

**NORMAS DE FUNCIONAMIENTO DE LABORATORIOS DE ANÁLISIS
FITOSANITARIOS DE PLANTAS CÍTRICAS DE VIVERO Y/O SUS PARTES**

DISPOSICIONES GENERALES

GENERALIDADES

El alcance de la presente normativa es referente a los diagnósticos obligatorios de enfermedades transmisibles por injerto a las distintas categorías y subcategorías de plantas cítricas.

La duración de los diagnósticos y su repetición se harán según el Anexo I de la Resolución N° RESOL-2022-63-APN-INASE#MEC de fecha 1 de noviembre de 2022.

Los laboratorios deberán contar con las condiciones ambientales, físicas y de equipamiento necesarias para el desarrollo de sus tareas, y podrán realizar sólo los ensayos para los cuales el INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS (INASE) los haya habilitado.

Dichos ensayos deberán estar documentados en protocolos con sus respectivos documentos de adopción del método. Tal como se menciona en el Anexo II, estos documentos tendrán que ser presentados ante la Dirección de Evaluación de Calidad del INASE para su aprobación.

Asimismo, se recomienda que se tengan en cuenta las normas de higiene y seguridad y aquellas referidas al descarte seguro de residuos del laboratorio.

El Director Técnico deberá capacitar a los analistas dejando constancia de dicha capacitación en el legajo del personal.

INSTALACIONES

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

LABORATORIO

El área del laboratorio y cada una de sus dependencias deben ser compatibles con el volumen de muestras que se procesen y con el personal disponible. Se debe establecer una separación eficaz entre zonas vecinas cuando se desarrollen en ellas actividades incompatibles de forma que el acceso y el uso de todos los sectores sea definido y controlado. Estos sectores deberán estar detallados en un croquis que será presentado al momento de la solicitud de habilitación (Anexo I-A).

En función del o los análisis para los cuales el laboratorio desee estar habilitado será necesario disponer de:

- Sector de recepción e ingreso de muestras (independiente de los demás sectores).
- Sector de acondicionamiento y lavado de muestras.
- Sector para el análisis mediante técnicas serológicas.
- Sector para el análisis mediante técnicas moleculares.
- Sector para almacenamiento de drogas y reactivos.
- Sector para almacenamiento de materiales de vidrio y plástico.
- Sector para el lavado de material.
- Sector de archivo de muestras.
- Sector de oficina.

INVERNÁCULO

El sector de invernáculo/s debe estar cercado con alambrado olímpico perimetral y contar con piletas de desinfección para la entrada peatonal y vehicular.

Toda el área comprendida en el alambrado perimetral, circundante a los invernáculos, debe estar limpia y libre de malezas que puedan albergar insectos vectores de plagas.

El diagnóstico de enfermedades se realizará en un invernáculo en condiciones de aislamiento exterior y con controles de temperatura.

Para llevar a cabo las pruebas biológicas de manera correcta, deberán existir TRES (3) sectores o invernáculos, en los cuales se desarrollarán las siguientes actividades:

Sector 1: siembra y cultivo de plantines indicadores y mantenimiento de las "plantas candidatas", con rango de temperatura entre 18-35°C.

Sector 2: denominado frío, con un rango de temperatura entre 18-27°C, utilizado para pruebas de diagnóstico para detectar grupo psorosis y tristeza de los cítricos.

Sector 3: denominado caliente, con un rango de temperatura entre 27-40°C, utilizado para pruebas de diagnóstico para detectar viroides.

En todos los sectores se llevarán registros de temperatura para poder correlacionar síntomas con temperatura del sector. Además, semanalmente se realizará el monitoreo de todo el invernáculo para el control de insectos mediante trampas amarillas y recolección de muestras de hojas.

Todo invernáculo dedicado al diagnóstico deberá contar con malla antiáfido (40 mesh) y 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, empleándose previo ingreso al invernáculo.

Al ingresar al invernáculo, en la antecámara se deberá desinfectar el calzado con un producto apropiado (solución desinfectante, cobre, etc.). Dicho desinfectante debe ser renovado periódicamente, dependiendo de la frecuencia del movimiento de personas que ingresen al mismo.

