



INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE *FUSARIUM CIRCINATUM* EN MUESTRAS DE VIVEROS BAJO CONTROL OFICIAL

TABLA DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PAGINA
1 OBJETIVOS Y ALCANCE	2
2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS	2
3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	3
4 REQUISITOS	3
4.1 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos	3
4.2 Requisitos de personal	6
4.3 Requisitos específicos	6
4.4 Medios de verificación de requisitos	7
5 ANÁLISIS/ENSAYO	7
5.1 Captación y envío	7
5.2 Recepción y manejo de la muestra/contramuestra	8
5.3 Metodología	9
5.4 Cálculo y expresión de resultados	13
5.5 Esterilización y eliminación de material de desecho	14
5.6 Variación de la metodología	14
6 COMUNICACIÓN Y REGISTRO DE LOS RESULTADOS	14
7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS ACREDITADOS	15
8 OBLIGACIONES	15
9 ANEXOS	16
9.1 Lista de analista(s) del laboratorio vinculados al diagnóstico	16
9.2 Aviso inicio recepción muestras para diagnóstico de <i>Fusarium circinatum</i>	17
9.3 Formulación de medios de cultivos	18
9.4 Formulario modelo para registro de Fotodocumentación de geles	21



1 OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo de este documento es establecer los requisitos que deberán cumplir los(as) interesados(as) que voluntariamente postulen ante el SAG, para ser laboratorios acreditados en la ejecución del diagnóstico de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, cuyos análisis son requeridos para la autorización de movilización de plantas y estacas de *Pinus* spp. y *Pseudotsuga* spp., de conformidad con la normativa de control oficial de esta plaga.

Asimismo, entrega las directrices para que estos laboratorios, una vez acreditados, realicen este análisis.

2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Cooke D. E. L. & Duncan J. M. (1997) Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on the ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA. *Mycological Research* 101, 667-677.
- EPPO. 2003. Ficha informativa sobre los organismos de cuarentena. *Gibberella circinata*. Boletín OEPP/EPPO 35, 383–386.
- Mihail. J. D and Rush. C. M. (Eds) (1992). *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. 265 p.
- Leslie, J. and Summerell, B. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*.
- Nelson et Al. 1983. *Fusarium species, An Illustrated Manual for Identification*.
- Nierenberg & O'Donnell. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 1998, pp. 434-458.
- Schweigkofler, W., O'Donnell, K. and Garbelotto, M., 2004. Detection and Quantification of Airborne Conidia of *Fusarium circinatum*, the Causal Agent of Pine Pitch Canker, from Two California Sites by Using a Real-Time PCR Approach Combined with a Simple Spore Trapping Method. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, 3512-3520.
- Servicio Agrícola y Ganadero. 2008. Resolución Exenta del Director Nacional N° 1424 del 24 de marzo del 2008 y sus modificaciones. Establece medidas de control obligatorio de *Fusarium circinatum*, modifica Resolución N° 1742 de 2003 y deroga Resolución N° 2256 de 2006.
- Servicio Agrícola y Ganadero. 2003. Resolución Exenta del Director Nacional N° 1742 del 2 de julio de 2003. Declara el control obligatorio de *Fusarium circinatum* a todas las personas y entidades que reproduzcan plantas de *Pinus* spp. y *Pseudotsuga* spp. a partir de campos de setos, ya sea para autoconsumo, comercio o investigación.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315–322. Academic Press, San Diego.



3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

PCR o Polymerase Chain Reaction.	Reacción en cadena de la polimerasa
MSF	Medio selectivo para <i>Fusarium</i>
PDA	Agar papa dextrosa
CLA	Agar clavel
SNA	Synthetischer nährstoffärmer agar
Servicio/SAG	Servicio Agrícola y Ganadero
Tercero Muestreador	Tercero acreditado para la realización del proceso de muestreo dirigido a viveros y campos de setos bajo control oficial de <i>Fusarium circinatum</i> .

4 REQUISITOS

4.1 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos

4.1.1 REQUISITOS DE INFRAESTRUCTURA

El laboratorio debe contar con una infraestructura tal que garantice el correcto desarrollo de la metodología de análisis a realizar.

En todos los casos debe existir una separación efectiva entre las áreas vecinas, ya sea mediante paneles o piezas separadas, en donde se efectúan actividades incompatibles, para evitar contaminación cruzada.

Las superficies de muros, cielos, pisos y mesones deben ser lisas, de fácil limpieza e impermeables.

Además, dependiendo de la etapa de análisis, se deberá cumplir con los siguientes requisitos:

Siembra en medios de cultivo: El laboratorio debe contar al menos con salas separadas de preparación de muestras y siembra.

PCR: El laboratorio debe contar al menos con salas separadas de preparación de muestras (extracción de ADN), de amplificación y electroforesis.

4.1.2 REQUISITOS DE EQUIPAMIENTO

El laboratorio debe contar con los equipos necesarios, acordes al volumen de muestras, que garanticen el correcto desarrollo de la metodología de análisis a realizar. Deben contar con su certificado de mantenimiento y calibración al día, efectuado una vez al año por una empresa pertinente en el área.

