

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

SANIDAD VEGETAL

Resolución 98/2003

Apruébanse las Normas de Funcionamiento de los Laboratorios de Diagnóstico de Enfermedades para Plantas Cítricas de Vivero y/o sus Partes. Instalaciones. Técnicas de laboratorio. Técnicas de invernáculo. Extracción de muestras. Certificado de diagnóstico.

Bs. As., 5/2/2003

Visto el expediente N° 800-011266/2001 del Registro de la ex-SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTACION, y

CONSIDERANDO:

Que a los fines de resguardar la calidad y sanidad de los materiales de propagación de plantas cítricas y/o sus partes que se encuentren en disponibilidad para la entrega al productor, es necesario establecer la normativa referente a la habilitación y funcionamiento de los Laboratorios que certificarán dicha calidad y sanidad.

Que las condiciones que debe reunir un laboratorio y las normas para su funcionamiento dependen de los análisis y del material que pretenda analizar.

Que a la presente norma complementa la Resolución del Registro de la ex-SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTACION N° 149 de fecha 27 de octubre de 1998 referida a las Normas para la Producción, Comercialización e Introducción de Plantas Cítricas de Vivero y sus Partes.

Que en virtud del artículo 13 de la Ley N° 20.247, los laboratorios de análisis deben estar inscriptos en el Registro Nacional de Comercio y Fiscalización de Semillas.

Que por los artículos 1°, 2° y 3° de la Resolución 42 de fecha 6 de abril de 2000 se crean categorías que contemplan a los laboratorios.

Que la resolución n° 42 de fecha 6 de abril de 2000 en su ANEXO I establece que los laboratorios deberán cumplir previamente a su inscripción, con normas establecidas en la materia.

Que a los efectos de dar cumplimiento a la Resolución de la ex-SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTACION N° 149 de fecha 27 de octubre de 1998, es necesario contar con laboratorios y establecer protocolos de habilitación a los cuales se deberán ajustar los laboratorios para inscribirse.

Que la COMISION NACIONAL DE SEMILLAS, creada por la Ley de Semillas y Creaciones Fitogénéticas N° 20.247, se ha pronunciado favorablemente según surge del Acta N° 288 de fecha 13 de agosto de 2001.

Que la DIRECCION DE LEGALES del AREA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS de la DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS JURIDICOS del MINISTERIO DE ECONOMIA, ha tomado la intervención que le compete, en virtud de lo dispuesto por la Resolución de la PROCURACION DEL TESORO DE LA NACION N° 7 de fecha 4 de febrero de 2002.

Que el suscrito es competente para dictar el presente acto en virtud de las facultades que le otorga el Decreto N° 475 del 8 de marzo de 2002.

Por ello,

EL SECRETARIO DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS

RESUELVE:

Artículo 1° — Apruébase las **NORMAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS**

DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES PARA PLANTAS CITRICAS DE VIVERO Y/O SUS PARTES que como Anexos I a VII forman parte integrante de la presente resolución.

Art. 2º — Los interesados deberán presentar la solicitud mencionada en el ANEXO I ante la Dirección de Calidad, Laboratorio Central de Análisis de Semillas (L.C.A.S.), de la SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS en la que se consignarán datos del propietario, dirección del laboratorio, profesionales responsables, instalaciones, equipos e instrumental y demás aspectos que se fijan en la presente resolución.

Art. 3º — La habilitación de laboratorios queda supeditada a la verificación de la capacidad técnica, instrumental y operativa del solicitante para la realización de los análisis para los cuales se requiere habilitación, la que estará a cargo de la Dirección de Calidad Laboratorio Central de Análisis de Semillas (L.C.A.S.), quien deberá solicitar la intervención del LABORATORIO DE SANIDAD VEGETAL (L.S.V.) dependiente del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA de esta Secretaría, para evaluar los aspectos de su competencia.

Art. 4º — Los diagnósticos de enfermedades que podrán realizar los laboratorios estarán condicionados por la idoneidad técnica del responsable y la disponibilidad de instrumental y equipo mencionado en el ANEXO II y III de la presente resolución.

Art. 5º — Una vez obtenida la habilitación el interesado deberá proceder a su inscripción ante el Registro Nacional del Comercio y Fiscalización de Semillas cumplimentando la reglamentación pertinente.

Art. 6º — Queda prohibida en el ámbito nacional la actuación de cualquier laboratorio que no cumplimente los requisitos establecidos en la presente resolución.

La falta de inscripción en el Registro Nacional de Comercio y Fiscalización de Semillas, hará pasible a los mismos de las sanciones previstas en el artículo 41 de la Ley N° 20.247. La falta de cumplimiento de cualquiera de las exigencias establecidas en la presente resolución facultará a la SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS a cancelar la habilitación del laboratorio, lo que dará lugar a la caducidad de la inscripción en el Registro Nacional de Comercio y Fiscalización de Semillas.

Art. 7º — Los certificados emitidos por los laboratorios habilitados tendrán validez en el orden nacional y deberán ser confeccionados en los formularios autorizados que se detallan en el ANEXO VII de la presente resolución.

A petición de un laboratorio habilitado el Laboratorio Central de Análisis de Semillas (L.C.A.S) ensayará por sí mismo o por terceros las muestras cuestionadas emitiendo su veredicto al respecto.

Art. 8º — La Dirección de Calidad, Laboratorio Central de Análisis de Semillas (L.C.A.S.) de la SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS, actuando en forma conjunta con el SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA, Laboratorio de Sanidad Vegetal, en los temas de su competencia, llevará a cabo la auditoría y la supervisión de los laboratorios inscriptos, debiendo éstos cumplimentar las directivas que se emitan sobre criterios de interpretación de resultados, procedimientos analíticos y ejecución de los ensayos de verificación.

Art. 9º — Los profesionales responsables quedarán sujetos a lo dispuesto en el punto 2 del Anexo III de la Resolución ex-INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS N° 42 de fecha 6 de abril de 2000.

Art. 10. — Toda modificación en la situación del laboratorio en cuanto a propietario, domicilio, instalaciones o profesionales responsables, deberá comunicarse en forma fehaciente a la Dirección de Calidad, Laboratorio Central de Análisis de Semillas (L.C.A.S.) dentro de los TREINTA (30) días de producida.

Art. 11. — Comuníquese, publíquese, dése a la Dirección Nacional del Registro Oficial y

SOLICITUD DE HABILITACION DE LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES DE PLANTAS CITRICAS DE VIVERO Y SUS PARTES.

PROPIETARIO

Nombre y Apellido o razón social

Domicilio CP Localidad Provincia.....

Teléfono/Fax/Correo electrónico

LABORATORIO

Nombre del Laboratorio

Domicilio CP... Localidad Provincia.....

Teléfono/Fax/Correo electrónico

PROFESIONALES RESPONSABLES

Jefe o Director Técnico

Nombre y Apellido LE/LC/DNI N°

Domicilio CP Localidad Provincia.....

Título expedido por Matr. Prof. N°

Teléfono/Fax/Correo electrónico

Reemplazante autorizado

Nombre y Apellido LE/LC/DNI N°

Domicilio CP Localidad Provincia.....

Título expedido por Matr. Prof. N°

INSTALACIONES

Agregar plano o croquis.

INSTRUMENTAL Y EQUIPOS

Agregar el detalle correspondiente de acuerdo a las normas de la presente resolución.

.....

Firma del propietario o representante

.....

Firma del profesional responsable

.....

Firma del reemplazante autorizado

NORMAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES DE PLANTAS CITRICAS DE VIVERO Y SUS PARTES.

1- DISPOSICIONES GENERALES:

El alcance de esta Normativa es referente a los diagnósticos obligatorios de enfermedades transmitidas por injerto a:

1. Plantas Madre Original y Planta Madre de Reserva.
2. Material de Fundación.
3. Plantas yemeras.
4. Plantas Madres Semilleras.
5. Plantas certificadas.

La duración de los diagnósticos (meses-horas) y su repetición se harán según el Anexo I de la Resolución N° 149/98.

Los laboratorios de diagnóstico de enfermedades para plantas cítricas de vivero y sus partes, deberán comprometerse a cumplir las siguientes normas y proporcionar al responsable técnico y/o analista las condiciones necesarias para el desarrollo y desempeño de su/s función/es.

El responsable técnico y/o analista deberá tener conocimiento del compromiso y los objetivos de estas normas.

Los conceptos omitidos y/o no previstos en estas normas serán resueltos por el INASE y/o la Dirección de Calidad de acuerdo a la competencia de los mismos.

Tanto el Director Técnico como el reemplazante autorizado deberán estar capacitados en técnicas de detección mediante métodos biológicos, bioquímicos y moleculares de enfermedades de plantas cítricas de viveros y sus partes, según normas técnicas de la dirección de calidad del INASE, u otras que demuestren ser adecuadas para tal fin. Los mismos avalarán con su firma los certificados que expidan haciéndose responsable de su contenido.

