agroindustriales, la prensa general y la especializada, y otros canales de información. Con toda la información debe generar en base a sus capacidades y oportunidades un proceso complejo de definición de la tecnología que aplicará, etc.

En este sentido, se necesita un nivel mínimo de capacidad de los productores y técnicos que permita usar un sistema de códigos en materia de tecnología que sea eficiente, único y suficiente.

El uso de plantas de alta calidad genético sanitaria con sus respectivas recomendaciones de uso y manejo, validadas por la experiencia y la investigación nacional, dirigidas a mercados con oportunidades relevadas o acordadas, aparecen como un elemento importante del paquete tecnológico en el momento de iniciar un cultivo.

En torno a la planta de calidad se deben construir los elementos de la cadena que aseguren el producto final.

Calidad operativa

La cadena para la producción de plantas de alta calidad debe ser elaborada y mantenida por todos los involucrados, ya que de otra forma pueden originarse retrasos o imperfecciones innecesarias. En este sentido, algunos de los papeles de los vectores pueden expresarse como sigue.

- **Los institutos de investigación** deben cumplir una función de liderazgo tecnológico mostrando a través de modalidades como experiencias pilotos u otras las distintas opciones disponibles. Deben asimismo desarrollar e incrementar la capacidad de generación o evaluación de materiales de calidad genético sanitaria.
- **Los organismos de contralor o auditores de calidad** son parte importante de la cadena, aseguran la continuidad de la misma, establecen y garantizan el funcionamiento de los estándares de procedimiento. Estos organismos deben buscar a través de propuestas de organización como los Programas de Certificación, que los vectores se ensamben en consenso y avancen a modelos autocontrolados.
- **Los productores especializados y las empresas de propagación** son los que realizan la escala de la producción. Este eslabón importante permite dar mayor operatividad y rapidez al sistema a través de esta producción y servicios especializados.
- **Los productores** usuarios deben participar en la elaboración de la cadena, para entenderla y poder sacar la máxima ventaja de la misma.

La participación eficiente de los vectores logrará un efecto sinérgico que se traducirá en una ganancia operacional del sistema. El modelo debe ser entonces multidisciplinario y sostenible.

OPORTUNIDADES DE LA CALIDAD GENÉTICO SANITARIA

Las oportunidades de la calidad genético sanitaria pueden resumirse en los siguientes aspectos:

Incremento de la competitividad de los productores

Al disponer de mejor información, disponibilidad física de materiales con garantía de calidad y oportunidades de capacitación, los productores podrán mejorar su proyecto de producción. Verán facilitadas sus relaciones con el resto del sistema, dimensionarán mejor y disminuirán el riesgo del negocio productivo.

Aumento de la capacidad de las agroindustrias

Al disponer de mejor calidad y cantidad del producto requerido por la ingeniería de transformación, las agroindustrias se beneficiarán por reducción de costos y posibilidad de mejora en aspectos como diversificación y dar valor agregado a los productos.

Incremento de las opciones de los consumidores

Al haber productos de mayor calidad percibida (precios, calidades técnicas, etc), los consumidores se beneficiarán al tener una mejor satisfacción de la demanda, lo que haría una fuerza desde la demanda para nuevas opciones productivas, estableciendo un mecanismo de retroalimentación y dando sostenibilidad al sistema.



A N E X O

ESTÁNDAR

CERTIFICACIÓN DE
MATERIALES DE PROPAGACIÓN

CÍTRICOS

INTRODUCCIÓN

Una de las modalidades más eficaces para lograr una calidad genético sanitaria de plantas ha sido justamente la constitución de Programas de Certificación de Plantas.

Estos Programas integran a los actores de la cadena y trabajan sobre la base de una visión compartida y esfuerzos sinérgicos.

Le hemos pedido al Instituto Nacional de Semillas y a la Dirección de Protección Agrícola de Uruguay, que nos permitieran reproducir en el Anexo que sigue, el texto del Estándar del Programa de Certificación de Cítricos.

Lo que queremos mostrar es con un ejemplo concreto, cuáles son los puntos principales que debe tener un Programa de este tipo y que puede ser aplicado a cualquier especie de propagación agámica.

Estamos convencidos de que los efectos sinérgicos de modalidades como ésta, serán de gran utilidad en la transformación productiva de los sectores vinculados a la producción intensiva de la región.