A continuación se detalla el equipamiento mínimo que se debe considerar:



- Balanza de 0.01 a 100 gr. con una resolución de 0.01 gr.
- Estufa de incubación que alcance una temperatura de 37°C, con un error máximo de +- 1°C
- Micropipetas de 0.5-10µl, 2-20µl, 20-200µl y 100-1000µl. Un set de uso exclusivo para PCR.
- Peachímetro.
- Freezer o congelador que alcance temperaturas de -18 °C o menores.
- Refrigerador que alcance una temperatura de 6°C+-2°C.
- Conservadora de muestras que alcance una temperatura de 6°C ± 2°C.
- Microscopio en óptimas condiciones, con objetivos de 4x, 10x y 40x como mínimo.
- Autoclave.
- Cámara de flujo laminar o gabinete de bioseguridad Clase II.
- Micro-Centrífuga (hasta 14000 r.p.m.).
- Baño de agua termoregulado (30-80°C).
- Agitador de tubos o Vortex.
- Termociclador.
- Fuente de poder.
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Transiluminador UV.
- Sistema fotográfico para registro de geles.

4.1.3 REQUISITOS DE MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

El laboratorio debe contar con los materiales y reactivos necesarios acordes al volumen de muestras (stock suficiente para los análisis de la temporada) y que garanticen el correcto desarrollo de la técnica de análisis (reactivos sin expirar).

A continuación se detallan algunos de los materiales, reactivos y medios de cultivo que se deben considerar como mínimo:

- Placas de 90mm de diámetro (plásticas o de vidrio Petri).
- Etanol 95%.
- Hipoclorito de sodio.
- Agua destilada.
- Papel filtro.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Agar papa dextrosa (PDA).
- Peptona.
- Agar.
- Pentachloronitrobenzeno (PCNB 75% polvo mojable).



- Fosfato de potasio (KH_2PO_4).
- Sulfato de magnesio heptahidrogenado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
- Estreptomicina sulfato.
- Neomicina sulfato.
- Bisturí.
- Hojas de bisturí.
- Guantes de látex.
- Isopropanol.
- Buffer CTAB.
- 10 X Buffer PCR.
- Cloruro de Magnesio (MgCl_2).
- dNTP's.
- Taq polimersa.
- Partidores específicos y universales.
- Puntas para micropipetas con y sin filtro.
- Tubos de PCR de 0.2mL libres de nucleasas.
- Tubos eppendorf de 1.5mL libres de nucleasas.
- Agua Libre de nucleasas.
- Marcador de peso molecular 100pb.
- Buffer TAE (Tris- acetato-EDTA).
- Bromuro de Etidio (10 mg/ml).
- Agarosa grado molecular.

4.1.4 REQUISITOS DE ESTÁNDARES

Se utilizará como estándares, cepa y ADN de *Fusarium circinatum* y *Fusarium* sp., proporcionadas por el Laboratorio de Micología del Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias del Servicio. Estos estándares, serán utilizados para el control del método de ensayo durante la visita de verificación y se entregarán una vez que el laboratorio postulante haya sido aceptado como laboratorio acreditado.

La cepa de referencia de *Fusarium circinatum* deberá ser mantenida en condiciones de resguardo similares a las exigidas para cuarentenas permanentes, vale decir, en instalaciones o equipos en aislamiento, con acceso restringido, con identificación clara de su condición y la aplicación de todas las medidas necesarias para evitar que el hongo pueda diseminarse.



4.2 Requisitos de personal

El laboratorio debe contar con el siguiente personal:

4.2.1 RESPONSABLE TÉCNICO

El laboratorio deberá designar un(a) responsable técnico, quien será la contraparte ante el SAG en temas técnicos asociados a su actividad como laboratorio acreditado, y deberá cumplir con los siguientes requerimientos:

- Poseer título profesional otorgado por una entidad reconocida por el Estado, correspondiente a una carrera de las ciencias silvoagrícolas, bioquímicas, biotecnológicas o biológicas, de una duración de al menos 10 semestres académicos. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Experiencia laboral en el área de laboratorios de al menos dos (2) años.
- Tener competencia técnica o experiencia laboral (de al menos 1 año) comprobable en laboratorio de fitopatología y técnicas moleculares.

4.2.2 ANALISTAS

El laboratorio deberá contar con analistas en número adecuado, de acuerdo a la cantidad de análisis a realizar, quienes deben cumplir el siguiente perfil:

- Contar con título profesional o técnico o ser egresado, de una carrera correspondiente al área biológica o afín, impartida por una entidad de enseñanza superior reconocida por el Estado. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Tener competencia técnica o experiencia laboral (de al menos 1 año) comprobable, en laboratorio de fitopatología y técnicas moleculares.

El laboratorio previendo una eventual ausencia del responsable técnico o del o los analistas, podrá postular a otras personas para que actúen en ausencia del o los titulares, en calidad de subrogante. En tal caso, el laboratorio deberá solicitarlo por escrito, presentando al Servicio la documentación que demuestre que ese personal cumple con el perfil para desempeñar el cargo.

4.3 Requisitos específicos.

El laboratorio debe contar con un manual de procedimiento que describa en forma detallada el proceso de análisis, el manejo de los controles, el manejo de las contramuestras y la eliminación de residuos. Sin perjuicio de lo anterior, el laboratorio también deberá contar con los procedimientos que consideren las metodologías indicadas en el numeral 5.3 de este Instructivo.

El laboratorio debe contar con un sistema de control de calidad interno con controles de referencia certificados o secundarios que aseguren la validez de sus ensayos.



