

Guía de estudio dirigido y autoevaluación: Unidad 1

- 1) ¿Cuál es la importancia del desarrollo de medios de cultivo sólidos (con agar), que realizó Koch?
- 2) La pasteurización es un método de esterilización? Explique su respuesta y brinde un ejemplo de su uso actual
- 3) Mencione al menos 10 medidas de bioseguridad propias de los laboratorios tipo 1.
- 4) ¿Cuál es la herramienta de contención primaria fundamental para laboratorios de bioseguridad tipo 1? Describa como se usa, y los cuidados a considerar.
- 5) Como se denomina la unidad de medida utilizada para caracterizar a las bacterias? ¿Qué relación existe entre esa unidad de medida y el milímetro?
- 6) Como se denomina la unidad de medida utilizada para caracterizar a un virión? ¿Qué relación existe entre esa unidad de medida y el milímetro?

- 7) Ud. cuenta con un Manual de bioseguridad para aplicar en granjas, editado por el INTA. Léalo, y mencione al menos 10 observaciones que recuerde haber visto en visitas a chacras, y que vayan en sentido opuesto a lo planteado en el mencionado manual

- 8) Ud. cuenta con un artículo escrito como primer autor por Di Feo, sobre el mal de rio cuarto, un problema de origen viral que afecta a diferentes hospedadores. Lea el artículo, y realice un gráfico de la cadena epidemiológica del mal de rio cuarto, indicando reservorio, vector, hospedador susceptible, vía de transmisión, puerta de salida, puerta de entrada. Para ello, puede basarse en los ejemplos de cadenas epidemiológicas que se muestran en el PDF de la clase de bioseguridad, así como en el apunte de cátedra. Una vez que haya realizado el grafico de la cadena epidemiológica, piense y escriba como le parece más sensato cortar el ciclo de la enfermedad. ¿Le sirvió graficar la cadena epidemiológica previamente para concluir como cortar el ciclo?

- 9) En función del artículo de reflexión sobre el rol del ingeniero agrónomo en la bioseguridad de explotaciones ganaderas, del autor Jesus Ciria Ciria: mencione 5 a 10 acciones del ejercicio profesional del ingeniero agrónomo, que hacen la diferencia entre implementar o no implementar medidas/actitudes/criterios de bioseguridad en granjas de explotación ganadera. Piense y redacte 10 puntos de bioseguridad para implementar en una chacra de producción de hortalizas.

Manual de Normas Básicas de Bioseguridad de una Granja Avícola

Autor: Vet. Francisco J. Federico



**Instituto Nacional
de Tecnología Agropecuaria**

Agradecimientos: Se agradece la colaboración desinteresada del Dr. Héctor Arbiza, del Dr. Leonardo Leiva, de la Lic. Corina Bernigaud y del Dr. Dante Bueno en la confección de este manual.

INDICE

Introducción	4
Plan de bioseguridad	5
1. Ubicación del galpón de producción	5
2. Diseño del galpón de producción	8
3. Personal y vehículos	10
4. Aves	14
5. Control Integral de Plagas	15
6. Programa de limpieza, desinfección y descanso	18
7. Alimentos y agua de bebida	20
8. Animales dentro de la granja	21
9. Plan sanitario.....	23
10. Uso y manejo de maples internos dentro de la granja	24
11. Tratamiento de cama y guano para traslado	25
12. Eliminación de aves muertas dentro de la granja	27
13. Registros	36

Introducción

El presente manual está destinado a granjeros y productores avícolas de Argentina con la finalidad de brindarle las normas básicas de bioseguridad que debe implementar a fin de impedir la entrada de agentes causantes de enfermedad en la granja. De esta manera, se logrará que las aves se encuentren saludables desde el principio al fin de la crianza.

La bioseguridad incluye todas las medidas de manejo llevadas a cabo para reducir el riesgo de que sus aves se enfermen, evitando de esta manera que se perjudique el rendimiento de las mismas. También debe comprender que la bioseguridad depende de las acciones que realiza cotidianamente en la granja..

Todas las personas que ingresan a la granja deben conocer las medidas de bioseguridad implementadas en todas las partes de la misma. El desconocimiento de éstas por parte de una sola persona puede llevar al fracaso del plan de bioseguridad y por consiguiente a la entrada de agentes patógenos y desarrollo de enfermedad en la granja. Es de destacar que cuanto más medidas se tomen, menores serán los costos de producción, ya que se invertirá menos en los tratamientos de las aves.

Existe un amplio abanico de enfermedades causadas por bacterias, virus y hongos que pueden ingresar a su granja, ya que al poseer animales vivos se encuentra expuesta a la entrada de cualquier enfermedad. Se espera lograr, con lo transmitido mediante este manual, minimizar el ingreso de estos agentes a su granja, disminuyendo de esta manera los costos de producción y lograr mayores rendimientos y ganancias. Así también, se podrán obtener productos (huevo y carne) de calidad óptima demandados por el mercado.

Plan de bioseguridad

1. Ubicación del galpón de producción

Preferentemente, cada galpón de su granja debe ubicarse en zonas altas, no anegadizas y alejadas de otras granjas de crianza. La distancia mínima a tener en cuenta de otras granjas de producción es de 1.000 metros, mientras que se debe establecer a 5.000 metros de granjas de reproducción de padres y 10.000 metros de granjas de reproducción de abuelas (Res. SENASA 542/2010).

Para el caso de Entre Ríos, existe una legislación que establece que las granjas avícolas deben estar ubicadas a una distancia mínima de 2.000 metros de las granjas porcinas cuando al menos una de ellas sea granja de multiplicación genética (reproductores padres y/o abuelos). Por otro lado, no se pueden establecer granjas porcinas y avícolas a menos de 1.000 metros cuando ambas son de carácter comercial (Resolución N° 5485/2005 S.P.G.).

Es una buena práctica colocar barreras naturales (barreras fitosanitarias), como árboles (Figura 1), alrededor de la granja. Esta barrera impide el ingreso de agentes provenientes por el aire, evitando el contagio de enfermedades procedentes de granjas vecinas.



Figura 1: Barrera fitosanitaria. Galpones de producción rodeados de árboles. (Fotografía gentileza Dr. Héctor Arbiza)

Además, es importante que existan carteles previos al ingreso al predio (Figuras 2 a y 2b), que indiquen la detención de aquellas personas ajenas al establecimiento que quieran acceder al mismo. Siempre que alguna persona desee ingresar al establecimiento debe ser habilitado por la persona responsable del mismo. También deben existir carteles identificatorios de la granja con su número del Registro Nacional Sanitario de Productores Agropecuarios (RENSPA) y con la habilitación de SENASA.



Figura 2 (a y b): Carteles de detención de ingreso en la entrada a un establecimiento.

Los caminos internos de la granja deben ser transitables y deben estar distribuidos de manera de acceder fácilmente a los galpones. Es una práctica importante colocar barreras en los caminos de accesos a los galpones, dentro del interior del predio, a fin de evitar la entrada a los mismos de personas ajenas al establecimiento (foto?).

2. Diseño de granja de producción

Los galpones de la granja se deben encontrar aislados del exterior por un vallado o cerco perimetral, el cual se debe situar a una distancia mínima de 20 metros de los galpones (Res. SENASA 542/2010) (Figura 4). A su vez, se debe contar con un acceso que permita el control de entradas y salidas de todo el personal de la granja y visitas, como así también la desinfección de todo vehículo que tengan que entrar y salir de ella. Este cerco debe separar bien todo el establecimiento del exterior, así como cubrir perfectamente el espacio entre el suelo y el borde inferior del mismo con el objetivo de que no ingresen animales a la granja.



Figura 4: Cerco perimetral de alambrado olímpico (Fotografía gentileza Dr. Héctor Arbiza).

Los galpones dentro de la granja deben ser de fácil acceso. Tenga en cuenta que hacia ellos deben llegar los camiones con pollitos al momento de recepción, como así también deben salir las aves al momento de enviarlas a faena.

Las puertas de los galpones se deben presentar en perfecto estado y estar siempre cerradas. El diseño del galpón debe permitir comodidad para los trabajos que se llevan a cabo.

-Instalaciones Fijas.

Tenga en cuenta que todas las instalaciones fijas del galpón (paredes, pisos, postes, etc) deben ser de fácil limpieza y desinfección.

Los laterales de los galpones de la granja deben contar con una malla antipájaros en su exterior. A su vez se debe prestar especial atención a la integridad de la misma a fin de evitar el ingreso de pájaros al interior del galpón.

Los establecimientos deberán contar con un espacio reservado, previo a la entrada, para que los visitantes procedan a colocarse obligatoriamente la ropa y la protección necesaria para el ingreso (botas, overol y cofia). No se deben almacenar en los galpones material no necesario o ser depósito de utensilios que ya no se utilicen en la explotación, pero que se almacenan por si alguna vez se vuelven a utilizar.

El establecimiento debe contar con un recinto separado del resto de las instalaciones para el almacenamiento de fármacos, productos de limpieza y desinfección, y drogas para el control integrado de plagas. Estos productos deben ser debidamente etiquetados y almacenados bajo las condiciones que ellos requieren.

-Instalaciones móviles:

Todas aquellas instalaciones que se puedan retirar del galpón de crianza se denominan móviles, como ser comederos, sistemas de calefacción removibles, ventiladores, etc. Las mismas deben ser de fácil limpieza y desinfección, de esta manera se pueden retirar del galpón para poder realizar estas acciones, dejando libre el interior del galpón para poder realizar la correcta limpieza y desinfección del mismo.

3. Personal y vehículos

Es necesario controlar de forma muy rigurosa el acceso de las personas a la granja, prohibiendo el acceso a los galpones de la granja a toda persona ajena a la actividad que se realiza. Sólo aquellas personas que tengan vinculación directa con la producción (veterinarios, supervisores de granja, vacunadores y cargadores) pueden acceder al interior de los galpones, tomando previamente todos los recaudos necesarios en medidas de bioseguridad. Tenga en cuenta que toda persona que ingrese a su granja puede traer consigo agentes productores de enfermedad en su ropa y/o calzado lo que puede provocar la consiguiente enfermedad de sus aves.

La persona que ingresa al galpón de crianza debe contar con ropa acorde al trabajo que va a realizar en su interior. Dicha ropa de trabajo debe ser exclusiva, debiendo permanecer la indumentaria en el galpón cuando se finaliza las tareas. Para ello es necesario que exista un espacio reservado para tal fin. En lo que respecta a desinfección de calzado es de utilidad el uso de botas de plástico encima del calzado particular (Figura 5), o bien el uso de pediluvios a la entrada de las granjas que contenga una solución desinfectante, que no se altere por las altas temperaturas y los rayos solares y que sean renovadas periódicamente.



Figura 5: Bolsas de plástico cobertoras de calzado.

Es fundamental que toda persona que trabaje en la granja realice frecuentemente el lavado y desinfectado de sus manos durante las labores que realiza. Esta tarea la debe realizar antes, durante (siempre que crea necesario), cada vez que se quiera ingresar a un galpón (sea cualquiera el de su granja) y luego de realizar las labores diarias en el galpón.

Es recomendable que todas las visitas se registren, identificando al visitante y el motivo de la visita. Se debe incluir y hacer hincapié en la información de la última visita del visitante a una granja de producción. Si se conoce que el visitante previamente visitó una granja con síntomas de enfermedad infectocontagiosa se le debe prohibir la entrada al establecimiento. Este visitante podrá ingresar al establecimiento, luego de transcurridas 72 horas, siempre y cuando tome los recaudos de vestimenta e higiene personal.

Los vehículos se deben limpiar y desinfectar rigurosamente en el acceso al establecimiento, constituyendo un paso obligado para realizar esta acción. La limpieza y desinfección puede realizarse de dos formas, manual o automática. Para la primera se debe contar con una bomba de agua que presente una adecuada presión de agua, tanque y manguera en perfectas condiciones para que ambas acciones sean efectivas (Figura 6). Se debe realizar el lavado manual del vehículo, utilizando mucha agua, y cepillar rigurosamente las cubiertas, interior de guardabarros y las partes inferiores del mismo. Para la segunda, se debe contar con un arco de desinfección, el cual puede poseer un sistema automático de detección de vehículos o no (Figura 7). El mismo consta de un equipo de dosificación de desinfectante el cual es propulsado por una bomba hacia los sprays que se dirigen hacia los laterales y la parte inferior del vehículo para garantizar un correcto lavado y desinfección del vehículo.