TABLA DE CONTENIDO

REVISIÓN	1
APROBACIÓN	1
REGISTRO DE MODIFICACIONES	3
DISTRIBUCIÓN	3
I INTRODUCCIÓN	4
1. ÁMBITO	4
2. REFERENCIAS	4
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	5
4. DESCRIPCIÓN	9
II REQUISITOS GENERALES	10
1. Lista de Plagas a Considerar	10
a. Plagas A2	10
b. Plagas No Cuarentenarias Reguladas	10
2. Esquema de Certificación	10
3. Bloques de Producción y Materiales Vegetales que en ellos se producen	12
4. Niveles de Tolerancia	12
5. Origen de la plantas incluidas en los distintos Bloque de Producción y controles que se realizan.	12
6. Condiciones de aislamiento.	14
Del Predio	14
De los Bloques de Producción	14
7. Condiciones Generales de Cultivo.	16
8. Identificación de las plantas en los Bloques de Producción.	16
9. Acondicionamiento e identificación de los materiales producidos.	17
10. Inspecciones.	18

REVISIÓN

Este Estándar de Certificación de Materiales de Propagación de Cítricos está sujeto a revisiones y modificaciones periódicas.

La fecha de la próxima revisión es:

APROBACIÓN

Este estándar de Certificación de Materiales de Propagación de Cítricos fue aprobado por la Junta Directiva del Instituto Nacional de por Resolución de fecha.....

REGISTRO DE MODIFICACIONES

Este Estándar está sujeto a modificaciones periódicas.

La fecha de la próxima revisión es:

DISTRIBUCIÓN

Este Estándar es distribuido por el Programa Nacional de Certificación y Control de Materiales Cítricos de Propagación a:

- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
- Facultad de Agronomía
- Comisión Honoraria Nacional del Plan Citrícola
- Delegados en el Grupo Técnico de Trabajo de Materiales Cítricos de Propagación
- Organizaciones Nacionales de Protección Vegetal de los países miembros del COSAVE
- Comité de Sanidad Vegetal del MERCOSUR
- Organizaciones de Certificación de Semillas de los países miembros del COSAVE
- Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria – FAO
- Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur
- Asociación Uruguaya de Viveristas de Cítricos
- Comité de Semillas de ALADI
- Comité de Semillas del MERCOSUR
- Cámara Uruguaya de Semillas
- Asociación Nacional de Productores de Semillas

I INTRODUCCIÓN

1.- ÁMBITO

Este Estándar de Certificación de Materiales de Propagación de Cítricos incluyendo los géneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella* y sus híbridos, se aplica para la producción de yemas, semillas y plantas certificadas en las diversas categorías.

2.- REFERENCIAS

- Certification scheme. Virus-free or virus-tested fruit trees and roostocks. Part I Basic scheme and its elaboration. Bulletin OEPP/EPPO. Bulletin 21. 267-278. 1991
- Certification Scheme. Virus-free or virus-tested fruit trees and roostocks. Part II. Table of viruses and vectors. Bulletin OEPP/EPPO. Bulletin 22. 255-263. 1992.
- Certification Scheme. Virus-free or virus-tested fruit trees and roostocks. Part III. Testing methods for virus or fruit trees presented in the EPPO region. Bulletin OEPP/EPPO. Bulletin 22. 265-275. 1992.
- Certification scheme. Virus-free or virus –tested fruit trees and roostocks. Part IV. Technical appendices and table of content. Bulletin OEPP/EPPO. Bulletin 22. 277-283. 1992
- Decreto 133/92 de fecha 30 de marzo de 1992
- Decreto 210/89 de fecha 5 de mayo de 1989
- Decreto 508/84 de fecha 14 de noviembre de 1984
- Decreto 84/83 de fecha 16 de mayo de 1983
- Decreto 854/985 de fecha 30 de diciembre de 1985
- Ley 15.554
- Ley 15.173
- Glosario de Términos Fitosanitarios. Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur – COSAVE. Marzo 1995.
- Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. ROISTACHER C. N. IOCV – FAO. 286 p. 1991.
- Guidelines for the Safe Movement of Citrus Germplasm. FRISON M. A. and TAHER M. M. (eds) 1991. FAO- IPGRI. Technical Bulletin. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. ITALIA.