El laboratorio deberá contar con timbres identificadores del laboratorio y que registren la fecha y en lo posible la hora.

4.4 Medios de verificación de requisitos.

De acuerdo a lo dispuesto en el **Reglamento Específico** para la acreditación de laboratorios de análisis/ensayos, los interesados en acreditarse para realizar el diagnóstico de *Fusarium circinatum*, deben presentar **junto a la solicitud de acreditación**, los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG:

1. Los antecedentes generales del laboratorio que se establecen en el numeral 6.1 del Reglamento Específico para la acreditación de laboratorios de análisis/ensayos.
2. Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas y ubicación de equipos.
3. Lista de equipos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio y capacidad cuando corresponda.
4. Lista de materiales y reactivos.
5. Formulario de identificación del personal que se desempeñará como analista, según formato establecido en el Anexo N° 9.1 de este Instructivo.
6. Certificado de título o de egreso de los/las analistas identificados en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
7. Documentos que acrediten la competencia o experiencia tanto del/la responsable técnico como de los/las analistas en el área de fitopatología y técnicas moleculares.
8. Documentos especificados en el numeral 4.3 del presente instructivo.

Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el Reglamento específico de acreditación como en este instructivo, serán confirmados por el Servicio en la visita de verificación o por los medios que considere idóneos para tal efecto.

Con este fin, el SAG podrá solicitar al postulante la ejecución de la técnica por parte del responsable técnico o de uno o más analistas del laboratorio.

5 ANÁLISIS/ENSAYO

5.1 Captación y envío

El muestreo será realizado por terceros acreditados por el SAG para este fin y debe seguir los procedimientos de acuerdo a lo establecido en el Anexo N° 5 del “Reglamento específico de acreditación de terceros para la realización de labores de muestreo en viveros y campos de setos bajo control oficial de *Fusarium circinatum*”, por lo tanto no es una actividad de competencia de los laboratorios acreditados en esta especialidad.



5.2 Recepción y manejo de la muestra/contramuestra

5.2.1 RECEPCIÓN DE LA MUESTRA

El laboratorio acreditado deberá informar por escrito (vía fax o correo electrónico) al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, el momento en que inicia una nueva temporada de diagnóstico en el marco de la acreditación ante el SAG. Este aviso deberá ser realizado dentro de las 24 horas siguientes de recibidas las primeras muestras. Para tal efecto, deberá utilizar un documento según formato establecido en Anexo N° 9.2 de este instructivo.

Toda muestra debe ingresar al laboratorio acreditado con su correspondiente “etiqueta de identificación de muestras” (código de barras con la fecha, el número de folio y correlativo de la muestra), generada por el Sistema de Información Vegetal (SISVEG) y acompañada por el formulario oficial de monitoreo de viveros y campos de setos positivos a *Fusarium circinatum*, indicado en el Anexo N° 5 del “Reglamento específico de acreditación de terceros para la realización de labores de muestreo en viveros y campos de setos bajo control oficial de *Fusarium circinatum*”.

El laboratorio deberá verificar al momento del ingreso de la muestra, que ésta se encuentre en condiciones adecuadas de embalaje y que el tiempo entre el muestreo y la recepción en el laboratorio sea menor o igual a 36 horas. Además, debe verificarse que la información contenida en el formulario oficial esté completa, con el respectivo timbre y firma del tercero acreditado muestreador, y que el número de folio y correlativo señalado coincida con la rotulación de la etiqueta de identificación de cada una de las muestras, así como también con la cantidad de muestras recibidas. Una vez verificado lo anterior, el recepcionista del laboratorio, dejará constancia de la recepción de la o las muestras, mediante timbre y firma del formulario oficial, indicando además la fecha y hora de recepción, quedándose el laboratorio acreditado con una copia de este formulario.

En caso que las muestras no vengán acompañadas por estos documentos, o que la información esté incompleta o no coincida, éstas podrán ser aceptadas, bajo exclusiva responsabilidad del laboratorio acreditado, en la medida que se asegure su trazabilidad y que el tercero muestreador se comprometa a regularizar tal situación, dentro de un plazo no mayor a 24 hrs.

Posteriormente, el responsable técnico debe evaluar la aptitud de las muestras para el análisis, para lo cual deberá considerar como muestra apta, aquella que no presente signos de deshidratación (a menos que sea indicado en las observaciones sobre esa condición desde el vivero), descomposición y/o presencia evidente de productos químicos, además debe ser representativa en cantidad y tamaño y encontrarse en forma íntegra (planta completa con tallo con acículas, cuello y raíces). Si la muestra llega en condiciones de embalaje inadecuadas o no apta para análisis, ésta debe ser rechazada.

En caso de rechazo de muestras, se debe avisar en forma escrita de tal situación (vía fax o correo electrónico) y de manera simultánea, tanto al tercero muestreador, como a la oficina SAG correspondiente al origen de la muestra. En este documento se deberá indicar que la muestra no ha sido apta para el análisis, identificando el N° de folio del protocolo, el o los números correlativos de las muestras y causal de rechazo (esto dentro



de un plazo de máximo 2 días corridos contados desde la recepción de la muestra por parte del laboratorio acreditado) y solicitar el envío de nueva muestra.

