

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN AGRARIA
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE ACUERDOS SANITARIOS Y CONTROL EN FRONTERA

CAMPAÑA DE EXPORTACIÓN DE FRUTA DE HUESO PROCEDENTE DE ESPAÑA CON DESTINO A SUDÁFRICA



Pautas Generales

Ce Veg 

Mayo 2013



INTRODUCCIÓN

En el año 2012 el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) y el Department of Agriculture, Forestry and Fisheries (DAFF) de la República de Sudáfrica llegaron a un acuerdo firmando el **Plan de Trabajo Fitosanitario para la Importación de Fruta de Hueso (*Prunus* spp.)** de España a Sudáfrica (PTF), en el que se incluye el Plan de Trabajo Específico para Especies de *Monilinia*, lo que supuso la apertura a las exportaciones de fruta de hueso del género *Prunus*.

Como novedad, en este año 2013 y como consecuencia a la introducción de *Drosophila suzukii* en nuestro país, dicho Plan de Trabajo se ha visto modificado. Estas modificaciones consisten en incluir *D. suzukii* como plaga de importancia cuarentenaria para Sudáfrica incorporando un Programa de Manejo. Igualmente se incorpora un Programa de Manejo para *Amphitetranychus viennensis* debido a las interceptaciones producidas en la última campaña.

En este documento se resumen los principales requisitos del PTF (provisional) el cual se puede consultar en el **Anexo 1**.



PLAZOS DE LA CAMPAÑA

Periodo de inscripción:

Del 28 de mayo al 7 de junio de 2013

Duración de la campaña:

Del 28 de mayo al 31 de diciembre de 2013



ACTUACIONES DEL OPERADOR

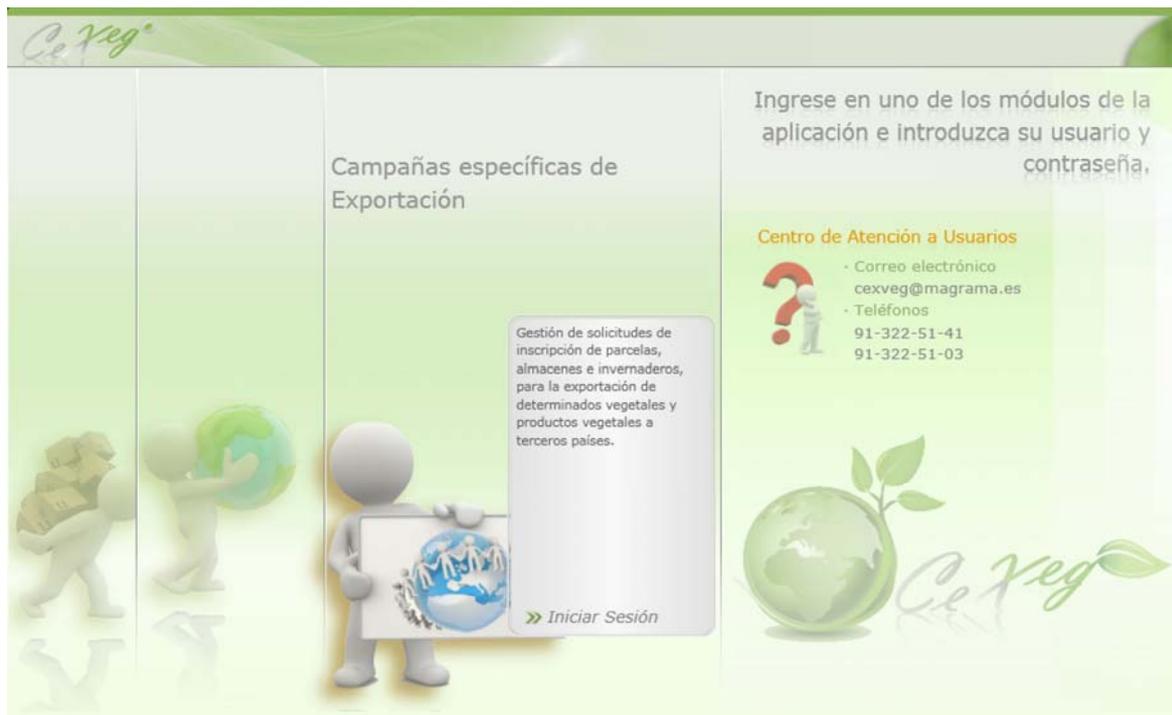
La cumplimentación y presentación de solicitudes deberá realizarse a través del **módulo de Campañas de Exportación de la aplicación informática CEXVEG.**



<http://programasnet.marm.es/cexveg/Inicio.aspx>

1.- REGISTRO EN CEXVEG

El Operador deberá registrarse en el módulo de campañas específicas de exportación de la aplicación informática



Para más información sobre cómo registrarse en  puede dirigirse al Centro de Atención al Usuario cexveg@magrama.es



2.- PRESENTACIÓN DE SOLICITUDES

El operador presentará dos tipos de solicitudes:

- **Solicitud de parcelas:** las parcelas serán inscritas según recinto **SIGPAC** y se incluirá en cada una de ellas las especies, variedades, producción y superficies de que estén compuestas.
- **Solicitud de almacenes de confección:** los almacenes se grabarán con su número de Registro Sanitario.

Para la presentación de ambos tipos de solicitudes será necesario adjuntar la siguiente documentación:

- **Contrato o precontrato** con la Entidad Auditora habilitada por la Comunidad Autónoma.
- **Declaración jurada** de autorización por parte de los titulares de las parcelas/almacenes para inscribirlas en la Campaña.
- **Declaración de compromiso** de conocimiento y cumplimiento del protocolo y pautas establecidas para la presente campaña.
- **Propuesta de los tratamientos fitosanitarios** a realizar en las parcelas (incluyendo los **6 tratamientos** obligatorios contra *Monilinia*), tal y como se establece en el **Plan de Trabajo Fitosanitario para la Importación de Fruta de Hueso (*Prunus* spp.) de España a Sudáfrica**, mediante el siguiente cuadro:

Materia activa	Nombre del producto	Fecha de aplicación

No obstante, esta propuesta de calendario de tratamientos se aportará sin perjuicio de los posibles tratamientos que se apliquen *a posteriori* como respuesta a emergencias puntuales.

3.- REQUISITOS IMPUESTOS POR SUDÁFRICA

El operador deberá cumplir los requisitos que se exponen a continuación. No obstante en el **Anexo 2** se detallan de manera más amplia.

- Cumplir con el Plan de Trabajo Fitosanitario para la Importación de Fruta de Hueso (*Prunus* spp.) de España a Sudáfrica que incluye el Plan de Trabajo Específico para Especies de *Monilinia*.
- Las parcelas deberán estar libres de los siguientes plagas de importancia cuarentenaria (ver **Anexo 3**):

Monilinia fructicola

Monilinia fructigena

Neonectria ditissima

Erwinia amylovora

Acalitus phloeocoptes

Eotetranychus carpini

Amphitetranychus viennensis

Drosophila suzukii

- Realizar un monitoreo y vigilancia de las plagas de importancia cuarentenaria para Sudáfrica, entre las que se encuentran *A. viennensis* y *D. suzukii*, para las que se requiere un programa de manejo (ver **Anexo 4**)
- Realizar un mínimo de **3 tratamientos** fungicidas durante la etapa de floración y otros **3 tratamientos** adicionales en el periodo comprendido entre los 28 y 10 días previos a la cosecha.

ACTUACIÓN DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA

A través de  deberá:

- Autorizar a las Entidades Auditoras.
- Validar las solicitudes de parcelas y almacenes que los operadores han presentado.
- Comprobar que la información relativa al listado de parcelas registradas y autorizadas sea correcta.
- Comunicar las inspecciones y análisis PCR realizados en pre y post cosecha (**ver Anexo 2**). La CA podrá autorizar a la Entidad Auditora a realizar dichas inspecciones y análisis cuando así lo determine.

Además, la CA deberá recibir de los operadores inscritos y comunicar a la Subdirección Gral. de Acuerdos Sanitarios y Control en Frontera, los hallazgos de cualquier plaga de importancia cuarentenaria potencial tal y como indica el Plan de Trabajo.

- Una vez aprobada la Unidad de Inspección la C.A. tendrá que validarla para que las parcelas o almacenes pertenecientes a esa Unidad de Inspección sean **AUTORIZADAS PARA EXPORTAR**.



Buscador de Inspecciones

Fecha envío Desde 01/01/2013 Hasta 28/02/2013 Tipo Seleccione un Tipo

Campaña Fruta de hueso a Sudáfrica Estado Seleccione un Estado

Comunidad Seleccione una Comunidad Polígono

Provincia Seleccione una Provincia Parcela

Municipio Seleccione un Municipio Recinto

Entidad Seleccione una Entidad Unidad Insp. []

Resultado []

- Preinscrita
- Registrada
- Autorizada por EA
- Rechazada
- Rechazada temporal
- Rechazada por Comunidad
- Autorizada para Exportación

ACTUACIÓN DE LA ENTIDAD AUDITORA

- Registrarse en la aplicación *CeXeg* Módulo de Campañas específicas de exportación.
- Solicitar la autorización de la C.A. para cada campaña específica de exportación.
- Tener un contrato o precontrato con el solicitante.
- Conocer los requisitos de la campaña.
- Realizar las agrupaciones necesarias en Unidades de Inspección.
- Cuando así lo determine la C.A., realizar las inspecciones y análisis PCR necesarias en pre y post-cosecha que exige Sudáfrica para comprobar "in situ" el cumplimiento del Plan de Trabajo.
- Aprobar y comunicar los resultados de las Unidades de Inspección a través de *CeXeg*.





ACTUACIÓN DEL MAGRAMA

- Dar de alta en la aplicación *CeXeg* a los operadores que soliciten inscribirse en la campaña.
- Enviar al DAFF **4 semanas antes del primer envío**, la lista de parcelas y almacenes de confección inspeccionados y aprobados.
- Notificar inmediatamente al DAFF cualquier detección de plagas de importancia cuarentenaria durante el Plan de Trabajo. Para ello, el operador se lo ha de comunicar al Servicio de Sanidad Vegetal de la Comunidad Autónoma correspondiente y esta a su vez al MAGRAMA.
- Emitir los **Certificados Fitosanitarios** con las Declaraciones Adicionales correspondientes, para lo que previamente el inspector comprobará en *CeXeg* que las parcelas y almacenes de los que provienen la fruta se encuentran **"Autorizados para Exportar"** por el Servicio de Sanidad Vegetal de la Comunidad Autónoma.

