

ANEXO

PROTOCOLO COMPLEMENTARIO DE INSCRIPCIÓN PARA CULTIVARES DE MAÍZ QUE DECLAREN BUENA RESPUESTA FRENTE AL “ACHAPARRAMIENTO DEL MAÍZ”

DEFINICIÓN

El Achaparramiento del Maíz o “corn stunt disease” se refiere al complejo de patógenos transmitidos por un insecto denominado *Dalbulus maidis*, conocido como “chicharrita del maíz”. Este vector transmite dos bacterias (mollicutes): espiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*, CSS o Corn Stunt Spiroplasma) y fitoplasma del maíz achaparrado (Maize Bushy Stunt Phytoplasma o MBSP) y dos virus: Virus del Rayado Fino (MRFV) y Virus del Mosaico Estriado del Maíz (Maize Striate Mosaic Virus – un geminivirus). Los patógenos pueden estar presentes, solos, o en un complejo. Para las evaluaciones del comportamiento al Achaparramiento del maíz no se considerará al geminivirus Maize Striate Mosaic Virus.

INSCRIPCIÓN PROVISORIA

Debido a la gran incidencia de esta enfermedad en la campaña 2023/24, al elevado nivel de daños observado, y la falta de cultivares adecuados, se permitirá la inscripción provisoria en el Registro Nacional de Cultivares de híbridos que demuestren buena respuesta frente al Achaparramiento del maíz, previo cumplimiento de los siguientes requisitos:

- Presentación del primer año de evaluación del cultivar inédito en ensayos fiscalizados en tres localidades de la misma Subregión Maicera, de acuerdo a los requisitos dispuestos en la Resolución 108/97 o la norma que en el futuro la reemplace.
- Presentación del primer año de evaluación del cultivar inédito en ensayos en donde se demuestre buena respuesta ante el Achaparramiento de Maíz según lo establecido en el apartado “Requisitos experimentales, metodología y criterios de evaluación” del presente protocolo.

Todo cultivar que NO DECLARE buena respuesta al Achaparramiento del maíz, sigue bajo los parámetros de la Resolución 108/97 o la norma que en el futuro la reemplace y no podrá acceder a la inscripción provisoria en el Registro Nacional de Cultivares.

Todo cultivar que DECLARE buena respuesta al Achaparramiento del maíz, debe cumplir con el apartado “Requisitos experimentales, metodología y criterios de evaluación” del presente Protocolo.

Las inscripciones provisorias serán admitidas exclusivamente durante el transcurso del año calendario 2025. La inscripción definitiva será concedida una vez que se haya presentado toda la información requerida conforme a lo estipulado en la mencionada Resolución 108/97 o la norma que en el futuro la reemplace, es decir, cumplimentar el segundo año de ensayo en tres localidades de la misma Subregión Maicera y con la presentación del segundo año de ensayo según lo establecido en el apartado “Requisitos experimentales, metodología y criterios de evaluación” del presente protocolo. Por lo tanto, la inscripción provisorias tendrá una duración de un año. En caso de no cumplir con lo mencionado se procederá a dar de baja la inscripción provisorias del cultivar en el Registro Nacional de Cultivares.

REQUISITOS EXPERIMENTALES, METODOLOGÍA Y CRITERIOS DE EVALUACIÓN

- Dos años de evaluación del comportamiento como mínimo en tres localidades dentro de la zona endémica. Esta se define como el área comprendida desde el paralelo 31° latitud sur hacia el norte, abarcando las provincias del NOA y NEA.
- Al momento de declarar los Ensayos Comparativos de Rendimiento (ECR), de acuerdo con lo dispuesto en la Resolución 108/97, la empresa debe presentar las localidades donde se está llevando a cabo la evaluación del complejo de enfermedades en la zona endémica. Esto incluye especificar la ubicación geográfica, la fecha de siembra, el número de plantas y los testigos empleados en el ensayo. Los ensayos en la zona endémica deben incluir dos repeticiones. Para una correcta evaluación del material inédito, se requiere la utilización de un testigo reconocido por su mala respuesta el cual deberá estar inscripto en el Registro Nacional de Cultivares. Se sugiere utilizar un cultivar de maíz blanco, pisingallo o dulce reportados por su mala respuesta frente a las enfermedades del complejo (Gimenez Pecci, comunicación personal).
- Como requisito mínimo, el diseño experimental debe ser en Diseño Bloques Completos Aleatorizados (DBCA). Se recomienda utilizar 4 surcos y evaluar los dos centrales. El número de plantas por surco debe ajustarse de forma que por repetición se puedan evaluar 50 plantas consecutivas.
- Seguir las prácticas agronómicas normales empleadas en los ensayos de maíz y realizar el ensayo en fechas de siembra tardías a partir de diciembre.
- La realización de los ensayos en la zona endémica implica completar dos escalas de evaluación: una para los síntomas foliares del Achaparramiento causado por *Spiroplasma kunkelii* / Maize Bushy Stunt Phytoplasma (MBSP), y el virus del Maíz Rayado Fino (MRFV)