Una vez el laboratorio acreditado ha verificado lo anterior y considerado que la(s) muestra(s) son apta(s) para su análisis, debe aceptarlas ingresándolas al sistema computacional SISVEG.

Las muestras deberán ser procesadas dentro de las 48 horas posteriores a la recepción de éstas, conservándolas durante este período a una temperatura de $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.2.2 MANEJO DE CONTRAMUESTRAS

El laboratorio deberá mantener como contramuestras, una placa Petri como mínimo por medio de cultivo utilizado, con el aislado original (con trozos de tejido vegetal) a partir del cual se realizó el diagnóstico final (tanto para muestras positivas, como negativas), selladas con parafilm y conservadas a una temperatura de $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por un período mínimo de un año a contar de la fecha de emisión del informe final.

Además, el laboratorio deberá mantener y conservar un cepario con aislados de todas las muestras positivas, purificadas a partir de cultivo monospórico, en dos tubos eppendorf con papel filtro y en una placa plástica de 2 compartimentos, cada uno con agar papa dextrosa y medio de cultivo SNA o CLA (indicado en el Anexo N° 9.3 del presente instructivo), el cual deberá conservarse en condiciones que permitan su viabilidad en forma indefinida a una temperatura inferior a -18°C , en el caso del papel filtro, y durante mínimo 1 año en el caso de medios de cultivo, período en el cual deberán estar disponibles a los requerimientos que el SAG estime pertinente. En el caso de ADN, las extracciones deben ser conservadas durante 1 año como mínimo, a una temperatura inferior a -18°C .

5.3 Metodología.

El diagnóstico de *Fusarium circinatum* debe realizarse de acuerdo al siguiente procedimiento:

5.3.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA (COMPUESTA POR MAS DE UNA PLANTA)

- a) Eliminar los restos de suelo o sustrato adheridos al cuello y las raíces, en bolsas para eliminación de residuos.
- b) Sumergir las raíces y cuello de las plantas, en una solución de hipoclorito de sodio al 2% de solución comercial, durante 10-15 segundos.
- c) Lavar las raíces y el cuello de las plantas con agua corriente, para eliminar los restos de suelo o sustrato y exceso de cloro que hayan quedado adheridos.
- d) Secar las plantas con papel absorbente estéril.
- e) De cada planta, cortar en forma aséptica 2-3 trozos de raíces de 1 cm. de largo (seleccionar raíces de 2-4 mm. aprox. de grosor y cercanos al cuello) y 3-4 trozos de tejido de la zona del cuello de 0.5x2 cm. (realizar los cortes en forma



longitudinal y de 1-2 mm. aprox. de grosor) con o sin síntomas de zona de avance de necrosis o lesión.

- f) Depositar los trozos cortados en un vaso precipitado estéril, previamente identificado con el número del folio y correlativo respectivo de la muestra, para ser sembrado en medios de cultivo.

5.3.2 SIEMBRA EN MEDIOS DE CULTIVO

- a) Desinfectar en forma superficial los trozos de tejido seleccionados, en hipoclorito de sodio al 1.5% de solución comercial por 1 minuto.
- b) Enjuagar los trozos 2-3 veces en agua destilada estéril.
- c) Secar los trozos en papel absorbente estéril, dentro de la cámara de flujo laminar o gabinete de bioseguridad.
- d) Sembrar en forma aséptica los trozos en Medio Selectivo de *Fusarium* (MSF) y PDA (formulación especificada en el Anexo N° 9.3 de este instructivo). Sembrar en forma equidistante 4-5 trozos por placa con 2 repeticiones en cada medio de cultivo, sellando cada placa con plástico parafilm o alusaplast.
- e) Identificar cada placa y dejarlas en incubación por 7 días como mínimo a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en completa oscuridad.
- f) Revisar los cultivos mediante microscopía, realizando una preparación en portaobjeto para determinar la presencia de *Fusarium* spp.
- g) Si no hay desarrollo de *Fusarium* spp. en ninguna de las placas, la muestra se diagnostica como negativa al hongo.
- h) Si existe desarrollo de *Fusarium* spp. en alguna de las placas, se debe realizar un prediagnóstico de cada uno de los aislados, seleccionando aquellos que posean algunas de las características morfológicas y de crecimiento de colonia típicas, descritas en la literatura para *Fusarium circinatum*.
- i) Una vez seleccionadas las colonias, éstas se deben marcar con una cruz con lápiz permanente en el envés de la placa. Si éstas se encuentran relativamente puras, se puede proceder con el diagnóstico de ADN en forma directa, de lo contrario se debe purificar efectuando un repique en MSF y PDA, repitiendo los pasos desde el punto e).
- j) En aquellas muestras positivas, proceder con el cultivo monospórico, para la obtención del cepario descrito en el numeral 5.2.

5.3.3 DETECCIÓN MEDIANTE PCR

a) Extracción de ADN

Para cada muestra, se debe realizar extracción de ADN a partir de micelio proveniente de cada una de las colonias seleccionadas (descritas en el punto i del numeral 5.3.2 de este instructivo) en forma individual y separada, es decir, una muestra podrá estar constituida



por más de una extracción, correspondiente cada una al templado de ADN a utilizar en forma individual en el mix o cóctel de PCR.

Pueden utilizarse diferentes kits comerciales de extracción de ADN de hongos o microorganismos que existen en el mercado, así como otros procedimientos descritos en la literatura científica, que aseguren una extracción de ADN confiable y de calidad.