1. Nombre y dirección del exportador / Name and address of exporter		2. CERTIFICADO FITOSANITARIO Plant Quarantine Certificate Nº CE / ES / 0300001 2 A	
3. Nombre y dirección declarados del destinatario / Declared name and address of consignee		4. Organización de Protección Fitosanitaria de / Plant Protection Organization of ESPAÑA / SPAIN	
		A. Organización(es) de Protección Fitosanitaria de / Plant protection Organization of	
		5. Lugar de origen / Place of origin	
6. Medio de transporte declarado / Declared means of transport		MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria Subdirección General de Asesoramiento, Sanidad y Control de Productos	
7. Punto de entrada declarado / Declared point of entry			
8. Marcos descriptivos de los buques, número y descripción de los buques, nombre del producto, nombre botánico de las plantas / Descriptive marks, number and description of packages, name of product, botanical name of plants		9. Cantidad declarada / Quantity declared	
10. Por la presente se certifica que las plantas o productos vegetales descritos más arriba / This is to certify that the plants/products described above - se han inspeccionado de acuerdo con los procedimientos adecuados y / have been inspected according to appropriate procedures, and - no constan de plagas de cuarentena, y probablemente exentas de otras plagas nocivas, y que se comprometo a que han - quarantine pests, and probably free from other significant pests, and that they - no constan de plagas de cuarentena, y probablemente exentas de otras plagas nocivas, y que se comprometo a que han - quarantine pests, and probably free from other significant pests, and that they - no constan de plagas de cuarentena, y probablemente exentas de otras plagas nocivas, y que se comprometo a que han - quarantine pests, and probably free from other significant pests, and that they			
11. Declaración suplementaria / Additional declaration			
TRATAMIENTO DE DESINFESTACIÓN Y/O DESINFESTACIÓN Quarantine insecticide/Quarantine treatment		16. Lugar de expedición / Place of issue	
12. Tratamiento / Treatment		Fecha / Date	
13. Producto químico (ingredientes activos) Chemical (active ingredients)	14. Duración y temperatura Duration and temperature	Nombre y Firma Name and signature del funcionario autorizado del subsector oficial	
15. Concentración / Concentration	16. Fecha / Date		
17. Información adicional / Additional information			



ANEXOS

ANEXO 1.- PLAN DE TRABAJO FITOSANITARIO PARA LA IMPORTACIÓN DE FRUTA DE HUESO (*PRUNUS* SPP.) DE ESPAÑA A SUDÁFRICA (PROVISIONAL)

ANEXO 2.- REQUISITOS DETALLADOS IMPUESTOS POR SUDÁFRICA

ANEXO 3.- CLAVES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PLAGAS EN CAMPO

ANEXO 4.- MONITOREO Y PROGRAMA DE VIGILANCIA

ANEXO 5.- TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ENVÍO A LABORATORIO

ANEXO 6.- IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *MONILINIA* EN LABORATORIO



**Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria
Subdirección General de Acuerdos Sanitarios y Control en Frontera**

Campaña de Exportación de fruta de hueso procedente de España con destino a Sudáfrica

Anexo nº 1 Plan de trabajo fitosanitario para la importación de fruta de hueso (*Prunus* spp.) de España a Sudáfrica (PROVISIONAL)

Mayo 2013



PHYTOSANITARY WORKPLAN FOR THE IMPORTATION OF STONE FRUIT (*Prunus* spp.) FROM SPAIN TO SOUTH AFRICA

In order to safely export stone fruit (*Prunus* spp.) from Spain to the Republic of South Africa (RSA), the Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment (hereinafter referred to as MAGRAMA) and the Department of Agriculture, Forestry and Fisheries of South Africa (hereinafter referred to as DAFF), on the basis of pest risk analysis (PRA), exchanged views and reached consensus as follows:

ARTICLE 1

REGISTRATION AND APPROVAL

1. The stone fruit (*Prunus* spp.) for export to South Africa shall originate from production sites, pack houses and storage facilities registered annually by MAGRAMA and jointly approved by DAFF and MAGRAMA.
2. A list/database of the registered facilities that have been inspected and approved by MAGRAMA for the export of stone fruit to South Africa must contain the following details:
 - 2.1. Name and registration number of each production site
 - 2.2. List/database of the pesticide/fungicide applications used in each production site as part of its Integrated Pest Management program
 - 2.3. Name and registration number of each pack house
 - 2.4. Name and registration number of each storage facility.
3. A list/database of the registered facilities that have been inspected and approved by MAGRAMA for export of stone fruit to South Africa, shall be made available to DAFF annually for consideration at least four weeks prior to the departure of the first consignment. DAFF will assess the list and the approved facilities will be updated on DAFF website and immediately notify MAGRAMA.
4. Production site, packing facilities and storage facilities shall comply with production and packaging standards (e.g. Integrated Production, GLOBALGAP, UNE 155000). MAGRAMA shall ensure that *Prunus* spp. for export to South

Africa originates from production sites that follow these production standards and comply with this phytosanitary workplan.

ARTICLE 2

PRE-HARVEST PEST MANAGEMENT PROGRAM AND GENERAL SURVEILLANCE

1. MAGRAMA shall be responsible for inspection before approval of production sites, pack house and storage facilities.
2. MAGRAMA shall, through inspection and continuous surveillance programs ensure that production sites are free from *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, *Neonectria ditissima*, *Erwinia amylovora*, *Acalitus phloeocoptes*, *Eotetranychus carpini*, *Amphitetranychus viennensis* and *Drosophila suzukii*. Surveillance records shall be made available for review upon request by DAFF.
3. Should pests listed in paragraph 2 above be detected in the registered production sites, the production site shall be rejected for the rest of that export season for South Africa.
4. Monitoring of pests shall be conducted regularly in the registered production sites by MAGRAMA. Should new potential quarantine pests be detected in association with *Prunus* spp., MAGRAMA shall immediately notify DAFF for appropriate action to be taken. DAFF shall then notify Spain of any phytosanitary measures to be implemented and subsequent changes to the quarantine pest list and phytosanitary import requirements.
5. Pest control, inspection and other relevant records and information shall be made available for review upon request by DAFF.
6. MAGRAMA shall ensure that the producers apply only authorised preventative measures (Integrated Pest Management).
7. Pre-harvest measures for *Monilinia* spp. shall be implemented according to Annex 3, Article 1 of the "Workplan specific to *Monilinia* spp".

ARTICLE 3

POST-HARVEST MEASURES

1. Only fruit sourced from production sites that meet the export requirements set out in this phytosanitary workplan shall be delivered to the storage and packing facilities. Fruit destined for South Africa shall not be mixed with fruit destined for other markets in pack houses or storage facilities.

2. During harvest and packing of fruit, growers shall avoid bruising the fruit.

3. During the packing period for export to South Africa, no fruit for the domestic market is to be packed at the same site and time. Rejected host material must be removed from the packing area at the end of each day.

4. *Prunus* spp. fruit must be appropriately cleaned, inspected, packed, stored and transported, so as to guard against contamination with quarantine pests of concern to South Africa.

5. Post-harvest treatments may include chemical treatments or heat treatments (EFSA, 2011).

6. Post-harvest inspection will be according to the following procedure:

6 (a). The principle of inspection according to a specific rate for fruit must be based on a sample of 143 packing units for a consignment of 2000 packing units or less. The inspection for consignments with more than 2000 packing units must be based on 150 packing units. This will provide for a 95% confidence level of detecting packing units with infested/infected fruit if the infestation rate is 2% or higher.

(b). Post-harvest inspection for *Monilinia* spp. shall be implemented according to Annex 3, Article 2 of the "Workplan specific to *Monilinia* spp".

7. Should any quarantine pests of concern as listed in Annex 1 be detected, the consignment/lot shall be rejected for export to South Africa and the production site shall be suspended for the rest of the export season.

8. Fruit shall be free from leaves and plant debris.

9. Only matured fruit, inspected and free from symptoms of infection shall be packed for export to South Africa.

10. The registered pack house and storage facility shall be clean and maintained free of pests, soil, plant debris and safeguarded and equipped to avoid fruit contamination.

11. The packing materials for *Prunus* spp. fruit destined for South Africa shall be new and clean cardboard boxes/cartons.

12. No packing material of plant origin, including straw, shall be used.

13. Should wood packaging material be used, it shall comply with ISPM 15.

ARTICLE 4

LABELING

1. Each carton (box) of *Prunus* spp. shall be marked in English with correct and accurate information as indicated in Annex 2.

ARTICLE 5

PHYTOSANITARY CERTIFICATION

1. An import permit is required in terms of the Agricultural Pests Act, 1983 (Act No. 36 of 1983).

2. Upon completion of fruit sampling and inspection, a phytosanitary certificate shall be issued by MAGRAMA within 14 days prior to shipment. A phytosanitary certificate shall only be issued for fruit that meet the requirements of this phytosanitary workplan. Entry of consignments into South Africa shall be subject to the availability of the original phytosanitary certificate.

3. MAGRAMA shall provide DAFF with a model of their phytosanitary certificate for confirmation and record keeping.

4. Each consignment of *Prunus* spp. fruit to be exported to South Africa must be accompanied by a phytosanitary certificate endorsed as follows:

4.1. Additional Declarations

4.1. The fruit in this consignment complies with all the requirements of the phytosanitary workplan for the importation of stone fruit (*Prunus* spp.) agreed upon between DAFF and MAGRAMA and are free from pests listed in Annex 1.

ARTICLE 6

PHYTOSANITARY INSPECTION ON ARRIVAL

1. Once a shipment of *Prunus* spp. arrives at the designated port of entry, DAFF shall examine the relevant documents and markings.
2. Any consignment with certification that does not conform to the specifications set out in this phytosanitary workplan shall be rejected.
3. Upon arrival of the consignment at the port of entry, a representative sample shall be drawn and inspected for all quarantine pests listed in Annex 1 and suspect fruit shall be dissected to determine the status of infestation.
4. Should pests or symptoms of infection be found, the samples shall be sent for laboratory identification, and the shipment shall be detained pending the result of laboratory identification. DAFF shall notify MAGRAMA of such interception immediately.
5. Should any of the quarantine pests in Annex 1 or any other quarantine pest be detected on arrival, the consignment shall be rejected and DAFF shall immediately notify MAGRAMA. DAFF shall provide MAGRAMA with the official laboratory identification results. The production site shall then be suspended while an investigation is carried out by MAGRAMA. DAFF and MAGRAMA shall consult and implement corrective measures as deemed necessary. Fruit certified for South Africa prior to the date of suspension and which are already at sea shall remain eligible for export. Such consignments shall be detained, inspected and a sample shall be taken and laboratory tests conducted for the quarantine pests in Annex 1. Should any quarantine pests of concern to South Africa be detected, the consignment/lot shall be rejected.
6. Should any pest be detected on *Prunus* spp. from Spain that has not been categorized, it shall require assessment to determine its quarantine status and whether phytosanitary action is required. The detection of any pest of potential quarantine concern not already identified in the analysis may result in a review of this phytosanitary workplan to ensure that phytosanitary measures provide appropriate level of phytosanitary protection for South Africa.
7. DAFF shall inspect up to 100% of the shipments and suspend any production site at any time should pests of quarantine concern be detected or should other phytosanitary import requirements not be met. DAFF will immediately advise MAGRAMA of any pest interceptions and other instances of non-compliance with any condition stipulated in this phytosanitary workplan.