Figura 6: Manguera y tanque de desinfección para vehículos.



Figura 7: Arco de desinfección de vehículos.

Solamente deben ser autorizados a ingresar al establecimiento aquellos vehículos de personal que realicen tareas propias de la producción de la granja. Preferentemente la carga de gas debe ser realizada desde el exterior de las instalaciones. Para lo cual, es necesario que la

“chancha de gas” se encuentre en cercanías de la puerta de acceso del galpón. Con esta acción se evitará la entrada de este vehículo que podría acarrear microorganismos desde granjas vecinas.

Todas las acciones de lavado y desinfección deben repetirse a las salidas de los vehículos, aunque también corresponde realizar este doble lavado y desinfección aunque la granja no cuente en ese momento con problemas sanitarios visibles. Esta es una recomendación que nos conduce a que todo vehículo que ingrese al establecimiento debe a la salida repetir la desinfección.

4. Aves

Las aves de su producción deben proceder de una planta de incubación inscrita según la legislación vigente. A su vez, se debe garantizar que las aves posean un plan de vacunación acorde. Este plan debe incluir la prevención de contraer enfermedades que puedan existir en la región en la cual se encuentra su establecimiento. Solicite a la empresa que le suministra las aves el plan de vacunación que será tenido en cuenta en la crianza de sus aves y las vacunas que le fueron aplicadas previas a la entrada a la granja. Toda esta información debe figurar en los remitos y facturas para demostrar la trazabilidad. Además deben quedar señalados en el formulario “Registro del Criador Avícola para Pollos de engorde” (Res. SENASA 542/2010).

Sus aves de producción deben poseer una única edad, debiendo instalarse dentro de su establecimiento el sistema “todo dentro-todo fuera”, el cual consiste en que las aves deben ingresar todas juntas (única edad) y retirarse las mismas en conjunto del establecimiento una vez finalizada la producción.

No deben coexistir las aves de producción con otro tipo de aves en el predio, ya que aves como gansos, patos, pavos, avestruces u otras en cercanías a la granja sirven como reservorios de agentes causantes de enfermedad y, por lo tanto, las pueden transmitir a las de producción (pollo o gallina). A su vez se debe evitar el ingreso de aves silvestres a los galpones, controlando la integridad de la malla antipájaros.

Una vez finalizada la crianza, las aves deben ser trasladadas hacia la planta de sacrificio con el documento de transporte de animales correspondiente. Por otro lado, las aves reproductoras adultas que han completado un ciclo de postura y las gallinas de postura de huevos comerciales que finalizaron su primer ciclo productivo, no pueden ser trasladadas a otros establecimientos avícolas para realizar la “muda forzada o replume” con el fin de iniciar un segundo ciclo productivo (Disposición SENASA 3/2013).

5. Control Integral de Plagas

Los insectos y los roedores son reservorios y transmisores de enfermedades infecciosas de importancia en sus galpones. Por lo tanto, es necesario realizar un control sistemático de todos ellos. Es sumamente importante que el establecimiento posea un protocolo escrito de desinsectación, control de moscas, cascarudos y roedores supervisado por el veterinario actuante. Tenga en cuenta que el momento ideal para hacer el control de plagas es el momento de descanso o vacío sanitario de su granja.

Dentro de los insectos y coleópteros más importantes se encuentran la mosca doméstica y el escarabajo negro *Alphitobius diaperinus*, este último más conocido como cascarudo o bicho negro. Por otro lado, existen una amplia variedad de especies de ratas y ratones que se pueden encontrar en el interior de las granjas, ya que en ella disponen de alimento, agua de bebida y un lugar para realizar sus nidos.

Hay que considerar que las moscas pueden volar de una explotación a otra o bien ser trasladadas por vehículos, lo que conlleva a aumentar las posibilidades de transmisión de enfermedades infecciosas. Aquí se debe tener en cuenta que los roedores se desplazan también fácilmente de una granja a otra vecina.



Figura 8: Cuevas de ratas en el lateral de un galpón (Fotografía gentileza Dr. Héctor Arbiza).

Para controlar las moscas se debe realizar un control integrado de las mismas, donde se utilicen productos químicos contra estadios de crecimiento como larva y adulto, como así también ejercer un control físico y/o biológico sobre su crecimiento.

Son prácticas sugeridas eliminar periódicamente el guano o materia fecal de las aves, evitar la pérdida de agua de los nipples o bebederos que conlleve a un aumento de la humedad del guano, disminuir lo máximo posible la pérdida de alimento de los comederos, poniéndolos a la altura apropiada (lomo del ave en pollos parrilleros), impidiendo de esta manera desperdicios que sirvan de punto de desarrollo de las larvas. Además, se justifica ventilar el galpón lo máximo posible, siempre que las condiciones ambientales y la rendimiento de las aves lo permitan.

El control biológico de moscas se puede realizar con la ayuda de otros insectos que desarrollan en el guano o gracias al crecimiento de algunos insectos que parasitan los huevos de las moscas.

Los roedores son una fuente de contaminación y, a su vez, de un gran consumo de alimento de las aves. Se deben llevar a cabo acciones permanentes contra la entrada de roedores a la granja, impidiendo su ingreso, anidación y/o reducción de la población existente en el establecimiento. Para ello, es necesario establecer un programa de desratización que se basará, básicamente, en colocar cebos en puntos estratégicos (cuevas, laterales del galpón, techos), evitando de esta forma que los roedores ingresen y proliferen en las instalaciones. Toda persona que participe de este programa debe tomar las medidas adecuadas para su protección individual, contando con guantes para el manipuleo de drogas y ropa adecuada de trabajo.

Una higiene adecuada de su granja y un ordenamiento de ciertos objetos (rollos vegetales, pilas de ladrillo, leña, restos de madera y o materiales de construcción) pueden disminuir la presencia de roedores y la realización de cuevas por parte de ellos (Figura 8). Estos materiales deben quedar fuera de la granja. Por otro lado, se debe mantener el césped corto a los costados del galpón; controlar rutinariamente las cajas de electricidad y disponer de cestos de basura con tapas bien cerradas. Cuando no se cumple con las prácticas recomendadas anteriormente los roedores pueden convertirse por su número y presencia en PLAGAS.

Todos los productos que se utilicen deben estar autorizados por la autoridad competente y se deben respetar las normas de utilización de cada uno de ellos. Estos productos deben ser almacenados en lugares destinados para tal fin y completamente cerrados, evitando

contaminación alguna del agua de bebida o del alimento que ponga en peligro la salud de las aves (Res. SENASA 542/2010).

6. Programa de limpieza, desinfección y descanso

“¡¡¡La limpieza y el orden contribuyen a la bioseguridad!!!”

Se debe realizar obligatoriamente entre crianza y crianza un descanso de la producción (vacío sanitario), desocupando los galpones de animales por al menos diez días, y cuanto mayor sea este período de descanso reducimos los riesgos. También se deberá realizar un descanso anual que contemple el vaciamiento total del galpón con limpieza y desinfección de todas las instalaciones y cambio de cama. Para estos descansos es necesario que se cumpla la práctica de crianza “todo adentro – todo afuera”, mencionada con anterioridad (Res. SENASA 106/2013).

Es necesario un lavado y una limpieza exhaustiva con agua y detergente de todas las instalaciones (fijas y móviles), ya que los desinfectantes deben contactar con los materiales en ausencia de materia orgánica (materia fecal, alimento, exudados y/o mucosidades de las aves).

Previo al retiro de la cama, se procederá al compostaje (autocalentamiento) de la misma (ver ítem 11 del presente manual). Durante el autocalentamiento de la cama es conveniente realizar una desinsectación del galpón, utilizando productos para insectos adultos que eviten que estos suban hacia el techo. Posteriormente, se debe retirar la cama tratada. Luego se deben desmontar y retirar todo los elementos que lo permitan, como comederos, bebederos, ventiladores y sistemas de calefacción removibles para su posterior limpieza y desinfección fuera del galpón y en lo posible bajo los rayos solares.

En el interior del galpón, se debe realizar un barrido exhaustivo del mismo para eliminar todo tipo de suciedad. Además, se debe detectar y retirar las telas de arañas que se encuentren en el galpón, las cuales son foco de mantenimiento de suciedades. Se debe repasa con un paño húmedo aquellas partes fijas como cortinas, conductos de cables, cajas de electricidad, sensores, etc. Luego de esto, se lava el interior con agua con detergente a presión, si es caliente mejor, y luego se procede a enjuagar para eliminar todo resto de materia orgánica que pudiese haber quedado. Culminado esto, se procede a desinfectar el galpón por pulverización o nebulización.

Para la desinfección del galpón, se debe tener siempre presente el utilizar indumentaria adecuada para no exponer la piel a los productos desinfectantes. Usted es responsable sobre su salud y debe exigir o tener el material adecuado para realizar la desinfección, como ser ropa de

material no absorbente (tela plástica) que recubra la totalidad del cuerpo, guantes, botas y máscaras que impidan la inhalación de los productos utilizados. Para la desinfección, debe cerrar absolutamente todo el galpón y pulverizar manualmente (con mochila de fumigación) o prender pastillas o velas fumígenas que le permiten desinfectar los galpones, abandonando en este caso el interior de los mismos.

Es de suma importancia que se rote la utilización de los desinfectantes con diferentes grupos químicos, ya que de esta manera no se crea resistencia y se obtienen resultados adecuados en estas maniobras. En el mercado existen desinfectantes comerciales con presencia de varias drogas o principios activos, lo que hacen a este tipo de productos más eficaces. Los desinfectantes más utilizados son aquellos a base de cloro y derivados, aldehídos, fenoles y compuestos oxidantes (como el peróxido de hidrógeno). Consulte con su veterinario que producto comercial utilizar en cada caso en particular. El uso y la aplicación deben ser los indicados por el profesional actuante inscripto en el registro.

Posterior a dicha limpieza y desinfección rigurosa del galpón se deben desinfectar todos los implementos que se utilicen en la producción, para lo cual es necesario sumergirlos en la solución desinfectante, dejando actuar el producto por el tiempo estipulado en la rotulación del mismo. Es sumamente necesario que preste atención en la preparación de la solución desinfectante, respetando la dosis que debe tener la misma al momento de utilizarla.

Una vez que el galpón y los implementos se encuentren limpios y desinfectados se ingresa al galpón, se coloca cama nueva en el interior del mismo y se ubican todos los implementos para recibir los pollitos. Existen una amplia gama de desinfectantes que pueden ser utilizados para tal fin, por lo cual es conveniente que su veterinario le indique el más apropiado para la integración.

“La desinfección no es un trabajo mal retribuido, es un aumento final en sus ganancias”.

7. Alimentos y agua de bebida

El alimento que usted utilice en la granja para alimentar sus aves debe provenir de una fábrica de alimentos balanceados aprobada por SENASA para la elaboración del mismo.

El mismo debe llegar en buenas condiciones, no debiendo encontrarse húmedo, apelmazado ni con olores fuertes a la llegada. El día de llegada del alimento a su granja se debe llenar el registro de alimento con los datos que se indiquen.

Es su responsabilidad mantener el alimento en perfecto estado, para lo cual debe realizar la limpieza y desinfección del o los silos al momento de realizar el vacío sanitario de la granja. Además, se deberán controlar los silos de almacenamiento de alimento con el objetivo de evitar fisuras o rajaduras en los mismos que produzcan deterioro del alimento en ellos almacenados.

Si almacena alimento en bolsas debe mantenerlas alejadas de las paredes y nunca apoyadas directamente sobre el piso, siendo bueno para tal fin tarimas de fácil limpieza y desinfección.

El agua de bebida de sus aves puede ser transmisor de agentes productores de enfermedades (bacterianas, parasitarias y/o víricas). La contaminación de la misma puede ser en el origen (pozo), durante el almacenamiento (tanque) o en el bebedero de la granja (más en bebederos de campana que en nipples).

Se exige, y es sumamente necesario, realizar un análisis físico-químico y microbiológico del agua de bebida al menos una vez por año (SENASA), a fin de garantizar la inocuidad de la misma. Los tanques de depósito deben permanecer tapados para evitar que caiga cualquier material dentro de ellos, a su vez que deben limpiarse y desinfectarse entre crianza, al igual que filtros y bebederos.