No obstante lo anterior y de acuerdo a los buenos resultados obtenidos, a continuación se detalla el procedimiento sugerido, para realizar la extracción de ADN (protocolo modificado de Cooke, D.E.L. & Duncan, J., 1997):

- i Rotular cada uno de los tubos eppendorf, de tal manera que permita identificar la muestra y colonia a analizar.
- ii Tomar con una aguja hipodérmica una pequeña porción de micelio (aprox. del tamaño de una cabeza de fósforo), evitando sacar parte del medio de cultivo.
- iii Depositarlo en un tubo eppendorf estéril libre de nucleasas de 1.5mL, con 1mL de buffer de extracción (200mM Tris HCl, 250mM NaCl, 25mM EDTA y 0.5% SDS) agregando una pequeña cantidad (50mg) de perlitas de vidrio de 0.2-0.5mm de diámetro (glass beads) o depositar en un mortero de porcelana estéril con buffer de extracción.
- iv Moler el material utilizando un homogenizador plástico o pistilo estéril, según corresponda.
- v En el caso de uso de mortero, el micelio macerado recuperar con micropipeta y depositar en un tubo eppendorf (asegurarse de completar un volumen de 1mL en el tubo).
- vi Invertir suavemente 2 a 3 veces e incubar a 65°C a baño maría (baño termostático) por 30 minutos, invertir 2-3 veces y mantener por 30 minutos más a 65°C.
- vii Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos, remover 750 µL del sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo estéril, rotulado.
- viii Agregar 750 µL (1 volumen) de isopropanol a -20°C e invertir suavemente 3-4 veces. Incubar a T° ambiente por 10-15 minutos o dejar toda la noche a -20°C.
- ix Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos, luego vaciar el isopropanol.
- x Lavar el pellet con 1mL de etanol al 70% y darle un spin a 13000 rpm por 2 minutos.
- xi Vaciar el exceso y secar al aire o estufa a 37°C por 30 a 40 minutos.
- xii Resuspender en 100 µL de agua libre de DNAasa y RNAasa grado molecular o en buffer TE.
- xiii Agregar 2 µL de RNAasa A (10mg/mL) e incubar 10 minutos a 37°C.
- xiv Proceder a la amplificación de ADN.
- xv Almacenar contramuestra de extracto de ADN a 20°C bajo cero $\pm 1^\circ\text{C}$.

b) Amplificación mediante partidores específicos.

El procedimiento que a continuación se describe, se basa en la utilización de partidores específicos para la detección de *Fusarium circinatum*, desarrollados por Schweigkofler, W. et al. (2004) y adaptados para el uso en PCR convencional por Hammerbacher, A. y Wright, L. (2005, TPCP-FABI). Además, se incorporó como control interno de



amplificación (CIA), el uso de partidores universales para eucariontes (White *et al.*, 1990 y Cooke *et al.* 1997).

i Secuencia de partidores a utilizar:

Nombre del Partidor	Secuencia	Detección
CIRC1A	5`-cttgctcgagaagg-3`	<i>Fusarium circinatum</i>
CIRC4A	5`-acctaccctacacctctact-3`	<i>Fusarium circinatum</i>
ITS1	5`-tccgtaggtagaacctgagg-3`	Control Interno de Amplificación
ITS4	5`-tcctccgcttattgatgc-3`	Control Interno de Amplificación
ITS6	5`-gaaggtagagtcgtaacaagg-3`	Control Interno de Amplificación

ii PCR Mix (25 microlitros de volumen de reacción final)

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen para 1 reacción (µL)
Agua grado molecular	-	-	16.1
Buffer PCR	10X	1X	2.5
dNTPs	10mM	0.25mM c/u	0.6
MgCl ₂	50mM	2mM	1
Primer CIRC1A	10µM	0.3µM	0.75
Primer CIRC4A	10µM	0.3µM	0.75
Primer ITS6 (o ITS1)	10µM	0.2µM	0.5
Primer ITS4	10µM	0.2µM	0.5
Taq Polimerasa	5U/µL	1.5U	0.3
ADN Templado*		-	2

(*) El volumen de templado varía de acuerdo a la concentración de ADN obtenida, el cual en este caso, está ajustado de acuerdo al método de extracción antes descrito.

iii Uso de controles

Además de las muestras a analizar, en cada reacción de amplificación se debe incorporar un control negativo blanco (control agua), un control negativo de *Fusarium sp.* distinto a la especie *circinatum* y un control positivo de *Fusarium circinatum*.

iv Amplificación

Ajustar el termociclador con el siguiente programa:

- 1) 95°C por 30 seg.
- 2) 62°C por 30 seg.



- 3) 72°C por 30 seg.
- 4) Volver al paso 1 y repetir 29 veces
- 5) Mantener a 4°C

c) Electroforesis

Cargar 10µL de cada muestra (mezclado con buffer de carga) en gel de agarosa al 1.5% en Buffer TAE al 1X (teñido con Bromuro de etidio). Las muestras se cargarán en el gel de izquierda a derecha, asegurándose que cada carril ubicado en los extremos se acragado con un marcador de peso molecular de 100 pb. Los controles negativos (control agua y control extracción) y positivo, se cargarán en ese orden, después del marcador de peso molecular a la derecha (tal como se indica en la figura 1).