8. In case of non-compliance with this phytosanitary workplan the importer shall be responsible for all costs relating to disposal, removal or rerouting, including costs incurred by DAFF to monitor the action taken.

ARTICLE 7

VISIT BY DAFF

1. As part of initial market access, DAFF shall send two quarantine experts to the relevant *Prunus* spp. producing areas in Spain to review the production practices and the laboratories that will be used for *Monilinia* spp. detection, in cooperation with MAGRAMA.
2. After program initiation, when necessary and agreed by both sides (i.e. in light of any significant changes in pest status and/or detections of quarantine pests on arrival), DAFF may send quarantine officials to Spain to conduct on-site inspections.
3. Based on the official documents and technical information provided by MAGRAMA and the report of the South African experts, DAFF may approve resumption of this program.

ARTICLE 8

RE-INSTATEMENT OF PRODUCTION SITES PREVIOUSLY REJECTED OR SUSPENDED FOR EXPORT TO SOUTH AFRICA

1. A production site previously rejected or suspended for export to South Africa shall only be re-instated if detailed corrective measures that comply with the requirements set out in this phytosanitary workplan are provided to DAFF.
2. MAGRAMA shall monitor and approve the reinstatement of the rejected or suspended production sited and provide the list and recommendations to DAFF.
3. DAFF shall assess and approve the list of the reinstated production sites provided, update it on the DAFF website and notify MAGRAMA as soon as possible.

ARTICLE 9

IMPLEMENTATION AND DISPUTE SETTLEMENT

1. MAGRAMA and DAFF agree to make every effort to settle any dispute arising from the interpretation or implementation of this phytosanitary workplan through bilateral consultation or negotiation.
2. This agreement is subject to review, revision and amendment as necessary.

ANNEX 1: QUARANTINE PESTS OF CONCERN TO SOUTH AFRICA

Mites: *Amphitetranychus viennensis*
Brevipalpus chilensis
Cenopalpus lanceolatisetae
Cenopalpus pulcher
Eotetranychus pruni
Eotetranychus sexmaculatus
Tetranychus canadensis
Tetranychus mcdanieli
Tetranychus pacificus
Tetranychus schoenei
Tetranychus tumidus

and

Insects: *Amyelois transitella*
Anarsia lineatella
Anastrepha fraterculus
Anastrepha ludens
Anastrepha obliqua
Anastrepha suspensa
Bactrocera dorsalis
Bactrocera invadens
Bactrocera tryoni
Bactrocera zonata
Choristoneura rosaceana
Conotrachelus nenuphar
Cydia funebrana
Drosophila suzukii
Ephiphyas postvittana
Eupoecilia ambiguella
Rhagoletis cerasi
Rhagoletis pomonella
Thrips palmi

Fungus: *Monilinia fructicola*
Monilinia fructigena
Neonectria ditissima

Bacteria: *Erwinia amylovora*

ANNEX 2: THE PACKING MARK

<p style="text-align: center;">Country of origin Production site name or its registered unique code Packing facility name or its registered unique code</p> <p style="text-align: center;">For the Republic of South Africa</p>

ANNEX 3: WORKPLAN SPECIFIC TO *MONILINIA* SPECIES

ARTICLE 1

PRE-HARVEST PEST MANAGEMENT PROGRAM AND GENERAL SURVEILLANCE

1. Cultural measures

1.1. During winter months, growers shall remove and destroy mummified fruits and infected tissues in order to reduce the inoculum potential. The residues of pruning shall be destroyed or inactivated.

1.2. After blossoming, infected or symptomatic twigs and branches shall be removed. Any infected fruit shall be destroyed.

1.3. Growers shall improve, when possible, ventilation and insulation by green pruning and the application of herbicides to avoid excess of moisture. Drip irrigation is recommended.

2. Pre-harvest treatments

2.1. Pre-harvest treatments shall include a minimum of 3 fungicide sprays during bloom and a further three sprays 28 days before harvest with the last application not more than 10 days before harvest.

2.2. Resistance against the benomyl, dicarboximides and demethylation-inhibiting fungicides (Cyproconazole, Difenoconazole, Fenbuconazole, Tebuconazole) have been reported in countries where fungicides have been used regularly (Leeuwen *et al.* 2001). All isolates of *M. fructicola* tested from Spain showed resistance to benzimidazole fungicides and a few of these isolates showed resistance to dicarboximide fungicides (EFSA, 2011). An anti-resistance strategy shall therefore be implemented to prevent development of pesticide resistance.

3. Pre-harvest inspection of fruits and testing

MAGRAMA shall inspect each registered production site for pests listed in paragraph 2 at least six weeks before harvest. During inspection a sample of 600 fruit shall be taken from each production site registered for export to South Africa. This sampling procedure provides for a 95% confidence level of detecting infested fruit, if the infestation rate is 0.5% or higher. The sample shall be sent to a laboratory for *Monilinia* spp. diagnosis. The samples shall be treated with paraquat as described by Northover & Cerkauskas (1994) or freeze treated as described by Michailides *et al.* (2000) and cultured in a humid chamber in the laboratory. Fruit showing brown rot shall be tested by PCR in accordance with one of the identification techniques (methods) for *M. fructicola* and *M. fructigena* recommended by EPPO, i.e. Hughes *et al.* (2000), loos &

Frey (2000) or Côte *et al.* (2004). If the result of the PCR testing for *M. fructicola* and/or *M. fructigena* is positive, the production site shall be rejected for export to South Africa.

ARTICLE 2

POST-HARVEST MEASURES

1. Post-harvest inspection and testing

A sub-sample of 750 or 630 fruit must be taken from a sample referred to in Article 2. Paragraph 7 (i.e. 143 packing units from a consignment of 2000 packing units or less or 150 packing units from a consignment with more than 2000 packing units). The sub-sample shall be sent to a laboratory for *Monilinia* spp. diagnosis. The samples shall be treated with paraquat as described by Northover & Cerkauskas (1994) or freeze treated as described by Michailides *et al.* (2000) and cultured in a humid chamber in the laboratory. The sample size provides for a 95% probability of detecting 0.5% infestation in 630 fruit 7 days after paraquat or freeze treatment and in 750 fruit 5 days after paraquat or freeze treatment. Fruit showing brown rot shall be tested by PCR in accordance with one of the identification techniques (methods) for *M. fructicola* and *M. fructigena* recommended by EPPO, i.e. Hughes *et al.* (2000), Iloos & Frey (2000) or Côte *et al.* (2004). If the result of the PCR testing for *M. fructicola* and/or *M. fructigena* is positive, the consignment/lot shall be rejected and the production site/production site shall be suspended for the rest of the export season to South Africa.

AUTHORIZATION

1. This workplan shall commence on the date of the signature below. The workplan will remain in effect unless rescinded or due to any of the circumstances given above as a cause of such action. Either DAFF or MAGRAMA may suggest changes in this workplan for discussion at any time.
2. DAFF reserves the right to suspend or change (in this workplan with MAGRAMA) the requirements for the importation of stone fruit from Spain to South Africa in the event that South Africa's phytosanitary requirements are not met.

ANNEX 4: *Amphitetranychus viennensis* MANAGEMENT PROGRAM

ARTICLE 1

PRE-HARVEST PEST MANAGEMENT PROGRAM AND GENERAL SURVEILLANCE

1. Management measures

The orchard shall be inspected on a weekly basis to detect *Amphitetranychus viennensis* among other quarantine mites of concern to South Africa. The sample will consist on 2 leaves per tree in 25 trees during the growing season.

In case of detection of *A. viennensis*, the orchard shall be rejected for the rest of that export season for South Africa and shall only be re-instated in accordance with the provisions of Article 8 of the Phytosanitary Workplan.

PROVISIONAL

ANNEX 5: *Drosophila suzukii* MANAGEMENT PROGRAM

ARTICLE 1

PRE-HARVEST PEST MANAGEMENT PROGRAM AND GENERAL SURVEILLANCE

1. Cultural methods

- 1.1. Where practical, growers shall remove cull fruit to eliminate additional feeding and breeding sites.
- 1.2. When possible, growers shall reduce moisture in the orchards, by watering at the base of the trees and avoiding hitting foliage.

2. Management measures

- 2.1. Orchards shall be monitored with a minimum of two baited traps¹ per orchard, at least one month before fruit ripening, both in edges and amongst crops.
- 2.2. Traps shall be set on the ground or hanged in the canopy of the tree, always in the shade, and checked weekly.

3. Chemical control measures

- 3.1. Cherries: treatments shall be applied to the crop with effective registered insecticides once the fruit begins to ripen and from the moment flies are detected in traps.

Stone fruits other than cherries: If flies are detected in traps, the orchard will be inspected weekly in order to detect fruit damage. The sample will consist on 8 fruits per tree in 25 trees. Treatments shall be applied to the crop with effective registered insecticides upon first detection of damage to fruit.

- 3.2. Growers shall avoid, when possible, the repeated use of the same insecticide or insecticides in the same chemical group to prevent the possible development of resistance.

¹ E.g: Lidded plastic bottles or containers, with four to ten 5mm holes drilled in their upper part, and filled up to 1/3rd in attractant bait such as apple cider vinegar, red wine with water or yeast.

SIGNATURES:

For the Department of Agriculture Forestry and Fisheries of the Republic of South Africa

Signed in _____ on the _____ day of _____ of the year _____

Name..... Signature.....

Title.....

For the Ministry of Agriculture, Food and Environment of Spain

Signed in _____ on the _____ day of _____ of the year _____

Name..... Signature.....

Title.....