Los analistas (o técnicos) deberán poseer entrenamiento e idoneidad en el diagnóstico de enfermedades transmisibles por injerto de plantas cítricas de viveros y sus partes, participar en cursos y reuniones técnicas. Se deberá proveer entrenamiento para el personal auxiliar.

2- INSTALACIONES:

Debido a la naturaleza de los diagnósticos necesarios para la certificación sanitaria de plantas cítricas y sus partes, toda entidad dedicada a esta actividad, deberá contar con una sección de laboratorio y una de invernáculo, adecuadamente equipados.

El ingreso de personas ajenas a estas instalaciones debe limitarse al mínimo necesario para disminuir los riesgos de contaminación.

El personal (tanto técnicos como auxiliares) deberán restringir su movimiento dentro de las instalaciones a las tareas que tienen asignadas.

A - LABORATORIO:

El área del laboratorio y cada una de sus dependencias deberán ser compatible con el volumen de muestras que se procesen y con el personal disponible. Se deberá establecer una separación eficaz entre zonas vecinas cuando se desarrollen en ellas actividades incompatibles. El acceso y el uso de todos los sectores que influyan sobre la calidad de estas actividades, deberán ser definidos y controlados. Estos sectores estarán detallados en un croquis que deberá presentarse al momento de la solicitud de habilitación. Incumbe al laboratorio cumplir con las exigencias vigentes en materia de salud y seguridad.

El laboratorio deberá disponer de los siguientes sectores:

- Recepción y registro de muestras: Con acceso externo, que asegure independencia de las demás dependencias.
- Sector de acondicionamiento y lavado de muestras.
- Sector de flujo laminar.

- Sector de cultivo de tejidos "in vitro" o micropropagación.
- Sector para el desarrollo de técnicas bioquímicas y/o moleculares (DAS-ELISA, Inmunoimpresión, Hibridación, sPAGE).
- Sector de revelado de film (cuarto oscuro).
- Sector del lavado del material, preparación de medios y esterilización. Sector para almacenamiento de drogas.
- Sector para el almacenamiento de materiales de vidrio y plástico. Sector de oficinas.

B- INVERNACULOS:

- La zona de invernáculo/s debe estar cercada con alambrado olímpico perimetral y contar con piletas de desinfección para la entrada peatonal y vehicular.
- Las entradas peatonales deberán constar de piletas de desinfección cubiertas con cobre en forma de polvo (oxicloruro, sulfato u otro tipo de formulación), que puede ser mezclado con grava o canto rodado pequeño (1 ó 1,5 cm de diámetro), para una mejor distribución del desinfectante, el cual deberá mantener la concentración necesaria que asegure su efectividad. El tamaño de las piletas dependerá del tránsito peatonal por entrada, pero deberán ser lo suficientemente amplias como para permitir el ingreso sin dificultad y diseñadas de tal manera que el peatón se vea obligado a pisarlas.
- Las piletas de desinfección vehicular contendrán una solución líquida de cobre (oxicloruro de cobre al 3 por mil), que se renovará periódicamente y con mayor frecuencia en períodos de lluvia, o cuando el tránsito es intensivo. Su tamaño debe ser acorde al tipo de vehículo que ingresa al establecimiento, deberá dar 2 vueltas completas la rueda del vehículo más grande que ingrese al sector y cubriendo completamente la cubierta.
- Deberá considerarse además la estructura de la pileta, dimensionada de tal manera que soporte el peso del vehículo con carga (el vehículo más pesado que ingrese a ese sector).
- Toda el área comprendida en el alambrado perimetral, circundante a los invernáculos, debe estar limpia, libre de malezas que puedan albergar insectos vectores de plagas.
- El diagnóstico de enfermedades se realizará en un invernáculo de vidrio, policarbonato o similar en condiciones de aislamiento exterior y con controles de temperatura.
- El tamaño del invernáculo dependerá de la cantidad de pruebas de diagnóstico e investigación que se van a llevar a cabo.
- Este invernáculo estará dividido en 3 sectores. En ellos se desarrollarán las siguientes actividades:
Sector 1: siembra y cría de plantines indicadores y mantenimiento de las "plantas candidatas", con una temperatura de **18-24°C**.
Sector 2: denominado frío, utilizado para pruebas de diagnóstico (**18-24°C**) para detectar psorosis y tristeza.
Sector 3: denominado caliente, utilizado para pruebas de diagnóstico (**28-32°C**) para detectar exocortis y cachexia-xiloporosis.
- En todos los sectores se llevarán registros de humedad y temperatura por medio de termohidrógrafos. Los datos obtenidos de las fajas de los termohidrógrafos se llevarán en planillas para poder (de ser necesario) correlacionar síntomas con temperatura del sector. Las fajas se archivarán en carpetas para su control.
- Semanalmente se realizará el monitoreo de todo del invernáculo para el control de insectos mediante trampas amarillas y recolección de muestras de hojas (de cada mesada debidamente identificada) que se observan bajo lupa. Los datos se registran en planillas.
- Todo invernáculo dedicado al diagnóstico deberá ser aislado (toda abertura al exterior deberá

contar con malla antiáfido, 30/32 hilos por pulgadas, contar con doble puerta de entrada con antecámara entre ambas puertas evitando el ingreso de insectos. En la antecámara se encontrarán los guardapolvos de uso obligatorio y los desinfectantes para manos (desinfección inmediata) empleándose previo ingreso al invernáculo.

- Al ingresar al invernáculo, en la antecámara y en cada sector del invernáculo se deberá desinfectar el calzado pisando una bandeja que contiene una esponja empapada en una solución desinfectante basado en yodo (I2). Dicho desinfectante debe ser renovado periódicamente, dependiendo su frecuencia del movimiento de personas que ingrese al mismo.
- El piso del invernáculo deberá ser de cemento con desagüe o canto rodado y contará con mesadas que pueden ser de cemento, madera, plástico o material apropiado para tal fin. El piso y las mesadas se desinfectarán con soluciones de hipoclorito de sodio (100% cloro activo) al 10% y de cobre al 3%. Se mantendrá la limpieza de los sectores y cada uno contará con tachos de residuos con tapa.
- Los invernáculos deberán contar con algún sistema de riego interno por goteo o de riego manual.

3- EQUIPAMIENTO:

El laboratorio y el/los invernáculos deberán estar provistos de todos los equipos y de los materiales de referencia necesarios para la ejecución correcta de los ensayos. Todos los equipos deberán ser mantenidos en adecuado estado de funcionamiento.

4- INSTRUCCIONES PARA EL FUNCIONAMIENTO:

PROCEDIMIENTOS:

Cada laboratorio y el/los invernáculos deberán contar con una carpeta donde consten todos los procedimientos operativos e instrucciones de trabajo actualizados conjuntamente con los otros registros que más adelante se detallan para permitir la/s auditoría/s por parte del INASE.

DOCUMENTACION:

- Boletín interno de análisis.
- Libro de registro de muestras.
- Certificados de análisis
- Archivo de documentos.
- Bibliografía técnica.
- Registro de reactivos.
- Registro de equipos.

Referente al Libro de registro de muestras: Este libro deberá contar con hojas numeradas con un sistema que asegure la inalterabilidad de los registros, preferentemente en posición horizontal, que pueda ser completadas en forma manual o una mecánica tipo PC. con sistema de seguridad.

Allí se registrarán todas las muestras que ingresen al Laboratorio y al invernáculo a las que se hallan emitido o no certificado (muestras de control interno de calidad, particulares, de entrenamiento, ensayo de referencia, muestras de fiscalización y otras), con número correlativo que corresponderá al número de diagnóstico de la misma. Se deberán detallar los datos mínimos obligatorios que hacen a la identificación de las muestras como: número de diagnóstico o test, fecha de recepción, remitente, procedencia u origen, especie, cultivar, categoría, número de lote, fecha y número de certificado de análisis y todos aquellos datos que se consideran necesarios para la identificación de la muestra.

Las muestras deberán registrarse en secuencia numérica en orden cronológico de recepción.

Muestras:

Las muestras ingresadas deberán ser identificadas con su respectivo número de recepción.

BOLETIN INTERNO DE DIAGNOSTICO.

Se emitirá un boletín interno por cada muestra. Este boletín deberá estar identificado con el mismo número de recepción que posee la muestra en el Libro de Registro de Muestras.

El Boletín Interno contará con la información indispensable para la ejecución del diagnóstico o test tales como: número de diagnóstico o test, determinaciones solicitadas, fecha de inicio y finalización del análisis, y otras informaciones complementarias.

Aquí se registrarán los resultados obtenidos de los diagnósticos o tests, datos e identificación del técnico (si las etapas están desarrolladas por distintos técnicos, cada uno deberá indicar la etapa que le corresponda mediante firma y aclaración).

ARCHIVO DE DOCUMENTOS.

Los Libros de Registro de Muestras, Boletines Internos, y Certificados emitidos se archivarán durante un período de cinco (5) años y estarán a disposición de los inspectores de la SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS o de sus organismos descentralizados en sus áreas de competencia, cuando ellos lo soliciten.

MUESTRAS.