EQUIPAMIENTO

El laboratorio y los invernáculos deberán estar provistos de todos los insumos y equipos necesarios para la correcta ejecución de los ensayos para los cuales el laboratorio desee habilitarse. Cada equipo tendrá una ficha técnica que contenga toda la información necesaria del mismo, así como las reparaciones, mantenimientos y calibraciones realizadas. Todos los equipos deberán ser mantenidos en adecuado estado de funcionamiento, debiendo para ello elaborarse un plan de mantenimiento/verificación de los mismos.

MATERIALES DE REFERENCIA

El laboratorio deberá contar con el material de referencia (controles/testigos positivos y sanos) adecuado para conducir los ensayos, el cual será identificado con las características técnicas que se consideren relevantes.

PROCEDIMIENTOS, REGISTROS Y DOCUMENTOS

El laboratorio establecerá y mantendrá un sistema documental en el que consten los siguientes registros:

- Protocolo/s de análisis para el cual/los cuales ha solicitado la habilitación.
- Documento de adopción del método para cada análisis/protocolo.
- Registro de ingreso de muestras.
- Registro de análisis de virus, viroides y bacterias (incluye boletín interno de análisis, lecturas de lector ELISA, salidas del equipo de PCR, fotografías de geles de agarosa y de membranas, según corresponda).
- Registro de materiales de referencia.
- Registro de pruebas periódicas de dilución de anticuerpos utilizados en la técnica de ELISA.
- Registro de equipos (listado de equipos, plan de mantenimiento/control de equipos, registros de controles, fichas técnicas).
- Registro de reactivos (facturas y/o remitos, fichas informativas que acompañan a los reactivos).
- Certificados de análisis emitidos.

Registro de ingreso de muestras: se registrarán en él todas las muestras que ingresen al laboratorio y al invernáculo, se haya emitido certificado o no (muestras de control interno de calidad, particulares, entrenamiento, test de referencia, muestras de fiscalización y otras), con número correlativo. Los campos mínimos obligatorios que deben ser completados son: número de muestra y/o de diagnóstico, fecha de recepción, remitente, procedencia u origen, especie, cultivar, categoría, número de lote, análisis solicitados, fecha de inicio y final del análisis, fecha de emisión y número del certificado de análisis.

Registro de análisis (de virus, viroides y bacterias): se elaborará un registro de análisis por patógeno/técnica. El mismo será identificado con el mismo número de ingreso que posee la muestra en el registro de ingreso de muestras.

El registro de análisis deberá contar con la siguiente información: número de ingreso de la muestra, análisis solicitados, fecha de inicio y finalización del análisis, resultados obtenidos, metodología utilizada, datos e identificación del analista (si las etapas fueran

desarrolladas por distintos analistas, cada uno indicará la etapa que le corresponda mediante firma y aclaración o sus iniciales). Se recomienda dejar un espacio para anotar observaciones que hubiera del ensayo.

Material de Referencia: el laboratorio deberá contar con los testigos positivos y sanos adecuados para conducir los ensayos.

Reactivos: los distintos reactivos empleados en los análisis de rutina deberán estar rotulados con: fecha de apertura del envase y fecha de vencimiento. Si se trata de soluciones preparadas en el laboratorio, como buffers, en el rótulo se indicarán los siguientes datos: nombre de la solución, fecha de preparación, fecha de vencimiento, nombre del analista que preparó la misma y otros campos que pudieran corresponder (por ejemplo: pH).

Informe de los resultados: los resultados de los ensayos solicitados se informarán en el "Certificado de Análisis Fitosanitarios de Plantas Cítricas de Vivero y/o sus partes". El mismo debe contener al menos los siguientes datos:

- Logotipo del laboratorio con datos (domicilio, localidad, provincia, teléfono, e-mail) y número de inscripción en el RNCyFS.
- Número de certificado de análisis.
- Fecha de emisión del certificado de análisis.
- Número de registro de muestra.
- Especie y variedad.
- Categoría de planta.
- Solicitante.
- Fecha de ingreso de la muestra.
- Enfermedad/patógeno analizado.
- Metodología empleada.
- Resultados.
- Observaciones.
- Firma y sello de Director Técnico.