PROVISIONAL



**Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria
Subdirección General de Acuerdos Sanitarios y Control en Frontera**

Campaña de Exportación de fruta de hueso procedente de España con destino a Sudáfrica

Anexo nº 2 Requisitos detallados impuestos por Sudáfrica

Mayo 2013

1.- Requisitos detallados impuestos por Sudáfrica

1.1 Medidas Pre-cosecha

El productor deberá llevar a cabo inspecciones y un programa de vigilancia continua para garantizar que la parcela está libre de las siguientes plagas:

Bacteria:	<i>Erwinia amylovora</i>
Hongos:	<i>Monilinia fructicola</i> <i>Monilinia fructigena</i> <i>Neonectria ditissima</i>
Ácaros:	<i>Acalitus phloeocoptes</i> <i>Amphitetranychus viennensis</i> <i>Eotetranychus carpini</i>
Insectos:	<i>Drosophila suzukii</i>

El ANEXO 4 del documento de Pautas Generales, detalla las estrategias de monitoreo y control para estas plagas. El productor tendrá la obligación de cumplimentar en su cuaderno de campo todos los controles realizados para cada una de las parcelas registradas, según lo indicado en el citado ANEXO 4, la Comunidad Autónoma o la Entidad Auditora supervisarán la correcta cumplimentación de los cuadernos de campo por parte de los productores.

El productor sólo podrá utilizar medidas preventivas autorizadas (Manejo Integrado de Plagas). En caso de detectarse cualquiera de estas plagas, la parcela no podrá exportar durante el resto de la campaña. En caso de detectarse otra(s) plaga(s) de importancia cuarentenaria potencial, el productor deberá informar inmediatamente a su Comunidad Autónoma.

Las medidas pre-cosecha contra *Monilinia* spp. se implementarán según las directrices recogidas en el **Plan de Trabajo Específico para Especies de *Monilinia***, incluido en el punto 1.4 de este anexo.

Las medidas pre-cosecha contra *A. viennensis* se implementarán según las directrices recogidas en el Annex 4 del **Plan de Trabajo Fitosanitario para la Importación de Fruta de Hueso (*Prunus* spp.)** de España a Sudáfrica incluido en el ANEXO 1 de este documento. Igualmente, las medidas pre-cosecha contra *D. suzukii* se implementarán según las directrices recogidas en el Annex 5.

1.2 Medidas Post-cosecha

El almacén de confección deberá garantizar que la fruta procedente de parcelas inscritas, se recibe, maneja, procesa y almacena separadamente de fruta procedente de parcelas no inscritas o de fruta de otra campaña. Deberá estar limpio y libre de plagas, suelo y restos vegetales y estar debidamente equipado para evitar la contaminación de la fruta.

Durante la cosecha y confección de la fruta se evitará golpearla, evitándose en todo momento

que su empaquetado coincida en lugar y tiempo con el de fruta destinada al mercado doméstico. El material de desecho deberá ser retirado de la zona de empaquetado al final de cada día.

La fruta será sometida a una limpieza, inspección, empaquetado, almacenamiento y transporte adecuado, debiendo protegerse de una posible contaminación con plagas de importancia cuarentenaria para Sudáfrica. Los tratamientos post-cosecha podrán incluir desinfección, tratamientos fungicidas o tratamientos térmicos.

Sólo se empaquetará fruta madura, inspeccionada y asintomática, limpia de hojas y restos vegetales. Para su empaquetado se usarán cajas/cartones nuevos, sin incluir ningún material de origen vegetal. Los embalajes de madera cumplirán con la NIMF-15.

1.3 Inspección Post-cosecha

La Comunidad Autónoma o una Entidad Auditora autorizada inspeccionarán y tomarán muestras representativas de cada envío de fruta para garantizar que está exento de plagas de importancia cuarentenaria. Previo a la exportación, un inspector autorizado someterá una muestra a inspección según un procedimiento que establezca un intervalo de confianza del 95% de detectar fruta infestada, si el porcentaje de infestación es del 2% o superior. La inspección post-cosecha para *Monilinia* spp. seguirá las directrices establecidas en el **Plan de Trabajo Específico para Especies de *Monilinia***, incluido en el punto 1.4 de este anexo.

Si se detectara alguna de las plagas enumeradas en el Anexo I del **Plan de Trabajo Fitosanitario para la Importación de Fruta de Hueso (*Prunus* spp.) de España a Sudáfrica**, la fruta no podrá ser exportada a Sudáfrica y la parcela de donde proceda será suspendida por el resto de la campaña.

Notas aclaratorias:

A la llegada del envío de *Prunus* spp. al puerto designado, se efectuará una inspección documental y fitosanitaria en destino. Una muestra representativa se inspeccionará para detectar cualquiera de las plagas enumeradas en el Anexo I del **Plan de Trabajo Fitosanitario para la Importación de Fruta de Hueso (*Prunus* spp.) de España a Sudáfrica**. De encontrarse alguna plaga de importancia cuarentenaria para Sudáfrica, el envío será rechazado y la parcela será suspendida por lo que resta de campaña.

En caso de incumplimiento del **Plan de Trabajo Fitosanitario para la Importación de Fruta de Hueso (*Prunus* spp.) de España a Sudáfrica**, el importador será responsable de todos los costes derivados.

1.4 Plan de Trabajo para Especies de *Monilinia*

El **Plan de Trabajo para Especies de *Monilinia*** prevé una serie de requisitos a cumplir tanto por parte del productor como por parte del almacén de confección al que se destine la fruta.

1.4.1. Medidas Culturales

El productor cumplirá las medidas relativas al control de *Monilinia* spp. (moniliosis) que establezcan las Normas Técnicas para la Producción Integrada de Fruta de Hueso de su Comunidad Autónoma o el Sistema de Producción Certificado al que se acoja.

En cualquier caso, las medidas culturales incluirán, como mínimo, las siguientes prácticas:

— Durante los meses de invierno, los productores deberán eliminar y destruir los frutos momificados y tejidos infectados para reducir el potencial de inóculo. Los residuos de la poda deberán ser destruidos o inactivados.

— Después de la floración y durante el cuajado y desarrollo de la fruta, eliminar las ramas atacadas y con síntomas. Posteriormente y hasta la madurez, eliminar los frutos atacados.

— Los productores deberán, cuando sea posible, favorecer la aireación y la insolación, realizando podas en verde y aplicar herbicidas en bandas para evitar un exceso de humedad. Si es posible, aplicar riego por goteo.

1.4.2. Tratamientos Pre-cosecha

Se realizarán un mínimo de 3 tratamientos fungicidas durante la etapa de floración y otros 3 tratamientos adicionales en el periodo comprendido entre los 28 y 10 días previos a la cosecha. Asimismo, se desarrollará una estrategia para prevenir la aparición de resistencias a los fungicidas utilizados.

El productor utilizará sólo materias activas autorizadas en España para control de *Monilinia* spp. (moniliosis) en el cultivo, respetando las limitaciones adicionales que puedan establecer los Reglamentos de Producción Integrada de su Comunidad Autónoma o, en su caso, las Normas Técnicas correspondientes. Asimismo, la fruta no deberá superar los límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por la legislación sudafricana.

Será responsabilidad del productor comprobar que las materias activas estén autorizadas por la legislación de residuos de plaguicidas sudafricana, así como conocer los LMRs permitidos.

1.4.3. Inspección Pre-cosecha y Análisis PCR

La Comunidad Autónoma o una Entidad Auditora autorizada realizarán una inspección de la parcela para las plagas enumeradas en el punto 1.1 de este anexo, **al menos 6 semanas antes de la recolección**. Durante la **inspección**, La Comunidad Autónoma o una Entidad Auditora autorizada **tomarán una muestra de 600 frutos de cada parcela** para su posterior análisis mediante PCR en laboratorio. El muestreo será dirigido, es decir, de entre los frutos disponibles se escogerán aquellos que presenten síntomas de infección por *Monilinia* spp., golpes o lesiones. Se darán preferencia a aquellas zonas donde exista mayor probabilidad de desarrollo de la enfermedad. Este procedimiento otorga un intervalo de confianza de detectar fruta infectada del 95%, si el porcentaje de infección es 0,5% o superior.

Las muestras deberán ser enviadas a un **laboratorio autorizado** por la Comunidad Autónoma correspondiente para el diagnóstico de *Monilinia* spp. Las muestras deberán ser tratadas tal y como se indica en el ANEXO 5 del documento de Pautas Generales.

Si el análisis mediante PCR resultara positivo para *M. fructicola* o *M. fructigena*, la parcela será suspendida para el resto de la campaña.

1.4.4. Inspección Post-cosecha y Análisis PCR

La Comunidad Autónoma o una Entidad Auditora autorizada inspeccionarán muestras representativas de cada envío de fruta para garantizar que está exento de *Monilinia* spp. en el momento del envío.

Para ello, deberá determinarse si el número de cajas que va a constituir el envío es mayor o menor de 2000 unidades. Si es menor o igual a 2000, la muestra la constituirán 143 cajas; si es mayor de 2000 unidades, la muestra la constituirán 150 cajas. En caso de duda, deberá tomarse una muestra de 150 cajas.

Se seleccionarán de manera aleatoria 143 o 150 confeccionadas (mientras que están conformando los palets). Estas cajas podrán ser seleccionadas directamente por el inspector o estar previamente seleccionadas, para que posteriormente se proceda a la inspección. De esta muestra se tomará una sub-muestra de 750 o 630 frutos, que será enviada a laboratorio para el diagnóstico de *Monilinia* spp.

Este procedimiento otorga un intervalo de confianza del 95% de detectar fruta infectada, si el porcentaje de infección es 0,5% o superior.

Las muestras deberán ser tratadas tal y como se indica en el ANEXO 5 de este documento. Ya en laboratorio se seguirán los protocolos establecidos en el ANEXO 6.



**Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria
Subdirección General de Acuerdos Sanitarios y Control en Frontera**

Campaña de Exportación de fruta de hueso procedente de España con destino a Sudáfrica

Anexo nº 3 Claves para la identificación de plagas en campo

Mayo 2013

Claves para la Identificación de Plagas en Campo

1) *Monilinia fructicola* y *Monilinia fructigena*

Monilinia fructicola y *M. fructigena* son hongos pertenecientes al phylum Ascomycota, y como muchos otros ascomicetos forma una fase asexual o anamórfica y otra sexual o teleomórfica sobre los frutos momificados de *Prunus* spp.

De cara a identificar los síntomas del ataque de *M. fructicola* y *M. fructigena*, es muy importante distinguirlos de la otra moniliosis presente en España, *M. laxa*. El productor debe saber que la diferenciación de las tres especies no puede realizarse de manera 100% fiable mediante observaciones de campo. Por ello, el **Plan de Trabajo Específico para Especies de *Monilinia*** requiere una inspección de frutos y un posterior análisis de las muestras mediante técnicas de laboratorio.

No obstante, la información que se aporta en este anexo puede ayudar al productor a discernir si la moniliosis está causada por *Monilinia fructicola* y/o *M. fructigena*.

Diferenciación entre las especies de moniliosis *M. fructicola*, *M. fructigena* y *M. laxa*

Monilinia fructicola (G. Winter) Honey



Fuente: CABI Crop Protection Compendium

Monilinia fructigena Honey



Fuente: CABI Crop Protection Compendium

Monilinia laxa (Aderh. & Ruhland)



Fuente: CABI Crop Protection Compendium

Las especies de *Monilinia* se diferencian en base a su gama de huéspedes, a la parte del árbol afectada y al color, tamaño y disposición sobre el fruto de los esporoquios:

Gama de huéspedes: una diferencia importante entre ellas es que *M. fructigena* incluye al manzano (*Malus* spp.) y al peral (*Pyrus* spp.) entre sus huéspedes mientras que las especies restantes afectan predominantemente a *Prunus* spp.

Parte del árbol afectada: una segunda diferencia es que *M. laxa* afecta preferentemente a las flores mientras que *M. fructicola* y *M. fructigena* tienen mayor incidencia sobre los frutos.

Características de los esporoquios: las lesiones de los anamorfos consisten en verrugas o esporoquios. Los esporoquios son haces de conidióforos de forma almohadillada, estrechamente apiñados. Los conidióforos son hifas especializadas que llevan las conidias, esto es, las esporas asexuales, en el ápice.

Cadenas ramificadas de conidios de *M. fructigena*



Fuente: www.biology.ed.ac.uk

Conidios en cadena de *Monilinia fructicola*



Fuente: www.pv.fagro.edu.uy

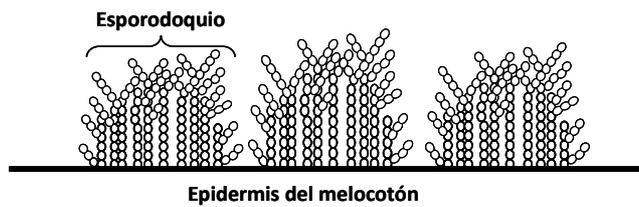


Figura: Detalle esquemático de los esporodocios de las moniliosis sobre la epidermis de la fruta

Se proponen tres caracteres basados en los esporodocios:

- ✓ **Color:** el color beige de *M. fructigena* es muy distinto del de las otras dos especies. La diferencia de color entre los esporodocios de *M. laxa* y *M. fructicola* es menos clara, gris verdoso para *M. laxa* y gris marrón para *M. fructicola*. Aparecen puntos negros en aproximadamente el 10% de la fruta infestada por *M. fructicola*.
- ✓ **Tamaño:** cuando el color no basta, puede usarse el tamaño como indicador. *M. fructigena* presenta esporodocios de gran tamaño, en forma de esferas compactas. Los de *M. fructicola* son medianos y los de *M. laxa* son los más pequeños y apenas destacan sobre la superficie de la fruta.
- ✓ **Disposición sobre la fruta:** Los esporodocios de *M. laxa*, densos, cubren toda la superficie afectada. Los de *M. fructicola* son más dispersos. Los de *M. fructigena*, a menudo dispersos, se disponen generalmente en círculos concéntricos.

Lesiones en ciruela debidas a *M. fructicola*, *M. laxa* & *M. fructigena*. Fila de arriba: izda- fruto sano; centro- *M. laxa*. dcha- *M. fructigena*; Fila de abajo: izda- *M. fructicola*; centro- *M. fructicola*; dcha- *M. laxa*.



Fuente: University of New South Wales (AU)

Lesiones en ciruela debidas a *M. fructicola*, *M. laxa* & *M. fructigena*. Fila de arriba: izda- fruto sano; centro- *M. laxa*. dcha- *M. fructigena*; Fila de abajo: izda- *M. fructicola*; centro- *M. fructicola*; dcha- *M. laxa*.



Fuente: University of New South Wales (AU)

Tabla. Resumen de los caracteres útiles para diferenciar las especies de moniliosis

Sobre frutos	<i>M. fructigena</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>M. laxa</i>
Color	blanco a beige	marrón	gris verdoso
Tamaño del esporoquio	grandes (1,5 mm de media)	medianos (1 mm de media)	pequeños (<0,5 mm de media)
Disposición sobre el fruto	a menudo dispersos en círculos concéntricos	moderadamente dispersos	densos

En la infección sobre frutos maduros se observa en primer lugar la formación de una zona de podredumbre. Los frutos podridos pueden quedar adheridos al árbol, momificándose, o caer al suelo y descomponerse. El proceso de momificación consiste en una deshidratación del fruto que al cabo del tiempo adquiere una consistencia acorchada.

NECTARINA MOMIFICADA



Fuente: IVIA

CIRUELAS MOMIFICADAS



Fuente: IVIA

Existen otras enfermedades asociadas a la fruta de hueso que también atacan al fruto, sin embargo sus síntomas son más difíciles de confundir con los de las moniliosis:

OIDIO

(*Podosphaera pannosa* (Wallr.) de Bary)



Antonia Ivascu

Fuente: CABI Crop Protection Compendium

LEPRA

Taphrina deformans (Berk.) Tul



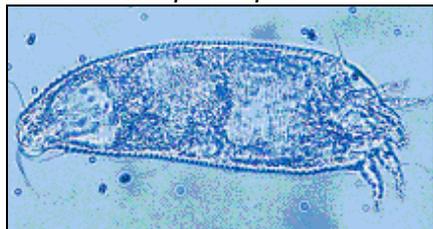
Alan L. Jones

Fuente: CABI Crop Protection Compendium

II) *Acalitus phloeocoptes*

La distribución de *A. phloeocoptes* parece restringida al sur de España, donde afecta principalmente al cultivo del ciruelo. El eriófido posee un cuerpo alargado, un poco arqueado y con anillos presentes y muy marcados. El adulto es de color blancuzco y mide de 0,13 a 0,15 mm de largo. El cuerpo está claramente segmentado con anillos con microtúbulos abdominales ovales muy marcados y sus patas anteriores presentan garras con cinco brácteas. Su pequeño tamaño los hace invisibles a simple vista, sólo pueden observarse con lupa.

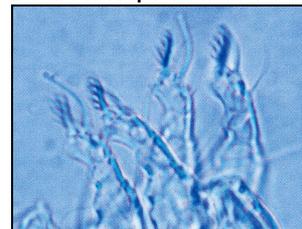
Adulto de *Acalitus phloeocoptes*



Detalle del cuerpo segmentado



Detalle de las patas anteriores

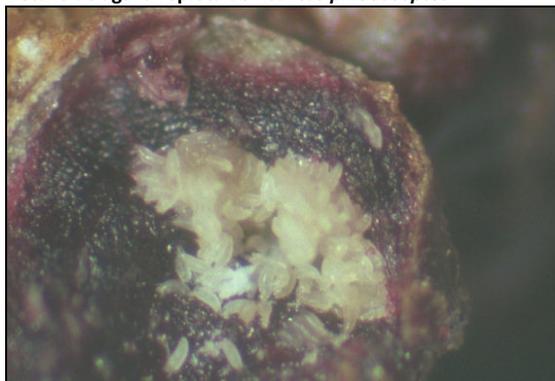


Fuente: Laboratorio de Diagnóstico de Sanidad Vegetal de Extremadura

Los síntomas que producen en las yemas de los ciruelos son unas deformaciones que a simple vista parece una proliferación anormal de yemas pero en la observación exhaustiva pueden apreciarse unas pequeñas agallas de 1 a 2 mm de diámetro mas bien redondeadas, de color pardo claro, subsféricas, brillantes y lobuladas o no, dependiendo de la época del año.

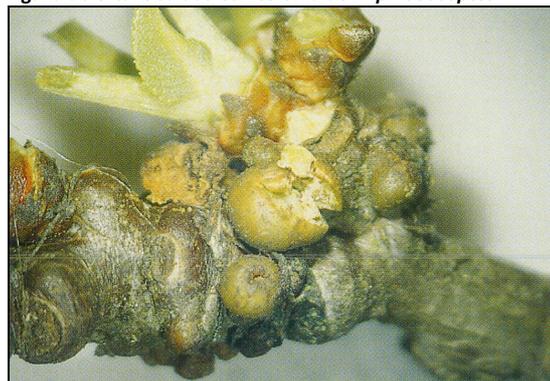
Cuando las agallas se abren, las hembras invernantes se dirigen a las zonas más tiernas del árbol y con su picadura alimenticia originan una deformación en el crecimiento de los tejidos y una nueva agalla. Estas agallas están formadas de tejido parenquimal, y son características de *A. phloeocoptes*. El ataque va dirigido fundamentalmente a las yemas. *A. phloeocoptes* puede llegar a causar deformaciones en el fruto en forma de espolón, pero es un síntoma muy poco frecuente.

Detalle de agalla repleta de *Acalitus phloeocoptes*



Fuente: Lab. de Diagnóstico de Sanidad Vegetal de Extremadura

Agalla abierta lobulada con colonia de *A. phloeocoptes*



Fuente: Lab. de Diagnóstico de Sanidad Vegetal de Extremadura

Existe otra especie de ácaro eriófido que también ataca a frutales de hueso, en concreto el melocotonero: es el *Aculus fockeui*. Su cuerpo, a diferencia de *A. phloeocoptes*, es anaranjado o amarillo, redondo y abombado y su movilidad es muy reducida.

Aculus fockeui está presente en las hojas causando una decoloración cuando se alimenta de ellas, de forma parecida al ataque de un virus.

Presencia de *Auculus. fockeui* en melocotón

Fuente: Washington State University

Daños de *A. fockeui* en hojas de melocotón.

Fuente: Washington State University

III) *Amphitetranychus viennensis* y *Eotetranychus carpini*

La distribución de *Tetranychus viennensis* parece restringida a la mitad norte de la Península. Posiblemente la competencia con *T. urticae*, plaga con la que suele estar asociada, sea la razón por la que *T. viennensis* no haya alcanzado el status de plaga de importancia en España.

Eotetranychus carpini se encuentra asociado en el norte de Europa al carpe (*Carpinus* spp.) mientras que en el sur de Europa se encuentra fundamentalmente asociada a vid. En España se encuentra presente en las CCAA de La Rioja, Navarra, Aragón, Valencia y Cataluña, estando también presente en otras zonas vitícolas. Se suele encontrar asociado con *T. urticae*.

Dado que ambos son organismos regulados por las autoridades sudafricanas, debe tenerse presente la posibilidad de que tanto *T. viennensis* como *E. carpini* estén presentes en nuestros frutales de hueso, especialmente en cerezo y en ciruelo.

Como se ha mencionado anteriormente, deben distinguirse de otras dos especies de ácaros habitualmente presentes en frutales de hueso y bien conocidas por los fruticultores: *Tetranychus urticae* y *Panonychus ulmi*. Para diferenciarlos no basta con observar los daños producidos en el cultivo sino que es necesario recurrir a características morfológicas.