- NAPPO Compendium of Phytosanitary Terms. NAPPO Doc. No. 96-027. February 1996.
- Principios para la reglamentación de las plagas de calidad (Nocivas) en el comercio Regional. COSAVE. Estándar N° 2.2 - Agosto 1994.
- Resolución del Poder Ejecutivo de fecha 22 de junio de 1983
- Resolución de la D.S.P.A. de fecha 11 de marzo de 1994

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Almácigo	Bloque de Producción instalado a partir de la siembra de Semillas Certificadas con destino a la obtención de Plantines .
Almácigo para Fundación	Almácigo instalado con el objetivo de producir Plantines para Fundación .
Almácigo para Incremento I	Almácigo instalado con el objetivo de producir Plantines para Incremento I .
Almácigo para Incremento II	Almácigo instalado con el objetivo de producir Plantines para Incremento II .
Almácigo para Vivero de Certificación	Almácigo instalado con el objetivo de producir Plantines para Vivero de Certificación .
AI I	Abreviación de Almácigo para Incremento I .
AI II	Abreviación de Almácigo para Incremento II .
AF	Abreviación de Almácigo para Fundación .
AV	Abreviación de Almácigo para Vivero de Certificación .
BAPS	Abreviación de Bloque de Árboles Productores de Semillas .

Bloque de Árboles Productores de Semillas	Bloque de Producción constituido por Plantas Certificadas de los cuales se obtienen Semillas Certificadas de portainjertos.
Bloque de Incremento I	Bloque de Producción constituido por plantas originadas a partir de Yemas para Incremento I injertadas sobre Plantines para Incremento I , destinado a la producción de Yemas para Incremento II .
Bloque de Incremento II	Bloque de Producción constituido por plantas originadas a partir de Yemas para Incremento I o Yemas para Incremento II injertadas sobre Plantines para Incremento II , destinado a la producción de Yemas Certificadas .
Bloque Fundación	Bloque de Producción constituido por plantas originadas a partir de Yemas de Material Inicial injertadas sobre Plantines para Fundación , destinado a la producción de Yemas de Incremento I .
BF	Abreviación de Bloque Fundación .
BI I	Abreviación de Bloque de Incremento I .
BI II	Abreviación de Bloque de Incremento II .
Certificación	Proceso técnico de supervisión y verificación realizado por la Entidad Certificadora , destinado a certificar la Condición Fitosanitaria , Identidad Genética y Calidad de los materiales de propagación en función de los Estándares aprobados.
Certificado	Documento Oficial que certifica la condición de los materiales de propagación de acuerdo al Estándar .
Condición Sanitaria	Ausencia, presencia o nivel en que las plagas se presentan en un individuo o conjunto de individuos.

Cultivar	Conjunto de plantas de un solo taxón botánico del rango más bajo conocido, que se define por la expresión de caracteres resultantes de un cierto genotipo o de una cierta combinación de genotipos, que se distingue de cualquier otro conjunto de plantas por la expresión de por lo menos uno de dichos caracteres y que se considera como una unidad, habida cuenta de su aptitud a propagarse sin alteraciones.
Entidad Certificadora	Organización encargada de conducir el proceso de Certificación .
Estándar	Documento establecido por consenso y aprobado por un cuerpo reconocido, que suministra, para uso común y repetido, reglas, lineamientos o características para las actividades o sus resultados, con el propósito de alcanzar el grado óptimo de orden en un contexto.
Etiqueta o Rótulo	Marbete destinado a identificar el material certificado en relación con un Certificado.
Germoplasma	Vegetales destinados a programas de mejoramiento o a su conservación.
Material Inicial	Material de Propagación proveniente de un Programa de Saneamiento y debidamente identificado y descrito.
Material de Propagación	Todo órgano vegetal y sus partes (semillas, yemas, etc) que se destinan a la multiplicación de los vegetales.
Medidas Fitosanitarias	Cualquier legislación, reglamentación o procedimiento oficial que tenga el propósito de prevenir la introducción y/o la diseminación de plagas.
Oficial	Establecido, autorizado o realizado por una organización oficial.
Plaga	Cualquier especie, raza o biotipo de vegetales, animales o agentes patogénicos, nocivos para los vegetales o productos vegetales.