Aclaraciones:

En el campo “Metodología” se debe indicar la metodología empleada para cada análisis realizado.

En el campo “Resultados” se deberá indicar lo siguiente:

- Si el patógeno a determinar no fue detectado, se deberá indicar “No detectado”.
- Si el patógeno a determinar fue detectado, se deberá indicar “Detectado”.

En el campo “Observaciones”, podrán indicarse aclaraciones, de ser necesario.

Archivo de Registros y Documentos:

Todos los registros, documentos y certificados emitidos deberán guardarse por un plazo de CINCO (5) años.

MUESTRAS PARA ANÁLISIS

Una vez que ingresan al laboratorio, las muestras recibidas deben ser identificadas con su respectivo número de ingreso y procesarse en el menor tiempo posible para evitar alteraciones en la calidad de las mismas. 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 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) es de 5-8°C en heladera, sector de verduras.

Las muestras quedarán a total disposición del INASE, durante VEINTE (20) días corridos después de entregado el correspondiente certificado de análisis, lapso durante el cual deberán mantenerse en condiciones adecuadas de temperatura y humedad y protegidas de contaminaciones.

TÉCNICAS DE LABORATORIO

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) MEDIANTE DAS-ELISA

Equipamiento obligatorio

- Micropipetas de rango apropiado para desarrollar el protocolo.
- Peachímetro rango de pH de 0 a 14, resolución 0,01, error +/- 0,1.
- Estufa de cultivo de temperatura regulable.
- Balanza analítica, capacidad para pesar 120 gr, precisión 0,001 gr.
- Heladera y Freezer (-20 °C).
- Equipo para producción de agua destilada o similar (o en su defecto deberá contar con agua destilada).
- Lector de microplaca (espectrofotómetro 405 nm).

Técnica

El laboratorio deberá enviar el protocolo, que dependerá de la marca comercial del kit utilizado, junto con el documento de adopción del método. Los mismos serán evaluados por la Dirección de Evaluación de Calidad del INASE.

Se deberán tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- La extracción se realizará a partir de corteza verde respetando una relación 1:10 (peso corteza verde: volumen buffer de extracción).
- Prueba de diluciones de anticuerpos: se realizará cada vez que se abre un nuevo lote de anticuerpos y deberá emplearse un testigo positivo de baja concentración.
- El número de testigos a emplear por placa, será como mínimo, el siguiente:
 - testigos positivos (enfermos): DOS (2). Uno de la menor concentración posible tal que se distinga del testigo sano (positivo débil) y otro de una concentración mayor.
 - testigos negativos (sanos): TRES (3).

- blanco (buffer): UNO (1).

Interpretación de los resultados

El tiempo de lectura variará según la calidad de las placas y de los anticuerpos empleados. Se podrá hacer una lectura preliminar a los TREINTA (30) minutos y la lectura final a los SESENTA (60) minutos.

Se considerarán positivas a aquellas muestras cuyas lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm (A 405) arrojen un valor mayor al doble de los controles sanos, o mayor al promedio del valor de la lectura de los controles sanos más un valor de 0,1 de absorbancia.

Todas las muestras con valores de absorbancia menores a lo expresado serán consideradas sanas.

En caso de lecturas donde el cálculo arroje interpretaciones dudosas o confusas, la interpretación final de los resultados quedará a criterio del Director Técnico.

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) MEDIANTE INMUNOIMPRESIÓN DIRECTA

Equipamiento obligatorio

- Micropipetas de rango apropiado para desarrollar el protocolo.
- Peachímetro rango de pH de 0 a 14, resolución 0,01, error +/- 0,1.
- Balanza analítica con capacidad para pesar 120 g(r) con resolución 0.001 gr.
- Lupa binocular de 10_x- 20_x de aumento.
- Heladera y Freezer (-20 °C).
- Equipo para producción de agua destilada o similar (o en su defecto deberá contar con agua destilada).
- Agitador magnético y orbital.
- Cámara fotográfica o dispositivo para tomar fotos.