Para facilitar la diferenciación de las cuatro especies, se ha elaborado un resumen de las principales características (tamaño y color de la hembra, formación de telarañas) que junto con las imágenes de las hembras, permite comparar los adultos de *T. urticae*, *P. ulmi*, *T. viennensis* y *E. carpini*.

Comparación de adultos



Tetranychus urticae (hembra)

Fuente: en.academic.ru



Panonychus ulmi (hembra)

Fuente: Facultad biología UCM



Tetranychus viennensis
(hembra estival)

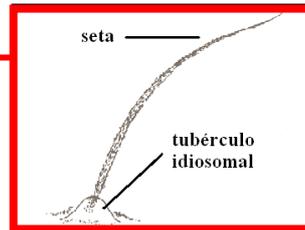
Fuente: www.ensam.inra.fr



Eotetranychus carpini (hembra)

Fuente: MARM

Características morfológicas diferenciadoras			
- Tamaño hembra: 0, 5 mm. de largo - Color hembra: transparente con coloración variable en función de la edad, de la estación y de la planta nutricia, con dos manchas laterales - Formación de telarañas: Sí	- Tamaño hembra: 0.4- 0.7 mm de largo - Color hembra: Rojizo o marrón, inserción de las setas de color blanquecino (tubérculo idiosomal) - Formación de telarañas: No	- Tamaño hembra: 0,5x0,36 mm - Color hembras : Rojo vinoso con patas blanquecinas (hembra estival) o rojo brillante y patas amarillas(hembra invernante) - Formación de telarañas: Sí	- Tamaño hembra: 0,35x 0,20 mm - Color hembra: Amarillo blanquecino (hembra estival) con manchas más oscuras en los laterales) o amarillo liso (hembra invernante) - Formación de telarañas: Sí



Panonychus ulmi (hembra)

Fuente: Facultad biología UCM; Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica

Detalle inserción de las setas

En laboratorio o bien si el productor o el técnico de la explotación está familiarizado con las técnicas de preparación de muestras de ácaros, se pueden tener en cuenta las siguientes diferencias morfológicas entre *T. viennensis* y *T. urticae*:

- ✓ Las hembras de *T. viennensis* carecen de la figura en forma de diamante formada por las estrías dorsales que se encuentra en el resto de las especies del género *Tetranychus* recogidas en España (ver Fig. 1).

El peritremo de machos y hembras es también muy característico, ya que termina en una estructura tubular reticulada (ver Fig. 2). El pomo del edeago está formado por una estructura alargada y terminada en punta que forma un ángulo recto con la base del edeago (ver Fig. 3).

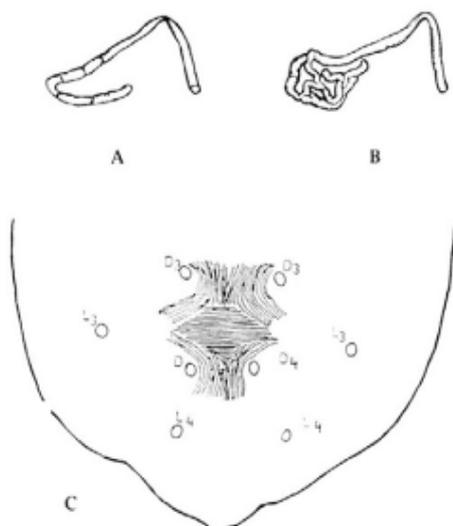


Fig. 1.—Disposición del extremo del peritremo en el género *Tetranychus*. (A) Terminado en gancho. (B) Terminado en una retícula. (C) Figura en forma de diamante en el dorso de la hembra de algunas especies en el género *Tetranychus*.

Fuente: Bol. San. Veg. Plagas, 15:271-281, 1989



Fig. 2.—Edeago de *T. urticae*.

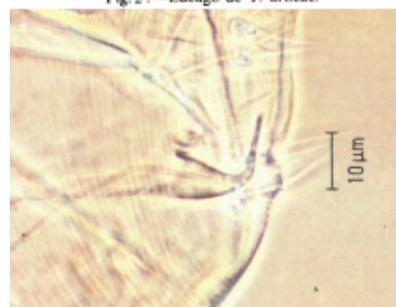


Fig. 3.—Edeago de *T. viennensis*.

En el caso de observar una especie no conocida que presente características similares a las descritas, el agricultor deberá enviar una muestra al laboratorio de diagnóstico.

IV) *Drosophila suzukii*

D. suzukii es una plaga nueva originaria del sudeste asiático ampliamente distribuida en China, India, Corea, Myanmar, Rusia y Tailandia. En Estados Unidos se detectó en el año 2008; ésta plaga está provocando daños de consideración. En Europa existen referencias de su presencia en Francia, Italia y España. Es por su gran capacidad de dispersión por lo que la EPPO la incluye en las listas de alerta.

Puede atacar a un amplio rango de frutas tanto cultivadas como silvestres que tengan la piel fina, siendo los frutos rojos junto a la cereza sus huéspedes preferidos, entre otros.

Durante la campaña 2011, en España se localizaron daños de consideración en cultivos de cerezas en la comarca del Baix Llobregat, y ya en 2012 se detectó su presencia en Andalucía.

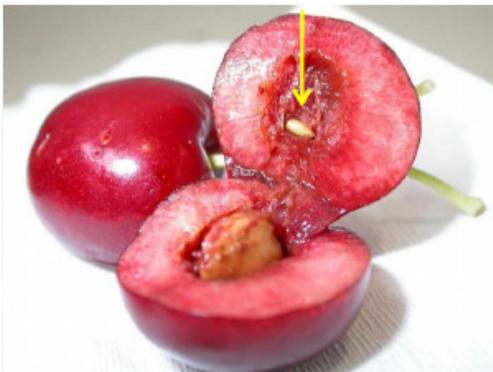
Se alimenta de frutos sanos y maduros que están aún en la planta. El daño es causado por el ovipositor de la hembra adulta al realizar la puesta y por la larva. Cuando emerge comienza a alimentarse en el interior del fruto, acelerando su ablandamiento y caída. Puede haber varias larvas en un mismo fruto. Dependiendo de la fruta, se pueden llegar a observar los orificios resultantes de la puesta de los huevos, que son usados por la larva para respirar. A medida que se desarrolla la larva alrededor de los orificios, se puede observar un ablandamiento de la epidermis con distinta tonalidad. Estas heridas pueden ser la vía de entrada de otros patógenos.

Los daños en cerezas inicialmente se podrían confundir con un ataque de *Rhagoletis cerasi*, aunque la diferencia radica en que los frutos atacados por *D. suzukii* pueden presentar mayor número de picadas.

Daños por *R. cerasi* en cereza



Daños por *D. suzukii* en cereza



Fuente: Generalitat de Catalunya, 2013

Fuente: Generalitat de Catalunya, 2013

Para facilitar la diferenciación de ambas especies, se muestran a continuación fotografías de larvas, pupas y adultos tanto de una especie como de otra.

R. cerasi

LARVA



Fuente: niskoselo.com

D. suzukii



Fuente: Washington State University



Fuente: Generalitat de Catalunya, 2013



Fuente: Generalitat de Catalunya, 2013

PUPA

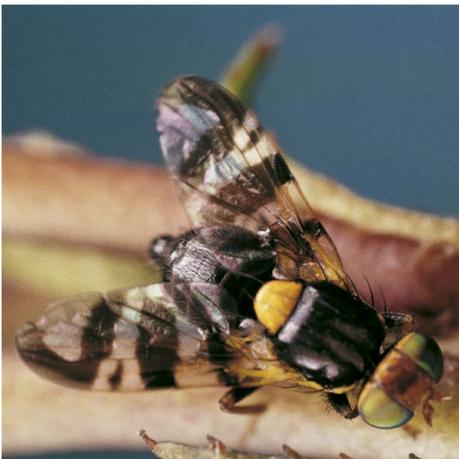


Fuente: Generalitat de Catalunya, 2013



Fuente: Generalitat de Catalunya, 2013

ADULTO



Fuente: www.phytoma.com



Fuente: Generalitat de Catalunya, 2013

V) *Neonectria ditissima*

Neonectria ditissima ataca principalmente al manzano, pero a veces también se encuentra en peral y membrillero; e incluso sobre roble, haya, álamo, etc.

Este hongo constituye una enfermedad de la madera que forma básicamente chancros en ramas, normalmente en torno a cicatrices foliares, heridas o cortes de poda. Los síntomas aparecen tanto en ramas viejas como jóvenes y comienzan por alteraciones en la corteza, que se oscurece y se seca; al seguir el crecimiento del árbol, esta zona necrosada se agrieta y forma un chancro que deja al aire la médula del árbol. Este chancro se sigue desarrollando, hasta que rodea todo el perímetro de la rama y muere la parte superior.

Síntomas en manzano (cv. Cox)



Fuente: CABI Crop Protection Compendium

Neonectria ditissima en una rama de frutal



Fuente: CABI Crop Protection Compendium

Después de un tiempo suelen aparecer unas eflorescencias de color amarillento o rosado en las zonas infectadas, que constituyen su fase asexual. Suele producir un debilitamiento del árbol por la formación de los chancros y por la muerte de los vástagos de crecimiento.

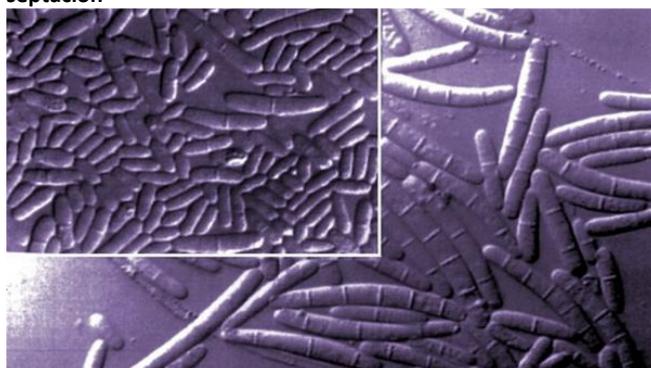
Hiberna en forma de micelio, esporodoquios y peritecas. Pueden encontrarse durante todo el año conidias y ascosporas, aunque su producción y liberación depende de la lluvia.

Peritecas de *Neonectria ditissima* en manzano



Fuente: CABI Crop Protection Compendium

Conidias de dos aislados con el rango de tamaño y grado de septación



Fuente: CABI Crop Protection Compendium

VI) *Erwinia amylovora*

La enfermedad del fuego bacteriano está causada por la bacteria *Erwinia amylovora*, considerada como organismo nocivo de cuarentena en la Unión Europea, para la que existe legislación específica sobre medidas preventivas contra la introducción y difusión (RD 58/2005), así como un programa nacional de erradicación y control del fuego bacteriano de las rosáceas (RD 1201/1999 modificado por el RD 1786/2011).