(**escala 1**), y otra para estimar las pérdidas de rendimiento por espiga (**escala 2**).

- Para completar las escalas, es necesario realizar el relevamiento de 100 plantas en tres momentos específicos del ciclo del maíz: VT (panojamiento), R4 (grano pastoso) y R6 (madurez fisiológica). Se exigirá la presentación de la escala 1 en los 3 momentos de evaluación.
- Además, se debe categorizar el nivel de daño en las espigas de estas mismas 100 plantas según la **escala 2**.

Asimismo, se exigirá la presentación de certificados de laboratorio para determinar la presencia o ausencia de los tres patógenos en al menos 10 plantas del inédito y 10 plantas del testigo de mala respuesta (análisis en planta individual). En relación a la detección de los patógenos se propone que se realice mediante un test de PCR cualitativa y/o ELISA. Los solicitantes deberán presentar certificados de análisis emitidos por un laboratorio que se encuentre habilitado por el INASE, el SENASA o estar acreditados bajo la norma ISO 17025, para ese alcance metodológico (PCR cualitativa y/o ELISA según corresponda, en el área vegetal). En todos los casos deberán presentar información de respaldo de la habilitación o acreditación que tengan.

En el caso de la PCR cualitativa el marcador a utilizar quedará a consideración del solicitante presentando evidencia científica que avale la capacidad del mismo para detectar el patógeno que se declare. En el caso de ELISA se deberá utilizar un sistema de detección que tenga un aval científico y/o comercial (kit comercial).

Los informes (uno para el inédito y otro para el testigo de mala respuesta) deberán contener fecha, identificación de la muestra, laboratorio que realizó el análisis, solicitante, firma del director técnico, resultado de las muestras y de los testigos positivos y negativos utilizados, así como sensibilidad y especificidad del método empleado.

Interpretación de resultados

Dado que el objetivo de los mencionados métodos es determinar la presencia o ausencia de los patógenos, se propone que el umbral de corte (cut off) para considerar “detectado” por la metodología ELISA, se calcule como el promedio de los valores de absorbancia de los controles sanos más tres veces la desviación estándar. Para el caso de PCR se considerará como “detectado” al resultado positivo de la misma. En todos los casos los controles positivos y negativos deberán resultar según lo esperado.

Clasificación de la respuesta del cultivar

Se define como “buena respuesta” del cultivar inédito, cuando el mismo presenta un grado de severidad 2 o inferior en la escala 1 y de 1 o inferior en la escala 2 para una temperatura promedio registrada durante el ciclo del cultivo en cada una de las localidades evaluadas. La respuesta quedará limitada a los patógenos detectados en los análisis de laboratorio.

Para acceder a la inscripción provisional, debe comprobarse la presencia de al menos uno de los tres patógenos en las tres localidades dentro de la zona endémica.

Pasos para tomar muestras de hojas para el análisis de la presencia de patógenos de acuerdo con Giménez Pecci et al., 2009

- *Momento de muestreo:* realizar el muestreo en el estadio de desarrollo de la planta en R4, cuando los síntomas foliares sean más intensos y claramente visibles.
- *Selección de la hoja:* elegir una hoja sintomática y metabólicamente activa del tercio superior de la planta. Esta parte de la planta suele mostrar los síntomas de la enfermedad de manera más prominente.
- *Toma de la muestra:* cortar la parte basal de la hoja seleccionada tomando parte de la unión con la vaina foliar, dado que allí la concentración de patógenos es más elevada.
- *Almacenamiento de la muestra:* colocar la muestra en una bolsa plástica etiquetada adecuadamente para identificarla correctamente. Es importante mantener la muestra refrigerada durante el transporte al laboratorio a una temperatura de 4°C. Para ello puede colocarse en una conservadora junto con hielo o conservantes, separándolos de las muestras con un cartón para evitar que queme el tejido foliar.
- *Envío al laboratorio:* enviar las muestras lo antes posible para su análisis.