Para la limpieza de tanques, cañerías y nipples, y garantizar la potabilidad del agua, es recomendable el uso de limpiadores desincrustantes y descontaminantes (peróxido de hidrógeno) Estos productos deben permanecer en la línea de agua por el término de 4 a 6 horas para lograr una limpieza completa de las líneas de agua. Esta acción debe realizarse entre crianzas y en la limpieza y desinfección total anual que se describe en el ítem 6 de este manual.

8. Animales dentro de la granja

Queda totalmente prohibida la crianza de otros animales dentro del predio de la granja (Figuras 9 a y b). Estos animales podrían actuar como reservorios de enfermedades o bien transmitir enfermedades directamente a las aves de producción.

Además, las mascotas que posea no deben tener acceso a los galpones de producción, ya que podrían no solo transmitir enfermedades entre los diferentes galpones, sino que también podrían transmitir enfermedades en granjas vecinas a su producción.



Figura 9a: Animales en cercanías de galpón de producción (Fotografía gentileza Dr. Dante Bueno).



Figura 9b: Animales en interior de galpón (Fotografía gentileza Dr. Dante Bueno).

9. Plan sanitario

Las aves de su granja deben contar con un plan sanitario acorde a su producción. Estas deben encontrarse protegidas mediante vacunaciones contra enfermedades que prevalecen en su región, y que la falta de ellas pueda ocasionar que sus aves se vean desprotegidas contra las mismas. Solicite a su empresa integradora el plan vacunal y lleve registros de las vacunaciones que poseen sus aves al ser recibidas en su granja, así como también de aquellas que se les colocan durante el ciclo de producción.

Las vacunaciones que se apliquen a las aves en la granja deben ser realizadas por personal destinado para tal fin, que conozca la metodología de aplicación, la manera de conservarla, la dosis a emplear e intervalos entre vacunaciones. El vacunador debe llenar el registro que quedará en la granja con la fecha de vacunación y firma del responsable.

10. Uso y manejo de maples internos dentro de la granja

En la actualidad, en la producción de gallinas ponedoras, se cuenta con maples de cartón o de plástico. Los maples de cartón se deben utilizar una sola vez, no debiendo ingresar nuevamente a la granja una vez que salen de la misma. Los maples de plástico se deben utilizar para el transporte de huevos dentro de la misma granja, y mejor que los mismos sean exclusivos de cada galpón, a fin de no incurrir en el peligro de acarrear enfermedades de un galpón a otro o entre diferentes granjas.

Los maples de plástico deben ser de fácil limpieza y desinfección, prestando mucha atención a estas dos tareas cada vez que se quiera volver a utilizarlos. La limpieza debe ser realizada con agua, detergente y cepillo.

11. Tratamiento de cama y guano para traslado

La cama y el guano (producto de la producción de pollos parrilleros y gallinas ponedoras, respectivamente) deben ser eliminados del establecimiento de una manera tal que no diseminen enfermedades al medio, realizando previamente un tratamiento adecuado del mismo según se detalla en este manual. Se prohíbe el traslado de guano, cama usada u otro deshecho de la granja cuando se hayan presentado síntomas de enfermedades infectocontagiosas de declaración obligatoria durante los tres meses anteriores a la finalización de la crianza en el establecimiento, teniendo en cuenta que sea tratado previamente por compostaje u otro método que garantice la inactivación de agentes productores de enfermedades (Res. SENASA 542/10).

El proceso de autocalentamiento de la cama (compostaje o apilado de la cama) es una buena forma de inactivar bacterias, virus y hongos que se encuentran en la misma. Éste debe ser realizado inmediatamente después del envío de las aves a faena.

Para ello es necesario que realice lo siguiente:

- ✓ Humedezca la cama en su totalidad con el sistema de riego u otra forma conveniente. La humedad necesaria se alcanza cuando al tomar y apretar cama en su mano no escurre agua, pero se siente húmeda. Si la cama no se mantiene unida, sino que se desintegra, debe agregarle agua.
- ✓ Recolecte la cama formando una pila en el centro del galpón. La altura de esta pila debe ser mayor a un metro (a mayor altura mejores resultados) (Figura 9).
- ✓ Levante las cortinas y cierre el galpón.
- ✓ Caliente la cama las primeras 24 a 48 hs como si estaría por recibir pollitos, haciendo uso de los calefactores.
- ✓ Mida la temperatura a lo largo del proceso y regístrela. Es importante comprobar que se mantenga una buena temperatura a lo largo de este proceso, debiéndose conservar la misma por encima de los 50 °C durante 7 días como mínimo.

Una vez culminado el proceso de calentamiento recién se puede retirar la cama del galpón para su posterior traslado (si no existió una enfermedad infectocontagiosa) y/o utilización en el establecimiento.

Si es necesario el almacenamiento de la cama en la granja, se mantendrá en lugares limpios y protegidos de aves silvestres, roedores e insectos.

Todo vehículo que ingrese al establecimiento para el retiro de la cama o guano debe ser lavado y desinfectado previamente. Además, se debe verificar que no existan fugas de material desde el camión de traslado al exterior del mismo y tapado para no esparcir material en su recorrido. Este vehículo debe circular con un certificado sanitario de desechos de la producción avícola (aves muertas, cama usada del galpón, guano u otros) (Res. SENASA 542/2010) firmado por el veterinario responsable para su correcto traslado luego de que se hayan establecido 30 días de ausencia de signos clínicos de enfermedades infectocontagiosas en la producción de su granja y que el desecho ha sido previamente tratado por alguno de los métodos establecidos en el presente manual.



Figura 10: Apilado de la cama dentro de un galpón de producción (Fotografía gentileza Lic. Corina Bernigaud).

12. Eliminación de aves muertas dentro de la granja

La mortandad diaria, o la producida por alguna enfermedad (Figura 10), deberán eliminarse dentro del predio del mismo establecimiento. Es de suma importancia que, independientemente al método de eliminación final utilizado, este debe impedir la diseminación de agentes infecciosos que afecten el rendimiento de las aves.



Figura 11: Mortandad diaria de un galpón de producción producto de una enfermedad infecciosa (Fotografía gentileza Dr. Héctor Arbiza).

El método más conveniente para la eliminación de las aves muertas aprobado actualmente es el compostaje. Como métodos alternativos pero no tan eficaces podrá utilizarse una fosa cerrada o la incineración cerrada u otro sistema de tratamiento químico, térmico autorizado por SENASA, que no produzca contaminaciones ambientales o produzca residuos que afecten la salud pública o animal.

De acuerdo a esto podemos encontrar las siguientes medidas de eliminación:

Fosa de enterramiento

Esta forma de eliminación de aves muertas no es utilizada, salvo cuando el número de aves muertas es elevado (Ej. Accidentes por calor) debiéndose disponer de un lugar adecuado para realizarla (Figura 11). En esta fosa se deben depositar las aves muertas aplicando cal viva en el fondo de la misma (Figura 12). Una vez que estas fosas se llenan se tapan con tierra, debiendo colocarse caños de escape de gases en cantidad suficiente.

Un punto importante a tener en cuenta es que las fosas se encuentren alejadas de las fuentes de agua para evitar su contaminación por drenaje de compuestos provenientes de los cadáveres.

Es necesario que quien realice esta actividad utilice todos los elementos necesarios de protección personal, tales como: guantes, botas y mascarilla.



Figura 12: Fosa de enterramiento con cal viva en su interior (Fotografía gentileza Dr. Héctor Arbiza).



Figura 13: Entierro de aves dentro de la fosa (Fotografía gentileza Dr. Héctor Arbiza).

Incineración:

Este método deberá tener en cuenta que el proceso conduzca a que el material incinerado se reduzca a cenizas. La cantidad pequeña de residuos generados en el proceso, como las cenizas, no atraen insectos y se pueden eliminar fácilmente. La preocupación ambiental principal que ocurre con este tipo de eliminación es que se generan partículas durante el proceso que pueden ser perjudiciales para la salud, por lo cual se desalienta el uso del mismo.

Para este método es conveniente disponer de un horno, sea de metal o de concreto (Figura 13).



Figura 14. Horno incinerador (Fotografía gentileza Dr. Héctor Arbiza).

Compostaje:

Esta es una de las tecnologías más recomendadas para la eliminación de la mortandad diaria de animales en su granja. El compostaje de aves muertas (o composta) es un proceso que se realiza mediante la degradación que producen bacterias, hongos y otra microflora de la mezcla de aves muertas, cama, pasto seco o viruta. Gracias a ello, se produce la transformación de la mezcla en un abono orgánico.

Este proceso se caracteriza por presentar dos fases. La primera se presenta con temperaturas de 15° C a 45° C, mientras que en la segunda se alcanzan temperaturas de 45° C a 70° C. Con estas altas temperaturas, se logra conseguir el cambio del residuo orgánico en un producto estable aplicable al suelo como abono, el cual mejora las propiedades físicas y químicas del mismo, incrementando el nitrógeno, fósforo, potasio y algunos micronutrientes importantes para las plantas, como zinc, cobre y manganeso, siendo una fuente de nutrientes para los cultivos. Además, este compost mejora la estructura y aumenta la capacidad de retención de agua del suelo.

El compostaje de aves muertas es una opción viable y de menor costo, comparada con la incineración o entierro y provoca un menor impacto ambiental. Aquí, los patógenos de los cuerpos de las aves son destruidos por las altas temperaturas propias del proceso. Sin embargo, es de suma importancia cerciorarse sobre cuáles fueron las causas de la muerte del ave, a fin de

tomar todas las medidas necesarias para evitar la transmisión de enfermedades hacia otras granjas.

Para realizar esta técnica es necesario que se utilicen materiales que aporten carbono y otros que aportan nitrógeno a la mezcla, siendo una relación óptima de carbono-nitrógeno de 3 a 1. O sea, mas cantidad de cama y paja o pasto seco (materiales que aportan carbono) que aves muertas (materiales que aportan nitrógeno).

Como la degradación de la materia orgánica es llevada a cabo por los microorganismos que se encuentran en las heces, cadáveres y el suelo es necesario que se mantengan ciertas condiciones en este proceso, como ser:

- ✓ Humedad: Es muy importante la presencia de agua para favorecer el proceso de degradación de la materia orgánica (cama, plumas, alimento y cadáveres de aves). Esta humedad no debe llegar a mojar al pollo, pues puede producir apelmazamiento de las capas y olores desagradables. Para comprobar la misma basta con apretar una porción en la mano, debiendo quedar compactada pero no escurrir agua desde ella.
- ✓ Oxígeno: Es otro de los factores determinantes, pues las bacterias que actúan necesitan de oxígeno para multiplicarse y crecer. Por eso es que es sumamente necesario realizar un volteo de la mezcla, para favorecer la aireación y el mezclado.
- ✓ Temperatura: esta se da como resultado de la actividad bacteriana y la altura de la pila. Se logran alcanzar temperaturas de 60 °C en su fase más activa. De esta manera, se reduce finalmente la población de patógenos, lo que justifica que se elija este proceso de alta temperatura.

El enfriamiento final del compostaje es un buen indicador de que el producto se ha estabilizado y el proceso ha culminado.

Para llevar a cabo el proceso de compostaje de aves muertas es necesario disponer de una casilla techada (Figura 14).



Figura 15: Casilla para realizado de compost (Fotografía gentileza Dr. Héctor Arbiza).

Esta casilla se debe construir en un sector de la granja que se encuentre cercano a los galpones de producción, pero lejos de la vivienda, para llevar las aves muertas diariamente hacia ese sector. Las medidas que debe poseer esta casilla dependen de la cantidad de aves alojadas en la granja, debiendo contemplar la capacidad de la misma. La construcción modular de la ilustración, es para una granja de 70.000 aves de capacidad y sus medidas son:

Largo: 4,7 metros

Ancho: 3,7 metros de cajones y 4,20 metros con la base

Alto: 2,85 metros a la cumbrera y 2,20 metros al alero

Techos: estos deben ser lo suficientemente altos para facilitar el trabajo, pero deben evitar cualquier entrada de agua.

Cajones: pueden ser de madera y no exceder 1,6 a 1,8 m de ancho (Figura 15)

Caminos de acceso: firmes y de fácil drenaje

Base: piso impermeable y duradero, de hormigón o tela de nylon (techón).

Material del cajón:

- Madera dura o semidura
- Madera tratada
- Restos de aserraderos o pallets
- Caña



Figura 16: Cajones de compostaje

Pasos a tener en cuenta para el compostaje de aves muertas

<p>1- Antes de iniciar un nuevo ciclo, limpiar y desinfectar bien la casilla de compostaje</p>	<p>2- Colocar 30 cm o más de cama usada, asegurando que sea más espesa, ya que los líquidos de la degradación van a fluir a ella.</p>
	
<p>3- Agregar posteriormente unos 15 cm o más de paja o pasto seco. La relación cama y pasto seco versus aves es 3 a 1.</p>	<p>4- Colocar una capa de pollos muertos, dejando una distancia de 15 cm de los laterales para evitar los derrames que se pueden observar en la figura.</p>
	
<p>5- Humedecer solamente las aves con una regadera con la finalidad de que aumente la humedad.</p>	<p>6- Para finalizar se deben tapar las aves con otra capa de cama usada de 30 cm de espesor y repetir las veces que sea necesario hasta completar el cajón.</p>
	

Fotografías gentileza Dr. Héctor Arbiza

13. Registros

Es imprescindible que existan registros de toda actividad que se lleve a cabo en la explotación que incida en la bioseguridad de la granja. Para ello es necesario que usted disponga y rellene cada vez que sea necesario el Registro del Criador Avícola (Resolución SENASA 542/010). En este registro hay que poner énfasis en los siguientes aspectos:

- ✓ Datos del establecimiento y del responsable de las aves.
- ✓ Ingresos de aves al establecimiento.
- ✓ Mortandad de las aves.
- ✓ Vacunas aplicadas.
- ✓ Fármacos utilizados en los tratamientos.
- ✓ Cantidad de aves que egresan del establecimiento para faena.

Estos registros deben ser conservados por lo menos durante las últimas cinco crías. Además el establecimiento debe contar con un protocolo de limpieza y desinfección y control de plagas, detallando en el mismo los productos que se utilizan, así como las tareas de que se llevan a cabo para garantizar esa acción.

A continuación se detallan modelos de registros, los mismos son ejemplos que pueden ser modificados de acuerdo a las necesidades de cada establecimiento.

**“La bioseguridad se logra con
perseverancia y voluntad para
realizar las tareas”**



Alteraciones fisiológicas asociadas a la infección con *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) y a fitotoxicidad provocada por su insecto vector (*Delphacodes kuscheli* Fennah) en trigo

Liliana del V. Di Feo, Irma G. Laguna & Elvio B. Biderbost

Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, IFFIVE- INTA, Córdoba, Argentina

Autor para correspondencia: Liliana del V. Di Feo, e-mail: ldifeo@correo.inta.gov.ar

RESUMEN

Mal de Río Cuarto virus en trigo provoca una enfermedad resultante de la acción combinada con su principal vector, *Delphacodes kuscheli*. La severa sintomatología inducida por virus e insecto condujo a determinar la posible existencia de alteraciones fisiológicas en el cultivar de trigo ProINTA Federal, infectado artificialmente con dos aislamientos geográficamente distantes del MRCV y sometido a picadura de insectos no virulíferos, respectivamente, en tres estadios fenológicos. ProINTA Federal fue picado por insectos no virulíferos e inoculado en la primera hoja emergiendo del coleóptilo, en la cuarta y quinta hojas desplegadas, respectivamente. La condición sanitaria de los diferentes tratamientos fue constatada mediante ELISA. Las plantas tratadas manifestaron alteraciones fisiológicas con similares variaciones entre estadios fenológicos. Azúcares solubles totales, almidón y proteínas solubles incrementaron significativamente su contenido en plantas infectadas por MRCV. En plantas PS y con MRCV, el contenido de clorofilas disminuyó marcadamente y lo inverso sucedió con el malondialdehído, lo que indicaría daño oxidativo por estrés en las mismas. No existieron diferencias entre estadios fenológicos y las variaciones de los indicadores de alteraciones fisiológicas considerados, excepto para el incremento de almidón, significativamente superior en plantas inoculadas en la primera hoja emergiendo del coleóptilo.

Palabras clave: infección viral, toxicidad por insectos, azúcares solubles, almidón, proteínas, clorofilas, malondialdehído, estadios fenológicos.

ABSTRACT

Physiological alterations associated to the *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) infection and to vector (*Delphacodes kuscheli* Fennah) phytotoxicity in wheat

Mal de Río Cuarto virus produces a wheat disease, resulting from the combined action of this pathogen and its main vector, *Delphacodes kuscheli*. Knowing that viruses and insects cause a severe symptomatology in different genotypes, the objective of this work was to determine the possible physiological alterations in three phenological stages of wheat (cv ProINTA Federal) inoculated by two geographically distant MRCV isolates and exposed to non viruliferous insects. Treatments were run at three plant stages: first leaf emergence through coleoptile, four and five unfolded leaves. The health status of these plants was confirmed by ELISA. Physiological alterations were observed in both infected plants and plants exposed to non viruliferous insects (PS). The total soluble sugar, starch and soluble protein contents increased remarkably in the plants infected by MRCV. While chlorophyll content decreased considerably in PS and MRCV infected plants, malondialdehyde levels increased in both cases. These variations could indicate oxidative damage associated to biotic stress in these plants. The physiological alterations were similar on the different phenological stages. Only the starch increase was significantly higher in plants infected at the first leaf emergence from the coleoptile.

Keywords: virus infection, insect toxicity, soluble sugars, starch, proteins, chlorophylls, malondialdehyde, phenological stages.

INTRODUCCIÓN

Mal de Río Cuarto es la enfermedad más importante del maíz, cultivo en el que puede llegar a ocasionar pérdida en el rendimiento de hasta 70%, en años de gran incidencia (March et al., 1993). A comienzos de la década del 80 se describieron detalladamente sus síntomas y se determinó la naturaleza viral de la misma (Bradfute et al., 1981; Nome et al., 1981). Su agente causal, *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV), pertenece a la familia *Reoviridae*, género *Fijivirus*, con partículas de forma icosaédrica de 65-70 nm

de diámetro y con 10 segmentos de doble cadena de RNA (Bradfute et al., 1981; Milne, 1983; Boccardo & Milne, 1984; Conti, 1984; Uyeda & Milne, 1995). Inicialmente se consideró que era una raza geográfica del *Maize rough dwarf virus* (MRDV) detectado en Italia (Conti, 1988), pero estudios posteriores de análisis comparativos de secuencia nucleotídica de distintos segmentos genómicos, permitieron concluir que el MRCV constituye una entidad viral diferente (Distéfano et al., 2002, 2003).

Como todos los reovirus, MRCV se difunde en la naturaleza sólo por acción de insectos. Sus partículas

confinadas al floema no son transmisibles mecánicamente. *Delphacodes kuscheli* Fennah, “chicharrita” perteneciente al orden *Hemiptera*, familia *Delphacidae* es el principal vector del MRCV (Remes Lenicov et al., 1985; Ornaghi et al., 1993; 1999). La modalidad de transmisión de los Fijivirus es persistente propagativa (una vez adquirido, el virus se multiplica dentro del cuerpo del vector, el cual permanece infectivo durante toda su vida) (Milne & Lovisolo, 1977; Arneodo, 2002a).

Respecto a los hospedantes naturales del MRCV, éstos pertenecen casi en su totalidad a la familia *Poaceae*; algunos de ellos son cultivos anuales invernales como avena y trigo (Rodríguez Pardina et al., 1998) los que, además de ser reservorios del virus, resultan propicios para la cría, alimentación y oviposición de la chicharrita que lo transmite, que luego migra hacia plantas de maíz en sus primeros estadios de crecimiento. De este modo, el trigo constituye un importante eslabón en la cadena epidemiológica de la enfermedad (Remes Lenicov et al., 1985; Teson et al., 1986; Ornaghi et al., 1993).

Basándose en estas observaciones, Rodríguez Pardina et al. (1998) efectuaron estudios tendientes a la detección e identificación del virus del Mal de Río Cuarto en cultivos de trigo del área endémica (Río Cuarto, Sampacho y La Carlota, Provincia de Córdoba, Argentina) acentuándose los mismos en la observación de síntomas. Estas investigaciones permitieron establecer que, en estado vegetativo, las plantas infectadas presentaban mayor cantidad de macollos, acortamiento de entrenudos, aspecto achaparrado, hojas más cortas, erectas y de consistencia coriácea con engrosamiento de nervaduras y en estado reproductivo, acortamiento de cañas, engrosamiento de las paredes celulares, hojas con bordes aserrados y enroscadas sobre sí mismas, curvamiento de espigas con acortamiento del raquis y esterilidad total o parcial (Rodríguez Pardina et al., 1998). Posteriormente, ensayos experimentales en los que se incluían distintos cultivares de la gramínea, corroboraron la gravedad de síntomas exhibidos en todos ellos: plantas achaparradas, hojas con área reducida, algunas enrolladas en tirabuzón, con bordes recortados y nervaduras hinchadas. Cuando se formaban espigas, éstas eran vanas y de crecimiento exiguo (Liliana Di Feo, datos no publicados). Complementariamente, en dichos experimentos se comprobó que el principal insecto vector del MRCV (*Delphacodes kuscheli* Fennah) es responsable durante la alimentación, de la inducción de un marcado efecto fitotóxico de tipo sistémico, manifestado a través de la disminución notable del crecimiento, reducción del área foliar y presencia de clorosis general y estrías cloróticas en hojas. Estos daños son semejantes a los ocasionados por otros insectos hemípteros, tales como: los áfidos *Therioaphis trifolii maculata* Buckton en alfalfa, *Acyrtosiphon pisum* Harris en arveja (Madhusudhan & Miles, 1998), los cicadélidos *Empoasca* spp., causal de “hopperburn” en diferentes plantas (Backus et al., 2005) y *Dalbulus maidis* De long & Wolcott en maíz (Gassen, 2000), el aleuródido

Bemisia tabaci (Gennadius) en varias especies vegetales y el delfácido *Nilaparvata lugens* (Stal) en arroz (Watanabe & Kitagawa, 2000), entre otros. Los mencionados son insectos toxicógenos que al tomar savia de sus hospedantes, simultáneamente inyectan toxinas a través de su saliva y producen distintas alteraciones en los vegetales, las cuales en general, conducen al debilitamiento de la planta, detención del crecimiento y disminución general de sus rendimientos. En el caso de *A. pisum* y *T. trifolii maculata*, análisis electroforéticos y bioquímicos revelaron que las toxinas son enzimas tales como pectinasas, peroxidasas y catecoloxidasas presentes en la saliva expulsada por ambas especies. En cuanto al “hopperburn” (achaparramiento y amarillamiento, apariencia de quemado del follaje) causado por *Empoasca* spp. no es sólo consecuencia de la fitotoxicidad de la saliva inyectada en el floema, sino también una respuesta a la herida en la planta producida por el movimiento del estilete, la cual es luego exacerbada por la saliva (Backus et al., 2005). De este modo, se llegó a la conclusión de que en la expresión de la virosis provocada por el mal de Río Cuarto en trigo se encuentra involucrado no sólo el virus, mas que existe una acción combinada de éste con su vector (Liliana Di Feo, datos no publicados). Por otra parte, la severa sintomatología exhibida por los cultivares estudiados al ser infectados con MRCV o sometidos a la acción del vector no infectivo, condujo a la presunción de la existencia de alteraciones de tipo fisiológico en ambos casos. Al respecto, si bien no hay suficientes antecedentes en relación al efecto de los virus vegetales sobre la fisiología del hospedante, existen estudios que indican la ocurrencia de alteraciones relacionadas con la replicación viral y la expresión de síntomas. Así, por ejemplo, las infecciones por Sunflower chlorotic mottle virus (SuCMoV) causan moteado clorótico y notable reducción del crecimiento en plantas de girasol, síntomas que redundan en importantes disminuciones de rendimiento en esta oleaginosa y que son comunes a diversas enfermedades virales (Dujovny et al., 1998). Investigaciones recientes indican que dichos efectos estarían relacionados con una alteración en la síntesis de compuestos carbonados y con la ocurrencia de estrés oxidativo. Pudo observarse que las hojas de girasol con síntomas de virus tuvieron mayor concentración de azúcares solubles, de almidón y de malondialdehído (MDA) que las hojas de plantas sanas (Arias et al., 2005). Lo inverso sucedió con el contenido de clorofilas que fue menor en hojas sintomáticas, situación análoga a la estudiada en batata infectada con “enanismo clorótico” (Di Feo et al., 1995).

En cuanto al MDA, que es un intermediario de la peroxidación de lípidos de las membranas celulares, junto con las alteraciones en la concentración de clorofilas y la salida pasiva de electrolitos (daño en membrana), son indicadores de estrés oxidativo en plantas (Pastori & Trippi, 1992; Iturbe-Ormaetxe et al., 1998).

Dada la inexistencia de estudios previos relativos a disturbios fisiológicos que se producen en el patosistema

trigo- MRCV- *D. kuscheli*, se planteó el presente estudio que tuvo como objetivo: determinar a través de la medición de distintas variables indicadoras, la ocurrencia de alteraciones fisiológicas en un cultivar de trigo infectado artificialmente con dos aislamientos geográficamente distantes del MRCV y sometido a picadura por insectos no virulíferos, respectivamente, en tres estadios fenológicos diferentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generación del tratamiento “plantas picadas por insectos no virulíferos” y “plantas infectadas con MRCV”

Con el propósito de implementar un ensayo de campo en el área experimental del Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (IFFIVE- INTA), en Córdoba, Argentina, durante el año 2003 plantas del cultivar ProINTA Federal fueron sometidas a picadura de insectos no virulíferos y a infección artificial con dos aislamientos del MRCV, en tres estadios fenológicos de la planta. En las transmisiones experimentales del MRCV, mediante *D. kuscheli*, se emplearon los aislamientos del Noroeste Argentino (NOA), procedente de Tafi del Valle, provincia de Tucumán (Virla et al., 1998), y de la Zona Endémica (ZE), proveniente del departamento Río Cuarto, sur de la provincia de Córdoba, respectivamente. Ambos aislamientos fueron renovados periódicamente mediante inoculaciones con el vector infectado con cada uno de ellos y se mantuvieron en invernáculo. En dichas transmisiones con *D. kuscheli*, el tiempo de adquisición fue de dos días, el de latencia de 10 días y el de infección de 48 h (Truol et al., 2001).

Para generar el tratamiento de plantas picadas por insectos no virulíferos (PS), los mismos se alimentaron de las plántulas sanas de trigo por un período de 48 h. En la obtención de plantas PS e infectadas por uno u otro aislamiento del MRCV se utilizaron tres insectos por planta, ya que, en ensayos previos en los que se incluyeron diferentes genotipos de trigo, se comprobó que ese número era el mínimo necesario para que la plántula de trigo inoculada con el virus o sometida a la acción de insectos no virulíferos se infectara o manifestara fitotoxicidad, sin llegar a morir (Liliana Di Feo, datos no publicados). Se contemplaron los siguientes momentos de infección o de picadura de insectos no virulíferos: a) plántulas con primera hoja emergiendo del coleóptilo (dos días desde emergencia), b) plántulas con cuatro hojas desplegadas (17 días desde emergencia) y c) plántulas con cinco hojas desplegadas (32 días desde emergencia). La totalidad del procedimiento descrito se condujo en fitotrón ($24 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 h de luz, 10.000 lux y $50 \pm 5\%$ HR).

Ensayo de campo

Luego de aplicaciones alternadas de Decis (Deltametrina 2,5%) y aficida Duperial (Pirimicarb 50%: 0,5g/l), con el fin de eliminar las distintas formas del insecto, las plantas tratadas se rusticaron y transplantaron en el campo

experimental del IFFIVE-INTA, bajo jaula antiáfidos, de tela de polietileno color cristal, de alta densidad (10 x 16 hilos/pulgada cuadrada), que provee total protección contra insectos pequeños como las chicharritas y no influye sobre la fisiología de las plantas que se desarrollan en su interior, al permitir una adecuada ventilación y paso de luz (Cafune et al., 2006). Complementariamente, se realizaron aplicaciones periódicas y quincenales de los insecticidas mencionados (la primera, al momento del transplante) con el fin de preservar la condición sanitaria de las diferentes variantes. Se siguió un diseño en parcelas divididas en bloques completos al azar, con tres repeticiones. Sólo se incluyeron en el ensayo plantas con signos conspicuos de oviposición (manchas ovales violáceas en la base del tallo) y de alimentación del insecto (manchas cloróticas y/o de apariencia oleosa en la lámina foliar). El control negativo correspondió a plantas de trigo del cultivar ProINTA Federal sano (S). El factor condición sanitaria, con cuatro ‘niveles’ (S, PS, ZE o NOA), se asignó a la parcela principal y el factor fenológico con tres estadios, a la parcela secundaria. Las parcelas estuvieron constituidas por 10 plantas a 0,10 m entre ellas. La distancia entre surcos fue de 0,35 m. El transplante de las plántulas tratadas en diferentes momentos de su crecimiento fue realizado simultáneamente.

Confirmación de la condición sanitaria de las plántulas muestreadas

La ausencia de MRCV en plantas sanas y picadas por insectos no virulíferos y su presencia en las inoculadas con los aislamientos ZE y NOA, fueron confirmadas mediante DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977), empleando un suero anti-MRCV producido en el IFFIVE (Rodríguez Pardina et al., 1998).

Preparación de reactivos de diagnóstico: a partir del suero contra MRCV, se purificó gamablobulina por precipitación con sulfato de amonio al 50% y posterior cromatografía en columna de DEAE Sephacel (Sigma Chemical Co, St. Louis) preparada en tampón fosfato salino diluido a la mitad (PBS, fosfato 0,02M; más ClNa-K 0,15M, pH 7,4). La misma fue eluida en el tampón mencionado y se colectaron fracciones de 1 ml, de las que se monitoreó su absorbancia (A_{280}). Posteriormente se preparó el conjugado enzimático, para lo cual 1 ml de la inmunoglobulina (IgG) con $A_{280}=1,4$ (corresponde a 1mg/ml) fue conjugada con fosfatasa alcalina (Type VII T, Sigma Chemical Co.) de acuerdo al protocolo de Clark & Adams (1977).

DAS-ELISA: para confirmar la condición sanitaria (S, PS, ZE y NOA) de cada una de las plantas del ensayo de campo, se tomó la tercera hoja desplegada (a partir del ápice de la planta) a los 60 días desde la emergencia en invernáculo y al mes del transplante en campo. La misma fue macerada en tampón PBS + 0,05% de tween 20 + 2% de polivinil pirrolidona (PVP) en proporción 1:5 (p/v).

Las placas soporte de la prueba (Nunc-Immunoplate MaxiSorp), de 96 celdillas, fueron cubiertas con $1\mu\text{g/ml}$ de IgG en carbonato de sodio 0,05M; pH 9,6, e incubadas a

37°C por 4h. Posteriormente, se adicionó el antígeno a las celdillas y el período de incubación fue de 18h a 5°C. A continuación, la placa a la que se le agregó IgG específica para MRCV conjugada con fosfatasa alcalina (conjugado enzimático diluido 1:1000 en tampón conjugado: PBS + 0,05% de tween 20 + 2% de PVP + 0,2% de ovoalbúmina) se llevó a 37°C por 4h. Entre los pasos mencionados de la prueba, se realizaron tres lavados, de tres minutos cada uno, con PBS + 0,05% de tween 20. Luego de colocar el sustrato (0,75mg/ml de p-nitrofenilfosfato disódico [Sigma Chemical Co.] en 10 % de dietanolamina, pH 9,8), la reacción fue cuantificada usando un lector de placas de ELISA (Dynatech MR 4000®). El punto crítico o umbral (valor de A_{405} a partir del cual una muestra es considerada positiva para MRCV), se estableció como la media de A_{405} de los controles sanos más tres veces la desviación estándar (se emplearon seis controles sanos por placa). Para comparar las lecturas de las diferentes placas, se calculó la absorbancia relativa (AR) dividiendo cada valor de A_{405} por el punto crítico mencionado, considerando como enfermas las muestras con AR igual o superior a 1. Los registros de AR (que estima de manera indirecta la concentración viral) en plantas infectadas con los aislamientos ZE y NOA del MRCV fueron posteriormente sometidos a ANAVA y complementariamente, permitieron calcular **el porcentaje de plantas infectadas** con aislamiento ZE o NOA del MRCV. En el caso de plantas picadas por insectos no virulíferos (PS), cuya condición de libres de MRCV fue confirmada por DAS-ELISA (AR < 1), se estableció el **porcentaje de plantas con síntomas de fitotoxicidad**.

Variables indicadoras de alteraciones fisiológicas

Muestreo de plántulas para determinación de variables indicadoras de alteraciones fisiológicas: el muestreo se llevó a cabo a los 60 días de la emergencia de las plántulas en invernáculo (un mes desde el trasplante en el campo). Las distintas mediciones se realizaron en dos plantas por bloque (seis plantas en total) para cada combinación de condición sanitaria (S, PS, ZE y NOA) y estadio fenológico en que la planta fue sometida a picadura por insecto no infectivo o a infección por uno u otro aislamiento del MRCV (primera hoja emergiendo del coleóptilo; plántulas con cuatro hojas desplegadas; plántulas con cinco hojas desplegadas, respectivamente).

Determinaciones relativas a variables indicadoras de alteraciones fisiológicas: se efectuaron diferentes mediciones indicativas de alteraciones fisiológicas tales como contenido de hidratos de carbono solubles e insolubles, proteínas solubles, clorofilas y MDA en la hoja inmediata inferior a la última desplegada, con síntomas típicos de fitotoxicidad causadas por insectos no virulíferos (en plantas PS) o de virosis (en plantas infectadas con MRCV). El control negativo correspondió a hojas de la posición indicada, provenientes de plantas sanas del cv ProINTA Federal. A los fines de determinar contenido de azúcares solubles totales y almidón ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PF) se siguieron

las técnicas de Guan & Janes (1991) y Sumner & Somers (1944), respectivamente. El contenido de proteínas solubles ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PF) de los extractos se estimó con la técnica del *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Bradford, 1976). La medición de contenido de clorofilas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PF) se efectuó según Tetley & Thimann (1974) y la del contenido de MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ PF) según Heath & Packer (1968).

Complementariamente se calcularon los incrementos o disminuciones porcentuales del contenido de azúcares solubles totales, almidón, proteínas solubles, MDA y clorofilas, relativos a plantas sanas, mediante la transformación de cada variable utilizando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ incremento} = \frac{(\text{media variable en ZE, NOA o PS} - \text{media variable en plantas sanas}) \times 100}{\text{media variable en plantas sanas}}$$

$$\% \text{ disminución} = \frac{(\text{media variable en plantas sanas} - \text{media variable en ZE, NOA o PS}) \times 100}{\text{media variable en plantas sanas}}$$

Para cada variable transformada se analizaron las diferencias entre estadios fenológicos y entre condiciones sanitarias y la probable existencia de interacción entre estadio fenológico y condición sanitaria. Para ello se realizaron análisis univariados de varianza, con un nivel de probabilidad de error inferior al 5%, mediante el empleo del programa estadístico *Infostat* 2004 (InfoStat, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediciones relativas a fitotoxicidad por insectos no virulíferos y a infección por MRCV

En las tres repeticiones del ensayo de campo pudo confirmarse la ausencia de infección viral en las plantas sanas (S) y en las picadas por insectos no virulíferos (PS), en los tres estadios fenológicos considerados (primera hoja emergiendo del coleóptilo, cuatro y cinco hojas desplegadas), que posteriormente fueron empleados para realizar las determinaciones de las alteraciones fisiológicas. En ambos casos, los registros de absorbancia relativa (AR) obtenidos a partir de las pruebas de DAS-ELISA fueron menores a 1.

Por otro lado, en las plantas infectadas con aislamiento de la Zona Endémica (ZE) y del Noroeste Argentino (NOA) de MRCV, que fueron usadas con el mismo fin, se corroboró la presencia del mencionado virus (AR > 1).

Concentración viral (AR): el ANAVA reveló la ausencia de diferencias significativas entre momentos de infección ($p = 0,4348$) y entre ambos aislamientos del MRCV ($p = 0,0509$) en la concentración viral, estimada indirectamente mediante AR (tabla 1).

Sintomatología: las plantas picadas por insectos no virulíferos (con AR < 1 en DAS-ELISA) exhibieron síntomas de igual severidad en los tres estadios fenológicos del tratamiento (disminución de crecimiento, debilitamiento, reducción del área foliar, clorosis generalizada y presencia de estrías cloróticas en hojas). En el caso de las plantas

infectadas con aislamiento ZE y NOA de MRCV, con valores de AR >1 en la prueba serológica, tampoco hubo diferencias de severidad de síntomas entre estadios fenológicos de infección con el virus, ni entre ambos aislamientos. En todos los casos, la sintomatología exhibida fue de reducción marcada del crecimiento, presencia de hojas coriáceas con nervaduras hinchadas y bordes recortados y ausencia de espigas o bien, espigas vanas.

Porcentaje de plantas afectadas por insectos no virulíferos y porcentaje de plantas infectadas con MRCV: en la tabla 2 puede observarse el *porcentaje de plantas con síntomas de fitotoxicidad* causada por la picadura de insectos no virulíferos y el porcentaje de *plantas infectadas con el aislamiento ZE y NOA* del MRCV. El ANAVA reveló la existencia de diferencias significativas estadísticamente ($p=0,0174$) entre condiciones sanitarias, ya que los menores porcentajes fueron para plantas afectadas por insectos no virulíferos (70%), en tanto que los porcentajes de plantas infectadas con los aislamientos ZE y NOA no discreparon entre sí (83 y 88%, respectivamente). En ningún caso fueron detectadas diferencias significativas entre los tres estadios fenológicos considerados ($p=0,2701$).

TABLA 1 - Valores de absorbancia relativa (AR= A405 muestra/ media A405 controles sanos + 3 desvíos estándar) de plantas de trigo cv ProINTA Federal infectadas con aislamiento de Zona Endémica (ZE) y del Noroeste Argentino (NOA) del *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) en tres estadios fenológicos diferentes (1: primera hoja emergiendo del coleóptilo, 2: cuarta hoja desplegada y 3: quinta hoja desplegada) (promedio + error estándar). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas ($p > 0,05$)

Estadio fenológico	NOA	ZE
1	11,01 ± 1,15 (a)	7,92 ± 2,17 (a)
2	20,84 ± 8,98 (a)	7,85 ± 2,52 (a)
3	18,98 ± 7,32 (a)	8,13 ± 1,90 (a)

TABLA 2 - Porcentaje de plantas de trigo cv ProINTA Federal afectadas por fitotoxicidad provocada por la picadura de insectos no virulíferos (PS) e infectadas por aislamiento de Zona Endémica (ZE) y del Noroeste Argentino (NOA) del *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) en tres estadios fenológicos diferentes (1: primera hoja emergiendo del coleóptilo, 2: cuarta y 3: quinta hojas desplegadas) (promedio + error estándar). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas

Condición Sanitaria	Estadio fenológico		
	1 (a)	2 (a)	3 (a)
PS (a)	65,30 ± 9,25	64,07 ± 4,07	80,17 ± 13,07
NOA (b)	76,67 ± 3,33	93,33 ± 3,33	80,00 ± 5,77
ZE (b)	83,33 ± 6,67	96,67 ± 3,33	83,33 ± 8,82

Variables indicadoras de alteraciones fisiológicas

Se registraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre condiciones sanitarias, en todas las variables indicadoras de alteraciones fisiológicas provocadas por estrés biótico. Es decir, tanto la picadura del insecto no infectivo como la infección del virus desencadenan dichas alteraciones en plantas de trigo (Figura 1).

Contenido de azúcares solubles totales y de almidón

El contenido de azúcares solubles fue superior en plantas afectadas por el MRCV que en plantas sanas (8,20 µg/mg PF), sin diferencias entre ambos aislamientos (29 µg/mg PF para ZE y 31 µg/mg PF para NOA). La picadura de insectos no virulíferos no alteró significativamente los niveles normales de azúcares y sólo provocó un aumento poco significativo con respecto a los controles sanos (11,18 µg/mg) (Figura 1 A).

En el caso del contenido de almidón, la situación que se presentó fue similar a la anterior. Frente al estrés causado por el virus, se incrementaron los valores de almidón en los tejidos foliares (15 µg/mg PF para ZE y 16 µg/mg PF para NOA) respecto a plantas sanas (8,3 µg/mg PF), lo que no sucedió de manera significativa cuando la planta fue sometida a fitotoxicidad por insectos (9,4 µg/mg PF) (Figura 1 B).

Respecto al incremento de la concentración de azúcares solubles y de almidón en plantas de trigo infectadas con MRCV, se conoce que, si bien algunos virus parecen tener poca influencia sobre los hidratos de carbono en hojas, otros pueden alterar su tasa de síntesis y de translocación. Debido a que la mayoría de los estudios al respecto fueron realizados a partir de pocas enfermedades, no es posible hacer generalizaciones suficientemente firmes sobre los cambios en los carbohidratos; sin embargo, dos efectos comunes en infecciones virales son: 1) el aumento en las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa de hojas infectadas y 2) la reducción en la translocación de hidratos de carbono fuera de las hojas (Hull, 2002). En relación al primero de ellos, se considera que el incremento en la concentración de azúcares solubles sería necesario para la replicación viral (Sindelárová et al., 1999). En cuanto al efecto mencionado en segundo término, en algunos virus de floema, tales como el BYV (*Beet yellows virus*), la reducida exportación de los hidratos de carbono desde las hojas conduce a la acumulación de los fotoasimilados en la lámina foliar, lo que induce a su engrosamiento y enrollamiento (Hull, 2002). Esto podría explicar en las infecciones de trigo con MRCV, la aparición de síntomas vinculados con dicha acumulación, tales como la presencia de hojas coriáceas y enroscadas en tirabuzón.

Por otro lado, en observaciones al microscopio electrónico de secciones ultrafinas practicadas en hojas de plantas sometidas a infección viral se detectaron cloroplastos deformados, agrupados, globosos y con vesículas, con tilacoides desorganizados, tal como fuera indicado por Arneodo et al. (2002 b) y con acumulación de almidón (Liliana Di Feo, datos no publicados). De acuerdo con esto,

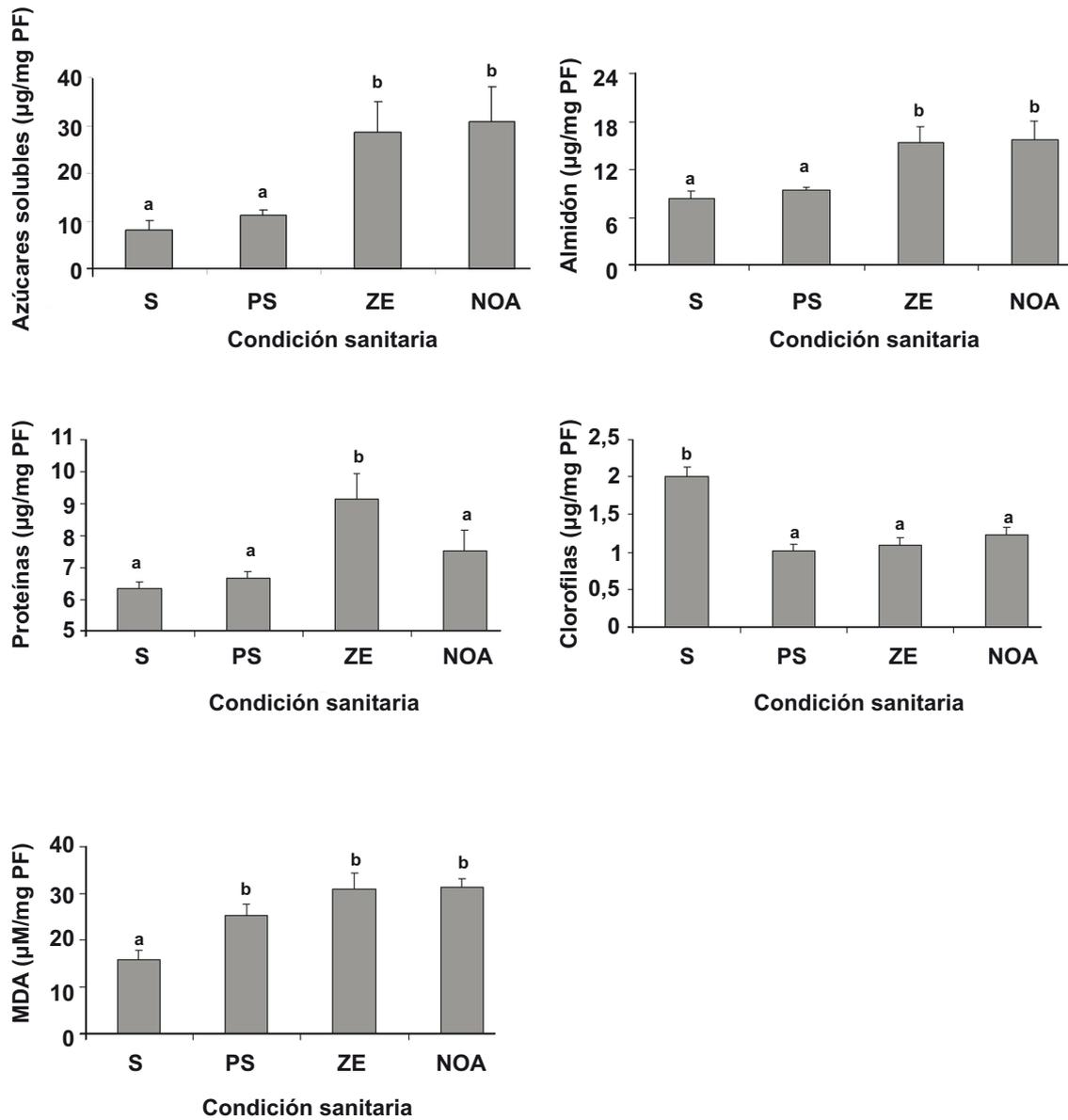


FIGURA 1 – A. Contenido de azúcares solubles totales ($\mu\text{g/mg PF}$); B. contenido de almidón ($\mu\text{g/mg PF}$); C. contenido de proteínas solubles ($\mu\text{g/mg PF}$); D. contenido de clorofilas ($\mu\text{g/mg PF}$) y; E. contenido de MDA ($\mu\text{M/mg PF}$) en plantas de trigo cv ProINTA Federal sanas (S), picadas por insectos no virulíferos (PS) e infectadas con aislamiento de Zona Endémica (ZE) y del Noroeste Argentino (NOA) del *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV).

es evidente que tal como sucede en infecciones de girasol con SuCMoV (Arias et al., 2003), el incremento de azúcares solubles en hojas de plantas de trigo afectadas por MRCV no provendría de la hidrólisis del almidón, sino de un reciclaje de otros componentes celulares. Estos cambios en el metabolismo del carbono pueden resultar en alteraciones en el transporte de electrolitos que culminan en la generación de especies activas de oxígeno (EAOs) (Arias et al., 2005).

Contenido de proteínas solubles

El contenido de proteínas solubles fue significativamente más alto en plantas infectadas con el aislamiento ZE del MRCV ($9 \mu\text{g/mg PF}$) que para las restantes

condiciones sanitarias, las cuales no se diferenciaron entre sí. No obstante, el aislamiento NOA también provocó un incremento ($7,54 \mu\text{g/mg PF}$), aunque no estadísticamente significativo, en relación a plantas sanas ($6,33 \mu\text{g/mg PF}$). En plantas PS no hubo variación respecto a dichos controles ($6,7 \mu\text{g/mg PF}$) (Figura 1 C).

Se conoce que la cubierta proteica de virus tales como el TMV, puede representar aproximadamente la mitad del total de proteínas de la hoja enferma (Hull, 2002). Basados en esto, sería factible considerar que el incremento de la concentración proteica en plantas de trigo enfermas podría ser consecuencia de la infección con MRCV.

Contenido de clorofilas y de MDA

El contenido de clorofilas fue significativamente menor en relación a los controles negativos: (2 µg/mg PF), en hojas de plantas PS: (1,02 µg/mg PF) o infectadas con aislamiento ZE: (1,11 µg/mg PF) y NOA: (1,24 µg/mg PF) del MRCV, los que no discreparon entre sí (Figura 1 D). Evidentemente, esta disminución en plantas picadas por insectos no virulíferos y en infectadas con el virus, junto con la alteración de la estructura de los cloroplastos (Liliana Di Feo, datos no publicados), conduce a una menor actividad fotosintética, que es quizá el modo más común por el cual la infección produce la reducción del tamaño de la planta (Hull, 2002).

En el caso del malondialdehído (MDA) sucedió lo inverso que para clorofilas, ya que su concentración aumentó en hojas de plantas tratadas (PS o infectadas con aislamiento ZE y NOA del MRCV) con respecto a las sanas (Figura 1 E). El incremento en el contenido de MDA, sumado a la degradación de los pigmentos clorofílicos en hojas de plantas tratadas (PS e infectadas con MRCV), indican la generación de estrés oxidativo que probablemente se debería a daños en las membranas de los cloroplastos, según lo evidencia la pérdida de clorofilas sufrida por tales plantas. Dicho daño oxidativo se asocia con la generación de especies activas de oxígeno (EAO's), tales como ión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, las cuales pueden reaccionar con proteínas, lípidos y DNA, causando daños y hasta muerte celular (Aro et al., 1993; Inzé & Van Montagu, 1995). Los cloroplastos son la fuente más importante de EAO's y por ende, las organelas más susceptibles a ellas frente a situaciones de estrés (Casano & Trippi, 1992; Palatnik et al., 2002). Uno de los indicadores de la presencia de daño oxidativo en los tejidos es el aumento de MDA, intermediario de la peroxidación de lípidos de las membranas celulares (Wang et al., 2009).

Por último, podría afirmarse que los cambios metabólicos sufridos por las plantas sometidas a estrés biótico (PS o enfermas con virus), tales como la desorganización de cloroplastos, reducción de clorofilas, incremento del contenido de MDA, son semejantes a los que acontecen durante un proceso de envejecimiento acelerado, notable sobre todo, en plantas infectadas con MRCV que mueren prematuramente sin llegar a florecer en casi su totalidad. Los resultados del análisis complementario del incremento de azúcares solubles totales, almidón, proteínas solubles y MDA y de la disminución del contenido de clorofilas, ambos relativos a plantas sanas, indicaron ausencia de interacción estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre condición sanitaria y estadio fenológico en que la planta fue tratada. Es decir que no hubo respuesta diferencial de estas variables para las diferentes condiciones sanitarias frente a ninguno de los tres estadios fenológicos considerados.

Tampoco se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre estadios fenológicos y contenido de azúcares solubles totales y de proteínas solubles en plantas infectadas. Del mismo modo, el incremento relativo en el contenido

de malondialdehído y la disminución en el de clorofilas en plantas picadas por insectos no virulíferos e infectadas con los aislamientos ZE o NOA del MRCV, fueron similares en los tres momentos en que la planta fue tratada. En contraposición, el incremento del contenido de almidón ($p = 0,0225$), resultó notablemente superior en plantas infectadas en el estadio de primera hoja emergiendo del coleóptilo (117,40%), que en las inoculadas en los estadios de cuarta o quinta hojas desplegadas (53,58% y 43,70%, respectivamente) (Figura 2).

En la tabla 3 se resumen los valores de las diferentes variables indicadoras de alteraciones fisiológicas en plantas de trigo sanas y en plantas picadas por insectos no virulíferos (PS) e infectadas con aislamiento ZE y NOA del MRCV, en cada uno de los tres estadios fenológicos considerados.

Se confirma experimentalmente la ocurrencia de alteraciones fisiológicas vinculadas a una severa sintomatología en plantas de trigo cuando, en estadios tempranos, éstas son afectadas por MRCV y/o por fitotoxicidad producida durante el proceso alimentario de su principal vector, *D. kuscheli*. Por tal motivo, si las condiciones climáticas permiten prever la probable ocurrencia de una severa epifitía del Mal de Río Cuarto virus y teniendo en cuenta que el trigo es uno de los principales reservorios invernales de virus e insecto vector, será necesario tomar las medidas pertinentes para controlar esta enfermedad que constituye una amenaza potencial para el cereal de grano fino de mayor relevancia en Argentina.

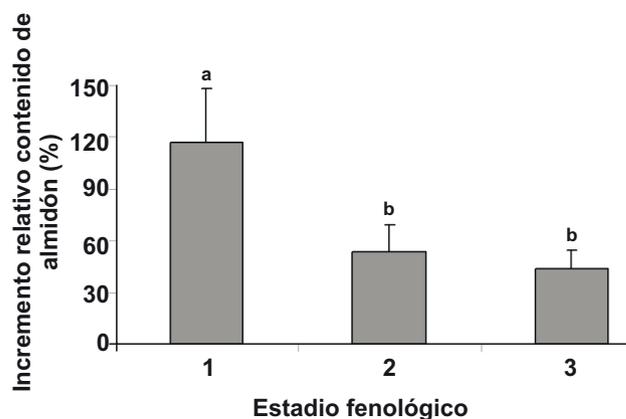


FIGURA 2 - Incremento porcentual de almidón, respecto a plantas de trigo cv ProINTA Federal sanas, para tres estadios fenológicos de picadura por insectos no virulíferos (PS) e infección por aislamiento de Zona Endémica (ZE) y del Noroeste Argentino (NOA) del *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV): 1) primera hoja emergiendo del coleóptilo, 2) cuarta hoja desplegada y 3) quinta hoja desplegada. Letras diferentes indican presencia de diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). %IA= (MCA – MCAS/ MCAS) x 100 (%IA: incremento porcentual del contenido de almidón relativo a plantas sanas; MCA: media del contenido de almidón en plantas ZE, NOA o PS; MCAS: media del contenido almidón en plantas sanas).

TABLA 3 - Contenido (promedio + EE) de azúcares solubles totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso fresco), almidón ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso fresco), proteínas totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso fresco), clorofilas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso fresco) y MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ PF) para cuatro condiciones sanitarias: plantas sanas y plantas picadas por insectos no virulíferos (PS) e infectadas con aislamiento de Zona Endémica (ZE) y con aislamiento del Noroeste Argentino (NOA) del *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) en tres estadios fenológicos (E.F.) diferentes: primera hoja emergiendo del coleóptilo (1), cuarta (2) y quinta hojas desplegadas (3)

Cond. sanit.	E.F.afe	E.F.	Azúcares solubles	Almidón	Proteínas totales	Clorofilas	MDA
Sanas			8,20 \pm 1,93	8,33 \pm 0,90	6,33 \pm 0,20	2,00 \pm 0,13	16,00 \pm 1,9
PS	1		10,5 \pm 1,2	8,75 \pm 0,51	6,73 \pm 0,24	0,93 \pm 0,12	21,5 \pm 2,6
	2		11,5 \pm 3,3	9,55 \pm 0,76	6,18 \pm 0,35	1,2 \pm 0,21	30,3 \pm 6,4
	3		11,37 \pm 0,98	9,93 \pm 0,83	7,12 \pm 0,35	0,93 \pm 0,10	23,8 \pm 1,6
ZE	1		51,3 \pm 14,8	18,33 \pm 2,95	9,83 \pm 1,59	1,2 \pm 0,15	37,73 \pm 3,9
	2		13,9 \pm 5,1	13,63 \pm 2,36	8,42 \pm 1,47	1,12 \pm 0,18	34 \pm 9,5
	3		13,36 \pm 2,6	11,2 \pm 0,86	8,97 \pm 1,62	0,98 \pm 0,13	23,7 \pm 3,1
NOA	1		32,63 \pm 9,3	20,76 \pm 5,48	6,13 \pm 0,78	1,2 \pm 0,10	29,5 \pm 2,1
	2		16,9 \pm 8,1	13,83 \pm 4,48	7,62 \pm 0,97	1,52 \pm 0,15	33,9 \pm 3,7
	3		42,4 \pm 18	12,67 \pm 1,41	8,87 \pm 1,37	1 \pm 0,18	30,7 \pm 3,6

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143:113- 134.

Arias MC, Lenardon SL, Taleisnik E (2003) Carbon metabolism alterations in sunflower plants infected with the Sunflower chlorotic mottle virus. *Journal of Phytopathology* 151:267- 273.

Arias MC, Luna C, Rodríguez M, Lenardon SL, Taleisnik E (2005) Sunflower chlorotic mottle virus in compatible interactions with sunflower: ROS generation and antioxidant response. *European Journal of Plant Pathology* 113:223-232.

Arneodo J D, Guzmán FA, Conci LR, Laguna IG, Truol G (2002a) Transmission features of *Mal de Río Cuarto virus* in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae). *Annals Applied Biology* 141:195-200.

Arneodo JD, Lorenzo, E, Laguna, IG, Abdala G, Truol, GA (2002b) Cytopathological characterization of *Mal de Río Cuarto virus* in corn, wheat and barley. *Fitopatología Brasileira* 27:298-302.

Backus EA, Serrano MS, Ranger CM (2005) Mechanisms of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior and physiology. *Annual Review of Entomology* 50:125-151.

Boccardo G, Milne R (1984) Plant reovirus group. CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses N° 294.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Bradfute OE, Teyssandier EE, Marino EM, Dodd JL (1981) Reolike virus associated with maize Río Cuarto disease in Argentina. *Phytopathology* 71:205.

Cafrune EE, Perotto MC, Conci VC (2006) Effect of two *Allxivirus* isolates on garlic yield. *Plant Disease* 90:898-904.

Casano LM, Trippi VS (1992) The effect of oxygen radicals on induced proteolysis in isolated chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 33:329- 332.

Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-482.

Conti M (1984) Epidemiology and vectors of plant reoviruses. En: K.F.Harris, de., (Ed.) *Current Topics in Pathogen-Vector-Host Research*, vol. 2 New York NY. Praeger Publishers. pp. 111-139.

Conti M (1988) Recent research on leafhopper vectors of plant virus and mycoplasmas at the Plant Virus Institute Turin. En, *Proceedings 6th Auchen Meeting*, Torino, Italy. pp. 447-457.

Di Feo L, Biderbost E, Racca R, Nome S, Mollinedo V, López Lambertini P (1995) Incidence of ontogeny and chlorotic dwarf, a viral disease, on the productivity of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cv *Morada* INTA. *Fitopatología* 30:96-99.

Distéfano AJ, Conci LR, Muñoz Hidalgo L, Guzmán FA, Hopp HE, del Vals M (2002) Sequence analysis of genome segments S4 and S8 of *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV): evidence that the virus should be a separate *Fijivirus* species. *Archives of Virology* 147:1699- 1709.

Distéfano AJ, Conci LR, Muñoz Hidalgo L, Guzmán FA, Hopp HE, del Vas M (2003) Sequence and phylogenetic analysis of genome segments S1, S2, S3 and S6 of *Mal de Río Cuarto virus*, a newly accepted *Fijivirus* species. *Virus Research* 92:113-121.

Dujovny G, Usugui T, Shohara K, Lenardon S (1998) Characterization of a potyvirus infecting sunflower in Argentina. *Plant Disease* 82:470-474.

Gassen DN (2000) Pragas iniciais em milho. www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co49.htm Acessado Febrero 16, 2005.

Guan HP, Janes HW (1991) Light regulation of sink metabolism in tomato fruit. II. Carbohydrate metabolizing enzymes. *Plant Physiology* 96:922-927.

Heath RL, Packer L (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125:189-198.

Hull R (2002) Induction of Disease 1: Virus Movement through the Plant and Effects on Plant Metabolism. En: *Matthews Plant*

- Virology. San Diego CA. Academic Press. pp. 373-436.
- InfoStat (2004). InfoStat, versión 2004. Manual del usuario. Grupo InfoStat/FCA. 2° edición. Córdoba. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas.
- Inzé D, Van Montagu M (1995) Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 6:153-158.
- Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo PR, Arrese-Igor C, Becana M (1998) Oxidative Damage in Pea Plants Exposed to Water Deficit or Paraquat. *Plant Physiology* 116:173-181.
- Madhusudhan VV, Miles PW (1998) Mobility of salivary components as a possible reason for differences in the responses of alfalfa to the spotted alfalfa aphid and pea aphid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 86:25-39.
- March GJ, Ornaghi JA, Beviacqua JE, Marinelli A (1993) Intensidad del Mal de Río Cuarto y pérdidas causadas a la producción de maíz en las campañas agrícolas 1981/82 a 1991/92. *Gaceta Agronómica* 13:384-388.
- Milne, RG, Lovisolo O (1977) Maize Rough Dwarf and related viruses. *Advances in Virus Research* 21:267-341.
- Milne RG, Boccardo G, Dal Bo E, Nome, SF (1983) Association of Maize Rough Dwarf Virus with Mal de Río Cuarto in Argentina. *Phytopathology* 73:1290-1292.
- Nome SF, Lenardon S L, Raju BC, Laguna IG, Lowe SK, Docampo D (1981) Association of Reovirus-like particles with "Enfermedad de Río Cuarto" of maize in Argentina. *Phytopathologische Zeitschrift* 101:7-15.
- Ornaghi JA, Boito G, Sanchez G, March GJ, Beviacqua J E (1993) Studies on the populations of *Delphacodes kuscheli* Fennah, in different years and agricultural areas. *Journal Genetics Breeding* 47:277-282.
- Ornaghi JA, March G J, Boito GT, Marinelli A. Beviacqua JE, Giuggia J, Lenardon SL (1999) Infectivity in natural populations of *Delphacodes kuscheli*, vector of "Mal de Río Cuarto" virus. *Maydica* 44:219- 223.
- Palatnik JF, Valle EM, Carrillo N (2002) **Oxidative stress and damage in chloroplasts from dawn to dusk.** En: Hemantaranjan A (Eds) *Advances in Plant Physiology*. Jodhpur. India. Scientific Publishers. Vol. 4, pp. 75-88.
- Pastori G, Trippi V (1992) Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. *Plant Cell Physiology* 33:957-961.
- Remes Lenicov A, Teson A, Dagoberto E, Huguet N (1985) Hallazgo de uno de los vectores del Mal de Río Cuarto del maíz. *Gaceta Agronómica* 25:251-258.
- Rodríguez Pardina PE, Laguna IG, Dagoberto E, Truol GA (1998) Wheat: a new natural host for the Mal de Río Cuarto Virus in the endemic disease area (Río Cuarto, Córdoba Province, Argentina). *Plant Disease* 82:149-152.
- Sindelárová M, Sindelár L, Burketová L (1999) Changes in glucose, fructose and saccharose metabolism in tobacco plant infected with Potato virus Y. *Biologia Plantarum* 42:431-439.
- Sumner JB, Somers GF (1944) The water soluble polysaccharide of sweet corn. *Archives Biochemistry* 4:4-7.
- Teson A, Remes Lenicov AMM de, Dagoberto EL, Paradel SL (1986) Estudio de poblaciones de delfácidos sobre maíz, avena y maleza circundante (Homoptera-Fulguroidea). *Gaceta Agronómica* 33:507-517.
- Tetley RM, Thimann KV (1974) The metabolism of oat leaves during senescence. I. Respiration, carbohydrate metabolism, and the action of cytokinins. *Plant Physiology* 54:294-303.
- Truol GA, Usugi T, Hirao J, Arneodo JD, Giménez Pecci MP, Laguna IG (2001) Transmisión experimental del virus del mal de Río Cuarto por *Delphacodes kuscheli*. *Fitopatología Brasileira* 26:39-44.
- Uyeda I, Milne R (1995) Introduction: Genomic organization, diversity and evolution of plant reoviruses. *Seminars in Virology*. Vol. 6. pp. 85-89.
- Virla E, Giménez Pecci MP, Herrera S, Conci LR, Laguna IG (1998) Presencia del virus del Mal de Río Cuarto en Tafi del Valle, provincia de Tucumán. *Avance Agroindustrial* 75:27-30.
- Wang JZ, Cui LJ, Wang Y, Li JL (2009) Growth, lipid peroxidation and photosynthesis in two tall fescue cultivars differing in heat tolerance. *Biologia Plantarum* 53:1192-1198.
- Watanabe T, Kitagawa H (2000) Photosynthesis and translocation assimilates in rice plants following phloem feeding by the planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Journal Entomology* 93:1192-1198.

TPP 9012 - Recibido 26 Janeiro 2009 - Aceptado 2 Fevereiro 2010
 Editor de Sección: Alice K. Inoue Nagata

El papel del ingeniero agrónomo en la bioseguridad de las explotaciones ganaderas

por: Jesús Ciria Ciria
Dr. Ingeniero Agrónomo
jciria@agro.uva.es

La ganadería intensiva se caracteriza por un incremento global de sus censos, del tamaño medio de las explotaciones y por una irregular distribución geográfica. Esto da lugar a problemas ambientales (puntualmente se concentra gran cantidad de deyecciones) y problemas infecto contagiosos. Por otra parte, en los últimos años se ha creado una opinión desfavorable a la producción intensiva (bienestar animal, supuesta artificialidad de sus productos...) y ha surgido una presión social reclamando productos derivados de ésta, con mayor calidad nutritiva, y sobre todo sanitaria, con la exigencia de mayor seguridad alimentaria.

Al comienzo de la intensificación, el uso de medicamentos y vacunaciones constituyó el pilar básico del control de las enfermedades. Actualmente, estas prácticas, por sí solas, no son suficientes para mantener animales sanos, productivos y rentables, y además, política y socialmente no son aceptadas. Quizás la única estrategia a seguir para solucionar estos problemas, está en la bioseguridad.

Concepto de bioseguridad

La bioseguridad es considerada como el conjunto de medidas (características de las instalaciones y prácticas de manejo) para prevenir y evitar la entrada y difusión de agentes patógenos que puedan afectar a la sanidad, el bienestar y los rendimientos técnicos de los animales o a la calidad de sus producciones (control de los vectores de transmisión).

Según Quiles y Hevia (2006) el concepto bioseguridad es amplio, y debe hacer referencia a la localización de la granja (bioseguridad física) y al diseño de la granja (bioseguridad estructural).

Según Álvarez (2008), la bioseguridad representa el mecanismo de lucha más económico y efectivo frente a la enfermedad, y ningún programa de prevención puede funcionar sin ella. La prevención de la enfermedad es siempre mejor alternativa que el tratamiento, sin embargo, mientras que la eficacia de éste es fácilmente observada por el ganadero, la eficacia de las medidas de bioseguridad es difícil de observar.

Aunque literalmente es una manera de evitar el contacto entre los animales y los microbios, bioseguridad es, sobre todo, sentido común en las buenas prácticas de manejo que deben ser utilizadas en la granja, y puede no costar mucho dinero (Herranz, 2008).

Protocolos de bioseguridad

La ordenación sanitaria de las explotaciones ganaderas se contempla en la Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal y establece el objetivo de prevenir, controlar y erradicar enfermedades de los animales, la necesidad de disponer de explotacio-



nes ganaderas cuya actividad sea respetuosa con el medio ambiente y el entorno natural, especialmente en la correcta gestión de los residuos. Algunas especies tienen regulación más específica.

Gázquez, A. (2004) propone que los protocolos de bioseguridad se basen en los principios de APPCC convenientemente adaptados a la situación real de una explotación ganadera, para conseguir unos niveles elevados de bioseguridad.

Según Tovar, M. (2001), para poder controlar los diferentes riesgos, hay que atender una serie de demandas:

- Localización de la granja para reducir el riesgo de infecciones aerógenas.
- Diseño de la granja para evitar contactos innecesarios.
- Procedimientos de visitas.
- Procedimientos para suministro y retirada de animales.
- Procedimientos para el suministro de pienso y materiales.
- Procedimientos para retirada de residuos, estiércol y animales muertos.

En una visión amplia, los puntos críticos en las explotaciones, para la aplicación correcta de las medidas de bioseguridad serán, como mínimo:

- Instalaciones: Correcta localización.
 - Diseño del conjunto (aislamiento de la explotación, infraestructuras sanitarias, alojamientos, otras instalaciones).
 - Cumplimiento de la legislación sanitaria y de bienestar animal.
 - Características constructivas: Tipo y calidad de los materiales.
- Protocolo de limpieza y desinfección de instalaciones y utensilios.
- Control de animales extraños:

- Roedores
- Insectos
- Animales salvajes y domésticos.
- Control de entrada: trabajadores, visitas y personal ajeno a la explotación.
- Calidad sanitaria del agua y del pienso.
- Manejo de los animales: Evitar estrés y respetar medidas de bienestar animal.
- Tratamiento adecuado de: Subproductos (estiércol y/o purines).
 - Residuos sanitarios.
- Gestión y eliminación de cadáveres.
- Control del movimiento de ganado y sus productos.
- Programas de vacunaciones y medicación de los animales.

En este trabajo vamos a analizar esa componente de la Bioseguridad en explotaciones ganaderas, relacionada con la localización, requisitos mínimos, diseño y características constructivas que se deben tener en cuenta y se deben describir, cuando los ingenieros agrónomos redactamos los proyectos técnicos.

Componentes de la bioseguridad en la redacción de proyectos

1.- Localización de la granja

Para la ubicación de cualquier explotación ganadera existen restricciones legales en cuanto a distancias al casco urbano, caminos y a otros tipos de instalaciones, bien sean ganaderas o centros específicos que supongan concentración o movimiento de animales, sus subproductos o residuos, pero desde el punto de vista de bioseguridad deberemos contemplar en primer lugar la densidad ganadera de la zona, y la existencia de centros de sacrificio y de centros de recogida y tratamiento de animales muertos o de residuos. Cuanto mayor sean estas distancias y menor la densidad ganadera, menores serán los riesgos.



La limpieza y desinfección son claves en cualquier protocolo de bioseguridad, por lo que los materiales de cerramiento y cubierta deberán ser lisos y resistentes

2.- Diseño de la granja

En la distribución del conjunto debe delimitarse correctamente la zona limpia y la zona sucia, entendiendo por la primera el perímetro al que sólo se puede acceder tras una rigurosa limpieza y desinfección. Este recinto presentará dimensiones y características diferentes en cada tipo de explotación, pero todos tienen en común, el asegurar que es "impermeable" a la entrada de vectores.

Debemos buscar el mayor aislamiento, o menor contacto con el exterior, realizando un vallado, con acceso controlado, en el que forzosamente exista un sistema de desinfección de vehículos. La disposición del vallado deberá permitir la carga de animales o sus productos (se deberán adosar al cerramiento los muelles para carga y descarga), así como la retirada del estiércol, purines y contenedores de animales muertos sin que sea necesaria la entrada de los vehículos en el recinto de la explotación.

En el caso de ganado porcino, la fosa de purines debería situarse lo más alejada posible de las naves, y siempre con posibilidad de extraerse el purín desde el exterior de la valla. Si se trata de granjas con reproductoras o centros de inseminación artificial, deberá existir un local de cuarentena, también separado del resto, evitando el cruce de circuitos de personal y utensilios, sin que previamente no hayan pasado por una desinfección.

Se establecerán vestuarios, con duchas y ropa de trabajo próximos a la entrada, que deben constituir la barrera higiénica de las personas que acceden, tanto de los empleados como de otras cuya entrada sea estrictamente necesaria (y que se registrará adecuadamente – libro de visitas). Además, cada acceso a diferentes zonas dispondrá de sistemas de lavado de botas y de pediluvio, limpio y con desinfectante adecuado, que garantice que cumple la función para la que se ha establecido. Estos serán de fácil limpieza. Para evitar el riesgo de otros vectores, se cubrirán todos los huecos exteriores de los alojamientos con mallas pajareras y con sistemas que impidan entrada de roedores o reptiles.

Por último, el diseño de alojamientos debe permitir la realización de la limpieza profunda, previa al vacío sanitario, tanto si se trata de explotaciones de producción continua (caso típico del porcino), como si se trata de explotaciones multiedad en diferentes naves (avicultura).

3.- Zonas exteriores

En las explotaciones ganaderas deberemos mantener las zonas próximas a las edificaciones con el mayor nivel de limpieza, y sobre todo sin malas hierbas. Por ello, es muy importante la realización de aceras perimetrales de anchura mínima de 1,50 m, en hormigón o aglomerado asfáltico, por ser más efectivo para la limpieza que el uso de herbicidas totales. La recogida y canalización de las aguas de lluvia mejora el mantenimiento de estas zonas, evitando encharcamientos.

4.- Características constructivas

La limpieza y desinfección son claves en cualquier protocolo de bioseguridad, por lo que los materiales de cerramiento y cubierta deberán ser lisos y resistentes, sin rincones ni puntos de difícil limpieza, (estructura, soportes de instalaciones, etc.), en que los equipos de limpieza disponibles (hidrolavadoras a presión) no sean efectivos. Es de gran interés que estos materiales sean hidrófugos o impermeables, por la mayor facilidad de limpieza. Se dispondrán instalación eléctrica y de suministro de agua cada 25,00 m, para facilitar la conexión de equipos de limpieza, y es deseable que la evacuación del agua de limpieza sea fácil, procurando desagües y ligeras inclinaciones de las soleras.

Es importante que cada una de las naves que componen la explotación, disponga de un almacén de herramientas y utensilios, tanto específicos como de uso general, para evitar el traslado de estas de una zona a otra.



*La bibliografía está disponible en el Colegio. Los interesados pueden solicitarla a través de redaccion.mda@agronomoscentro.org