Las Muestras deberán ser empaquetadas en bolsas plásticas de polietileno junto con una etiqueta resistente. La bolsa deberá ser envuelta firmemente alrededor del material para evitar espacios de aire excesivos y deberá ser colocada en una segunda bolsa. Esta bolsa deberá ser sellada o cerrada fuertemente con un cordel o una banda elástica y ser rotulada nuevamente con la firma del responsable de la extracción y del Director Técnico o Representante de la empresa.

La temperatura de conservación de muestras vegetales (varetas, hojas, brotes, semillas de cítricos) es de 5-8°C-heladera, sector de verduras.

Las muestras ingresadas deberán ser identificadas con su respectivo número de recepción.

El, protocolo de extracción de las muestras se describe en el ANEXO V.

ANEXO III

TECNICAS DE LABORATORIO

1. DETECCION DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CITRICOS

A- INMUNOIMPRESION DIRECTA - ELISA

Muestra: Brotes tiernos: pedicelos de hojas o pedúnculos de frutos.

Almacenamiento de la muestra: La muestra se puede guardar en una bolsa plástica en heladera como máximo 2 semanas.

Drogas y Equipo mínimo requerido:

Kit (membrana de nitrocelulosa con controles positivos, anticuerpo monoclonal específico del virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) marcados con fosfatasa alcalina)

Sustrato para revelado: pastillas de BCIP-NBT, Sigma Fast.

Drogas para preparar los Buffer (solución tampón), en las diferentes etapas.

Destilador, en su defecto agua destilada.

Heladera

Agitador orbital

Agitador magnético

Papel absorbente

Lupa binocular de 10X - 20X de aumento.

Material para cortar.

Balanza analítica, capacidad 120gr con resolución 0,001gr.

Micropipetas de volúmenes variables o varias de volúmenes fijos.

Tips estériles adaptables a las micropipetas.

Peachimetro rango de pH de 0 a 14, resolución 0,01, error +/- 0,1 rango de temperatura de 0,5 a 100°C, 1°C de resolución, +/- 1°C de error.

Autoclave

Material de vidrio o plástico necesario.

Preparar el buffer sustrato disolviendo una pastilla de BCIP-NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolyl phosphate/ nitroblue tetrazolium tablets), en 10ml de agua destilada. Añadir sobre las membranas y dejar incubar hasta la aparición de color violeta-púrpura en el testigo positivo (3 a 7 minutos). Paralizar la reacción lavando la membrana con agua corriente. Dejar extendida sobre papel absorbente.

Lectura de la membrana:

Observar las impresiones con ayuda de una lupa (X 10 - X 20 aumentos).

La presencia de precipitados violáceos en la zona vascular de las secciones de material vegetal, indica la presencia del virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) (reacción positiva).

TABLA DE DROGAS Y SOLUCIONES:

Droga o Solución	Composición	pH u Observaciones
Albúmina de suero bovino	.	.
Agua fisiológica tamponada (AFT)10 X:	20ml agua destilada 1,6gr NaCl 0,08gr NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O 0,268gr Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O Diluir 1 ml en 9ml de agua destilada.	pH 7,4
Tampón de lavado:	1 ml AFT 10 X 4mg NaN ₃ 10ul Tween 20 Llevar a 20ml con agua destilada	pH 7,2-7,4

B- DAS-ELISA

Muestras: corteza verde.

Almacenamiento de la muestra: La muestra se puede guardar en una bolsa plástica en freezer (-20°C) durante varios meses.

Drogas y Equipo mínimo requerido:

Kits completos (inmunoglobulinas, inmunoglobulina marcada con fosfatasa alcalina) para la determinación del virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV).

Sustrato para revelado: p-nitrofenil fosfato de sodio.

Drogas para preparar las soluciones tampón, en las diferentes etapas.

Agitador magnético.

Destilador, en su defecto agua destilada.

Placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno con fondo plano y de una capacidad de 350 µl de capacidad por pocillo de excelente calidad.

Pizetas de plástico de volúmenes variables.

Micropipetas de volúmenes variables o varias de volúmenes fijos.

Tips estériles adaptables a las micropipetas.

Pipetas multicanal 8 ó 12 (capacidad: 50 a 200µl).

Peachímetro rango de pH de 0 a 14, resolución 0,01, error +/- 0,1 rango de temperatura de 0,5 a 100°C, 1°C de resolución, +/- 1°C de error.

Estufa de cultivo de temperatura regulable (rango temperatura ambiente a 50°C).

Material de vidrio o plástico necesarios.

Balanza analítica, capacidad 120gr, resolución 0,001gr.

Heladera y freezer (-20°C).

Lector de microplaca (espectrofotómetro 405nm) optativo.

Testigos positivos.

Testigos sanos.

Tapizado: Añadir 200ul por pocillo de inmunoglobulinas (IgG) específicas en la concentración indicada en el envase, en tampón carbonato (pH 9,6).

Incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 4 horas o toda la noche a 4°C.

Vaciar los pocillos y lavar la placa con tampón de lavado (PBST). **Repetir 4 a 8 veces.**

Adición de la muestra:

TECNICA DE PROTOCOLO

Preparación de la muestra vegetal: realizar cortes transversales limpios en brotes tiernos, pedicelo de hojas o pedúnculos de frutos. Presionar cuidadosamente las secciones recién cortadas contra la membrana de nitrocelulosa. Dejar secar la huella o impronta unos minutos. Las membranas impresas pueden conservarse durante varios meses en lugar seco.

Para analizar plantas adultas se deben tomar 5 brotes tiernos (de la última brotación) o 10 hojas alrededor de la copa y preferentemente de la parte superior.

La máxima fiabilidad del método se obtiene realizando 2 improntas por cada brote u hoja.

Bloqueo de la membrana:

Diluir en 10 ml de agua destilada 0,1g de albúmina de suero bovino para cada membrana. Colocar la membrana en un recipiente apropiado (bandeja, bolsa de plástico hermética). Verter sobre ella, cubriéndola, la solución de albúmina e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, desechar la solución de albúmina manteniendo las membranas en el mismo recipiente.

Adición de anticuerpos monoclonales específicos de CTV conjugados con fosfatasa alcalina:

Diluir 10 µl de anticuerpo monoclonal en 10ml de agua fisiológica tamponada (AFT). Añadir la solución sobre la membrana cubriéndola. Incubar durante 2-3 horas a temperatura ambiente y desechar la solución del conjugado.

Lavado de la membrana:

Preparar la solución del buffer de lavado. Lavar agitando (manual o mecánicamente) con 10 ml de solución durante 5 minutos. Eliminar la solución y repetir la operación con la solución restante.

Revelado de la membrana:

Añadir 200ul por pocillo de un homogenizado 1:10 (peso de corteza verde: volumen tampón extracción) del material en que se desee detectar la presencia del virus.

Incubar toda la noche a 4°C.

Colocar 2 controles negativos, 2 controles positivos y 1 blanco (PBST).

El lavado se realiza como se describió anteriormente.

Adición del conjugado:

Añadir 200ul por pocillo de una dilución en tampón conjugado de IgG conjugada en la concentración indicada en el envase.

Incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 horas.

El lavado se realiza como se describió anteriormente.

Revelado de la reacción y lectura:

Añadir 200ul por pocillo del sustrato (1mg de p-nitrofenil fosfato de sodio por cada mililitro de tampón sustrato pH 9,8).

Incubar de 15 a 60 minutos a temperatura ambiente.

Paralizar la reacción añadiendo 50ul por pocillo de NaOH 3M.

Realizar lectura visual o colorimétrica a 405nm. La intensidad del color será proporcional al contenido en antígenos de la muestra. Comparar los resultados con el de los controles negativos.

TABLA DE DROGAS Y SOLUCIONES

Drogas o Soluciones	Composición	pH u Observaciones
Tampón Carbonato	1,59gr Na ₂ CO ₃ 2,93gr NaHCO ₃	

	<p>0,20gr NaN_3</p> <p>Llevar con agua destilada a 1 litro de solución.</p>	pH 9,6
Tampón de lavado (PBST)	<p>8gr NaCl</p> <p>0,2gr KH_2PO_4</p> <p>1,45gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$</p> <p>0,2gr KCl</p> <p>0,2gr NaN_3</p> <p>0,5ml Tween 20</p> <p>Llevar con agua destilada a 1 litro de solución</p>	pH 7,4
Tampón conjugado	<p>2gr BSA (albúmina de suero bovino)</p> <p>20gr PVP. MW 40.000</p> <p>0,2gr NaN_3</p> <p>Llevar con PBST a 1 litro de solución.</p>	pH 7,4
Tampón de extracción	<p>1,3gr Na_2SO_3 (anhidro)</p> <p>2,0gr Albúmina de huevo</p> <p>20,0gr PVP.MW. 40.000</p> <p>20ml Tween 20</p> <p>Llevar con PBST a 1 litro de solución.</p>	pH 7,4
Tampón sustrato	<p>0,1 gr MgCl_2</p> <p>97ml Dietanolamina</p> <p>0,2gr NaN_3</p> <p>Llevar con agua destilada a 1 litro de solución.</p>	pH 9,8

2. DETECCION DE LA CLOROSIS VARIEGADA DE LOS CITRICOS (CVC)

Muestras: nervadura central de la hoja.