Técnica

El laboratorio deberá enviar el protocolo, que dependerá de la marca comercial del kit utilizado, junto con el documento de adopción del método. Los mismos serán evaluados por la Dirección de Evaluación de Calidad del INASE.

Se deberán tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- La extracción se realizará a partir de brotes tiernos, pedicelos de hojas o pedúnculos de frutos. Se deben tomar CINCO (5) brotes tiernos de la última brotación o DIEZ (10) hojas alrededor de la copa y preferentemente de la parte superior.
- Se deben realizar al menos DOS (2) improntas por cada brote u hoja.
- Todas las membranas deberán llevar los correspondientes controles positivos y negativos.
- La membrana debe fotografiarse y archivar la foto en el boletín de análisis.

Interpretación de los resultados

La presencia de precipitados violáceos en la zona vascular de las secciones de material vegetal indica una reacción positiva y, por lo tanto, la presencia del virus.

TÉCNICAS MOLECULARES

DETECCIÓN DE VIROIDES MEDIANTE ELECTROFORESIS (s-PAGE)

Equipamiento

- Micropipetas de rango apropiado para desarrollar el protocolo.
- Balanza analítica, capacidad 120gr con resolución 0,001gr.
- Agitador orbital.
- 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.
- Cuba de electroforesis y sus respectivos peines.
- Fuente de electroforesis (100mA, 1000 V de capacidad o superior).

- Cámara fotográfica o dispositivo para tomar fotos.
- Transiluminador.

Técnica

El laboratorio deberá enviar el protocolo junto con el documento de adopción del método, los cuales serán evaluados por la Dirección de Evaluación de Calidad del INASE.

Interpretación de los resultados

La aparición de banda/s en la mitad superior del gel en concordancia con el testigo positivo indica la presencia de viroide/s en la muestra.

La ausencia de bandas indica que el patógeno analizado no fue detectado en esa muestra.

La banda debe observarse en el control positivo (enfermo) y no observarse en el control negativo (sano).

Los resultados esperados son bandas correspondientes a los ARN viroidales en las diversas alturas debido a la diferencia de migración por su peso molecular. Así, CEVd, que es de mayor tamaño se visualiza más arriba en el gel, luego se observa CBLVd y más abajo los demás viroides con bandas muy próximas entre sí.

Cabe aclarar que la utilización de este método en el diagnóstico de viroides, permite detectar la presencia de los mismos, pero no su diferenciación.

DETECCIONES MEDIANTE PCR, RT-PCR Y RT-qPCR

Equipamiento

- Micropipetas de rango apropiado para desarrollar el protocolo.
- Termociclador para PCR o para qPCR, según corresponda.
- Heladera (4°C) y Freezer (-20°C).
- Balanza analítica con resolución 0,001gr.

- Sistema de molienda de material vegetal.
- Centrífuga refrigerada.
- Agitador vórtex.
- Cuba electroforética, camas y peines para geles de electroforesis.
- Cámara fotográfica o dispositivo para tomar fotos.
- Transiluminador.
- Espectrofotómetro para cuantificar ácidos nucleicos (optativo).

Técnica

El laboratorio deberá enviar los siguientes protocolos:

- Protocolo de extracción de ácidos nucleicos.
- Protocolo de síntesis de cDNA en caso de virus y viroides.
- Protocolo de PCR.

También, deberá enviar el respectivo documento de adopción del método, el cual será evaluado por la Dirección de Evaluación de Calidad del INASE.

Además, se tendrá que cumplir con las siguientes consideraciones:

-Para detectar los distintos patógenos mediante RT-PCR, PCR y RT-qPCR deberán utilizarse únicamente los cebadores que se detallan en la **Tabla 1**. No se permite utilizar otros cebadores que no estén incluidos en dicha tabla.

-Las detecciones son de tipo CUALITATIVO.

-Para la detección de la enfermedad Huanglongbing (HLB), el protocolo y los cebadores se detallan en el Anexo IV.