Correr el gel en buffer TAE al 1X por 40-50 minutos a 80V.

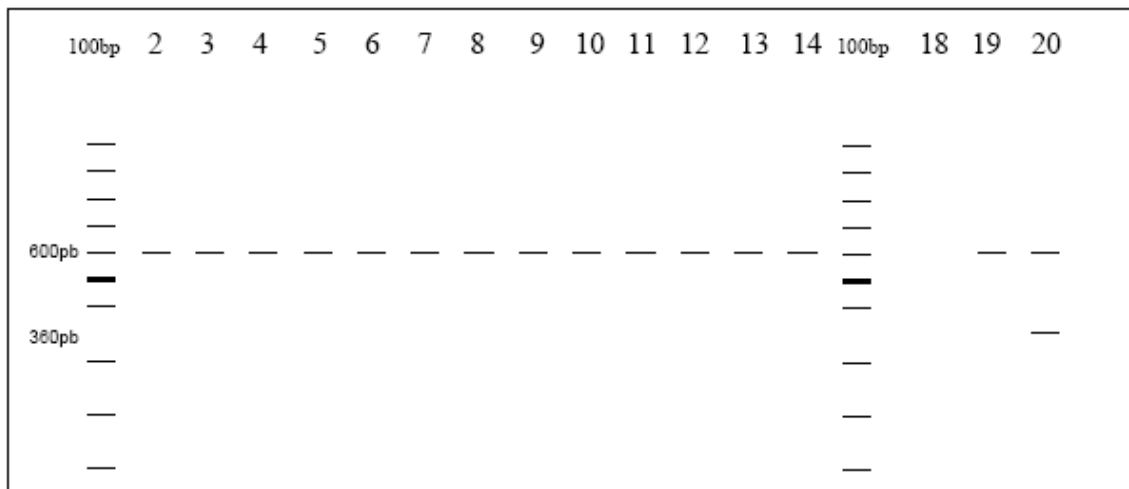


Figura 1: Carriles 1 y 15 Marcador de peso molecular 100bp; 2 a 14 Muestras; 18 y 19 Controles negativos; 20 Control positivo.

d) Foto documentación y Registro

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se visualiza en transiluminador con luz UV. El gel debe ser foto documentado y mantenido en un registro digital o documento impreso en forma clara y ordenada, de acuerdo al formato señalado en el Anexo N° 9.4 de este instructivo.

5.4 Cálculo y expresión de resultados

Se considerará un **diagnóstico positivo o negativo** a *Fusarium circinatum*, de acuerdo a los resultados obtenidos en una misma reacción y a los productos de PCR observados en una sola corrida de gel, según el siguiente esquema:



Diagnóstico	Muestra		Control Agua		Control Extracción		Control Positivo	
	Banda 360pb	CIA 600pb	Banda 360pb	CIA 600pb	Banda 360pb	CIA 600pb	Banda 360pb	CIA 600pb
Positivo	+	+ 0 -	-	-	-	+	+	+ 0 -
Negativo	-	+	-	-	-	+	+	+ 0 -

5.5 Esterilización y eliminación de material de desecho

Todo material utilizado en las diferentes etapas de la metodología de diagnóstico debe ser esterilizado mediante autoclavado. El material que no se pueda reutilizar, debe ser autoclavado y desechado en bolsas claramente identificadas, para su posterior incineración.

El material vegetal, suelo y/o sustrato de desecho, también debe ser autoclavado y desechado en bolsas claramente identificadas, para su posterior incineración.

5.6 Variación de la metodología

En el caso de utilizar reactivos, protocolos o metodologías diferentes a los indicados en los procedimientos de análisis definidos en el numeral 5.3 de este instructivo, estos quedarán sujetos a la evaluación por parte del Servicio.

No obstante lo anterior, los laboratorios podrán presentar para la evaluación por parte del Servicio, otras metodologías o variantes de las indicadas en este instructivo, las que una vez aprobadas y validadas podrán ser implementadas por los laboratorios acreditados.

6 COMUNICACIÓN Y REGISTRO DE LOS RESULTADOS

Los resultados deberán ser ingresados al sistema computacional SISVEG, en un plazo mínimo de 7 días (en el caso de muestras que no presentaron desarrollo de *Fusarium sp.* En los medios de cultivo) y máximo de 15 días, desde la fecha de recepción de la(s) muestra(s) por parte del laboratorio acreditado. Conjuntamente deberá notificar lo anterior vía correo electrónico, FAX u otro medio, a la Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra, con copia al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, indicando el o los números de folio de protocolo que fueron ingresados al sistema.

En caso que el laboratorio acreditado prevea cualquier atraso en el tiempo de respuesta de alguna muestra, deberá informarlo con 24 horas de anticipación a la fecha límite de respuesta, vía correo electrónico, FAX u otro medio al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, indicando el número de la muestra (folio de protocolo con su respectivo correlativo) en esa situación.



El laboratorio deberá contar con un libro de registro de resultados de muestras que incluya el N° de folio de protocolo con su correlativo respectivo, fecha de recepción, aceptación/ rechazo, resultado, fecha de resultado, firma del analista y observaciones

Además, el laboratorio deberá mantener una copia firmada de los registros de los resultados ingresados y autorizados en el sistema computacional SISVEG.