Almacenamiento de la muestra: La muestra se puede guardar en una bolsa plástica en freezer durante varios meses.

Drogas y Equipo mínimo requerido:

Kits completos (inmunoglobulinas, inmunoglobulina marcada con fosfatasa alcalina) para la determinación de la Clorosis variegada de los cítricos (CVC).

Sustrato para revelado: p-nitrofenil fosfato de sodio.

Drogas para preparar las soluciones tampón, en las diferentes etapas.

Agitador magnético.

Destilador, en su defecto agua destilada.

Placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno con fondo plano y de una capacidad de 350 µl de capacidad por pocillo de excelente calidad.

Pizetas de plástico de volúmenes variables.

Micropipetas de volúmenes variables o varias de volúmenes fijos.

Tips estériles adaptables a las micropipetas.

Pipetas multicanal 8 ó 12 (capacidad: 50 a 200ml).

Peachímetro rango de pH de 0 a 14, resolución 0,01, error +/- 0,1 rango de temperatura de 0,5 a 100°C, 1°C de resolución, +/- 1°C de error.

Estufa de cultivo de temperatura regulable (rango temperatura ambiente a 50°C).

Material de vidrio o plástico necesarios.

Balanza analítica, capacidad 120gr, resolución 0,001gr.

Heladera y freezer (-20°C).

Lector de microplaca (espectrofotómetro 405nm).

Testigos positivos.

Testigos sanos.

TECNICA DE PROTOCOLO DAS-ELISA:

Tapizado:

Añadir 200ul por pocillo de inmunoglobulinas (IgG) específicas en la concentración indicada en el envase, en tampón carbonato pH: 9,6.

Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 2 horas.

Vaciar los pocillos y lavar la placa con tampón fosfato (PBST) vaciando los pocillos rápidamente.

Repetir 3 veces.

Adición de la muestra:

Añadir 200ul por pocillo de un homogeneizado 1:5 (peso de nervadura central de la hoja: volumen de tampón extracción) del material en que se desee detectar la presencia de la bacteria.

Incubar toda la noche a 4°C.

Controles: 2 controles positivos, 2 controles negativos y 1 blanco (PBST).

El lavado se realiza como se describió anteriormente.

Adición del conjugado:

Añadir 200ul por pocillo de una dilución en tampón conjugado de IgG conjugada en la concentración indicada en el envase.

Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 2 horas.

El lavado se realiza como se describió anteriormente.

Revelado de la reacción y lectura:

Añadir 200ul por pocillo del sustrato (1mg de p-nitrofenil fosfato de sodio por cada ml de tampón sustrato pH: 9,8).

Incubar de 30 minutos a 2 horas a temperatura ambiente.

Paralizar la reacción añadiendo 50ul por pocillo de NaOH 3M.

Realizar lectura con espectrofotómetro con filtro de 405nm.

Interpretación de los resultados:

Se considerará positiva la muestra que arroje un resultado del doble de la Densidad óptica (O.D.) de los controles sanos o promedio del valor de la lectura de los controles sanos más un valor de 0,1 de densidad óptica.

TABLA DE DROGAS Y SOLUCIONES

Soluciones	Composición	pH u Observaciones
Tampón carbonato	Bis Virus de la Tristeza de los cítricos.	.
Tampón de lavado	Bis Virus de la tristeza de los cítricos.	.
Tampón conjugado	2gr albúmina de suero bovino Llevar con PBST a 1 litro de solución.	pH 7,4
Tampón de extracción	Idem PBST	.
Tampón sustrato	97ml Dietanolamina Llevar con agua destilada a 1 litro de solución	. pH 9,8

3. DETECCIÓN DE LA CANCROSIS DE LOS CITRICOS

Muestras: 25 hojas asintomáticas tomadas al azar.

Almacenamiento de la muestra: La muestra se puede guardar en una bolsa plástica en heladera como máximo 2 semanas.

El lavado de las hojas se puede guardar durante varios meses a -20°C.

Drogas y Equipo mínimo requerido:

Kits completos (inmunoglobulinas, inmunoglobulina marcada con fosfatasa alcalina) para la determinación de la Cancrosis de los cítricos.

Sustrato para revelado: p-nitrofenil fosfato de sodio.

Drogas para preparar las soluciones tampón, en las diferentes etapas.

Agitador magnético.

Destilador, en su defecto agua destilada.

Placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno con fondo plano y de una capacidad de 350 μ l de capacidad por pocillo de excelente calidad.

Pizetas de plástico de volúmenes variables.

Micropipetas de volúmenes variables o varias de volúmenes fijos.

Tips estériles adaptables a las micropipetas.

Pipetas multicanal 8 ó 12 (capacidad: 50 a 200 μ l).

Peachímetro rango de pH de 0 a 14, resolución 0,01, error +/- 0,1 rango de temperatura de 0,5 a 100°C, 1°C de resolución, +/- 1°C de error.

Estufa de cultivo de temperatura regulable (rango temperatura ambiente a 50°C).

Material de vidrio o plástico necesarios.

Balanza analítica, capacidad 120gr, resolución 0,001gr.

Heladera y freezer (-20°C).

Lector de microplaca (espectrofotómetro 405nm) optativo.

Testigos positivos.

Testigos sanos.

TECNICA DE PROTOCOLO DAS-ELISA:

Tapizado:

Añadir 200 μ l por pocillo de inmunoglobulina (IgG) específica en la concentración indicada en el envase, en tampón carbonato (pH 9,6).

Incubar toda la noche a 4°C.

Vaciar los pocillos y lavar la placa con tampón de lavado (PBST) 1 minuto tres veces.

Adición de la muestra:

Añadir 200 μ l por pocillo del sobrenadante del lavado de las hojas (agitar por 20 minutos en tampón peptonado con Tween la muestra de hojas a procesar, con una relación de 25 hojas por 50 ml de tampón; centrifugar dicho lavado a 10.000 rpm por 20 minutos; extraer el sobrenadante con bomba de vacío preferentemente; resuspender el precipitado en 1 ml de PBS).

Incubar 2 horas a 37°C.

Colocar controles negativos, controles positivos y 1 blanco (PBST).

El lavado se realiza como se describió anteriormente.

Adición del conjugado:

Añadir 200 μ l por pocillo de una dilución en PBST de IgG conjugada en la concentración indicada en el envase.

Incubar 2 horas a 37°C.

El lavado se realiza como se describió anteriormente.

Revelado de la reacción y lectura:

Añadir 200 μ l por pocillo del substrato (1mg de p-nitrofenil fosfato de sodio por cada ml de tampón

sustrato pH 9,8.

Incubar de 15 a 60 minutos a temperatura ambiente.

Paralizar la reacción añadiendo 50ul por pocillo de NaOH 3M.

Realizar lectura visual o colorimétrica a 405nm. La intensidad del color será proporcional al contenido en antígenos de la muestra. Comparar los resultados con el de los controles negativos.

TABLA DE DROGAS Y SOLUCIONES

Soluciones	Composición	pH Observaciones
Tampón Carbonato	Bis Virus de la Tristeza de los cítricos.	.
Tampón de lavado	Bis Virus de la Tristeza de los cítricos	.
Tampón peptonado con Tween	8,5gr NaCl 1gr Peptona 250ul Tween 20 1l agua destilada	pH 7,2-7,4
Tampón Conjugado	Bis tampón de lavado para Cancrosis.	.
Tampón Sustrato	Bis virus de la Tristeza de los cítricos.	.

4. DETECCIÓN DE VIROIDES: EXOCORTIS Y CACHEXIA

Esquema de Técnicas para la detección de viroides:



A - EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS:

Muestras: Se toma aproximadamente 10 cm de la parte apical de la planta inoculada (Tejido de Cidra Etrog).

Almacenamiento de la muestra: la muestra procesada (ácido nucleico) se guarda en freezer -20°C durante varios meses.

Equipo mínimo requerido:

Tijeras de podar

Molinillo de café o Mortero

Termo para N₂ líquido

Homogeneizador

Drogas para preparar las soluciones

Balanza analítica, capacidad 120gr con resolución 0,001gr

Pipetas de vidrio o plástico calibradas

Micropipetas de volúmenes adecuados para desarrollar el protocolo

Tips adaptables a las micropipetas

Material volumétrico de vidrio o plástico

Agitador orbital

Tubos de diálisis

Tubos (30-50 ml) para centrifuga

Centrífuga

Tubos (15-20 ml) para centrifuga

Campana desecadora preferentemente acoplada a una bomba de vacío.

Freezer-Heladera

Peachímetro rango pH de 0 a 14, resolución 0,01, error +/- 0,1 rango de temperatura de 0,5 a 100°C de resolución, +/- 1°C de error.