Escala 1 para evaluación por síntomas foliares

Achaparramiento por Espiroplasma (bacteria- *Spiroplasma kunkelii*) y rayado fino (virus-*Maize rayado fino virus* – MRFV)

Momento: VT-R4-R6

Incidencia: Dos repeticiones, 100 plantas (Oliveira et al., 2003 modificada)

Severidad:

Grados	Síntomas espiroplasma/fitoplasma	+ Síntomas rayado fino
0	Sin síntomas	
1	Amarillamiento generalizado, principalmente en las hojas superiores	
2	Borde foliar enrojecido/ necrótico ^a	Punteado clorótico a lo largo de nervaduras
3	Veteado rojo-amarillo-verde desde el borde foliar ^a	Leve rayado fino a lo largo de nervaduras
4 ^c	Estrías amarillas <u>irregulares</u> típicas ^b , altura de planta 10-15% menor	Rayado fino a lo largo de nervaduras
5 ^c	Multiespigas / macollos / filodia, Altura de planta menor 30% (<i>identificar al menos 2 de estos síntomas en cada planta</i>).	Falta de granos Disminución altura de planta mayor 30%
6 ^c	Entrega/ muerte prematura	

Barontini et al., 2021; Oleszczuk et al, 2020

NOTAS/ACLARACIONES

a	Al menos en 2 hojas de la planta.
b	Las estrías cloróticas (blanquecinas/amarillentas) <u>irregulares</u> que nacen <u>en la base</u> de la lámina son el único síntoma que indica con certeza la presencia del espiroplasma.
c	No unificar 4, 5 y 6 porque los rindes serán distintos.

En general, pero no siempre, la severidad de los síntomas se corresponde con igual grado de pérdida de rendimiento.

BARONTINI JM, PEÑA MALAVERA A, FERRER M, TORRICO AK, MAURINO MF, MP GIMENEZ PECCI. 2021. "*Spiroplasma kunkelii* infection in temperate and tropical x temperate maize in Argentina and development of a severity rating tool to evaluate germplasm susceptibility". **European Journal of Plant Pathology** DOI: 10.1007/s10658-021-02415-4-Handle<http://hdl.handle.net/20.500.12123/10842>.

OLESZCZUK JD; CATALANO MI; DALAISÓN L; DI RIENZO J; GIMÉNEZ PECCI MP; PD CARPANE. 2020. Characterization of components of resistance to corn stunt disease. **PLOS ONE** [PONE-D-20-15874] 15(10): e0234454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234454>

OLIVEIRA, E., R. O. RESENDE, GIMÉNEZ PECCI, M. P., I. G. LAGUNA, P. HERRERA, I. CRUZ. 2003. Incidencia de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por mollicutes em milho no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, EMBRAPA, Brasília (ISSN 0100-204X) V38, n 1, p 19-25, jan.

María de la Paz Giménez Pecci

Ing. Agr., Dr.

Profesional Asociado INTA IPAVE CIAP

Grado 2

**Veteado rojo-
amarillo-verde
desde el borde
foliar**

**Punteado
clorótico a lo
largo de
nervadura**



Grado 3

**Veteado rojo-
amarillo-verde desde
el borde foliar**

**Leve rayado
fino a lo largo
de nervaduras**



Grado 4

Estrías amarillas irregulares típicas.
Altura 10-15% menor



Grado 4

Rayado fino



Grado 5 (2 o + sintomas/planta)

Multiespigas



Macollos



Falta de granos



Grado 5
(2 o +
síntomas/planta)

h menor 30%

filodia



Grado 6

Entrega y muerte
prematura



German Schlie INTA
Rafaela

María de la Paz Giménez Pecci

Ing. Agr., Dr.

Profesional Asociado INTA IPAVE CIAP

Escala 2 para la estimación de pérdidas de rendimiento por espiga

Daño		Merma de producción de espiga *
Sin daño	0	0-5%
Bajo	1	6-20 %
Medio	2	21-60 %
Alto	3	61-100 %

Ponso, A. (modificado). Tesis de Maestría. Generación y validación de una escala para la estimación de pérdidas de rendimiento por híbrido, causada por el complejo del achaparramiento del maíz.