Todos los registros y documentos se deben conservar al menos durante los 5 años siguientes de realizado el análisis.

7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS ACREDITADOS

Todo laboratorio acreditado será supervisado mediante visitas al menos una vez al año. Sin embargo, deberá estar dispuesto a recibir supervisiones adicionales, en cualquier momento.

El Encargado de Supervisión SAG del Laboratorio Acreditado, podrá solicitar a este último en cualquier momento, el envío de contramuestras, ya sea ADN y/o cepas (acorde a lo indicado en el numeral 5.2.2 de este instructivo), para ser analizados por el SAG. En el caso de no haber concordancia con los resultados, se programará una visita de supervisión para verificar la conducción del ensayo y determinar las medidas que correspondan.

Si producto de las acciones de supervisión, el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias detecta faltas en el desempeño del Laboratorio Acreditado, que afecten negativamente el resultado del Programa de Control Oficial de *Fusarium circinatum* asociado a su acreditación, el SAG, de conformidad con lo dispuesto en la cláusula sexta del correspondiente convenio de acreditación, podrá instruir al Laboratorio Acreditado mediante una carta suscrita por el/la Jefa del Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias o un Jefe de oficina, el cese inmediato de prestaciones de servicios ejecutados en el alcance de su acreditación hasta que el SAG resuelva en definitiva su caso.

8 OBLIGACIONES

Sin perjuicio de las obligaciones estipuladas en el capítulo VII del Reglamento específico de acreditación de laboratorios de análisis/ensayos, el laboratorio acreditado deberá cumplir con lo siguiente: no podrá prestar servicios como laboratorio acreditado para el diagnóstico de *Fusarium circinatum*, cuando el representante legal, socios, directores, accionistas, gerentes, responsable técnico o analistas tengan o desarrollen una actividad con interés directo e incompatible con los servicios requeridos.



9 ANEXOS

9.1 Lista de analista(s) del laboratorio vinculados al diagnóstico

Nombre Completo	Nº Cédula de Identidad	Firma	Técnica que realiza

Firma del postulante o representante legal

Fecha,.....



9.2 Aviso inicio recepción muestras para diagnóstico de *Fusarium circinatum*

Logo Laboratorio Acreditado

Diagnóstico *Fusarium circinatum*

INICIO RECEPCION MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE *FUSARIUM CIRCINATUM*

Fecha aviso	
-------------	--

ANTECEDENTES TERCERO ACREDITADO (Emisor)	
Nombre Laboratorio Acreditado	
Nombre Responsable Técnico	
Dirección Oficina/ Comuna	
Fax	
Teléfono (s) (fijo/ móvil)	

ANTECEDENTES SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (Uso exclusivo SAG)			
Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias – UNIDAD DE FITOPATOLOGÍA			
Nombre Funcionario Receptor			
Firma Funcionario Receptor		Fecha Recepción	

ANTECEDENTES RECEPCION MUESTRAS						
INFORMO A UD. QUE A PARTIR DE _____(indicar fecha) SE HA COMENZADO A RECEPCIONAR MUESTRAS VEGETALES Y/O SUSTRATOS PARA DIAGNÓSTICO DE <i>FUSARIUM CIRCINATUM</i> , DE ACUERDO AL SIGUIENTE DETALLE:						
Nº REGISTRO SAG	Nº FOLIO PROTOCOLO	Nº CORRELATIVO DESDE/HASTA	VIVERO PROPIETARIO	REGION	COMUNA	NOMBRE TERCERO MUESTREADOR

NOMBRE	FIRMA Y TIMBRE
RESPONSABLE TECNICO LABORATORIO ACREDITADO	



9.3 Formulación de medios de cultivos

a) **Agar Papa Dextrosa (PDA)**

- ✓ 39 gramos de PDA .
- ✓ Vaciar en Matraz Erlenmeyer u otro de 1L.
- ✓ Aforar a 1.000 ml. Con agua destilada.
- ✓ Esterilizar por 15 minutos a 121°C en autoclave.
- ✓ Una vez tibio, agregar 20 gotas de ácido láctico hasta un pH final de 5,6.
- ✓ Dejar enfriar hasta aproximadamente 50°C dentro del gabinete.
- ✓ Vaciar 20 ml en cada Placa Petri.
- ✓ Dejar enfriar las placas, identificarlas con las iniciales del medio.
- ✓ Guardar en conservadora a 6°C ± 2°C.

b) **Medio Selectivo de Fusarium (MSF)**

- **PEPTONA PCNB AGAR** (Nash - Snyder Medium (Nash and Snyder, 1962; modificado por Nelson et al, 1983)

- ✓ Peptona 15 grs.
- ✓ Agar 20 grs.
- ✓ KH₂PO₄ 1 gr.
- ✓ Mg SO₄ 7H₂O 0,5 gr.
- ✓ PCNB 75% polvo mojable 1 gr.
- ✓ Mezclar los ingredientes
- ✓ Ajustar a pH 5.5-6.5.
- ✓ Autoclavar
- ✓ Agregar Estreptomina sulfato (20mL/L) y neomicina sulfato (12mL/L), provenientes desde soluciones stock estériles cuando el medio esté a unos 45 °C, justo antes de vaciar en las placas.
- ✓ Ambas soluciones stock, deben ser preparadas agregando 5 gr y 1 gr de estreptomina y neomicina respectivamente en 100 ml de agua destilada estéril para cada una.
- ✓ Permitir que el medio se seque unos 5 días en las placas Petri, antes de usar.