Tabla 1: Cebadores específicos para detectar los distintos patógenos mediante PCR, RT-PCR y RT-qPCR. CVC: Clorosis variegada de los cítricos, CEVd: Exocortis de los cítricos, CBLVd: Viroide de la curvatura de la hoja de los cítricos, HSVd: Cachexia de los cítricos, CDVd: Viroide del enanismo de los cítricos, CTV: Virus de la tristeza de los cítricos, CPsV: Virus de la psorosis de los cítricos.

Patógeno	Nombre	Secuencia 5'- 3'	Tamaño del fragmento (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)
CVC	CVC-1	AGATGAAAACAATCATGCAAA	500	61.5
	272-2i	GCCGCTTCGGAGAGCATTCT		
CEVd	CEV-AM3 R	CCGGGGATCCCTGAAGGACTT	371	55
	CEV-AP3 F	GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG		
CBLVd	CBLV-CM2 R	TCGACGACGACCAGTCAGCT	233	55
	CBLV-AP2 F	TCCCCTTCACCCGAGCGCTGC		
HSVd	CV2-AM R	CCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGT	302	55
	CV2-AP F	GGCAACTCTTCTCAGAATCCAGC		
CDVd	CV3-AM R	TCACCAACTTAGCTGCCTTCGTC	271	55
	CV3-AP F	CTCCGCTAGTCGAAAGACTCCGC		
CBCVd	CV4-AM3 R	TCTATCTCAGGTCGCGAAGGAAGAAGC	209	55
	CV4-AP4 F	TCTGGGGAATTTCTCTGCGGGACC		
CTV	Univ P33-F	GATGTTTGCCTTCGCGAGC	1000	65
	Univ P33-R	CCCGTTTAAACAGAGTCAAACGG		
CPsV	HPCP1C	GTTCAAGATGGAGCAAGTTGATGGA	113	58
	hpCP3	GAGACCCTTGTGTAAAAACCAGCAC		

Interpretación de los resultados

En el caso de las detecciones mediante RT-PCR o PCR convencional, la aparición en el gel de una banda a la altura esperada (tamaño de fragmento esperado) y en concordancia con la banda observada en el control positivo (enfermo), indica la presencia del patógeno en la muestra.

La ausencia de banda indica que el patógeno analizado no fue detectado en esa muestra. La banda debe observarse en el control positivo y no observarse en el control negativo (sano).

Para la estimación del tamaño del amplicón, la banda se debe comparar con un marcador de peso molecular adecuado y, además, con el control positivo.

En el caso de la detección del virus de la psorosis de los cítricos (CPsV) que se realiza mediante RT-qPCR, la muestra se considerará positiva cuando:

- La temperatura de Melting en la cual ocurre el pico, se encuentre dentro del rango establecido por el laboratorio.
- Cuando el valor de Ct obtenido se encuentre dentro del rango establecido por el laboratorio.

Tanto el rango de Tm como el rango de Ct serán establecidos y demostrados/validados por el laboratorio en el documento de adopción del método que el mismo presentó al momento de la habilitación. Cualquier cambio en los reactivos que pudiera modificar los rangos de Tm y Ct de las muestras positivas, el laboratorio deberá realizar una nueva validación y presentar su correspondiente documento de adopción del método.

TÉCNICAS DE INVERNÁCULO

El **protocolo de extracción de las muestras** se describe a continuación:

1)- La planta "candidata" a Planta Madre Semillera (PMS) debe estar en un lote de PMS. Se debe contar con un plano del lote y tener un registro de origen, procedencia del material y fecha de plantación para verificar la calidad genética de la futura PMS.

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

3)- Extracción de la muestra:

Se revisará el árbol para observar posibles problemas sanitarios, de producción o de fidelidad varietal.

Se dividirá el árbol en CUATRO (4) sectores y a una altura aproximada de 1,50 m desde el suelo.

Se extraerán TRES (3) varetas yemeras por sector (total: DOCE (12) varetas). Las varetas deberán ser maduras, de sección circular.

En caso de que las varetas no se inoculen en el corto plazo, se las tratará con parafina en los extremos (para evitar su deshidratación) y se colocarán en heladera, en bolsas de polietileno debidamente identificadas con tarjetas (adentro y afuera de la bolsa).

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

4)- La firma o el solicitante del análisis, enviará de inmediato la muestra al Laboratorio de Diagnóstico autorizado por el INASE y se comunicará de forma fehaciente con el mismo, indicando transporte, fecha de envío e identificación del material enviado (número de muestras y datos de cada muestra).

SIEMBRA Y CULTIVO DE PLANTINES INDICADORES PARA PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO BIOLÓGICAS

Los plantines indicadores se obtendrán de semillas de Plantas Madres Semilleras con resultado negativo de pruebas de diagnóstico para psorosis. Las semillas se cosecharán de estos árboles según procedimientos rutinarios, se secarán y desinfectarán, conservándose hasta su siembra a una temperatura de 5-8°C.

Las semillas se sembrarán en cajones germinadores dentro del invernáculo. Una vez alcanzados entre 10-15 cm de altura se trasplantarán a macetas bajo estricta selección que permita la mayor uniformidad de los plantines seleccionados, evitando recesivos y de origen sexual.

Se debe garantizar la obtención de plantines vigorosos, libres de deficiencias y de patógenos de manera de evitar el enmascaramiento de síntomas foliares a observar en las pruebas biológicas.

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO BIOLÓGICAS

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

- El inóculo de la planta "candidata" (obtenido de una vareta yemera) se injertará en forma de escudete o "T" en número de TRES (3) inóculos (yemas o piezas de corteza de vareta/s yemera/s) por cada plantín indicador, empleándose OCHO (8) plantines de cada indicador por planta "candidata" a testear:

-CUATRO (4) plantines de cada indicador, inoculados con la planta candidata a

controlar.

-DOS (2) plantines como controles positivos, inoculados preferentemente con un aislamiento severo y uno leve, de la enfermedad que se está diagnosticando.

-DOS (2) plantines como controles negativos (sin inocular).

El objetivo de los controles (negativos y positivos) es disponer de plantines/plantas con síntomas (enfermos) y sin síntomas (sanos) para comparar con los observados en los inoculados con la planta "candidata". Esto evita la subjetividad de las observaciones y permite comprobar que las condiciones ambientales son óptimas para la manifestación de los síntomas, sin deficiencias nutricionales y/o daños de insectos que pudieran enmascarar los mismos.

- Estas pruebas también pueden realizarse en forma grupal, utilizando CINCO (5) plantas "candidatas" por grupo. En este caso, en lugar de DOS (2) testigos positivos y DOS (2) testigos negativos por planta "candidata", se emplean CUATRO (4) testigos positivos y CUATRO (4) testigos negativos por grupo.

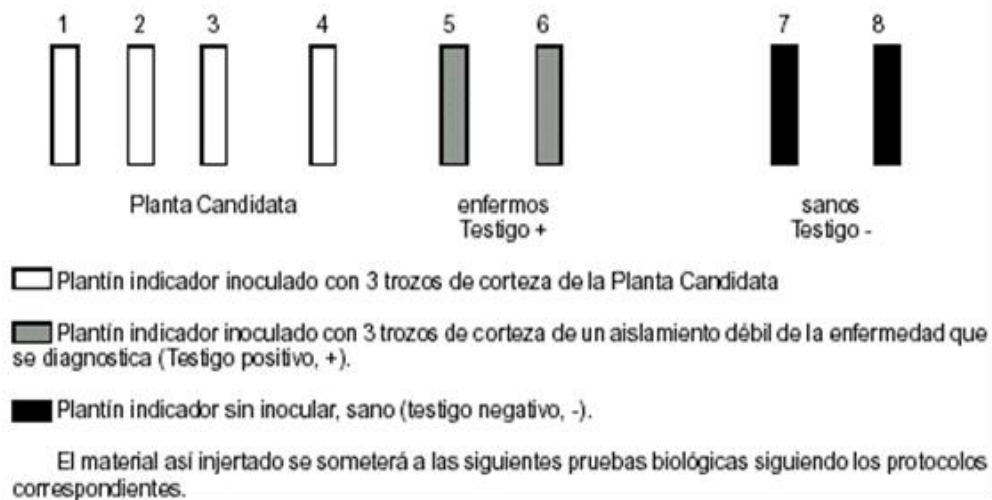
Los testigos positivos se inoculan:

-DOS (2) testigos con un aislamiento débil de la enfermedad a diagnosticar y

-DOS (2) testigos con otro aislamiento débil de la misma enfermedad a diagnosticar (en lo posible debería ser un testigo positivo de origen conocido).