Plaga Cuarentenaria	Plaga que puede tener importancia económica para el área que corre el riesgo que esa plaga entraña cuando aún la plaga no existe o, si existe, no está extendida y se encuentra bajo control oficial.
Plaga No Cuarentenaria Regulada	Plaga no cuarentenaria cuya presencia en las plantas para plantación influye en el uso a que se destinan esas plantas con repercusiones económicamente inaceptables y que, por lo tanto, está regulada en el territorio de la parte contratante importadora.
Plaga Reglamentada	Plaga cuarentenaria o plaga no cuarentenaria reglamentada.
Planta	Plantas vivas y parte de ellas, incluyendo las semillas y el germoplasma .
Planta Certificada	Planta producida en un Vivero de Certificación obtenida por injerto de una Yema Certificada en un Plantín Certificado .
Plantín Certificado	Planta sin injertar obtenida a partir de una semilla certificada o a partir de una estaca o vareta extraída de un Bloque de Incremento II y enraizada, cultivada cumpliendo con los requerimientos de un Almácigo para Vivero de Certificación .
Plantín para Fundación	Planta sin injertar obtenida a partir de una semilla certificada cultivada cumpliendo con los requerimientos de un Almácigo para Fundación .
Plantín para Incremento I	Planta sin injertar obtenida a partir de una semilla certificada cumpliendo con los requerimientos de un Almácigo para Incremento I .
Plantín para Incremento II	Planta sin injertar obtenida a partir de una semilla certificada cultivada cumpliendo con los requerimientos de un Almácigo para Incremento II .

PNCC	Abreviación de Programa Nacional de Certificación de Cítricos.
Programa de Saneamiento	Conjunto de actividades conducentes a la eliminación de enfermedades transmisibles en los materiales de propagación y a la confirmación de los resultados en función de los Estándares correspondientes.
Semilla Certificada	Son las que proceden de Bloques de Árboles Productores de Semillas .
Vareta o estaca	Trozo de rama con yemas, destinado a la propagación, ya sea por injerto de yema, púa o mediante el enraizamiento del mismo.
Vivero de Certificación	Bloque de Producción instalado con el cometido de producir Plantas Certificadas , constituido por plantas originadas a partir de Yemas Certificadas injertadas sobre Plantines Certificados .
Yemas Certificadas	Son yemas producidas en un Bloque de Incremento II .
Yemas Fundación	Son yemas extraídas del Material Inicial .
Yemas para Incremento I	Son yemas producidas en un Bloque Fundación .
Yemas para Incremento II	Son yemas producidas en un Bloque de Incremento I .

4.- DESCRIPCIÓN

El presente Estándar presenta:

- La lista de plagas A2 y No Cuarentenarias Reguladas en el ámbito nacional.
- El Esquema de Certificación a aplicarse.
- La categorización de los Materiales de Propagación producidos.

- Las condiciones de aislamiento que cumplen los Bloques de Producción de Materiales para las distintas categorías, las inspecciones que se realizan especificando el objetivo de las mismas y los momentos en que se realizan.
- La metodología de muestreo a utilizar especificando el momento en que se realiza la extracción.
- Los niveles de tolerancia para las plagas consideradas en las distintas categorías.
- Los métodos analíticos a utilizar en los casos que corresponda, a aplicar en la implementación del Programa Nacional de Certificación de Cítricos.

II REQUISITOS GENERALES

1.- Lista de Plagas a Considerar

a. Plagas A2

Xanthomonas axonopodis pv *citri* Bacteria de la Cancrosis de los Cítricos

b. Plagas No Cuarentenarias Reguladas

CCAVd Viroide de la Cachexia – Xiloporosis de los Cítricos

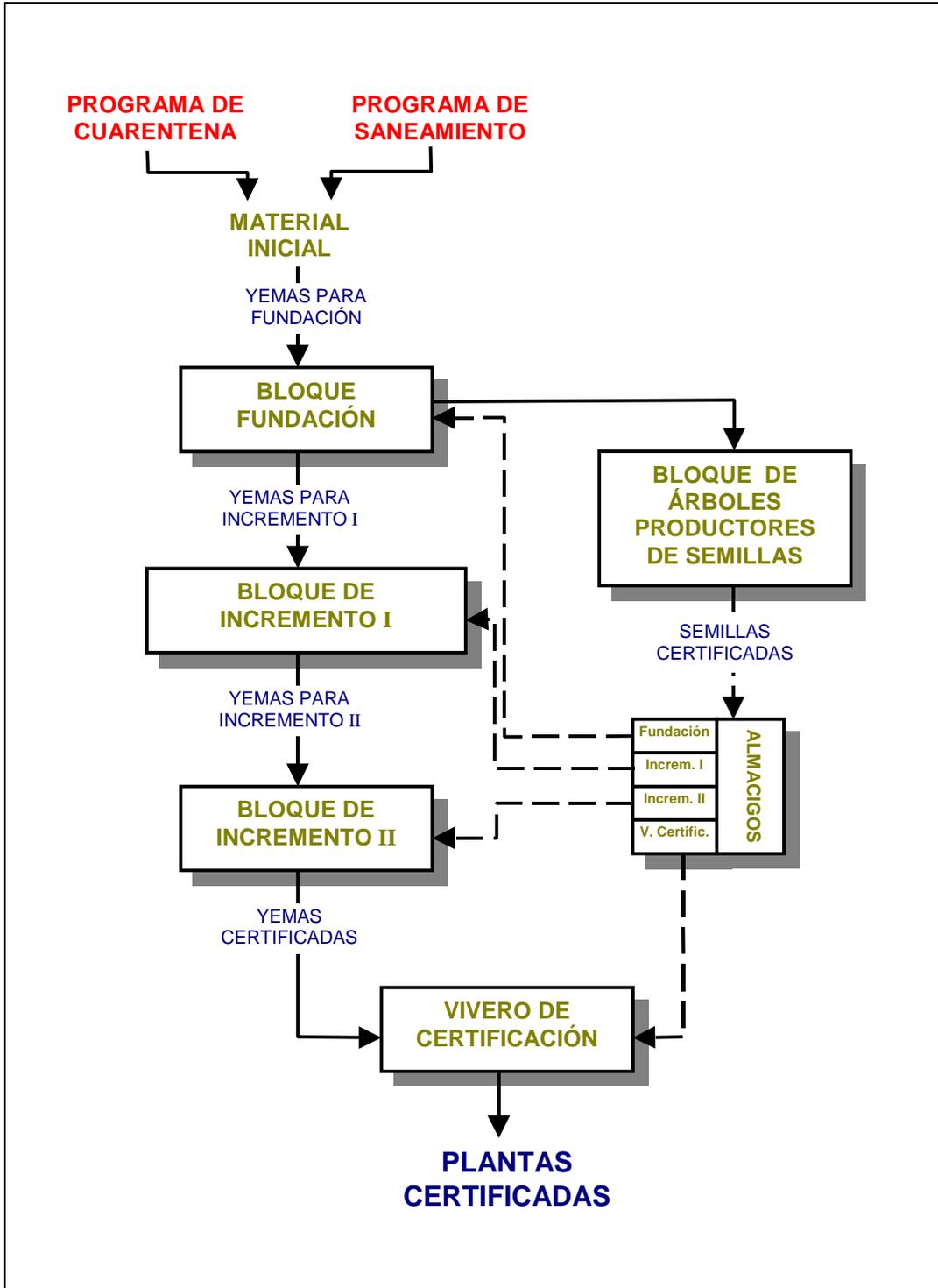
CEVd Viroide de la Exocortis de los Cítricos y relacionados

CPsV Complejo de la Psorosis de los Cítricos

CTV Virus de la Tristeza de los Cítricos

2. Esquema de Certificación

En la producción de materiales de propagación certificados oficialmente, se aplica el siguiente esquema:



3. Bloques de Producción y Materiales Vegetales que en ellos se producen

El presente Estándar considera la instalación de los siguientes Bloques de Producción y las siguientes categorías de Materiales Vegetales que en ellos se producen. Esta información se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Bloques de Producción y Materiales que en cada uno de ellos se producen.

BLOQUE DE PRODUCCIÓN		MATERIAL VEGETAL	
BLOQUE FUNDACIÓN		YEMAS PARA INCREMENTO I	
BLOQUE DE INCREMENTO I		YEMAS PARA INCREMENTO II	
BLOQUE DE INCREMENTO II		YEMAS CERTIFICADAS	
BLOQUE DE ÁRBOLES PRODUCTORES DE SEMILLAS		SEMILLAS CERTIFICADAS	
ALMACIGOS	FUNDACIÓN	PLANTINES	PARA FUNDACIÓN
	INCREMENTO I		PARA INCREMENTO I
	INCREMENTO II		PARA INCREMENTO II
	VIVERO DE CERTIFICACIÓN		CERTIFICADOS
VIVERO DE CERTIFICACIÓN		PLANTAS CERTIFICADAS	

4. Niveles de Tolerancia

Para todas las categorías, los niveles de tolerancia para las plagas consideradas son del **0%**.

5. Origen de la plantas incluidas en los distintos Bloque de Producción y controles que se realizan

Se presenta, en el Cuadro 2, el origen de las plantas que integran los distintos Bloques de Producción y se describen los controles, tanto sanitarios como de Identidad Genética, que en cada uno de ellos se realizan.

Cuadro 2. Origen de las plantas en cada Bloque de Producción y Controles Sanitarios y de Identidad Varietal.

	ORIGEN DE LAS PLANTAS	CONTROLES SANITARIOS	CONTROLES DE IDENTIDAD GENÉTICA
BLOQUE FUNDACIÓN	Yemas provenientes del Material Inicial injertadas sobre Plantines para Fundación.	Inspección individual, en los momentos de mayor brotación, para detección de síntomas de las plagas consideradas. Tristeza y Psorosis: Testaje anual individual. Cancrosis: Testaje anual individual para confirmación de inexistencia de bacteria asintomática. Viroides: Testaje cada 3 años.	Inspección visual de las características descriptivas del cultivar. Establecimiento a campo, en condiciones normales de cultivo, de plantas realizadas con Yemas para Fundación o cambios de copa con Yemas para Fundación.
BLOQUE DE INCREMENTO I	Yemas provenientes del Bloque Fundación injertadas sobre plantines para Incremento I.	Inspección visual individual en los momentos de mayor brotación para detección de síntomas de enfermedades transmisibles por injerto. Tristeza: Test del 5% de cada Clon con tamaño de muestra mínimo de 2 plantas. Cancrosis: Testaje anual por clon para confirmación de inexistencia de bacteria asintomática.	Inspección visual detallada de las características descriptivas de cada cultivar del Bloque.
BLOQUE DE INCREMENTO II	Yemas provenientes del Bloque Fundación o del Bloque de Incremento I injertadas sobre plantines para Incremento II o de categorías superiores.	Inspección visual individual en los momentos de mayor brotación para detección de síntomas de enfermedades transmisibles por injerto. Tristeza: Test sobre 2% de cada Clon con tamaño de muestra mínimo de 5 plantas. Cancrosis: Testaje anual por cultivar para confirmación de inexistencia de bacteria asintomática.	Inspección visual detallada de las características descriptivas de cada cultivar del Bloque.
BLOQUE DE ÁRBOLES PRODUCTORES DE SEMILLAS	Yemas provenientes de cualquiera de los Bloques de cualquier Categoría injertadas sobre plantines certificados o de categorías superiores.	Inspección visual en los momentos de mayor brotación para detección de síntomas de enfermedades transmisibles por semillas. Psorosis: Testaje individual anual.	
ALMACIGOS	Semillas Certificadas	Inspección visual para detección de síntomas de las plagas consideradas con especial atención a la presencia de hongos de suelo (Ej.: <i>Phytophthora</i>). Tests confirmatorios si corresponde.	Inspección visual para detección de plantines de origen cigótico, anormales o fuera de tipo.
VIVERO DE CERTIFICACIÓN	Yemas Certificadas o de categorías superiores injertadas sobre plantines Certificados o de categorías superiores.	Inspección visual para detección de síntomas de las plagas consideradas con especial atención a la presencia de hongos de suelo (Ej.: <i>Phytophthora</i>). Tristeza: Test sobre el 0,5% de cada Clon con un tamaño mínimo de muestra de 10 plantas por cultivar.	Inspección visual detallada de las características descriptivas de cada cultivar del Bloque.

6. Condiciones de aislamiento.

Del Predio

a. Ubicación

Los Predios donde se instalan Bloques de Producción de Materiales de Propagación de Cítricos cumplen con la normativa vigente en cuanto a la prohibición de instalación de los mismos en Zonas de Alto Riesgo por Cancrosis.

b. Desinfección al Ingreso

Se realiza la desinfección de personas, vehículos, implementos y herramientas al ingreso al Predio donde se instalan Bloques de Producción con un bactericida adecuado (Ej.: Amonio Cuaternario).

De los Bloques de Producción

a. Ubicación, condiciones de aislamiento y plazo de utilización

En el Cuadro 3, se presentan las condiciones de aislamiento (*) y plazo máximo de utilización de cada Bloque de Producción.

b. Desinfección de herramientas de corte.

En el Cuadro 4 se presentan las instancias de desinfección que se realizan con **Hipoclorito de Sodio** para evitar la contaminación de los materiales en los Bloques de Producción.

Cuadro 4. Instancias de desinfección de herramientas de corte según Bloque de Producción.

	DESINFECCIÓN PREVIA	DESINFECCIÓN ENTRE PLANTAS	DESINFECCIÓN ENTRE LOTES
BLOQUE FUNDACIÓN	SI	SI	-----
BLOQUE DE INCREMENTO I	SI	SI	-----
BLOQUE DE INCREMENTO II	SI	-----	SI
BLOQUE DE ÁRBOLES PRODUCTORES DE SEMILLAS	SI	SI	-----
VIVERO DE CERTIFICACIÓN	SI	-----	SI
ALMÁCIGOS TODAS LAS CATEGORÍAS	SI	-----	SI

* Otras condiciones de aislamiento no contempladas en el presente estándar pueden ser consideradas particularmente, a los efectos de equivalerlas a las establecidas en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Condiciones de aislamiento y plazo de utilización para cada Bloque de Producción.

	CONDICIONES DE AISLAMIENTO	PLAZO DE UTILIZACIÓN
BLOQUE FUNDACIÓN	Plantas en macetas individuales con sustratos esterilizados en recintos cubiertos a prueba de insectos vectores y sin piso de tierra. Doble puerta. Sistema de desinfección a la entrada.	Indefinido
ALMÁCIGO FUNDACIÓN	Distancia a otros cultivos comerciales de cítricos: 1000 metros Circulación mínima necesaria de personal.	No corresponde
BLOQUE DE INCREMENTO I	Recintos cubiertos a prueba de insectos vectores y doble puerta. Sistema de desinfección a la entrada.	Dos años desde la injertada. Superado el mismo podrá utilizarse como Bloque de Incremento II por dos años más.
ALMÁCIGO INCREMENTO I	Distancia a otros cultivos comerciales de Cítricos: 500 metros. Circulación mínima necesaria de personal.	No corresponde
BLOQUE DE INCREMENTO II	En recintos cubiertos de manera tal que le confieran cierta protección contra insectos vectores, con sistema de desinfección a la entrada la distancia a otros cultivos cítricos es de 100 metros.	Tres años desde la injertada.
ALMÁCIGO DE INCREMENTO II	A campo, la distancia a otros cultivos comerciales de cítricos es de 500 metros.	No corresponde
BLOQUE DE ÁRBOLES PRODUCTORES DE SEMILLAS (*)	A campo la distancia a otros cultivos comerciales de cítricos es de 50 metros.	Indefinido
VIVERO DE CERTIFICACIÓN	A campo la distancia a otros cultivos comerciales de cítricos es de 100 metros.	No corresponde
ALMÁCIGO DE VIVERO DE CERTIFICACIÓN		

* Hasta tanto estos Bloques se instalen y entren en producción, se exceptúan del cumplimiento de las exigencias de aislamiento autorizándose la utilización de semillas obtenidas a partir de árboles testados y hallados libres de Psorosis.

7. Condiciones Generales de Cultivo.

En los Bloques de Producción existen condiciones adecuadas para lograr un correcto desarrollo de las plantas y un control eficiente de plagas.

Las herramientas de corte no se utilizan en Bloques de Producción de diferente categoría.

8. Identificación de las plantas en los Bloques de Producción.

En el Cuadro 5 se establecen los criterios a aplicar para la identificación de las plantas de los diferentes Bloques de Producción y la información mínima que figura.

Cuadro 5. Identificación de las plantas en los distintos Bloques de Producción.

	CRITERIO DE IDENTIFICACIÓN	INFORMACIÓN
BLOQUE FUNDACIÓN	Individual de cada planta y código de colores	Código PNCC, Identificación del Cultivar e identificación de la planta (A, B, C, etc)
BLOQUE DE INCREMENTO I		Código PNCC, identificación del cultivar e identificación de la planta (A, B, C, etc) de la que se extrajeron los injertos. Identificación del Bloque donde se produjeron los injertos.
BLOQUE DE ÁRBOLES PRODUCTORES DE SEMILLAS		Código PNCC, identificación del cultivar e identificación de la planta
BLOQUE DE INCREMENTO II	Por conjunto de plantas derivadas de un mismo clon	Código PNCC e identificación del cultivar
VIVERO DE CERTIFICACIÓN	Por conjunto de plantas derivadas de un mismo clon injertadas sobre el mismo portainjerto	Código PNCC e identificación del cultivar del injerto y Código PNCC e identificación del cultivar del portainjerto
ALMÁCIGOS TODAS LAS CATEGORÍAS	Por conjunto de plantines obtenidos de semillas del mismo cultivar y mismo origen	Código PNCC e identificación del cultivar

9. Acondicionamiento e identificación de los materiales producidos

Todos los materiales producidos en el marco del PNCC están debidamente etiquetados y acondicionados. En la Tabla 6 se establecen los criterios a aplicar para el acondicionamiento e identificación de estos materiales de propagación factibles de ser producidos. (Cuadro 6)

Cuadro 6. Acondicionamiento de los materiales producidos e información que debe figurar en los respectivos rótulos o etiquetas.

	CRITERIO DE IDENTIFICACIÓN	INFORMACIÓN de la ETIQUETA
YEMAS INCREMENTO I	En bolsas	Nº de Etiqueta Identificación del Cultivar Código PNCC Planta del Bloque Fundación de la que derivan. Identificación del Bloque Categoría del Material Cantidad de Yemas Fecha de Cosecha Empresa Productora
YEMAS INCREMENTO II		Nº de Etiqueta Identificación del Cultivar Código PNCC Identificación del Bloque Categoría del Material Cantidad de Yemas Fecha de Cosecha Empresa Productora
YEMAS CERTIFICADAS		Nº de Etiqueta Identificación del Cultivar Código PNCC Identificación del Bloque Categoría del Material Cantidad de Yemas Fecha de Cosecha Empresa Productora
SEMILLAS CERTIFICADAS	En manojos de hasta 50 unidades	Nº de Etiqueta Identificación del Cultivar Código PNCC Identificación del Bloque Categoría del Material Kilogramos de semilla Fecha de Cosecha Empresa Productora
PLANTINES		Nº de Etiqueta Identificación del Cultivar Código PNCC Identificación del Bloque Categoría del Material Cantidad Fecha de arrancado Empresa Productora
PLANTAS CERTIFICADAS	Individual	Nº de Etiqueta Empresa Productora Identificación del Bloque Mes y Año Del Injerto: <ul style="list-style-type: none"> • Identificación del Cultivar • Código PNCC Del Portainjerto: <ul style="list-style-type: none"> • Identificación del Cultivar • Código PNCC

10. INSPECCIONES

En el proceso de certificación se realizan las inspecciones requeridas en los momentos y con los objetivos que se indican en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Inspecciones: momentos y objetivos

MOMENTO	OBJETIVO	OBSERVACIONES
A la siembra de semillas certificadas	Control del cumplimiento de las condiciones de aislamiento del lugar donde se instalará el almácigo, del Origen del Material utilizado y de la identificación de las parcelas.	Inspección obligatoria a realizarse al instalar almácigos en sus distintas categorías.
Durante desarrollo de los plantines en almácigo	Detección de síntomas posiblemente ocasionados por las plagas consideradas y de plantines fuera de tipo.	
Al arranque de los plantines	Control de la calidad y del rotulado de los materiales producidos.	
Al enviverado de los plantines	Control del cumplimiento de las condiciones de aislamiento, del Origen del Material utilizado y de la identificación de las parcelas.	
Durante el desarrollo de los plantines en vivero	Detección de síntomas ocasionados por las plagas consideradas y de plantines fuera de tipo y control de las condiciones generales del cultivo.	
A la injertación	Control del origen de los materiales a injertar y de la identificación de las plantas o parcelas (según corresponda).	
Luego de 20 días de la injertación	Control de prendimiento de los injertos.	
A la reinjertación (si corresponde y sólo en Viveros de Certificación)	Control del origen de los materiales y de la reinjertación con materiales pertenecientes al mismo clon del injerto no prendido.	
Previo a la extracción de yemas (Bloques Fundación y de Incremento)	Detección de síntomas posiblemente ocasionados por las plagas consideradas y estimación de producción de material.	
A la extracción de yemas	Control de la calidad y del rotulado de los materiales producidos.	
Previo al arranque de plantas	Detección de síntomas ocasionados por las plagas consideradas y de plantas fuera de tipo y control de las condiciones generales del cultivo.	
Al arranque de las plantas	Control de la calidad y del rotulado de los materiales producidos.	
Cosecha de fruta	Detección de síntomas ocasionados por las plagas consideradas, estimación de producción de materiales, control de operativa asegurando identidad genética.	
Extracción de semillas	Control de la operativa asegurando la identidad genética de los lotes, envasado y rotulado.	

En todas las instancias de Inspección se realiza el control del cumplimiento de medidas de aislamiento tales como desinfección al ingreso al predio, desinfección al ingreso a los Bloques de Producción, existencia de herramientas de uso exclusivo, etc.

Esta publicación del PROCISUR, tiene un tiraje de 600 ejemplares y se terminó de imprimir en la ciudad de Montevideo, Uruguay, en el mes de mayo de 1999.

Diagramación y armado: Cristina Díaz

Impresión: Imprenta Boscana S.R.L.

Depósito Legal N° 314.424

**Programa Cooperativo para el
Desarrollo Tecnológico Agropecuario del
Cono Sur - PROCISUR**



**ARGENTINA - BOLIVIA - BRASIL
CHILE - PARAGUAY - URUGUAY**

IICA  **Instituto Interamericano de
Cooperación para la Agricultura**