FUNDAMENTO DE LA TECNICA:

El protocolo de extracción de ácidos nucleicos consiste en una homogeneización del tejido de las plantas a analizar seguida de un proceso que permite obtener preparaciones enriquecidas en viroides, y susceptibles de ser analizadas mediante sPAGE o hibridación molecular. Con los métodos de análisis disponibles, la detección de viroides sólo es sensible y fiable cuando se emplea como material vegetal de partida plantas de cidro previamente inoculadas por injerto y mantenidas durante 3-6 meses preferentemente a 28-32°C.

TECNICA DE PROTOCOLO

1. Homogeneizar el tejido (5 gr de tejido, 15 ml de fenol y 5 ml de EM) en un homogeneizador Virtis. Se puede intentar pulverizar el tejido con nitrógeno líquido en un molinillo de café, transferirlo a un tubo donde se agregará fenol y EM para homogeneizarlo con el Politrón.
2. Transferir a tubos de centrifuga (30-50 ml) y centrifugar a 10.000rpm durante 20 minutos.
3. Recoger la fase acuosa y transferirlo a otro tubo (30-50 ml) y desechar la fase orgánica. Estimar el volumen recuperado (6-7 ml).
4. Agregar 1/10 volúmenes de Acetato de Sodio y 3 volúmenes de Etanol. Mezclar invirtiendo el tubo. Mantener a -20°C al menos 1 hora.
5. Centrifugar a 10.000rpm durante 20 minutos.
6. Desechar el sobrenadante. Secar el precipitado que se encuentra adherido a las paredes del tubo.
7. Resuspender el precipitado con 1-1,5 ml de TKM (medio de resuspensión).
8. Hidratar los tubos de diálisis con agua y transferir la preparación anterior a los mismos. Dializar en TKM en agitación durante toda la noche a 4°C.
9. Recuperar la preparación del tubo de diálisis y transferir a tubo de 15-20 ml estimando el volumen.

10. Agregar el mismo volumen de una solución 4 M de LiCl y mezclar invirtiendo el tubo. Mantener a 4°C durante al menos 4 horas (se puede dejar durante toda la noche).
11. Centrifugar a 10.000rpm durante 10 minutos. Recuperar el sobrenadante y desechar el precipitado.
12. Estimar el volumen del sobrenadante recuperado y agregar 3 volúmenes de Etanol frío. Mantener a -20°C durante al menos 1 hora.
13. Centrifugar a 10.000rpm durante 20 minutos.
14. Desechar el sobrenadante. Secar al vacío el precipitado que se encuentra adherido a las paredes del tubo.
15. Resuspender el precipitado con el menor volumen posible (300 ul). Separar en alícuotas de 20 ul para análisis por sPAGE, o 10 ul para Hibridación Molecular. La preparación puede guardarse a -20°C durante varios meses.

TABLA DE DROGAS Y SOLUCIONES

EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS:

Soluciones	Composición	Filtrar o Autoclavar	Observaciones
Medio de extracción	0,4M Tris HCl pH8,9 1% SDS 5mM EDTA pH7,0 2% Mercaptoetanol	.	.
Fenol saturado en agua a ph neutro	Al fenol cristalizado agregarle agua hasta que se observen 2 fases. Ajustar el pH con NaOH 1 M	.	.
Etanol	.	.	Guardar a 4°C
Solución 3M de Acetato de sodio	Disolver 24,6gr de acetato de sodio en 100ml de agua. Ajustar el pH a 5,5 con ácido acético	.	Guardar a 4°C
Medio de Resuspensión (TKM) 10 X	50ml 2M Tris pH7,4. 100ml 1 M KCl 10ml 0,1 M MgCl ₂ Aforar a 1 litro.	.	Guardar a 4°C.
Solución 4M de LiCl	Disolver 42,4gr de LiCl en 250ml de agua	.	Guardar a 4°C

	destilada		
--	-----------	--	--

B - HIBRIDACION MOLECULAR

Muestras: Se usan secciones transversales del tallo.

Conservación de las muestras: Las muestras una vez fijadas se pueden conservar envueltas primero en papel de filtro y luego en papel de aluminio en lugar seco.

Drogas y Equipo mínimo requerido:

Membrana de Nylon (carga positiva)

Baño térmico

Horno de vacío o cámara de U.V. o estufa a 80°C.

Micropipetas de rango apropiado para desarrollar el protocolo

Material fungible (Eppendorf, Falcón, u otros similares)

Aparato para sembrar muestras: Hydri-dot system o equivalente.

Tijeras de podar.

Drogas para preparar soluciones.

Filtro Milipore de 0,22 micras y filtro de 0,45 micras

Agitador magnético

Agitador orbital

Horno de hibridación

Botellas de hibridación o bolsas de plástico con cierre hermético.

Sonda

Kit Boehringer Mannheim N° 1363514/ Dig luminiscient detection Kit for nucleic acid: control de ADN, 1 ml de esperma de salmón, antidigoxigenina AP (anti-DIG-AP), agente de bloqueo y CSPD (Disodium 3-(4-methoxySpiro (1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo (3.3.1.1) decan) -4-yl) phenyl phosphate.

Cassette para film

Film X-Omat (Kodak)

Film adherente

Papel de aluminio

Bandejas para revelado

Balanza analítica, capacidad 120gr con resolución 0,001gr

Peachimetro rango de pH de 0 a 14, resolución 0,01, error +/- 0,1 rango de temperatura de 0,5 a 100°C de resolución, +/- 1°C de error.

Autoclave

FUNDAMENTO DE LA TECNICA:

La hibridación es una técnica que permite detectar ácidos nucleicos (en nuestro caso viroides) mediante el uso de sondas de DNA marcadas con digoxigenina.

Ello se realiza según el siguiente protocolo:

- Preparación de membranas con las muestras que se quiere analizar.
- Prehibridación
- Hibridación
- Lavados
- Tratamiento con anticuerpo y revelado

TECNICA DE PROTOCOLO.

Preparación de las membranas:

1- Calcular el tamaño de la membrana necesario en función del número de muestras que se desea analizar.

2- Colocación de las muestras:

Impresiones:

Se realizará un corte lo más nítido posible del tejido que se desea analizar (en general se emplea secciones transversales del tallo) que se aplican sobre la membrana haciendo una ligera presión.

Se recomienda hacer como mínimo dos impresiones por muestra. Todas las membranas deberán llevar los correspondientes controles positivos y negativos.

Acidos nucleicos:

Tomar 10 ul de la muestra y agregar 6ul de SSPE 20X y 4ul de formaldehído en un tubo eppendorf. Calentar a 60°C durante 15 minutos en baño térmico y colocar en hielo. Aplicar las muestras al Hydridot system o equivalente.

3- Fijar las muestras a las membranas en un horno U.V. con el programa correspondiente.

Como alternativa puede utilizarse un horno de vacío o incluso una estufa a 80°C durante 2 horas.

4- Sólo en el caso de impresiones, antes de iniciar la hibridación pretratar la membrana con una solución de mercaptoetanol 2M durante 10 minutos seguido de 2 lavados con agua destilada.

PREHIBRIDACION

1- Encender el horno y ajustarlo a 42°C.

2- Colocar la solución tampón de prehibridación en la botella que ya contiene la membrana.

3- Agregar el esperma de salmón ya desnaturalizado a la botella.

4- Colocar la botella en el horno durante mínimo 2 horas.

HIBRIDACION:

1- Desnaturalizar el esperma de salmón y la sonda en agua hirviendo durante 10 minutos y colocar en hielo.

2- Sacar la botella del horno y cambiar la temperatura del mismo a 50°C. Desechar la solución tampón de prehibridación. Añadir la solución tampón de hibridación y colocar en el horno a 50°C.

3- Colocar el esperma de salmón y la sonda ya desnaturalizados en la botella con el tampón de hibridación y la membrana.

4- Colocar nuevamente la botella en el horno de hibridación a 50°C e incubar durante toda la noche.

LAVADOS:

1- Sacar la botella que estuvo hibridando del horno, apagar el horno y dejar la puerta abierta.

2- Decantar la solución de hibridación y añadir el volumen de la solución de lavado I necesario para cubrir la membrana.

3- Poner la botella en el horno con la puerta abierta durante 15 minutos.

4- Repetir nuevamente el paso anterior.

5- Ajustar la temperatura del horno a 60°C. Desechar la solución de lavado y añadir el volumen necesario de la solución de lavado II para cubrir la membrana. Colocar la botella en el horno a 60°C durante 1 hora.

TRATAMIENTO CON ANTICUERPO Y REVELADO:

1. Sacar la botella del horno y desechar la solución de lavado II. Agregar en cada botella el volumen necesario para cubrir la membrana de la solución tampón 1 y 30 ul de Tween en agitación durante unos 3 a 5 minutos a temperatura ambiente.

2. Desechar la solución tampón 1. Agregar el volumen necesario para cubrir la membrana de la solución tampón 2 y dejarla a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación.

3. Colocar 1 ul de anticuerpo en 5 ml de la solución tampón 2. Desechar la solución de tampón 2. Añadir la solución tampón 2 más el anticuerpo y dejarla a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación.

4. Desechar la solución tampón 2 más anticuerpo.

5. Añadir el volumen necesario para cubrir la membrana de la solución tampón 1 y dejarla a temperatura ambiente durante 15 minutos en agitación.

6. Repetir el paso anterior.

7. Desechar la solución tampón 1. Añadir el volumen necesario para cubrir la membrana de la solución tampón 3 y dejarla a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación.

8. Desechar la solución tampón 3. Añadir 5 ml solución tampón 3 y 13 ul de CSPD. Agitar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

9. Desechar la solución con el CSPD. Sacar la membrana.

10. Colocar la membrana sobre el cartón forrado con la cara de las impresiones para fuera. Envolver todo en plástico.

11. Ir al cuarto oscuro. Colocar el cartón en el cassette y encima una hoja de film. Cerrar el cassette y envolverlo con el papel de aluminio.

12. Incubar a 37°C durante 20 minutos aproximadamente.

13. Revelado del film:

- Sacar el film del cassette y ponerlo en la solución de revelado durante unos minutos.
- Cuando se vean las señales de hibridación, transferirlo a agua para parar el revelado. Enjuagar.
- Transferirlo a la solución fijadora y dejarlo durante 30 segundos.
- Transferirlo a agua para eliminar los restos del fijador.
- Secar el film al aire.

TABLA DE DROGAS Y SOLUCIONES

Preparación de membranas:

Solución o Droga	Composición	pH u Observaciones	Conservación
Mercaptoetanol	4ml Mercaptoetanol	.	.

2M	26ml de agua		
Tampón SSPE 20 X	175,3gr NaCl 27,6gr NaH ₂ PO ₄ 7,4gr EDTA Llevar a 1 litro de solución	Ajustar el pH a 7,4 con NaOH 10N Autoclave.	Temperatura ambiente.
SDS 5%	12,5gr SDS 250ml agua	.	Temperatura ambiente
Solución de Denhardt	0,5gr Ficoll 0,5gr Polivinilpirrolidona MW24.000 0,5gr Albúmina bovina 50ml agua	Filtrar la solución con filtro Milipore (0,22 micras). Colocar la solución estéril en tubos estériles.	Freezer -20°C
Formaldehído	.	.	.

Prehibridación:

Solución o Droga	Composición	pH u Observaciones	Conservación
Tampón de prehibridación	1/2formamida 1/10 SDS 5% 3/10 tampón SSPE 20X 1/10 solución de Denhardt	Esterilizar la solución pasándola por un filtro de 0,45 micras	
Esperma de salmón	.	.	Freezer -20°C

Hibridación:

Solución Droga	o	Composición	pH u Observaciones	Conservación
Tampón Hibridación	de	1/2 Formamida desionizada 1/10 SDS 5% 3/10 tampón SSPE 20 X 1/10 agua estéril	.	.

Lavados:

Solución Drogas	o	Composición	pH u Observaciones	Conservación
Solución lavado 1	de	20 X SSC 50ml SDS 5% 10ml Llevar la solución a un volumen final de 500ml con agua destilada.	.	.
Tampón 20X	SSC	175gr NaCl 88,2gr Na Citrato Llevar a 1 litro de solución	Ajustar a pH7,0 Esterilizar	Temperatura ambiente

Tratamiento con anticuerpo y revelado

Solución Droga	o	Composición	pH u Observaciones	Conservación
Tween	.	.	.	Temperatura ambiente
Solución Stock de Bloqueo 10X		Compuesto del bloqueo del Kit 20g Tampón 1 150ml. Llevar a un volumen final con 200ml de agua.	Esterilizar	Almacenar a 4°C o a -20°C
0,5 M MgCl ₂		Disolver 51gr MgCl ₂ en 500ml de agua	Esterilizar	Almacenar a 4°C.
1 M NaCl		Disolver 29,2gr de NaCl en	Esterilizar	Almacenar a 4°C

	500ml de agua		
1 M Tris ph 9,5	Disolver 60,55gr de Tris en 500ml de agua	Ajustar el pH a 9,5 con HCl. Esterilizar	Almacenar a 4°C.
Tampón 1	Acido maleico 11,61gr NaCl 18,766gr Agua 800ml	Ajustar el pH a 7,5. con NaOH 10N y llevar a un volumen de solución final de 1 litro.	
Tampón 2	Solución de stock de bloqueo 2,5ml Tampón 1 17,5ml		
Tampón 3	Tris-HCl 10mM pH 9,5 NaCl 0,1 M MgCl ₂ 50mM Agua estéril 350ml		Almacenar a 4°C

C - ELECTROFORESIS (sPAGE)

Muestras: Agregar 10 ul de glicerol 60% a la muestra (20ul de ácido nucleico) a analizar.

Drogas y Equipo mínimo requerido:

Material volumétrico de vidrio o plástico

Micropipetas de rango apropiado para desarrollar el protocolo

Tips adaptables a las micropipetas

Drogas para preparar las soluciones

Pipetas de vidrio o plástico

Balanza analítica, capacidad 120gr con resolución 0,001gr

Bandejas

Agitador orbital

Peachimetro rango de pH de 0 a 14, resolución 0,01, error +/- 0,1 rango de temperatura de 0,5 a 100°C, 1°C de resolución, +/- 1°C de error.

Cuba de electroforesis refrigerada y sus respectivos peines.

Fuente de electroforesis (100mA, 1000 V de capacidad o superior).

Transiluminador U.V.

Transiluminador luz blanca.

Cámara fotográfica Polaroid o similar.

Microcentrífuga.

FUNDAMENTO DE LA TECNICA:

El sistema de electroforesis secuencial en geles del 5% de poliacrilamida permite el análisis de viroides con una gran resolución. El proceso se basa en la migración de las moléculas de ácidos nucleicos en una electroforesis estándar (5% PAGE) y la excisión del segmento del gel que contiene los viroides que se somete a una segunda electroforesis en un gel polimerizado con 8M de urea (5% dPAGE).

El procedimiento que se detalla a continuación, aprovecha la mejor separación de las formas circulares de los RNAs viroidales cuando el segundo gel se prepara a pH 6,5(tampón TAE) y se somete a electroforesis en tampón a pH 8,3(tampón TBE)

TECNICA DE PROTOCOLO:

Preparación del primer gel (5% PAGE):

1. Acoplar los cristales y separadores en el formador de geles.
2. Colocar en un vaso de precipitado 24 ml de H₂O, 20 ml de Solución C y 4,8 ml de Solución B. En otro vaso de precipitado colocar 10 ml de la solución A y 1 ml de la solución E. Mezclar el contenido de ambos vasos.
3. Depositar en el espacio que existe entre los cristales la mezcla preparada en el paso anterior y colocar el peine.
4. Comprobar que ha tenido lugar una correcta polimerización (20 minutos) y sacar el peine.
5. Ensamblar el gel en el equipo de electroforesis.
6. Dispensar el tampón TAE en los 2 depósitos del equipo.
7. Agregar 10ul de glicerol 60% a las muestras a analizar. Mezclar bien dando un pulso en la microcentrífuga.
8. Cargar las muestras en los pocillos y los controles correspondientes.
9. Cargar en los pocillos de ambos extremos una mezcla de los dos colorantes (azul de bromofenol y xileno cianol) que permitirá valorar si la migración en el gel es la esperada.
10. Correr a una corriente constante de 60mA a 4°C durante 3-3,5 horas o cuando se observe que el azul de bromofenol haya migrado 7cm y el xileno cianol 4cm.
11. Terminada la corrida, sacar el gel y teñirlo en una bandeja con 200ml de agua y 30ul de bromuro de etidio. Mantener con agitación suave durante 15 minutos.
12. Observar el gel en el transiluminador y fotografiar. Cortar el segmento horizontal del gel comprendido entre el RNA-7s y 1 cm por encima del mismo.

Preparación del segundo gel:

1. Acoplar los cristales y separadores en el formador de geles.
2. Colocar en un vaso de precipitado 28,8gr de urea, 14ml de H₂O, 6ml de la solución G y 10ml de la solución A. Calentar el vaso de precipitado y cuando se observe que la urea está completamente disuelta, agregar 5ml de la solución B y 1 ml de la solución E.
3. Depositar con rapidez la mezcla en el espacio que existe entre los cristales. No hay que colocar el peine.
4. Comprobar que ha tenido lugar una correcta polimerización (20 minutos).
5. Ensamblar el gel en el equipo de electroforesis.
6. Dispensar la solución tampón TBE en los 2 depósitos del equipo.

7. Colocar el segmento del primer gel en el espacio disponible. Agregar el resto del tampón.
8. Aplicar una corriente constante de 18mA a temperatura ambiente durante 4-5 horas.
9. Desensamblar la cubeta y sacar el gel. Colocarlo en una bandeja e iniciar la tinción con nitrato de plata:
 - Agregar 200ml de la solución 1 y mantener en agitación suave durante 1 hora o toda la noche.
 - Desechar la solución 1 y agregar 200ml de la solución 2. Mantener en agitación suave durante 1 hora.
 - Desechar la solución 2 y agregar 200ml de agua y 2ml de la solución de nitrato de plata.
 Mantener en agitación suave durante 1 hora.
 - Desechar la solución de nitrato de plata y enjuagar 2 veces con agua y una vez con revelador.
 - Agregar 200ml de revelador. Al cabo de 20-30 minutos deben observarse las bandas correspondientes a los **viroides** en la mitad superior del gel.
10. Observar el gel en el transiluminador de luz blanca y fotografiar.

TABLA DE DROGAS Y SOLUCIONES

Solución	Composición	Filtrar o Autoclavar	Observaciones
A	30g acrilamida 0,75gr bisacrilamida Aforar con 100ml de agua	Filtrar	Guardar a 4°C.
B	2ml Temed en 50ml de agua	.	Guardar a 4°C.
C (TAE)	120mM Tris 60mM Acetato de sodio. Tri hidratado. 3mM EDTA-Na Ajustar a pH7,2 con ácido acético	.	Guardar a 4°C
D 10 X (TAE)	400mM Tris 200mM Acetato de sodio tri hidratado. 10mM EDTA-Na Llevar a pH 7,2 con ácido acético y aforar a un litro.	.	Guardar a 4°C
D' 10 X (TBE)	225mM Tris 225mM ácido bórico.	.	Guardar a 4°C

	5mM EDTA-Na Aforar a un litro.		
E	Disolver 1 gr. de persulfato amónico en 10ml de agua.	.	Guardar a 4°C
G	Tomar 30ml TAE 10X y llevar a 100ml Ajustar a pH 6,5 con ácido acético .	.	Guardar a 4°C
Glicerol 60%	.	.	Temperatura ambiente
Bromuro de etidio	5 mg por ml	.	.
Azul bromofenol	0,3% en glicerol 60%	.	.
Xilen cianol	0,3% en glicerol 60%	.	.
Soluciones de tinción de plata: 1 2	Etanol 50% más ácido acético 10% Etanol 10% más ácido acético 1%	.	.
Nitrato de Plata	12mM (NO ₃ Ag)	.	.
Revelador	KOH 0,75M Formaldehído 0,28%	.	.

TECNICAS DE INVERNACULO

DESINFECCION:

A- Desinfección inmediata: Concentración del producto desinfectante a utilizar expresado en porcentaje del producto formulado.

Productos desinfectantes	Superficie a desinfectar		
	Manos	Máquinas, herramientas,	Cajones de madera,

		elementos plásticos, etc.	escaleras, etc.
Antigermen potente	2%	0,5%	4%
Lorasol	4%	1%	5%
Lapsasqua	0,5%	1%	1%
Cloruro de Benzalconio al 33% de pr. activo	1%	NO	NO

B- Desinfección lenta (previo lavado y dejando actuar por lo menos 1 hora)

Concentración del producto desinfectante a utilizar expresado en por mil del producto formulado.

Productos desinfectantes	Superficie a desinfectar Máquinas, herramientas, elementos plásticos, cajones de madera, escaleras, pisos*, mesadas, *etc.
Antigermen potente	1 por mil
Lorasol	1 por mil
Lap sasquad	1 por mil
Cloruro de benzalconio al 33% de pr. activo.	2 por mil
Hipoclorito de sodio* 100 gr. de cloro activo	Para cajones de madera, canastos, escaleras, cajones, elementos plásticos, etc. Al 1 por mil dejar actuar por lo menos una hora.
.	Para pisos y mesadas al 10 por mil.
Cobre (oxiclورو o sulfato)*	Para pisos y mesadas al 10 por mil.

ANEXO IV

SIEMBRA y CRIA DE PLANTINES INDICADORES PARA PRUEBAS DE DIAGNOSTICO BIOLOGICAS:

- Los plantines indicadores se obtendrán de semillas de Plantas Madres Semilleras con pruebas de diagnóstico para Psorosis (resultado negativo). Se cosecharán de estos árboles según procedimientos rutinarios, se secarán y desinfectarán. Se conservarán hasta su siembra a una temperatura de 5-8°C. No se utilizarán semillas que tengan más de un año de cosechadas. Las semillas se siembran en cajones germinadores a 30°C en un sustrato de arena dentro del invernáculo dedicado al diagnóstico. Una vez alcanzados entre 10-15cm de altura se transplantarán a macetas

bajo estricta selección que permita la mayor uniformidad de los plantines seleccionados evitando recesivos y de origen sexual.

- La maceta será de polietileno negro de 60-80 micrones de espesor, perforada en la base, de 25 x 35 cm. El sustrato empleado puede ser una mezcla de turba (60%) (puede ser la del sur u otro lugar o cualquier otro sustrato que permita desarrollar plantines vigorosos, libres de deficiencias) y arena (40%) con una fertilización de base compuesta por dolomita ($MgCO_3$), fosfato diamónico y solución de micronutrientes. El sustrato será esterilizado con vapor de agua ($90^\circ C$ durante una hora), con bromuro de metilo o con otro producto y/o metodología de eficiencia comprobada. El producto o metodología empleada deberá garantizar la ausencia de patógenos en el sustrato.
- Los plantines se fertilizarán semanalmente con una solución de fertilizantes que asegure plantines indicadores vigorosos y libres de deficiencias minerales (estas deficiencias enmascaran los síntomas foliares a observar).

PRUEBAS DE DIAGNOSTICO BIOLOGICAS:

La prueba de diagnóstico clásica se desarrolla de la siguiente manera:

- El inóculo de la "planta candidata" (obtenido de una varetta yemera) se injertará en forma de escudete o "T" invertida en número de 3 inóculos por cada plantín indicador, empleándose 4 plantines de cada indicador por planta candidata a controlar. Se utilizarán 2 plantines como controles positivos (con una raza débil de la enfermedad que se está diagnosticando) y 2 plantines como controles negativos (sin inocular). El objetivo de estos controles (negativos y positivos) es disponer de plantines con síntomas (enfermos) y sin síntomas (sanos) para comparar con los observados en los plantines inoculados con la Planta "candidata". Esto evita la subjetividad de las observaciones y permite comprobar que el invernáculo está funcionando en óptimas condiciones que aseguran que los plantines manifiesten los síntomas claramente y que los plantines se hallan bien nutridos (no tener deficiencias nutricionales).
- Estas pruebas pueden realizarse en forma grupal (5 plantas "candidatas" por grupo) utilizando para ello testigos positivos (+) y negativos (-) por grupo. Se emplean en lugar de 2 testigos positivos y 2 testigos negativos por planta "candidata", 4 testigos positivos y 4 testigos negativos por grupo.
- Los 4 testigos positivos se inoculan: 2 testigos con un aislamiento débil de la enfermedad a diagnosticar y 2 testigos con otro aislamiento débil de la misma enfermedad a diagnosticar (en lo posible debería ser un testigo positivo de reconocido origen).
- Toda prueba lleva una planilla de invernáculo donde se registra toda la información que identifica la planta "candidata", fecha de inoculación y de revisión de prendimiento del inóculo y cantidad de inóculos; identificación del testigo positivo (enfermo) utilizado; para qué la enfermedad se diagnostica; qué especie se utiliza como indicador; qué cantidad de plantines se utiliza (si es prueba clásica o grupal); las observaciones que se realizan y el análisis de los resultados cuando finaliza la prueba.

Esquema de una Prueba de Diagnóstico Biológica Clásica:



TRISTEZA:

Método: siguiendo el esquema de Prueba de Diagnóstico Clásico o Grupal se inoculará por injerto a plantines de lima Mejicana o lima Key (*Citrus aurantifolia*) de 15 meses de edad crecidos en condiciones aisladas, en invernáculo.

Indicador: lima Mejicana o lima Key (Citrus aurantifolia)

Número de plantines indicadores por prueba individual (test): 8 (ocho).

4 plantines inoculados con planta "candidata" a planta madre.

2 plantines inoculados con aislamiento débil de tristeza (testigo positivo o enfermo)

2 plantines sanos, sin inocular (testigo negativo o sano)

Inóculo: 3 yemas o piezas de corteza de vareta /vareta yemera/yemeras de la planta "candidata" por plantín indicador.

Observaciones al plantín inoculado: deberán realizarse sobre hojas de brotes jóvenes y adultos después de 3 meses de inoculado y durante por lo menos 3 brotaciones. Para la observación de síntomas en ramitas (stempitting) se debe esperar 8 meses de inoculado.

Temperatura: toda la prueba (test) deberá desarrollarse en invernáculo, en condiciones aisladas, con temperatura a observar entre 18 y 24°C.

Síntomas a observar: Un plantín indicador de tristeza mostrará (de resultar positivo o enfermo): aclareamiento de nervadura (vein clearing), acorchamiento de nervadura (vein corking), abarquillados de hojas (cupping), acanaladuras en ramitas (stem pitting) con o sin presencia de goma.

GRUPO PSOROSIS

(psorosis, concave gum, impietratura y otras del grupo psorosis)

Esta prueba se divide en 2 etapas: **Primera etapa:** prueba para grupo psorosis.

Segunda etapa: prueba de protección cruzada.

PRIMERA PARTE:

Método: transmisión por injerto a plantines de Naranja dulce Pineapple y/o Tangor Dweet, de 15 meses de edad crecidos en condiciones aisladas, en invernáculo.

Indicador: Naranja dulce Pineapple (Citrus sinensis) y/o Tangor Dweet (hibrido). Número de plantas indicadoras prueba individual (test): 8 (ocho)

4 plantines inoculados con planta "candidata" a planta madre.

2 plantines inoculados con aislamiento débil de psorosis (testigo positivo o enfermo)

2 plantines sin inocular (testigo negativo o sano)

Inóculo: 3 yemas o piezas de corteza de vareta/s yemera/s de la planta "candidata" por plantín indicador.

Observaciones al plantín inoculado: deberá realizarse sobre hojas de brotes jóvenes y adultos después de 1 mes de inoculado y durante, por lo menos, 5 brotaciones.

Temperatura: toda la prueba (test) deberá desarrollarse en invernáculo, en condiciones aisladas, con temperatura entre 18 y 24°C.

Síntomas a observar: Un plantín indicador del grupo psorosis mostrará (de resultado positivo o enfermo): necrosis de brotes (shock), en brotes jóvenes: flecking, manchas, moteado, mosaico, variegado, punteado, anillo. En brotes buenos: variegado, anillo, goma.

SEGUNDA PARTE:

Duración de la segunda etapa: 6 meses

Método: por Protección cruzada (cross protection) realizado en los plantines utilizados en la primera etapa del protocolo.

Indicador: Naranja dulce Pineapple (Citrus sinensis) y/o Tangor Dweet (híbrido). Número de plantas indicadoras prueba individual (test): 8 (ocho)

2 plántulas de los 4 plántulas inoculadas con planta "candidata" (en la primera etapa) se inocularán con un aislamiento fuerte de psorosis.

1 plántula de los 2 plántulas inoculadas con aislamiento débil de psorosis (en la primera etapa) (testigo positivo o enfermo) se inocula con un aislamiento fuerte de psorosis.

1 plántula de los 2 plántulas sin inocular (en la primera etapa) (testigo negativo o sano), se inocula con un aislamiento fuerte de psorosis.

Inóculo: 2 piezas de corteza de varetta yemera del aislamiento fuerte de psorosis en los plántulas indicadores especificados en el párrafo anterior.

Observaciones al plántula inoculado: sobre hojas de brotes adultos después de 3 meses de inoculados y hasta aparición de síntomas.

Temperatura: toda la prueba debe desarrollarse en invernáculo, en condiciones aisladas, con temperatura entre 18 y 24°C.

Síntomas a observar: Un plántula indicador del grupo psorosis NO mostrará (de resultar positivo o enfermo): presencia de goma en hojas, brotes adultos (brotes buenos) y en ramitas.

Estos síntomas sólo deben observarse en los plántulas indicadores que en la primera Etapa dieron negativos para el grupo Psorosis, de esa manera se confirma la ausencia de esta enfermedad.

EXOCORTIS

Método: transmisión por injerto a plantas de Cidra Etrog Arizona 861 S 1 de 15 meses de edad crecidas en condiciones aisladas, en invernáculo.

Indicador: Cidra Etrog Arizona 861 S1 (Citrus medica) injertado sobre un portainjerto vigoroso. Número de plantas indicadoras prueba individual (test): 8 (ocho).

4 plantas inoculadas con planta "candidata" a planta madre.

2 plantas inoculadas con aislamiento débil de exocortis (testigo positivo o enfermo)

2 plantas sanas sin inocular (testigo negativo o sano)

Inóculo: 3 yemas o piezas de corteza de varetta/s yemera/s de la planta candidata por plántula indicador.

Observaciones a la planta inoculada: sobre pecíolos y hojas de brotes adultos después de 3 meses de inoculados como mínimo y durante por lo menos un año.

Temperatura: toda prueba (test) deberá desarrollarse en invernáculo, en condiciones aisladas, con temperatura entre 28 y 32°C.

Síntomas a observar: Un plántula indicador de exocortis mostrará (de resultar positivo o enfermo): epinastia de hojas, amarronamiento del pecíolo, de nervaduras central, de nervaduras secundarias y de la punta de la hoja.

Nota: Cidra Etrog Arizona 861 S1 es un clon. Se multiplica por injerto de yema sobre un pie rugoso (limón rugoso).

CACHEXIA (XILOPOROSIS)

Método: transmisión por injerto a plantas mandarina Parson special injertadas sobre limón rugoso (u otro portainjerto) crecidas en condiciones aisladas, en invernáculo.

Indicador: Mandarina Parson Special injertadas sobre Limón Rugoso (u otro portainjerto vigoroso).

Número de plantas indicadoras prueba individual: 8 (ocho).

4 plantas inoculadas con planta "candidata" a planta madre.

2 plantas inoculadas con aislamiento débil de cachexia (xiloporosis) (testigo positivo o enfermo).

2 plantas sanas sin inocular (testigo negativo o sano).

Inóculo: 3 yemas o piezas de corteza de vareta/s yemera/s de la planta candidata por planta indicadora.

Observaciones a la planta inoculada: después de 9-10 meses de inoculada (como mínimo) y hasta 24 meses se realiza una ventana (levantar la corteza) en la zona de unión del injerto para observar la presencia de goma y poros en corteza y tronco.

Temperatura: toda prueba (test) deberá desarrollarse en invernáculo, en condiciones aisladas, con temperatura entre 28 y 32°C.

Síntomas a observar: Un plantín indicador de xiloporosis mostrará (de resultar positivo o enfermo): al levantar la corteza en la zona de unión del injerto se observará la presencia de goma y poros en corteza y tronco.

ANEXO V

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE MUESTRAS A PLANTAS "CANDIDATAS" A PLANTAS MADRES SEMILLERAS DE CAMPO

1- La planta "candidata" a Planta Madre Semillera debe estar en un Lote de Plantas Madres Semilleras. Debe haber plano del lote y tener un registro de origen, procedencia del material y fecha de plantación para verificar la calidad genética de la futura Planta Madre Semillera.

2- Se debe ubicar el número de lote, el número de fila y el número de planta de la "candidata" a PMS (Planta Madre Semillera) y se identificará dicha planta mediante tarjeta metálica (no oxidable) con los datos: especie cítrica, lote, fila y planta.

3- Extracción de la muestra:

a) se realizará durante mayo-junio de cada año

b) se revisará el árbol para observar posibles problemas sanitarios, de producción o de fidelidad varietal.

c) se dividirá el árbol en 4 sectores y a una altura de 1,50 desde el suelo se extraerán 3 varetas yemeras por sector (total: 12 varetas). Cada vareta deberá ser de 10-15 cm de largo y con un grosor no mayor de 1,5 cm.

d) a las 12 varetas se las tratará con parafina en los extremos (para evitar su deshidratación) y se colocarán en bolsas de polietileno transparentes de 60-80 micrones de espesor debidamente identificadas (adentro y afuera de la bolsa).

Los datos a colocar en las 2 tarjetas de la bolsa serán los que figuran en el árbol de donde se sacó la muestra (punto 2) y la fecha de extracción de la muestra y el responsable de la extracción.

4- Se enviará de inmediato la muestra al Laboratorio de Diagnóstico autorizado por el INASE y se enviará un fax al mismo laboratorio indicando transporte, fecha de envío e identificación del material enviado (número de muestras y datos de cada muestra).

ANEXO VI

Para lograr trazabilidad del ensayo se deberá llevar registro de

Reactivos utilizados

Fecha de compra

Marca

N° de artículo

Fecha de vencimiento

N° de muestras

Fecha de inicio del ensayo

Fecha de finalización

Registro de resultados verificables por copia o en forma informática.

ANEXO VII

**CERTIFICADO DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES DE PLANTAS DE VIVERO
CITRICAS Y/O SUS PARTES**

NUMERO DE MUESTRA:

CODIGO DE LA MUESTRA:

CATEGORIA DE PLANTA:

FECHA DE INGRESO.

Declaración del Responsable del Laboratorio

Certifico que el diagnóstico de enfermedades de plantas de vivero cítricas se ha realizado aplicando la metodología de análisis aprobada y se ha efectuado en el Laboratorio habilitado por la SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS o sus organismos descentralizados en el área de sus competencias, bajo el número de RNCFS:

ANALISIS SOLICITADOS:

TRISTEZA DE LOS CITRICOS:

CLOROSIS VARIEGADA DE LOS CITRICOS

CANCROSIS DE LOS CITRICOS

EXOCORTIS.....

CACHEXIA.....

PSOROSIS.....

OBSERVACIONES:

Firma del responsable

Fecha de análisis

NOTA: El certificado debe estar escrito a máquina. Si el resultado de un análisis es negativo debe colocarse —0— y si no ha sido realizado se debe colocar —N—

El certificado carece de validez , si no tiene membrete oficial del laboratorio y la firma del responsable autorizado, como así también el número y fecha de análisis.

No deben aceptarse certificados con alteraciones, enmiendas o raspaduras, no debidamente salvadas.

En Observaciones se colocará la metodología de análisis efectuada.