- Toda prueba debe llevar una planilla de invernáculo donde se registrará 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; que enfermedad se diagnostica; que especie se utiliza como indicador; si es prueba clásica o grupal; las observaciones que se realizan y los resultados cuando finaliza la prueba.

Esquema de una prueba clásica de diagnóstico biológico:



DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV)

Indicador: lima mejicana o lima Key (*Citrus aurantifolia*).

Observaciones al plantín inoculado: deberán realizarse a partir de la primera brotación y durante por lo menos TRES (3) brotaciones. Para la observación de síntomas en ramitas (*stem pitting*) se debe esperar OCHO (8) meses de inoculado.

Temperatura: entre 18 - 27°C (sector “frío”).

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

DIAGNÓSTICO DE GRUPO PSOROSIS

(Psorosis, Concave gum, Cristacortis, Impietratura y otras enfermedades del Grupo psorosis)

Esta prueba se divide en **DOS (2) etapas**:

1)- Primera etapa: prueba para Grupo psorosis.

Indicador: Naranja dulce Pineapple (*Citrus sinensis*) y/o Tangor Dweet (híbrido).

Temperatura: entre 18 - 27°C (sector “frío”).

Observaciones al plantín inoculado: deberá realizarse sobre hojas de brotes jóvenes y adultos a partir de la primera brotación.

Síntomas a observar: un plantín indicador del grupo psorosis mostrará, de resultar positivo o enfermo: necrosis de brotes (*shock*), flecos cloróticos en brotes jóvenes (*flecking*), manchas, moteado, mosaico, variegado, puntillado. En brotes adultos: variegado, anillos, goma.

2)- Segunda etapa: prueba de protección cruzada.

Duración de la segunda etapa: luego de SEIS (6) a OCHO (8) semanas desde la inoculación.

Método: 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:

Se inocularán DOS (2) de los CUATRO (4) plantines inoculados con planta "candidata" en la primera etapa, con un aislamiento de Psorosis B.

Además, UN (1) plantín de los DOS (2) plantines inoculados con un aislamiento leve de psorosis en la primera etapa (testigo positivo o enfermo), se inoculará con un aislamiento de Psorosis B.

Por último, UN (1) plantín de los DOS (2) plantines sin inocular en la primera etapa (testigo negativo o sano), se inoculará con un aislamiento de Psorosis B.

Inóculo: DOS (2) piezas de corteza de vareta yemera de planta con psorosis anterior.

Temperatura: entre 18 - 27°C (sector “frío”).

Observaciones al plantín inoculado: sobre hojas de brotes adultos a partir de las OCHO (8) – DOCE (12) semanas desde la inoculación y hasta aparición de síntomas.

Síntomas a observar: un plantín indicador del grupo psorosis, de resultar positivo o enfermo con el virus de la psorosis, NO mostrará presencia de goma en hojas, en brotes adultos y en ramitas. Estos síntomas sólo deben observarse en los plantines indicadores que en la primera etapa dieron negativos para el virus de la psorosis, de esa manera se confirma la ausencia de esta enfermedad, no así para las muestras enfermas con OTROS virus del Grupo Psorosis (que sí muestran síntomas de Psorosis B).

Aclaración: en los casos en los que se emplea la técnica de RT-qPCR para detectar CPsV, no es necesario llevar a cabo la segunda etapa (etapa de protección cruzada).

DIAGNÓSTICO DE VIROIDES CÍTRICOS

Indicador: Cidra Etrog Arizona 861 S1 (*Citrus medica*) injertada sobre un portainjerto vigoroso.