En España, se ha detectado diversos focos de fuego bacteriano desde 1995 en distintos huéspedes y en varias Comunidades Autónomas, donde se han aplicado programas intensivos de erradicación. Tras las actuaciones de erradicación efectuadas en los focos identificados, la enfermedad no está implantada en España excepto en la Comunidad Autónoma de Castilla y León y Extremadura. Hasta el año 2011, todas las zonas de España disfrutaban de la condición de zona protegida para la Unión Europea, pero desde entonces Castilla y León, y Extremadura han perdido recientemente este privilegio.

Erwinia amylovora afecta a numerosas especies de rosáceas: frutales (peral, manzano, membrillero, níspero), ornamentales (*Cotoneaster*, *Pyracantha*, *Stranvaesia*) y silvestres (espino albar, serbal).

Los síntomas, que aparecen en primavera, son: ennegrecimiento de una o varias flores del corimbo y oscurecimiento del pedúnculo floral; coloración negra o rojiza de brotes, curvándose en cayado de pastor; oscurecimiento de frutos que acaban momificándose; formación de chancros en tronco y ramas, en ocasiones con exudados. Pelando el tallo superficialmente aparecen unas estrías oscuras. El árbol adquiere un aspecto de quemado.

Síntomas de *Erwinia amylovora*: exudado de bacteria en fruto infectado de manzano



Fuente: CABI Crop Protection Compendium

Síntomas de *Erwinia amylovora*: infección floral en un huésped ornamental, *Cotoneaster salicifolius*



Fuente: CABI Crop Protection Compendium



**Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria
Subdirección General de Acuerdos Sanitarios y Control en Frontera**

Campaña de Exportación de fruta de hueso procedente de España con destino a Sudáfrica

Anexo nº 4 Monitoreo y Programa de Vigilancia

Mayo 2013

Monitoreo y Programa de Vigilancia

I) *Monilinia fructicola* y *Monilinia fructigena*

Para garantizar que la parcela está libre de *Monilia fructicola* y *Monilinia fructigena*, deberán seguirse los requisitos establecidos en el **Plan de Trabajo Específico para especies de *Monilinia***.

El control de la mayoría de enfermedades que pueden atacar la fruta de hueso debe realizarse de forma preventiva y viene condicionado por la problemática existente durante el periodo vegetativo anterior (nivel de inóculo), los estados fenológicos más sensibles y su epidemiología. Los ataques de *Monilinia* spp. pueden darse desde la época de floración hasta la recolección, si se dan condiciones favorables.

El factor más importante para la infección es la presencia de humedad; así con el 100% de humedad relativa todos los órganos florales son atacados y con un 70%-80% de humedad relativa la infección sólo ocurre en los estambres y estigmas. La temperatura óptima está entre los 20 y 24° C.

UMS	UMS/UMP	Época	Umbral y/o Criterio Mínimo de Intervención	Recomendaciones
Árbol entero	-	De floración a recolección, si se dan condiciones favorables.	Los establecidos en el Plan de Trabajo Específico para especies de <i>Monilinia</i> .	Las establecidas en el Plan de Trabajo Específico para especies de <i>Monilinia</i> .

Unidad de muestreo primaria (UMP): árbol.

Unidad de muestreo secundaria (UMS): árbol.

II) *Acalitus phloeocoptes*

El seguimiento de *Acalitus phloeocoptes* se realizará conforme al Reglamento de Producción Integrada de la Comunidad Autónoma o las Normas Técnicas del sistema de producción certificado pertinente. En las Comunidades Autónomas en las que no se especifique la plaga en concreto, habrá que seguir los controles que se establezcan para ácaros o eriófidios. En aquellas en las que no existe un control establecido, se propone la siguiente estrategia de control:

UMS	UMS/UMP	Época	Umbral y/o Criterio Mínimo de Intervención	Recomendaciones
Brotes	1	A la salida de adultos de las agallas.	Presencia de formas móviles	Podar las ramas afectadas

Unidad de muestreo primaria (UMP): árbol.

Unidad de muestreo secundaria (UMS): brote.

Número de UMP: 25

III) *Amphitetranychus viennensis*

Para el seguimiento de este ácaro se recomienda:

- Inspeccionar la superficie de las hojas con el objeto de buscar moteados producidos por la alimentación del insecto así como cierto combamamiento de las hojas.
- Muestrear tallos y sépalos para encontrar hembras en diapausa o poblaciones propagativas.
- Inspeccionar las grietas en tallos y ramas para buscar hembras en diapausa bajo la corteza.
- Aplicación de acaricidas en primavera cuando las hembras están activas, en botón rosa o cuando se alcancen los umbrales.

Para garantizar que la parcela está libre de *A. viennensis*, deberán seguirse los requisitos establecidos en el Anexo 4 del **Plan de Trabajo Fitosanitario para la Importación de Fruta de Hueso (*Prunus spp.*) de España a Sudáfrica.**

UMS	UMS/UMP	Época	Umbral y/o Criterio Mínimo de Intervención	Agentes Biológicos	Recomendaciones
Hojas	2	Invierno	Presencia de individuos en hoja en la primera mitad del ciclo vegetativo.	<i>Amblyseius</i> sp. <i>Anthocoris</i> sp. <i>Eusius stipulatus</i> <i>Stethorus</i> sp. <i>Typhlodromus</i> <i>phialatus</i>	No mezclar con fungicidas por posibles fitotoxicidades
Hojas	2	Desde caída de pétalos a recolección	Presencia de individuos en hoja en la segunda mitad del ciclo vegetativo.		

Unidad de muestreo primaria (UMP): árbol.

Unidad de muestreo secundaria (UMS): hoja.

Número de UMP: 25

IV) *Eotetranychus carpini*

Para el seguimiento de este ácaro se recomienda:

- Inspeccionar la superficie de las hojas con el objeto de buscar moteados producidos por la alimentación del insecto así como cierto combamamiento de las hojas.
- Muestrear tallos y sépalos para encontrar hembras en diapausa o poblaciones propagativas.
- Inspeccionar las grietas en tallos y ramas para buscar hembras en diapausa bajo la corteza.
- Aplicación de acaricidas en primavera cuando las hembras están activas, en botón rosa o cuando se alcancen los umbrales.

El seguimiento de *Eotetranychus carpini* se realizará conforme al Reglamento de Producción Integrada de la Comunidad Autónoma o las Normas Técnicas del sistema de producción certificado pertinente. En las Comunidades Autónomas en las que no se especifique la plaga en concreto, habrá que seguir los controles que se establezcan para ácaros o tetránquidos. Para aquellas Comunidades Autónomas en las que no existe un control establecido, se propone la siguiente estrategia de control:

UMS	UMS/UMP	Época	Umbral y/o Criterio Mínimo de Intervención
Hojas	2	Invierno	Presencia de individuos en hoja en la primera mitad del ciclo vegetativo.
Hojas	2	Desde caída de pétalos a recolección	Presencia de individuos en hoja en la segunda mitad del ciclo vegetativo.

Unidad de muestreo primaria (UMP): árbol.

Unidad de muestreo secundaria (UMS): hoja.

Número de UMP: 25

V) *Drosophila suzukii*

Para garantizar que la parcela está libre de *D. suzukii*, deberán seguirse los requisitos establecidos en el Anexo 5 del **Plan de Trabajo Fitosanitario para la Importación de Fruta de Hueso (*Prunus spp.*) de España a Sudáfrica.**

Las estrategias de control recomendadas para *D. suzukii* son:

- Recolectar la fruta en el momento óptimo y no dejar que sobremadure.
- Eliminar restos de cosecha y no abandonar fruta en el campo por ser ésta susceptible de ser atacada. Para ello, se recomienda meter la fruta de destrío en bolsas de plástico cerradas y dejarlas al sol durante la semana, para que el efecto de la temperatura y la humedad mate las larvas.
- Mantener las parcelas con un bajo nivel de humedad, regando la base de los árboles evitando mojar las hojas, para así dificultar el desarrollo de la mosca.
- Los tratamientos fitosanitarios se realizarán al inicio del envero.
- Un tratamiento de frío en post-cosecha puede limitar la difusión de la plaga.
- Como organismos de control biológico, se puede utilizar *Beauveria bassiana*. Además, *Pachytrepoideus vindemniae* y *Leptopilina boulardi* se han identificado como parasitoides de *D. suzukii*.

VI) *Neonectria ditissima*

En el siguiente cuadro se resumen los síntomas asociados y las estrategias de control más usuales para *Neonectria ditissima*:

Enfermedad	Síntomas	Medidas Culturales	Recomendaciones
Chancro común <i>Nectria galligena</i>	Manzano y peral. Chancros en zonas terminales de brotes, ramas y tronco. Se inicia cerca de yemas, heridas y cortes de poda. A veces con desprendimiento papiráceo de la piel.	Eliminar brotes afectados como fuente de inóculo. Eliminación de chancros. Proteger las heridas de poda. Proteger las heridas naturales provocadas por la caída de la hoja.	Proteger antes periodos lluviosos en primavera y verano.

VII) *Erwinia amylovora*

En el caso de *E. amylovora*, es necesario distinguir entre las actuaciones previstas para la zona según tengan o no el estatus comunitario de Zona Protegida en relación al fuego bacteriano de las rosáceas. A continuación se resumen las actuaciones requeridas según la legislación vigente (RD 1201/1999 modificado por el RD 1786/2011):

- Zonas que tengan el estatus comunitario de Zona Protegida:

Los productores deberán notificar inmediatamente al órgano competente de la Comunidad Autónoma la existencia de vegetales o productos vegetales con síntomas de fuego bacteriano.

De acuerdo con lo previsto en la Orden de 31 de enero de 1994, por la que se establecen las modalidades de los estudios a realizar en el marco del reconocimiento por la Unión Europea de las zonas protegidas en España, expuestas a riesgos fitosanitarios específicos, las Comunidades Autónomas efectuarán en sus respectivos ámbitos territoriales **prospecciones sistemáticas** encaminadas a descubrir la presencia de la bacteria sobre las especies de rosáceas, cultivadas o espontáneas, de los géneros hospedantes del fuego bacteriano, con particular atención a los viveros.

Si como consecuencia del resultado de las prospecciones o de la comunicación se confirmara la presencia de un foco inicial de fuego bacteriano, la Comunidad delimitará la extensión del foco y se ordenará el arranque y destrucción inmediata de toda planta contaminada y de todas las plantas huéspedes sin síntomas de su entorno inmediato. Posteriormente, se establecerá una zona de seguridad alrededor del foco detectado, que cubrirá una extensión mínima de un círculo de 1 kilómetro de radio y en la cual se efectuará un seguimiento intensivo en primavera y otoño, durante dos años consecutivos antes de considerar erradicado el foco.

- Zonas que no tengan el estatus comunitario de Zona Protegida (Castilla y León, y Extremadura) establecidas en el Reglamento (CE) nº 690/2008 de la comisión de 4 de julio de 2008 y posteriores modificaciones por el que se reconocen determinadas zonas protegidas en la Comunidad expuestas a riesgos fitosanitarios específicos (texto refundido)

Para evitar la propagación de la enfermedad se aplicarán, por el propietario o titular de las plantas afectadas, alguna de las medidas obligatorias siguientes:

a) Arranque y destrucción inmediata de toda planta hospedante con síntomas, sin necesidad de un análisis bacteriológico que lo confirme.

b) Extirpación y destrucción de partes de la planta huésped con síntomas, mediante el corte efectuado, al menos, a 40 centímetros del límite proximal visible de la infección y con desinfección inmediata del instrumental empleado.

En ambos casos, se efectuarán tratamientos fitosanitarios en las épocas adecuadas con un principio activo autorizado.

Sin embargo, la legislación de la Unión Europea no incluye las especies del género *Prunus* L. como hospedantes del fuego bacteriano. Está citado que *E. amylovora* puede afectar a huéspedes esporádicos del género *Prunus* L., como el ciruelo japonés, pero sólo en condiciones de elevado nivel de inóculo.

En cualquier caso, es responsabilidad del productor asegurarse de que la parcela está libre del patógeno mediante inspecciones y un programa de vigilancia continua. Para ello en el siguiente cuadro se resumen los síntomas asociados y las estrategias de control más usuales para *E. amylovora*:

Enfermedad	Síntomas	Medidas Culturales
Fuego bacteriano <i>Erwinia amylovora</i>	Manzano y peral. Necrosis de corimbos florales, brotes y frutos. Chancros con exudaciones en ramas y tronco.	Eliminar inmediatamente los árboles afectados. Desinfectar las herramientas de poda.



**Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria
Subdirección General de Acuerdos Sanitarios y Control en Frontera**

Campaña de Exportación de fruta de hueso procedente de España con destino a Sudáfrica

Anexo nº 5 Toma y preparación de muestras para envío a laboratorio

Mayo 2013

Toma y Preparación de Muestras para Envío a Laboratorio

La Comunidad Autónoma o una Entidad Auditora autorizada realizará una inspección de la parcela al menos 6 semanas antes de la recolección para las plagas enumeradas a continuación, por ser estas de importancia cuarentenaria para Sudáfrica presentes en España, y que son por tanto relevantes para las exportaciones de fruta de hueso a Sudáfrica:

Bacteria:	<i>Erwinia amylovora</i>
Hongos:	<i>Monilinia fructicola</i> <i>Monilinia fructigena</i> <i>Neonectria ditissima</i>
Ácaros:	<i>Acalitus phloeocoptes</i> <i>Amphitetranychus viennensis</i> <i>Eotetranychus carpini</i>
Insectos:	<i>Anarsia lineatella</i> <i>Cydia funebrana</i> <i>Drosophila suzukii</i> <i>Eupoecilia ambiguella</i> <i>Rhagoletis cerasi</i>

Durante la inspección, la Comunidad Autónoma o una Entidad Auditora autorizada tomará una muestra de 600 frutos de cada parcela para su posterior análisis mediante PCR en laboratorio. El muestreo será dirigido, es decir, de entre los frutos disponibles se escogerán aquellos que presenten síntomas de infección por *Monilinia* spp., golpes o lesiones. Se darán preferencia a aquellas zonas donde exista mayor probabilidad de desarrollo de la enfermedad. Este procedimiento otorga un intervalo de confianza de detectar fruta infectada del 95%, si el porcentaje de infección es 0,5% o superior.

Para enviar la muestra a laboratorio, los frutos se envolverán en papel de periódico para que se absorba la humedad, y posteriormente se enviará al laboratorio en bolsas plásticas cerradas o cajas de cartón. Siempre que sea posible, se recomienda seleccionar aquellas muestras que sólo presenten síntomas iniciales de la infección, para evitar que el avance de la enfermedad deteriore la muestra durante el transporte.

**Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria
Subdirección General de Acuerdos Sanitarios y Control en Frontera**

Campaña de Exportación de fruta de hueso procedente de España con destino a Sudáfrica

Anexo nº 6 Identificación de especies de *Monilinia* en laboratorio

Mayo 2013

Identificación de Especies de *Monilinia* en Laboratorio

De acuerdo al Artículo 2 (1) del **Plan de Trabajo Específico para Especies de *Monilinia***, las muestras recogidas en la inspección pre-cosecha y post-cosecha se tratarán con paraquat tal y como describen Northover & Cerkauskas (1994) o tratadas con frío como describen Michailides et al. (2000) y cultivadas en cámara húmeda en laboratorio.

Aquellos frutos que muestren síntomas de podredumbre parda deberán analizarse mediante un test PCR de acuerdo con una de los métodos de identificación para *M. fructicola* y *M. fructigena* recomendados por la EPPO, es decir, Hughes *et al.* (2000), loos & Frey (2000) o Côte *et al.* (2004).

A modo ilustrativo, se adjunta el protocolo del método desarrollado por loos & Frey (2000), tras las mejoras implementadas en 2008 por un estudio colaborativo europeo.

Identification of *Monilinia fructicola* by conventional PCR (loos & Frey, 2000)

This protocol initially developed by loos & Frey (2000) was further improved and validated by a European collaborative study (loos & Iancu, 2008). This test was ring-tested according to EN ISO 16140 in 2007 by 13 European laboratories through the European mycological network (EMN) regarding the molecular part of the test, excluding the extraction. The collaborative study showed that the accuracy, sensitivity and selectivity of the test were 100%, 100% and 100%, respectively. The accordance and concordance (i.e. qualitative repeatability and reproducibility) of the test were also estimated to 100% each (loos & Iancu, 2008). Species specific primers have been designed. The specificity of the primers was tested with a large collection of *Monilinia* species consisting of 17 isolates of *M. laxa*, 16 isolates of *M. fructigena* and 6 isolates of *M. fructicola*. The primers have also been tested with *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*, two fungi close to the genus *Monilinia*, and with DNA extracted from other pathogens commonly associated with brown rot on trees or fruits. No amplification was obtained with any of the fungal species tested.

1. General Information

- 1.1. This protocol has been developed by loos & Frey (2000).
- 1.2. DNA is extracted (A) from cultures or (B) from suspect fruits.
- 1.3. The target regions are two polymorphic regions of the internal transcribed spacer region (ITS).
- 1.4. The amplicon covers a region spanning from bases 88–108 (ITS 1) to bases 422–443 (ITS 2).
- 1.5. Amplicon size is 356 bp.
- 1.6. Oligonucleotides: forward primer 5'-TATGCTCGCCAGAGGATAATT-3' (ITS1-Mfc1), reverse primer 5'-TGGGTTT TGGCAGAAGCACACT-3' (ITS4Mfc1). Care should be taken that the primers are purified.
- 1.7. Taq DNA polymerase at a concentration of 5 U μL^{-1} .
- 1.8. Nucleotide concentration: 0.2 μM for the oligonucleotides, 150 μM each for the dNTPs
- 1.9. Taq polymerase buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl.
- 1.10. TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8).
- 1.11. PCR grade water is used for all reactions.
- 1.12. PCR reactions were initially developed with a Hybaid thermal cycle model Omn-E, but other thermocyclers are suitable.

2. Methods

2.1. Nucleic acid extraction and purification

2.1.1. DNA is extracted (A) from cultures from a 1-cm² plug taken from a culture of the fungi or (B) from suspect fruits by cutting approximately 1 cm² of suspect tissue with a scalpel and transferred into a mL microcentrifuge tube. The sample is then ground for 2 min with two 3-mm steel or tungsten carbide beads and 400 µL of the lysis buffer, at a frequency of 30 Hz with a bead beater (Tissuelyser®; Qiagen, les Ullis, FR, or equivalent). The samples may also be ground in a mortar by a pestle with liquid nitrogen, or using other efficient grinding techniques.

2.1.2. Nucleic acid extraction: DNA is extracted with the hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) /proteinase K method (Henrion et al., 1994). Other commercial DNA extraction kits are also suitable (loos, pers. comm.) and should preferably used since they require less toxic reagents.

2.1.3. Fungal or infected plant tissue DNA samples are stored at less than) 17 °C until analysis

2.2. Polymerase chain reaction – PCR (final concentration)

2.2.1. Total reaction volume of a single PCR reaction: 20 µL

2.2.2. PCR buffer: 1x

2.2.3. 2 mM MgCl₂

2.2.4. 150 µM of each dNTPs

2.2.5. 0.0375 U per µL of Taq polymerase

2.2.6. 0.2 µM forward primer

2.2.7. 0.2 µM reverse primer

2.2.8. 1–3 ng per µL of template DNA.

2.2.9. PCR grade water is added to 20 µL

2.2.10. PCR cycling parameters: 3 min at 94 °C followed by 35 cycles of denaturation (94 °C, 30 s), annealing (63 °C, 30 s), and extension (72 °C, 60 s), with a final extension (72 °C, 10 min).

3. Essential Procedural Information

3.1. PCR products are separated on 1% agarose gel in 0.5×TBE buffer.

3.2. A negative control (no target DNA) should be included to ensure the absence of contamination, as well as a positive control corresponding to the limit of detection (diluted genomic DNA from a reference strain of *M. fructicola*, or diluted subcloned *M. fructicola* ITS1Mfcl / ITS4Mfcl PCR product). In addition, since two other European *Monilinia* species, namely *M. fructigena* and *M. laxa* may be present in the same ecological niche and are phylogenetically very close to *M. fructicola*, genomic DNA from reference strains of both species may be used in each PCR run as specificity controls for the PCR reaction.

3.3. The quality of the DNA extract may be assessed for instance by using an ad hoc internal amplification control or by testing the extract in PCR with the universal fungal ribosomal genes primers ITS1 and ITS4 (White et al., 1990). In the latter case, the PCR conditions are those described above, simply replacing the ITS1Mfcl/ITS4Mfcl primers with ITS1 and ITS4 primers, and decreasing the annealing temperature to 50 °C. A positive signal following this test would mean that the DNA extract was amplifiable: DNA was successfully extracted and a sufficiently low level of inhibitory compounds was co-extracted.

3.4. Plant samples whose DNA extract yields a 356-bp fragment should be considered as infected by *M. fructicola*. Samples whose DNA extract does not yield the expected fragment should be considered as negative only providing that the DNA extract was amplifiable and that there was no significant inhibitory effect.