Tabla de Daño en Espiga:

Daño en espiga (wi)	Cantidad de espigas por Daño cada 100 (xi)
Sin Daño	0 0
Daño Bajo	1 0
Daño Medio	2 0
Daño Alto	3 0
	6 SUMA PRODUCTO
	$=(\text{suma producto}/6)*2$

Suma producto de la cantidad de espigas por nivel de daño

Porcentaje de pérdida de rinde de espiga.

$$\text{SUMAPRODUCTO} = (0 \times 0 + 0 \times 1 + 0 \times 2 + 0 \times 3)$$

En esta tabla, se registra la cantidad de espigas por nivel de daño cada 100 espigas examinadas. Los niveles de daño se dividen en cuatro categorías: Sin Daño, Daño Bajo, Daño Medio y Daño Alto.

Para la clasificación, se compara la espiga principal de las plantas previamente clasificadas en la **escala 1** con lo declarado para la misma en el descriptor del cultivar respecto a su longitud, diámetro en el centro y número de hileras.

Si una espiga cumple con lo declarado para la misma en el descriptor del cultivar y/o difiere hasta un 5%, se considerará como 0 (cero).

Se utiliza el peso de las espigas clasificadas como 0 (cero) como referencia para evaluar las categorías de daño en espiga. Tener en cuenta el porcentaje de humedad de los granos para que los pesos sean comparables.

Clasificación de Espigas:

Clasificación 1: Las espigas que difieren entre un 5% y un 20% de las espigas clasificadas como 0 (cero).

Clasificación 2: Las espigas que difieren entre un 21% y un 60% de las espigas clasificadas como 0 (cero).

Clasificación 3: Las espigas que difieren entre un 61% y un 100% de las espigas clasificadas como 0 (cero).

Para calcular la suma del producto de la cantidad de espigas por nivel de daño, primero se multiplica la cantidad de espigas en cada nivel de daño (x_i) por su respectivo nivel de daño (0, 1, 2, 3) (w_i), y luego se suman estos productos. Una vez que se tiene la suma del producto, se la divide por 6, que es la sumatoria de los niveles de daño en espiga, para obtener una media ponderada del daño por espiga (\bar{x}).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i * w_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Cálculo del Porcentaje de Pérdida de Rinde de Espiga:

El cálculo del porcentaje de pérdida de rendimiento de la espiga implica la multiplicación de la media ponderada obtenida (\bar{x}) por 2. Esto se realiza para expresar el daño en términos de un porcentaje que represente la reducción en el rendimiento de la espiga.

Para obtener una estimación de la pérdida de rendimiento en kilogramos por hectárea debido al daño en las espigas, se puede realizar el siguiente cálculo: multiplicar el rendimiento esperado en kg/ha por el porcentaje de pérdida de rendimiento en espiga y dividirlo por 100:

$$\text{Pérdida de rendimiento estimada (kg/ha)} = \frac{R \times P}{100}$$

Donde:

R es el rendimiento esperado por hectárea (en kg/ha).

P es el porcentaje de pérdida de rendimiento en espiga (expresado como un valor entre 0 y 100)

Bibliografía

De Rossi, R. L., Guerra, F. A., Lábaque, M. J., Plazas, M. C., & Guerra, G. D. (2024). Propuestas para la evaluación y estimación de la disminución de rendimiento causada por el Complejo del Achaparramiento del maíz. *Notas de Sanidad Vegetal*, (3).

Giménez Pecci, M. P., Carpane, P., Carloni, E., Nome, C. F., Fiorona, M., & Laguna, I. G. (2009). Técnicas empleadas en la identificación y caracterización de *Spiroplasma kunkelii* Withcomb (Reino Eubacteria, Clase Mollicutes). In I.G. Laguna, V. Conci, P. Rodriguez Pardina, G. Truol, M.Fiorona, & L. Di Feo (Eds.), *Procedimientos empleados en la identificación de organismos fitopatógenos (pp.53–65)*. Ediciones INTA.

Documento preparado por el Comité de Cereales Estivales (asesor de la CONASE) y la Dirección de Registro de Variedades (INASE), haciendo una mención especial a la Dra. María de la Paz Giménez Pecci, a la Ing. Agr. Macarena Casuso, y al Ing. Agr. M Sc Marcelo Carmona por su invaluable colaboración.



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: Anexo EX -2024-59715148- -APN-DRV#INASE

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 15 pagina/s.