Temperatura: entre 27 - 40°C (sector “caliente”).

Observaciones a la planta inoculada: sobre pecíolos y hojas de brotes adultos después de TRES (3) meses de inoculados como mínimo y durante por lo menos UN (1) año.

Síntomas a observar: un plantín indicador de viroides mostrará (de resultar positivo o enfermo): epinastia, 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 vigoroso (por ejemplo, *Citrus jambhiri* o limón rugoso).

DIAGNÓSTICO DE CACHEXIA (XILOPOROSIS)

Indicador: Mandarina Parson’s Special injertadas sobre *Citrus jambhiri* (limón rugoso u otro portainjerto vigoroso).

Observaciones a la planta inoculada: después de, como mínimo, NUEVE (9) a DIEZ (10) meses de inoculada y hasta DOS (2) años, 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: entre 27 - 40°C (sector “caliente”).

Síntomas a observar: de resultar positivos o enfermos, los plantines mostrarán, al levantar la corteza en la zona de unión del injerto, presencia de goma y poros en corteza y tronco.

DIAGNÓSTICO DE CANCROSIS DE LOS CÍTRICOS

Insumos y Reactivos:

- Vasos de precipitado de 50 y 100 ml.
- Jeringas de 5 ml.
- Micropipetas de 10 y 50 ul.
- Tips para micropipetas.
- Cajas de Petri.
- Papel de filtro.
- Agar agua al 10%.
- Hipoclorito de sodio.
- Frascos para lavado y desinfección de las hojas de 100 ml.
- Morteros.
- Cámara de flujo laminar.
- Estufa de cultivo con luz.
- Destilador o agua destilada.
- Cámara de crecimiento con luz y regulación de temperatura.

Método: infiltración de tejido susceptible.

Procedimiento:

a) En hoja desprendida:

- 1- Cortar hojas jóvenes de una variedad sensible: lima mejicana o pomelo Duncan,

- y colocarlas en un frasco grande.
- 2- Lavarlas con agua corriente durante QUINCE (15) minutos.
 - 3- Lavar por CINCO (5) minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 1%.
 - 4- Enjuagar TRES (3) veces, CINCO (5) minutos, en agua destilada estéril.
 - 5- Bajo flujo laminar, secar las hojas en papel de filtro estéril.
 - 6- Pinchar, generando heridas en cada hoja en el envés, alrededor de la nervadura central, CINCO (5) veces de cada lado.
 - 7- Colocar la hoja en caja de Petri conteniendo agar agua al DIEZ POR CIENTO (10%) y sembrar en cada herida 10 ul de la solución problema.
 - 8- Preparar un testigo negativo con agua destilada estéril.
 - 9- Incubar a 28°C con luz permanente.
 - 10- Leer hasta DOS (2) o TRES (3) semanas.

La primera semana aparece una pequeña mancha oleosa. Luego se manifiesta un halo amarillento alrededor y, finalmente, se forma un tejido calloso blanco granuloso alrededor de la herida.

b) En plantas de variedad sensible:

Indicador: pomelo Duncan y lima Key.

Inóculo: trocitos de cancro de hojas, tallos o frutos que se trituran en mortero y se maceran en agua corriente. El líquido sobrenadante se utiliza como inóculo.

Los plantines deben mantenerse en excelentes condiciones de crecimiento.

Se eligen hojas jóvenes y se inoculan en el envés con jeringa de 5 ml sin aguja, esta inoculación se realiza por presión cerca de la nervadura central donde la suspensión (inóculo) penetra hasta el mesófilo de la hoja. Se realizan OCHO (8) puntos de inoculación (CUATRO (4) inoculaciones a cada lado de la hoja) introduciendo el inóculo en el mesófilo de la hoja, abarcando la mitad de la misma. Se dejan en cámara de crecimiento y, a los CUATRO (4) o CINCO (5) días se observan los síntomas. Al comienzo se observarán pequeñas puntuaciones cloróticas y luego, en la mitad de la hoja inoculada, se desarrollan los típicos canchros.



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: Anexo III EX-2023-35593550-APN-DA#INASE

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 20 pagina/s.