c) **Agar Agua** (Tuite. J. Plant Pathological Methods Fungi and Bacteria. 239 p)

- ✓ 15 gr. de Bacto agar.
- ✓ Vaciar en matraz Erlenmeyer u otro de 1L.
- ✓ Aforar a 1000 ml con agua destilada.
- ✓ Esterilizar por 15 minutos 121°C, en autoclave.
- ✓ Dejar enfriar hasta aproximadamente 50°C dentro del gabinete.
- ✓ Dejar enfriar las placas, identificarlas con las iniciales del medio.
- ✓ Guardar en conservadora a 6°C ± 2°C.



d) Synthetischer Nährstoffärmer agar (SNA; Nirenberg y O`Donnell, 1998)

- ✓ KH₂ PO₄ 1.0 gr.
- ✓ KNO₃ 1.0 gr
- ✓ MgSO₄ 7H₂O 0.5 gr.
- ✓ KCl 0.5 gr.
- ✓ Glucosa 0.2 gr
- ✓ Sacarosa 0.2 gr.
- ✓ Agar 23.0 gr
- ✓ NaOH 1N 0.6 mL
- ✓ Agua destilada 1000 ml
- ✓ Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- ✓ Esperar enfriar y vaciar a las placas o tubos.
- ✓ Agregar a cada placa o tubo un trozo de papel filtro estéril (1X2 cm), sobre el agar una vez enfriado.

e) Carnation Leaf Agar (CLA; Singleton, Mihail y Rush, 1992)

- ✓ Agar 20 gr.
- ✓ Agregar Agua destilada 1L

Hojas de clavel deben ser cosechadas de plantas jóvenes en crecimiento activo, que no hayan sido tratadas con aplicaciones de pesticidas.

Cortar las hojas en trozos de alrededor de 5-8mm² y secar en estufa a 45 a 55 °C, por dos horas. Estos trozos deben ser esterilizados con radiación gama, o con fumigación con óxido de propileno.

En caso de no contar con ese tipo de esterilización, se debe desinfectar con hipoclorito de sodio 5% (solución comercial) durante 5 minutos, lavar posteriormente con agua destilada estéril y luego con alcohol al 70% por 1 minuto, se repite el lavado con agua estéril y posteriormente se deja secar bajo la cámara de flujo antes de agregarlas al medio.

Agregar sobre el Agar cuando el medio esté tibio, dos (2) trozos de hoja de clavel de 5-8mm² (1cm de largo aprox.) por placa de 9mm de diámetro, separados a una distancia de 5cm cada uno. Dejar el medio unos 3-4 días a temperatura ambiente, para verificar si hay desarrollo de hongos contaminantes sobre las hojas del clavel.

f) Técnica de Papel Filtro para mantención de cepas de hongos

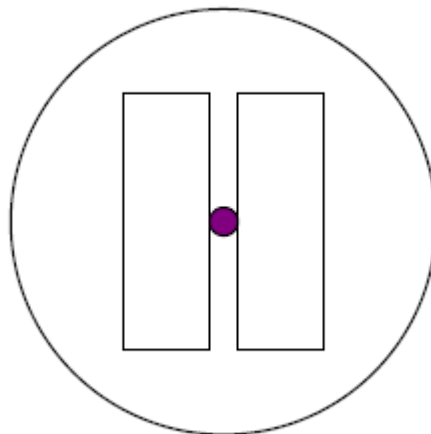
- ✓ Cortar papel filtro de acuerdo al tamaño de la placa a utilizar (generalmente se utiliza placa de 9mm de diámetro).
- ✓ Autoclavar papel filtro.
- ✓ Depositar un disco de papel sobre agar agua.
- ✓ Transferir micelio de *Fusarium circinatum* sobre el papel.
- ✓ Retirar el papel filtro una vez desarrollado por completo el micelio.
- ✓ En forma aséptica, cortar el filtro en trozos (3-4).



- ✓ Introducir los trozos en un tubo plástico de 5ml
- ✓ Almacenar en freezer a -15 °C.

Alternativa:

- ✓ Depositar dos trozos de 1.5 x 3cm. de papel filtro estéril en el centro de una placa, separados a una distancia de 5mm aprox. cada uno.
- ✓ Transferir micelio de cultivo monospórico de *Fusarium circinatum*, y depositarlo en el agar entre ambos trozos de papel (como indica la figura).
- ✓ Una vez desarrollado el micelio sobre todo el papel, estos se retiran en forma aséptica y se guardan en viales estériles de 2 mm.
- ✓ Guardar un trozo de papel por tubo (en total 2 tubos).





9.4 Formulario modelo para registro de Fotodocumentación de geles

FICHA REGISTRO PCR

RESPONSABLE : _____
 FECHA : ____/____/____
 PATÓGENO : _____
 N° FOLIO(S) : _____

Carriles Superiores		
	N° Muestra (Folio-correlativo)	Resultado +/-
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		
11.		
12.		
13.		
14.		
15.		
16.		
17.		
18.		
19.		
20.		
Carriles inferiores		
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		
11.		
12.		
13.		
14.		
15.		
16.		
17.		
18.		
19.		
20.		

FOTO

OBSERVACIONES: