

	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p>Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales</p>	<p>D-GF-CPT-PT-034 Versión 01</p>
--	---	--	---------------------------------------

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE HONGOS Y OOMYCETES EN MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN Y SUSTRATOS PARA EL PROGRAMA DE CERTIFICACIÓN DE PLANTAS FRUTALES

TABLA DE CONTENIDOS

1.	OBJETIVOS Y ALCANCE	4
2.	REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS.....	4
3.	DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	5
4.	REQUISITOS	7
4.1.	REQUISITOS DE INFRAESTRUCTURA, EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	7
4.1.1.	Requisitos de Infraestructura	7
4.1.2.	Requisitos de Equipamiento	8
4.1.3.	Requisitos de Materiales, Reactivos y Medios de Cultivo.....	8
4.1.4.	Requisitos de Estándares	9
4.2.	REQUISITOS DE PERSONAL	9
	A. Responsable Técnico	9
	B. Analistas.....	9
4.3.	REQUISITOS ESPECÍFICOS	10
4.4.	MEDIOS DE VERIFICACIÓN DE REQUISITOS	10
5.	ANÁLISIS/ENSAYO.....	11
5.1.	CONDICIONES PREVIAS	11
5.2.	CAPTACIÓN Y ENVÍO.....	11
5.3.	TIPO Y CANTIDAD DE MUESTRAS A ENVIAR.....	12
5.4.	RECEPCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA/CONTRAMUESTRA	12
5.4.1.	Recepción de la muestra.....	12
5.4.2.	Manejo de contramuestras.....	13
6.	METODOLOGÍA DE ANÁLISIS.....	14
6.1.	PROCEDIMIENTO GENERAL	14
6.1.1.	Aptitud de la muestra, observación de síntomas y/o signos.....	14
a)	Para Frutillas y olivos	14
6.1.2.	Siembra en medios de cultivos	14
6.1.3.	Análisis molecular	15
6.1.4.	Extracción de ADN	15
a)	Para Frutillas y olivos	15
b)	Para Sustrato	15
6.1.5.	Amplificación mediante partidores específicos.	15
6.1.6.	Digestión Enzimática (RFLP). (Exclusivo para Frutillas)	16
6.1.7.	Secuenciación de ADN	16
6.1.8.	Electroforesis	16
6.1.9.	Foto documentación y registro	16
6.2.	PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO	17
6.2.1.	Para frutillas.	17
a)	<i>Phytophthora cactorum</i>	17
b)	<i>Phytophthora fragariae var. fragariae</i>	19
c)	<i>Verticillium albo-atrum</i>	21
d)	<i>Verticillium dahliae</i>	22
6.2.2	Para Olivos	24

a)	<i>Verticillium albo-atrum</i>	24
b)	<i>Verticillium dahliae</i>	24
6.2.2.1	Para muestras de sustrato	24
7.	VARIACIÓN DE LA METODOLOGÍA	24
8.	COMUNICACIÓN Y REGISTRO DE LOS RESULTADOS	24
9.	SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS	25
9.1.	MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO.....	26
10.	OBLIGACIONES	26
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
12.	FORMULARIOS Y ANEXOS.....	27

	Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales	D-GF-CPT-PT-034 Versión 01
--	---	-------------------------------

1. OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo principal de este documento es establecer los requisitos que deberán cumplir los laboratorios interesados que voluntariamente postulen ante el SAG, para operar como laboratorio autorizado en la ejecución de análisis de diagnóstico para la determinación de hongos y oomycetes asociados al material vegetal de propagación de frutillas, olivos y sustrato.

Asimismo, entrega las directrices de funcionamiento que deben cumplir los laboratorios, que una vez autorizados, realicen estos análisis.

El alcance del presente documento, es de carácter nacional y está dirigido al diagnóstico de los siguientes patógenos:

1. *Phytophthora cactorum*
2. *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*
3. *Veticillium albo-atrum*
4. *Veticillium dahliae*

Sin perjuicio de lo anterior y en caso que el Servicio lo requiera, se podrán incorporar patógenos y técnicas diagnósticas al alcance de la autorización, dado lo anterior, el laboratorio autorizado podrá postular a la ampliación de su autorización.

2. REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS


- Bonants, P.; Hagenaar-de Weerd, M.; van Gent-Pelzer, M.; Lacourt, I.; Cooke, D.; Duncan, J. (1997) Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology*, 103(4), 345-355.
- Carder JH, Morton A, Tabrett AM & Barbara DJ (1994) Detection and differentiation by PCR of subspecific groups within two *Veticillium* species causing vascular wilts in herbaceous hosts. In: *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification* (Ed. Schots A, Dewey FM & Oliver R), pp. 91-97. CAB International, Oxford (GB).
- Carder JH, Morton A, Tabrett AM & Barbara DJ (1994) Detection and differentiation by PCR of subspecific groups within two *Veticillium* species causing vascular wilts in herbaceous hosts. In: *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification* (Ed. Schots A, Dewey FM & Oliver R), pp. 91-97. CAB International, Oxford (GB).
- 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.
- Cooke, D. E. L., Duncan, J. M., Williams, N. A., Weerd, M. H.-d. and Bonants, P. J. M. (2000), Identification of *Phytophthora* species on the basis of restriction enzyme fragment analysis of the internal transcribed spacer regions of ribosomal RNA. *EPPO Bulletin*, 30: 519-523. C.M.I. Descriptions of Pathogenic fungi and Bacteria N°131, 255, 256, 275, 346, 406, 475.
- EPPO Bulletin (2007) 37, 528-535. *Veticillium albo-atrum* and *V. dahliae* on hop.

- Frezzi M.J. Las especies de "Phytophthora" en la Argentina. (1950) Revista de Investigaciones Agrícolas. pp. 47-134.
- Inderbitzin P, Bostock RM, Davis RM, Usami T, Platt HW, et al. (2011) Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species. PLoS ONE 6(12): e28341. doi:10.1371/journal.pone.0028341
- Ioos R., Laugustin L., Schenck N, Rose S., Husson C. and Frey P. (2006). Usefulness of single copy genes containing introns in *Phytophthora* for the development of detection tools for the regulated species *P. ramorum* and *P. fragariae*. European Journal of Plant Pathology 116:171-176.
- Lacourt, I., Bonants, P.J.M., Van Gent-Pelzer, M.P., Cooke, D.E.L., Hagenaar-De Weerd, M., Surplus, L. and Duncan, J.M. (1997). The use of nested primers in the polymerase chain reaction for the detection of *Phytophthora fragariae* and *P. cactorum* in strawberry. Acta Hort. 439, 829-838. DOI:10.17660/ActaHortic.1997.439.137.http://dx.doi.org/10.17660/
- Moukhamedov, R., Hu, X., Nazar, R. N. and Robb, J. 1994. Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. Phytopathology 84:256-259.
- Nazar R. N., Hu X., Schmidt J., Culham D. and Robb J. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *verticillium* wilt pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology 39, 1-11.
- Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.
- Robb J, Moukhamedov R, Hu X, Platt HW & Nazar RN (1993) Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assays. Physiological and Molecular Plant Pathology 43, 423-436. SAG. REA-LAB-01-v02.
- Schena L., Duncan J. & Cooke D. E. L. (2008) Development and application of a PCR-based "molecular tool box" for the identification of *Phytophthora* species damaging forest and natural ecosystems. Plant Pathology 57, 64-75.

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

ADN/DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Analista	Persona designada por el laboratorio autorizado, para desempeñarse en temas técnicos asociados a su actividad y cumple con el perfil definido por el SAG para este cargo.
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio.
Buenas Prácticas de Laboratorio	Conjunto de normas referente a la organización y condiciones sobre las que los trabajos de laboratorios son planificados, realizados, monitoreados, registrados e informados.
CMA	Agar Maíz (Corn Meal Agar en Inglés).

Colonia	Grupo de hifas (frecuentemente con esporas), las cuales si provienen de una espora o célula, pueden corresponder a un solo individuo.
DLECAP	Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias Agrícolas y Pecuarias del Servicio Agrícola y Ganadero
Laboratorio Autorizado	Laboratorio autorizado por el Servicio para ejecutar uno o más análisis/ensayos determinados, en apoyo a los programas oficiales del SAG, bajo condiciones definidas por el Reglamento Específico para la autorización de Laboratorios y los correspondientes Instructivos Técnicos.
Lesión	Área localizada o bien definida de tejido enfermo.
Material de Referencia	Material, sustancia u organismo que provee trazabilidad esencial y se usa para demostrar la exactitud de los resultados, calibraciones de equipos y métodos, para monitorear el funcionamiento del laboratorio, para validar métodos y que permite la comparación de métodos, usándolos como estándares transferibles.
MSP	Medio Selectivo para <i>Phytophthora</i> spp.
MSV	Medio Selectivo para <i>Verticillium</i> spp.
Oomycete	Clase de organismos pertenecientes al Phylum Oomycota del Reino Stramenopila o supergrupo Chromista, similares a los hongos y al cual pertenecen especies de importancia económica agrícola como por ejemplo <i>Phytophthora</i> , <i>Phytium</i> , mildiús, entre otros.
Patógeno	Agente virulento que es capaz de infectar una planta.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa. Técnica con la cual se obtiene un gran número de copias de un fragmento de ADN.
PDA	Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Agar en Inglés).
Primer/Partidor	Cebadores o iniciadores correspondientes a secuencias cortas de nucleótidos (normalmente de 18 a 22) que definen los extremos de una secuencia de ADN que se desea replicar y que permiten que la enzima polimerasa inicie la reacción en cadena.
Propágulo	Unidad discreta, separada de un organismo que es capaz de crecer y propagar al organismo.
Repique	Cultivo de un microorganismo en un medio de cultivo, a partir del cultivo original, con el fin de obtener un aislado puro del individuo.
Responsable Técnico	Persona designada por un laboratorio autorizado para actuar como contraparte del SAG, en temas técnicos asociados a su actividad y que cumple con el perfil definido por el SAG para

	Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales	D-GF-CPT-PT-034 Versión 01
--	---	-------------------------------

este cargo.

RFLP	Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (en Inglés Restriction Fragment Length Polymorphism). Técnica molecular que permite identificar genéticamente individuos y se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción (endonucleasas) y que varían entre individuos.
Servicio/SAG	Servicio Agrícola y Ganadero.
Signo	Presencia del agente causal en una planta enferma.
Síntoma	Expresión externa o interna de alteraciones morfológicas por la acción de un agente causal en una planta enferma.

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 del/los análisis a realizar, disponiendo de áreas con suficiente espacio para desarrollar en forma óptima las actividades.

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 lo siguiente:

- **Recepción y preparación de muestras:**


El laboratorio debe contar con un área de recepción (mantención) y preparación de muestras vegetales (área sucia), separadas o aisladas de las áreas de análisis (área limpia), de tal manera que se eviten posibles contaminaciones por manipulación y/o lavado de las muestras.

- **Aislamiento en medios de cultivo:**

El laboratorio debe contar al menos con una sala de preparación de medios de cultivo y siembra de tejidos, separada o aislada del resto de los procesos de análisis.

- **PCR:**

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

	Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales	D-GF-CPT-PT-034 Versión 01
--	---	-------------------------------

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 mantención y/o de calibración al día, efectuado a lo menos una vez cada 2 años por una empresa pertinente y reconocida 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 a lo menos 32°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.
- pH metro.
- Freezer o congelador que alcance temperatura de -18 °C o inferior.
- 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 (2 como mínimo) de volumen no menor a 50L cada uno.
- 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.
- Medios de Cultivo en polvo
- Antibióticos
- Bisturí.
- Hojas de bisturí.
- Guantes de látex u otros.
- Soluciones o kit para extracción de ADN
- Taq polimersa y reactivos asociados.
- Partidores específicos y universales.

	Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales	D-GF-CPT-PT-034 Versión 01
--	---	-------------------------------

- 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 o TBE (Tris- acetato-EDTA, Tris-borato-EDTA).
- Solución de tinción de ADN (bromuro de etidio u otro)
- Agarosa grado molecular.

4.1.4. Requisitos de Estándares

Se utilizará como estándares, dependiendo de cada caso, la cepa y/o ADN de cada uno de los patógenos a diagnosticar, proporcionados por el 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 autorizado.

4.2. REQUISITOS DE PERSONAL

El laboratorio debe contar con el siguiente personal:

a. Responsable Técnico


El laboratorio deberá designar un(a) responsable técnico (formulario F-GF-CGP-PT-069, del reglamento específico de autorización de análisis/ensayo), quien será la contraparte ante el SAG en temas técnicos asociados a su actividad como laboratorio autorizado, y deberá cumplir con los siguientes requerimientos:

- i. 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 equivalente a 10 semestres académicos. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- ii. Experiencia laboral en el área de laboratorios de al menos dos (2) años.
- iii. Tener competencia técnica o experiencia laboral (de al menos 1 año) comprobable en laboratorio de fitopatología y técnicas moleculares.

b. 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, la información debe enviarla en el formulario F-GF-CGP-PT-157, del presente instructivo:

- i. Contar con título profesional, técnico o ser egresado de una carrera de las ciencias silvoagrícolas, bioquímicas, biotecnológicas o biológicas 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.
- ii. Tener competencia técnica o experiencia laboral (de al menos 1 año) comprobable, en laboratorio de fitopatología y técnicas moleculares.

	Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales	D-GF-CPT-PT-034 Versión 01
--	---	-------------------------------

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 lo siguiente:

- Proceso de análisis,
- Manejo de los controles,
- Manejo de las contramuestras
- Eliminación de residuos.

En el manual, además se deberá describir con claridad cada uno de los protocolos a utilizar para el diagnóstico de los patógenos asociados al alcance considerando las metodologías indicadas en el punto 6 de este instructivo.

Es responsabilidad del Laboratorio, acceder y disponer de literatura técnica de descripción de síntomas y signos de enfermedades en Frutillas y Olivos asociados a hongos y oomycetes fitopatógenos, principalmente de los patógenos asociados al alcance, así como también de los artículos científicos señalados como referencia en este Instructivo.

Lo anterior, será supervisado en la visita de verificación, para lo cual el laboratorio deberá disponer de esta documentación en forma impresa en una carpeta, archivador o dossier claramente identificado para ser evaluado y aprobado por el supervisor.


El Laboratorio autorizado, deberá contar con timbres que registren el nombre del laboratorio, la fecha y hora.

4.4. MEDIOS DE VERIFICACIÓN DE REQUISITOS

Los interesados en autorizarse para realizar el diagnóstico de hongos y oomycetes, en material vegetal de propagación de Frutillas y Olivos, deberán presentar los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el Servicio.

Los antecedentes para la postulación del laboratorio se establecen en el numeral 6.1 del Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos (D-GF-CGP-PT-012).

- i. Solicitud de autorización de laboratorios de análisis/ensayo (F-GF-CGP-PT-068), presente en el del reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.
- ii. Formulario Anexo a la solicitud de la autorización, indicando el material vegetal de propagación y los análisis a realizar (Frutillas, Olivos o ambos) F-GF-CGP-PT-156 del presente instructivo.
- iii. Los antecedentes generales del laboratorio que se establecen en el numeral 6.1 del Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.
- iv. Plano o Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas y ubicación de equipos, en forma clara y detallada.
- v. Lista de equipos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio y capacidad cuando corresponda.

	Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales	D-GF-CPT-PT-034 Versión 01
--	---	-------------------------------

- vi. Lista de materiales y reactivos.
- vii. Formulario de identificación del responsable técnico (F-GF-CGP-PT-069), del Reglamento Específico para la autorización de Laboratorios de análisis/ensayos.
- viii. Certificado de título del responsable técnico identificado en el formulario anterior, en original o fotocopia legalizada.
- ix. Formulario de identificación del personal vinculado al/los análisis, F-GF-CGP-PT-157 del presente instructivo.
- x. Certificado de título o de egreso de los/las analistas identificados en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
- xi. 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.

El cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el Reglamento Específico de Autorización 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. CONDICIONES PREVIAS

El vivero deberá informar al Servicio a qué laboratorio autorizado se deberán enviar las muestras para ser analizadas, con el fin de coordinar la calendarización tentativa de muestreo. Dicha información, debe ser enviada a través de un correo electrónico (cpf@sag.gob.cl) el cual va dirigido al Encargado(a) del Programa de Certificación de Plantas Frutales y al Encargado(a) Regional de Semillas.

5.2. CAPTACIÓN Y ENVÍO

El muestreo será realizado por personal del SAG o por una Empresa Externa autorizada por el Servicio, de acuerdo a los procedimientos establecidos por el Servicio, por lo tanto no es una actividad de responsabilidad de los laboratorios autorizados en esta especialidad.

El despacho de la(s) muestra(s), será de responsabilidad del funcionario de la oficina SAG sectorial a cargo del muestreo o del funcionario de la empresa externa autorizado por el Servicio, garantizando el envío en el tiempo y las condiciones de temperatura adecuados (mantención de cadena de frío de ser necesario), según los requerimientos específicos establecidos en el presente instructivo.

Los costos asociados al despacho de la encomienda, serán de cargo al laboratorio de destino de la(s) muestra(s) a analizar, por lo que el envío se efectuará, según sea el caso, de la siguiente manera:

- i Cargado a un número de cuenta, previamente informado al Servicio o al tercero muestreador autorizado (de acuerdo a documento según formato establecido en formulario F-GF-CGP-PT-085), en caso de existir un convenio entre el laboratorio autorizado y una empresa de transporte de encomiendas, o,
- ii Por cobrar al laboratorio autorizado, si al momento de efectuar el envío, el laboratorio de destino no posea, o el Servicio no esté en conocimiento de la existencia del convenio antes descrito. En este caso, el SAG se reserva el derecho de envío a través de una empresa de transporte de encomiendas que asegure adecuadas condiciones de

traslado, siendo obligación por parte del laboratorio, recepcionar la(s) muestra(s) y pagar la tarifa correspondiente.

El laboratorio autorizado, deberá gestionar la devolución de las cajas de transporte de muestras, enviando correo a cpf@sag.gob.cl, quienes informarán el proceder.

5.3. TIPO Y CANTIDAD DE MUESTRAS A ENVIAR

Para el caso de Olivos y sustrato, la muestra a analizar, dependerá de la etapa del proceso de certificación a la cual se desee realizar el análisis, de acuerdo al siguiente cuadro:

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD DE MUESTRA A ANALIZAR POR ETAPA		
	GERMOPLASMA (1/1)	INCREMENTO (1/500)	PLANTA CERTIFICADA (1/15000)
PLANTAS (RAÍCES)	5-10g/muestra*	1 muestra compuesta de 5 plantas*	1 muestra compuesta de 10 plantas
SUSTRATO/ SUELO	400-500g	N/A	N/A

(*).Debe enviarse planta completa con raíces. En caso de no poder enviarse por corresponder a material escaso, único o tratarse de árboles adultos, se debe enviar 5-10 gramos de raíces y raicillas por muestra (a partir de 1 planta por muestra).


5.4. RECEPCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA/CONTRAMUESTRA

5.4.1. Recepción de la muestra

El laboratorio autorizado, deberá informar por escrito vía correo electrónico, al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, el inicio de actividades asociadas al alcance de la autorización correspondiente a la primera recepción de muestras de la temporada. Este aviso, deberá ser realizado el mismo día de recepción de las muestras, señalando lo siguiente:

INFORMO A USTED, QUE EL DÍA DE HOY _____(dd/mm/aaaa) EL LABORATORIO AUTORIZADO _____ (indicar nombre) HA DADO INICIO A LAS ACTIVIDADES ASOCIADAS AL ALCANCE DE LA AUTORIZACIÓN, RECEPCIONÁNDOSE _____(indicar cantidad) MUESTRAS VEGETALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE HONGOS Y OOMYCETES EN MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE PLANTAS DE _____ (indicar el material vegetal frutilla/olivo/sustrato).

Toda muestra debe ingresar al laboratorio autorizado con su correspondiente identificación (código de barras, número de solicitud o correlativo numérico) y acompañada por el "Acta de Toma de Muestras", generada por el Sistema en línea de Semillas y Plantas Frutales u otro que estime pertinente el Servicio, acompañada (de ser necesario) por el "Formulario oficial para el envío de muestras vegetales y de suelo".

	Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales	D-GF-CPT-PT-034 Versión 01
--	---	-------------------------------

El laboratorio autorizado, 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 48 horas. Además, debe verificarse que la información contenida en el Acta de Toma de Muestras esté completa y que los antecedentes enviados, coincidan con la 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 del ingreso de la o las muestras, mediante su nombre, firma y timbre del laboratorio en el Acta, indicando además la fecha y hora de recepción, quedándose el laboratorio autorizado con una copia de este formulario y del documento o guía de despacho de la empresa de encomiendas.

Posteriormente, el responsable técnico deberá evaluar la aptitud de las muestras para el análisis, considerándose como muestra apta, aquella que no presenta signos evidentes de deshidratación y/o descomposición.

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

Las muestras, debe ser analizada en búsqueda de los síntomas y/o signos característicos causados por el o los patógenos solicitados a analizar.

En caso que las muestras no vengan acompañadas por todos sus documentos, que la información esté incompleta, no coincida y/o en caso de rechazo de muestras, se debe avisar en forma escrita de tal situación vía correo electrónico y de manera simultánea, al correo cpf@sag.gob.cl y al Encargado Regional de Semillas correspondiente al origen de la muestra. En éste documento, se deberá indicar el problema, identificando el número de folio del Protocolo, el o los números correlativos de las muestras (esto dentro de un plazo máximo de 1 día corridos, contados desde la recepción de la muestra por parte del laboratorio autorizado) y solicitar las medidas a seguir (corrección del problema o envío de nueva muestra, según corresponda).

Una vez que el laboratorio autorizado ha verificado los términos documentales y la condición analítica de la muestra, deberá ingresar al sistema en línea (<http://csm.sag.gob.cl>) el número de folio del Acta de Toma de Muestras, para validar los patógenos a analizar.

5.4.2. Manejo de contramuestras

El laboratorio deberá mantener como contramuestras, la planta o parte de ésta, así como también 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), claramente identificadas y almacenadas en forma ordenada y en óptimas condiciones (placas selladas con parafilm o alusaplast) y conservadas a una temperatura de $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por un período mínimo de un mes para plantas y seis meses para placas con aislados, a contar de la fecha de emisión del informe final.

Además, deberán mantenerse como contramuestras, tubos originales con cada una de las extracciones de ADN utilizadas para los análisis moleculares, identificados en forma clara y ordenada, las que deberán ser conservadas en óptimas condiciones durante 1 año como mínimo, a una temperatura inferior a -18°C .

	Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales	D-GF-CPT-PT-034 Versión 01
--	---	-------------------------------

6. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

El análisis de las muestras deberá seguir un procedimiento de análisis general estándar de diagnóstico, el cual variará de acuerdo a la plaga señalada en la solicitud de análisis, siguiendo un procedimiento específico para cada patógeno:

6.1. PROCEDIMIENTO GENERAL

6.1.1. Aptitud de la muestra, observación de síntomas y/o signos

a) Para Frutillas y olivos

- i. Al recibir una muestra, deberá realizarse una inspección visual general de ésta, estableciéndose inicialmente si cumple o no con el tipo de muestra necesario para el análisis respectivo (planta con cuello y raíces).
- ii. Se procede a eliminar los restos de suelo o sustrato adheridos al cuello y las raíces, lavándose posteriormente con agua corriente.
- iii. Se troza la muestra, separando la parte aérea del cuello y las raíces, siguiendo el procedimiento estándar de método de cámara húmeda y de siembra en medios de cultivo.

b) Para Sustrato

- i. Al recibir una muestra de sustrato, se realiza una inspección visual de ésta, verificándose si cumple con las características necesarias para el análisis en cuanto a cantidad y humedad. Posteriormente, desde la muestra de sustrato se pesa una submuestra de acuerdo a lo indicado en el kit de extracción utilizado, tomando desde diferentes puntos, de manera de constituir una muestra representativa.
- ii. Luego se procede según las indicaciones del Kit de extracción de suelo para la realización de la Técnica molecular correspondiente.
- iii. El peso mínimo de sustrato a analizar será de 1.5g en total, lo que determinará la cantidad de submuestras de acuerdo a las indicaciones del fabricante del kit de extracción.

6.1.2. Siembra en medios de cultivos

Materiales necesarios:

- . Agua destilada.
- . Agua corriente.
- . Solución hipoclorito al 1.5%.
- . Alcohol al 70%.
- . Vaso de precipitado de 100mL.
- . Cinta adhesiva para identificación.
- . Pinzas y aguja de disección.
- . Papel absorbente o filtro estéril.

Operatoria:

- i. Dependiendo del patógeno, se selecciona y corta en forma aséptica tejido de cada planta (cuello y raíces) con o sin síntomas de zona de avance de necrosis o lesión.
- ii. Depositar los trozos cortados en un vaso precipitado estéril, previamente identificado con el número respectivo de la muestra, para ser sembrados en medios de cultivo.
- iii. Desinfectar en forma superficial los trozos de tejido seleccionados. Dependiendo del tipo de patógeno a aislar, en hipoclorito de sodio al 1.5% de solución comercial o en Alcohol al 70% por 1-2 minutos.

	Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales	D-GF-CPT-PT-034 Versión 01
--	---	-------------------------------

- iv. Enjuagar los trozos 2-3 veces en agua destilada estéril, eliminando el exceso de Cloro o alcohol.
- v. Secar los trozos en papel absorbente estéril, dentro de la cámara de flujo laminar o gabinete de bioseguridad.
- vi. Sembrar en forma aséptica los trozos en Medio de cultivo respectivo al patógeno a analizar, indicado en el Anexo 1 de este instructivo. Sembrar en forma equidistante 5 trozos por placa con 2 repeticiones en cada medio de cultivo, sellando cada placa con plástico parafilm o alusaplast.
- vii. Identificar cada placa y dejarlas en incubación por 5-7 días como mínimo a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en completa oscuridad (o ciclos de luz y oscuridad si es posible).
- viii. Revisar los cultivos mediante microscopía, realizando una preparación en portaobjeto para determinar la presencia del patógeno solicitado.
- ix. Si no hay desarrollo en ninguna de las placas del o los patógenos solicitados, la muestra se diagnostica como negativa.
- x. Si existe desarrollo de alguno de los patógenos en alguna de las placas, se debe realizar una preparación (portaobjeto) para el análisis microscópico de cada uno de los aislados, realizando la identificación mediante las características morfológicas y de crecimiento de la colonia típica, descrita en la literatura técnica para el patógeno en análisis.
- xi. Para el caso de patógenos que requieran de análisis molecular, se debe proceder según lo establecido en el procedimiento específico del patógeno.

6.1.3. Análisis molecular

A continuación, se describe en forma general, las etapas y procesos involucrados en la técnica de diagnóstico molecular y que deben ser utilizados para la identificación de hongos y oomycetes que requieran de esta metodología y que son detallados en el procedimiento específico de cada patógeno.

6.1.4. Extracción de ADN

a) Para Frutillas y olivos

Se debe realizar extracción de ADN a partir de micelio proveniente de cada una de las colonias seleccionadas 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.

Para la extracción de ADN, se utilizará la metodología descrita por Cooke et al. (1997) con algunas modificaciones (Anexo 2), sin perjuicio que pueda utilizarse otro protocolo o kit comercial para la obtención de ADN de microorganismos, recomendándose la utilización del kit DNeasy Plant minikit (Qiagen).

b) Para Sustrato

Se pueden utilizar kits comerciales de extracción de Suelo, como Power Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio) u otro de similares características.

6.1.5. Amplificación mediante partidores específicos.

El procedimiento se basa en la utilización de protocolos desarrollados en trabajos de investigación científica de la disciplina y bajo condiciones específicas establecidas por los autores. En términos generales consiste en:

	Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales	D-GF-CPT-PT-034 Versión 01
--	---	-------------------------------

- i La utilización de partidores de secuencia específica para la detección e identificación del patógeno.
- ii Una mezcla de reactivos o PCR mix a concentraciones finales.
- iii En cada reacción de amplificación, además de las muestras a analizar, se debe incorporar un control negativo blanco (control agua), un control negativo del patógeno a identificar (del mismo género, pero de distinta especie) y un control positivo del patógeno a analizar.
- iv Amplificación utilizando termociclador, con un programa de ciclos de temperatura específico para el ADN objetivo.

6.1.6. Digestión Enzimática (RFLP). (Exclusivo para Frutillas)

Para la diferenciación de especies dentro de un género, se recurre a la metodología PCR-RFLP, mediante la cual se amplifica un fragmento específico del ADN para ese grupo (género en este caso), éste es sometido a digestión mediante 1 o varias enzimas de restricción, obteniéndose un patrón único de fragmentos de PCR para cada especie, permitiendo la identificación del individuo.

El procedimiento se basa en:

- i Utilización de una o más enzimas de restricción.
- ii Incubación a 37°C de un fragmento amplificado por PCR (templado) con la(s) enzima(s).
- iii Visualización del o los fragmentos obtenidos, mediante electroforesis en gel (agarosa u otro).

6.1.7. Secuenciación de ADN

Para la secuenciación de ADN, ésta se realizará a partir de ADN obtenido de cultivos puros y el PCR se desarrollará bajo las condiciones descritas para los genes o regiones especificados.

El fragmento de PCR obtenido, se enviará a secuenciar (ej. Macrogen Inc.) en ambos sentidos con los mismos partidores, para obtener el fragmento completo y las secuencias obtenidas serán alineadas mediante programa de análisis y edición de secuencias múltiples de ADN (ej. Bioedit, Geneious u otro) obteniendo el consenso editado para cada gen. Éste será comparado mediante BLAST con las secuencias disponibles en las bases de datos (ej. NCBI de GenBank), determinándose el porcentaje de similitud.

6.1.8. Electroforesis

Se debe cargar un volumen de 8-10µL de cada templado (mezclado con buffer de carga) en gel de agarosa al 1.5-2% en Buffer TAE o TBE al 1X (teñido con Bromuro de etidio u otra tinción de ADN, tipo Gel Red u otro en el caso de las frutillas). Las muestras se cargarán en el gel de izquierda a derecha, asegurándose que cada carril ubicado en los extremos sea cargado con un marcador de peso molecular de 50 o 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 (ver Figura 1).

6.1.9. Foto documentación y registro

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se visualiza en transiluminador con luz UV. El gel debe ser foto documentado, mantenido en un registro digital y documento impreso en forma clara y ordenada en el respectivo archivador junto a los Informes Fitosanitarios, de acuerdo al formato señalado en el Formulario F-GF-CGP-PT-160 de este instructivo.

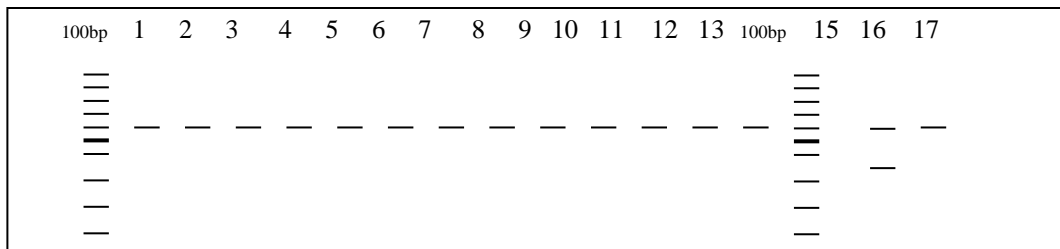


Figura 1. Formato de carga de muestras, controles y marcador molecular en gel de agarosa para electroforesis.

6.2. PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO

A continuación se detalla el procedimiento de análisis a utilizar, para el diagnóstico de cada uno de los patógenos asociados al listado de hongos y oomycetes en material vegetal de propagación de frutillas, olivos y sustrato.

6.2.1. Para frutillas.

a) *Phytophthora cactorum*.

- Tipo de Muestra : Cuello y raíces
- Metodología de diagnóstico : Medio de cultivo (MSP)
Microscopía
Técnica molecular
- Identificación : Morfología
PCR primer específico
RFLP y/o Secuenciación de ADN

Siembra en medio de cultivo

- i. Proceder de acuerdo a lo señalado en los numerales 6.1 del procedimiento general, considerando cortar en forma aséptica de cada planta 4-5 trozos de raíces de 1 cm. aprox. de largo (seleccionar raíces de 2-3mm. 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 1mm. aprox. de grosor) con o sin síntomas de zona de avance de necrosis o lesión.
- ii. Sembrar los tejidos seleccionados en medio de cultivo selectivo para *Phytophthora* (MSP).
- iii. Revisar los cultivos mediante microscopía, determinando aquellos que posean alguna de las características morfológicas y de crecimiento de colonia típica, descritas en la literatura para *Phytophthora* spp.
- iv. Si no hay desarrollo de *Phytophthora* spp. en ninguna de las placas, la muestra se diagnostica como negativa al patógeno.
- v. Si existe desarrollo de *Phytophthora* spp. las colonias deben marcarse con una cruz con lápiz permanente en el envés de la placa. Si éstas se encuentran relativamente puras y con suficiente desarrollo de micelio aéreo, se puede proceder con la extracción de ADN en

forma directa, de lo contrario se debe efectuar un repique de uno o varios bloques de agar con presencia de propágulos del patógeno en PDA y/o CMA.

- vi. Identificar el patógeno a nivel de especie, mediante análisis molecular de PCR, utilizando partidores y condiciones específicas.
- vii. El diagnóstico se considerará positivo o negativo de acuerdo al resultado obtenido del punto anterior (identificación por técnica molecular).

Análisis molecular

En caso de ser necesario un análisis molecular complementario y/o confirmatorio, este análisis deberá realizarse de acuerdo a las siguientes condiciones:

Utilizar uno de los protocolos y parejas de partidores de acuerdo a las condiciones señaladas por las referencias del siguiente cuadro:

Nombre Partidores	Secuencia (5´-3´)	Fragmento (pb)	Referencia
Yph1F+Yph2R (1ª ronda) Ycac1F + Ycac2R (2ª ronda)	Yph1F: CGACCATKGGTGTGGACTTT Yph2R: ACGTTCTCMCAGGCGTATCT Ycac1F: CCATACAAAATTCTGCGCTAGG Ycac2R: AGACACACAAGTGGACCGTTAG	470 194	Schena et al., 2008
DC6+ITS4 (1ª ronda) ADF1+ADR1 (2ª ronda)	DC6: GAGGGACTTTTGGGTAATCA ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC ADF1: TACTGTGGGGACGAAAGTCCT ADR1: CCGATTCAAAGCCAAGCAACT	1310 524	Lacourt et al., 1997
PC1+PC2	PC1: GAAACGGGTGTTGATATCGGAC PC2: GTTTCGGGTGCTGCCAAAACT	450	Causin et al., 2005.

Se considerará un **diagnóstico positivo** a *Phytophthora cactorum* cuando colonias sospechosas de ser *Phytophthora* sp., se analizan mediante técnica molecular de PCR y producto de este análisis se obtiene la banda de amplificación del tamaño señalado para los primers específicos utilizados para el análisis.

Para el caso de diagnósticos negativos, se debe verificar la extracción de ADN y/o la ausencia de inhibición de la reacción, siendo necesario utilizar partidores de control interno de amplificación (CIA).

Se considerará un **diagnóstico negativo** a *Phytophthora cactorum* si no hay desarrollo de colonias sospechosas de ser *Phytophthora* sp. en ninguna de las placas de medio de cultivo, o bien, si a partir de algún aislado sospechoso que se analiza mediante técnica molecular de PCR no se observa la banda de amplificación respectiva para los primers específicos utilizados para el análisis y además se observa la banda de amplificación de CIA.

Para dar cumplimiento con lo anterior, pueden utilizarse en forma separada o en la misma mezcla de PCR, tanto los partidores específicos, como una de las parejas de partidores universales (detallados en Anexo 3), cuya elección dependerá del tamaño del fragmento específico del patógeno a detectar y de la optimización de la metodología de cada laboratorio.

En caso de diagnósticos positivos mediante los partidores ADF1 y ADR1, este resultado deberá confirmarse mediante análisis molecular de PCR-RFLP y/o secuenciación de ADN de la región ITS del ADN ribosomal, considerándose como positiva una muestra que genere el patrón de digestión asociado a *P. cactorum* (de acuerdo a lo descrito por Cooke et al. 2000) y/o al obtener un 100% de homología producto de los alineamientos (BLAST) de la muestra en estudio con las secuencias de ADN disponibles en bases de datos de genes (ej. Genbank).

b) *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*

- Tipo de Muestra : Cuello y raíces
- Metodología de diagnóstico : Medio de cultivo (MSP)
- Microscopía
- Técnica molecular
- Identificación : Morfología
- PCR primer específico

Siembra en medio de cultivo

- i. Proceder de acuerdo a lo señalado en los numerales 6.1 del procedimiento general, considerando cortar en forma aséptica de cada planta 4-5 trozos de raíces de 1 cm. de largo (seleccionar raíces de 2-3mm. 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 1mm. aprox. de grosor) con o sin síntomas de zona de avance de necrosis o lesión.
- ii. Sembrar los tejidos seleccionados en medio de cultivo selectivo para *Phytophthora* (MSP).
- iii. Revisar los cultivos mediante microscopía, determinando aquellos que posean alguna de las características morfológicas y de crecimiento de colonia típica, descritas en la literatura para *Phytophthora* spp.
- iv. Si no hay desarrollo de *Phytophthora* spp. en ninguna de las placas, la muestra se diagnostica como negativa al patógeno.
- v. Si existe desarrollo de *Phytophthora* spp. las colonias deben marcarse con una cruz con lápiz permanente en el envés de la placa. Si éstas se encuentran relativamente puras y con suficiente desarrollo de micelio aéreo, se puede proceder con la extracción de ADN en forma directa, de lo contrario se debe efectuar un repique de uno o varios bloques de agar con presencia de propágulos del patógeno en PDA y/o CMA.
- vi. Identificar el patógeno a nivel de especie, mediante análisis molecular de PCR, utilizando partidores y condiciones específicas.
- vii. El diagnóstico se considerará positivo o negativo de acuerdo al resultado obtenido del punto anterior (identificación por técnica molecular).

Análisis molecular

Utilizar uno de los protocolos y parejas de partidores de acuerdo a las condiciones señaladas por los autores del siguiente cuadro:

Nombre Partidores	Secuencia	Fragmento (pb)	Referencia
DC6+ITS4 (1ª ronda) DC1+DC5 (2ª ronda)	DC6: GAGGGACTTTTGGGTAATCA ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC DC1: ACTTAGTTGGGGGCCTGTCT DC5: CGCCGACTGGCCACACAG	1310 550	Bonants et al., 1997
(1ª ronda) RAS-PFR109h1-F + RAS-PFR109h1-R (2ª ronda) TRP-PFF309a9-F + TRP-PFF309a9-R	RAS-PFR109h1-F: TGTCGAGAGTGATTTATT RAS-PFR109h1-R: AATGGCAAGGCTAGTTACTA TRP-PFF309a9-F: CTACCTCCCTAAGCTTATCA TRP-PFF309a9-R: ACGCAGCATCATAGAAAAT	229 403	Ioos et al., 2006

Se considerará un **diagnóstico positivo** a *Phytophthora fragariae var. fragariae* cuando colonias sospechosas de ser *Phytophthora* sp., se analizan mediante técnica molecular de PCR y producto de este análisis se observa la banda de amplificación del tamaño señalado para los primers específicos utilizados para el análisis.

Para el caso de diagnósticos negativos, se debe verificar la extracción de ADN y/o la ausencia de inhibición de la reacción, siendo necesario utilizar partidores de control interno de amplificación (CIA).

Se considerará un **diagnóstico negativo** a *Phytophthora fragariae var. fragariae* si no hay desarrollo de colonias sospechosas de ser *Phytophthora* sp. en ninguna de las placas de medio de cultivo, o bien, si a partir de algún aislado sospechoso que se analiza mediante técnica molecular de PCR no se observa la banda de amplificación respectiva para los primers específicos utilizados para el análisis y además se observa la banda de amplificación de CIA.

Para dar cumplimiento con lo anterior, pueden utilizarse en forma separada o en la misma mezcla de PCR, tanto los partidores específicos, como una de las parejas de partidores universales (detallados en Anexo 3), cuya elección dependerá del tamaño del fragmento específico del patógeno a detectar y de la optimización de la metodología de cada laboratorio.

Si el laboratorio lo considera necesario, los resultados obtenidos los puede complementar con análisis de secuencia de ADN de la región ITS del ADN ribosomal y con los partidores específicos utilizados.

c) *Verticillium albo-atrum*

- Tipo de Muestra : Cuello y raíces
- Metodología de diagnóstico : Medio de cultivo (MSP y PDA)
Microscopía
Técnica molecular
- Identificación : Morfología
PCR primer específico

Siembra en medio de cultivo

- i. Proceder de acuerdo a lo señalado en los numerales 6.1 del procedimiento general, considerando cortar en forma aséptica de cada planta 4-5 trozos de raíces de 1 cm. de largo (seleccionar raíces de 2-3 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 mm. aprox. de grosor) con o sin síntomas de zona de avance de necrosis o lesión.
- ii. Sembrar los tejidos seleccionados en medio de cultivo PDA
- iii. Revisar los cultivos mediante microscopía, determinando aquellos que posean alguna de las características morfológicas y de crecimiento de colonia típica, descritas en la literatura para *Verticillium* spp.
- iv. Si no hay desarrollo de *Verticillium* spp. en ninguna de las placas, la muestra se diagnostica como negativa al patógeno.
- v. Si existe desarrollo de *Verticillium* spp. las colonias deben marcarse con una cruz con lápiz permanente en el envés de la placa. Si éstas se encuentran relativamente puras y con suficiente desarrollo de micelio aéreo, se puede proceder con la extracción de ADN en forma directa, de lo contrario se debe efectuar un repique de uno o varios bloques de agar con presencia de propágulos del patógeno en PDA.
- vi. Identificar el patógeno a nivel de especie, mediante análisis molecular de PCR, utilizando partidores y condiciones específicas.
- vii. El diagnóstico se considerará positivo o negativo de acuerdo al resultado obtenido del punto anterior (identificación por PCR)

Análisis molecular

Utilizar uno de los protocolos y parejas de partidores de acuerdo a las condiciones señaladas por los autores del siguiente cuadro:

Nombre Partidores	Secuencia	Fragmento (pb)	Referencia
2+3	2: ATGGACCGAACAGCTAGGTA 3: TCTCAGATATATGCTGCTGC	300	Carder et al., 1994; EPPO 2007
Vaf+Var	Vaf: CCGGTACATCAGTCTCTTTA Var: ACTCCGATGCGAGCTGTAAT	334	Nazar et al., 1991; Robb et al., 1993

Se considerará un **diagnóstico positivo** a *Verticillium albo-atrum* cuando colonias sospechosas de *Verticillium* sp., se analizan mediante técnica molecular de PCR y producto de este análisis se observa la banda de amplificación del tamaño señalado para los primers específicos utilizados para el análisis.

Para el caso de diagnósticos negativos, se debe verificar la extracción de ADN y/o la ausencia de inhibición de la reacción, siendo necesario utilizar partidores de control interno de amplificación (CIA).

Se considerará un **diagnóstico negativo** a *Verticillium albo-atrum* si no hay desarrollo de colonias sospechosas de *Verticillium* sp. en ninguna de las placas de medio de cultivo, o bien, si a partir de algún aislado sospechoso que se analiza mediante técnica molecular de PCR y producto de este análisis no se observa la banda de amplificación respectiva para los primers específicos utilizados para el análisis y además se observa la banda de amplificación de CIA.

Para dar cumplimiento con lo anterior, se puede utilizar en la misma mezcla de PCR los partidores específicos junto a las parejas de partidores universales (detallados en Anexos 3) de manera separada en reacciones o mezclas distintas utilizando cada pareja de partidores en forma individual, cuya elección dependerá del tamaño del fragmento específico del patógeno a detectar y de la optimización de la metodología de cada laboratorio.

Si el laboratorio lo considera necesario, los resultados obtenidos los puede complementar con análisis de secuencia de ADN de la región ITS del ADN ribosomal y con los partidores específicos utilizados.

d) *Verticillium dahliae*

- Tipo de Muestra : Cuello y raíces
- Metodología de diagnóstico : Medio de cultivo (MSP y PDA)
Microscopía
Técnica molecular
- Identificación : Morfología
PCR primer específico

Siembra en medio de cultivo

- i. Proceder de acuerdo a lo señalado en los numerales 6.1 del procedimiento general, considerando cortar en forma aséptica 4-5 trozos de raíces de 1 cm. de largo (seleccionar raíces de 2-3 mm. aprox. de grosor y cercanos al cuello) de cada planta y 3-4 trozos de tejido de la zona del cuello de 0.5x2 cm. (realizar los cortes en forma longitudinal y de 1 mm. aprox. de grosor) con o sin síntomas de zona de avance de necrosis o lesión.
- ii. Sembrar los tejidos seleccionados en medio de cultivo selectivo PDA.
- iii. Revisar los cultivos mediante microscopía, determinando aquellos que posean alguna de las características morfológicas y de crecimiento de colonia típica, descritas en la literatura para *Verticillium* spp.

- iv. Si no hay desarrollo de *Verticillium* spp. en ninguna de las placas, la muestra se diagnostica como negativa al patógeno.
- v. Si existe desarrollo de colonias en alguna de las placas, que posean alguna de las características morfológicas y de crecimiento de colonia típicas del hongo, las colonias deben marcarse con una cruz con lápiz permanente en el envés de la placa. Si éstas se encuentran relativamente puras y con suficiente desarrollo de micelio aéreo, se puede proceder con la extracción de ADN en forma directa, de lo contrario se debe efectuar un repique de uno o varios bloques de agar con presencia de propágulos del patógeno en PDA.
- vi. Identificar el patógeno a nivel de especie, mediante análisis molecular de PCR, utilizando partidores y condiciones específicas.
- vii. El diagnóstico se considerará positivo o negativo de acuerdo al resultado obtenido del punto anterior (identificación por PCR).

Análisis molecular

Utilizar uno de los protocolos y parejas de partidores de acuerdo a las condiciones señaladas por los autores del siguiente cuadro:


Nombre Partidores	Secuencia	Fragmento (pb)	Referencia
19+22	2: ATGGACCGAACAGCTAGGTA 3: TCTCAGATATATGCTGCTGC	580	Carder et al., 1994; EPPO 2007
Vdf+Vdr	Vdf: CCGGTCCATCAGTCTCTCTG Vdr: ACTCCGATGCGAGCTGTAAC	334	Nazar et al., 1991; Robb et al., 1993

Se considerará un **diagnóstico positivo** a *Verticillium dahliae* cuando colonias sospechosas de *Verticillium* sp., se analizan mediante técnica molecular de PCR y producto de este análisis se observa la banda de amplificación del tamaño señalado para los primers específicos utilizados para el análisis.

Para el caso de diagnósticos negativos, se debe verificar la extracción de ADN y/o la ausencia de inhibición de la reacción, siendo necesario utilizar partidores de control interno de amplificación (CIA).

Se considerará un **diagnóstico negativo** a *Verticillium dahliae* si no hay desarrollo de colonias sospechosas de *Verticillium* sp. en ninguna de las placas de medio de cultivo, o bien, si a partir de algún aislado sospechoso que se analiza mediante técnica molecular de PCR y producto de este análisis no se observa la banda de amplificación respectiva para los primers específicos utilizados para el análisis y además se observa la banda de amplificación de CIA.

Para dar cumplimiento con lo anterior, se puede utilizar en la misma mezcla de PCR los partidores específicos junto a las parejas de partidores universales (detallados en Anexos 3) o de manera separada en reacciones o mezclas distintas utilizando cada pareja de partidores en forma individual, cuya elección dependerá del tamaño del fragmento específico del patógeno a detectar y de la optimización de la metodología de cada laboratorio.

	Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales	D-GF-CPT-PT-034 Versión 01
--	---	-------------------------------

Si el laboratorio lo considera necesario, los resultados obtenidos los puede complementar con análisis de secuencia de ADN de la región ITS del ADN ribosomal y con los partidores específicos utilizados.

6.2.2 Para Olivos

Seguir procedimiento como se indica para material frutilla anteriormente descrito para los siguientes hongos:

- a) *Verticillium albo-atrum*
- b) *Verticillium dahliae*

6.2.2.1 Para muestras de sustrato

Para ambos hongos solicitados se procede de la misma forma, según lo indicado en el numeral 6.1.1 letra b), del procedimiento general de una muestra de sustrato, a la cual se le verifica la cantidad y humedad, para posteriormente proceder a constituir una submuestra representativa según lo indicado en el kit de extracción utilizado.

La extracción de ADN se realiza según lo indicado en el Kit de extracción de suelo utilizado.

Detectar el patógeno, mediante análisis molecular de PCR, de acuerdo a lo indicado en el numeral 6.2, utilizando partidores y condiciones específicas descritas en él.

El diagnóstico se considerará positivo o negativo de acuerdo al resultado obtenido del punto anterior (identificación por PCR).

7. VARIACIÓN DE LA METODOLOGÍA

En el caso de utilizar reactivos, protocolos o metodologías diferentes a los indicados en los procedimientos de análisis específicos, éstos quedarán sujetos a la evaluación y aprobación por parte del Servicio previo a ser utilizados en análisis oficiales.

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

En aquellos casos excepcionales, en donde se solicite análisis de patógenos sólo a nivel de género, el laboratorio deberá dar respuesta de acuerdo a lo establecido en la letra c) de la descripción de la metodología específica respectiva. Sin perjuicio de lo anterior, una vez recibida la muestra por parte del laboratorio acreditado, éste debe informar en forma escrita (vía correo electrónico, u otro) de esta situación, al inspector u oficina SAG de origen de la muestra con copia al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio.

8. COMUNICACIÓN Y REGISTRO DE LOS RESULTADOS

Los resultados deberán ser ingresados a una base de datos y autorizados por el responsable técnico del laboratorio autorizado, mediante la utilización del sistema computacional de Certificación de Semillas y Plantas Frutales (<http://csm.sag.gob.cl/Common/frmLogin.aspx>), en un plazo mínimo de 7 días (en el caso de muestras que no presentaron desarrollo del patógeno solicitado) y máximo de 15 días seguidos, desde la fecha de recepción de la(s) muestra(s) por parte del laboratorio autorizado.

Una vez ingresados los resultados, el laboratorio deberá notificar lo anterior en forma escrita, a la Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra, al Encargado de Supervisión SAG de

	Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales	D-GF-CPT-PT-034 Versión 01
--	---	-------------------------------

ese laboratorio, con copia al correo electrónico cpf@sag.gob.cl, indicando el o los números de folio del acta de toma de muestras (con su correspondiente correlativo) que fueron ingresados al sistema.

Además, en forma semanal, el laboratorio deberá enviar en forma escrita vía correo electrónico (cpf@sag.gob.cl), al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, una planilla digital formato tipo Excel de resultados de muestras actualizados que incluya a lo menos el N° de Solicitud con su correlativo respectivo, fecha de recepción, aceptación/rechazo, resultado, fecha de análisis (positivo, negativo o pendiente), fecha de ingreso de resultado al sistema computacional en línea, analista responsable y observaciones, para lo cual se deberá utilizar un documento según formato establecido en formulario F-GF-CGP-PT-159.

En caso que el laboratorio autorizado 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, al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio con copia al correo electrónico cpf@sag.gob.cl, indicando el número de la muestra en esa situación (folio del acta de toma de muestras con su respectivo número correlativo), para que el Servicio determine los pasos a seguir.

Además, el laboratorio deberá mantener un archivador o libro de registro con los antecedentes antes mencionados, junto al registro fotodocumentado del análisis molecular si es que correspondiera.

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


Cualquier información obtenida producto del proceso de análisis (resultados parciales o totales u otro), será de carácter confidencial entre el laboratorio autorizado y el SAG, en caso de no respetarse lo anterior, sin previa autorización del Servicio, será considerado como una no conformidad crítica y causal de suspensión inmediata de la condición de autorizado.

9. SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS

Todo laboratorio autorizado será supervisado mediante visitas al menos dos (2) veces al año. Sin embargo, deberá estar dispuesto a recibir supervisiones adicionales, en cualquier momento.

El Encargado de Supervisión SAG del Laboratorio Autorizado, podrá solicitar a este último en cualquier momento, el envío de contramuestras, ya sea tejido vegetal, sustrato, cepas y/o ADN (acorde a lo indicado en el punto 5.3.2 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, se detectan faltas en el desempeño del Laboratorio Autorizado, que afecten negativamente el resultado del Programa de Certificación en material de propagación de Frutillas asociado a su autorización, el SAG, de conformidad con lo dispuesto en la cláusula sexta del correspondiente convenio de autorización, podrá instruir al Laboratorio Autorizado mediante una carta suscrita por el/la Jefe(a) del Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias, Director(a) Regional y/o Jefe(a) de Oficina Sectorial, el cese inmediato de prestaciones de servicios ejecutados en el alcance de su autorización hasta que el SAG resuelva en definitiva su caso.

	<p align="center">Instructivo Técnico para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales</p>	<p align="right">D-GF-CPT-PT-034 Versión 01</p>
--	---	---

9.1. MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO

En caso de detectarse algún incumplimiento o hallazgo durante las supervisiones, se procederá a evaluar la criticidad del mismo, por lo cual el autorizado quedará afecto a la aplicación de medidas por incumplimiento dependiendo del tipo de incumplimiento en el marco de las obligaciones de su actividad.

Las medidas que se pueden aplicar ante la detección de incumplimientos son:

- Suspensión de la autorización.
- Revocación de la autorización.

Las medidas señaladas se aplicarán a nivel nacional, sin perjuicio de las sanciones que contemplan las leyes vigentes.

Cabe señalar, que en caso de detectar incumplimientos moderados, el supervisor podrá consignar en el acta de supervisión correspondiente, una amonestación por escrito y establecerá un plazo para solucionar el hallazgo. En caso que el incumplimiento no sea subsanado, en el plazo establecido, se aplicará la medida por incumplimiento que corresponda.

Las **suspensiones** de la autorización, durarán **el tiempo que determine el Servicio** considerando la gravedad del hallazgo. En el caso de tener que subsanar algún incumplimiento, la suspensión durará, al menos, el tiempo que requiera el autorizado para implementar las medidas correctivas y su posterior verificación por parte del Servicio, caso en que la medida de suspensión quedará levantada a contar de la fecha en que el supervisor SAG a cargo de la supervisión comunique por escrito al laboratorio autorizado la verificación conforme de las medidas correctivas por éste implementadas.

En caso de **revocación**, el laboratorio autorizado afecto a tal medida, quedará inhabilitado para postular nuevamente a esta autorización, **por el plazo de 2 (dos) años**, contados desde que quede ejecutoriada la resolución que la establece.

10. OBLIGACIONES

El laboratorio autorizado ante el SAG para la ejecución de labores asociadas al diagnóstico de hongos y oomycetes en material vegetal de propagación de frutillas, olivos y sustrato, tendrá las obligaciones señaladas en el numeral 7 de la última versión del Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.

En el caso que, por motivos del transporte propiamente tal, las muestras lleguen al laboratorio en mal estado o que no cumplan con las condiciones específicas para realizar los análisis (es decir estado de descomposición u otro), el laboratorio autorizado deberá cambiar de empresa de transporte de encomiendas o courier, cuando tal situación ocurra en 3 oportunidades consecutivas, dando cuenta de tal situación al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, mediante documento escrito enviado vía correo electrónico u otro.

En caso de cambio o término abrupto de convenio con empresa de transporte de encomienda por parte del laboratorio autorizado, éste deberá dar aviso formal por escrito vía correo electrónico en forma inmediata al Encargado del Programa de Certificación de Plantas Frutales SAG, con copia al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio.

No podrá ejercer como laboratorio autorizado para el diagnóstico de hongos y oomycetes en material vegetal de propagación de frutillas, olivos y sustrato, cuando el representante legal, socios, directores, accionistas, gerentes, responsable técnico o personal de la empresa tengan

un interés directo e incompatible con la actividad para la cual fue autorizada, como ser propietario del producto que se desea certificar, u otras que determine el Servicio.

Cualquier información obtenida producto del proceso de análisis (resultados parciales o totales u otro), será de carácter confidencial entre el laboratorio autorizado y el SAG, en caso de no respetarse lo anterior, sin previa autorización del Servicio, será considerado como una no conformidad crítica y causal de suspensión inmediata de la condición de autorizado.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias para Identificación/Descripción morfológica de *Phytophthora cactorum*, *P. fragariae*, *Verticillium albo-atrum* y *V. dahliae*.

<http://www.phytophthoradb.org/species.php?a=view&p=&l=&sf=&sv=>

<http://forestphytophthoras.org/species/cactorum>

[http://www.q-](http://www.q-bank.eu/Fungi/BioloMICS.aspx?Table=Phytophthora%20species%20ONLINE&Rec=518&Fields=All)

[bank.eu/Fungi/BioloMICS.aspx?Table=Phytophthora%20species%20ONLINE&Rec=518&Fields=All](http://www.q-bank.eu/Fungi/BioloMICS.aspx?Table=Phytophthora%20species%20ONLINE&Rec=518&Fields=All)

[http://www.q-](http://www.q-bank.eu/Fungi/BioloMICS.aspx?Table=Phytophthora%20species%20ONLINE&Rec=547&Fields=All)

[bank.eu/Fungi/BioloMICS.aspx?Table=Phytophthora%20species%20ONLINE&Rec=547&Fields=All](http://www.q-bank.eu/Fungi/BioloMICS.aspx?Table=Phytophthora%20species%20ONLINE&Rec=547&Fields=All)

<http://www.verticilliumdb.org/species.php>

IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 1966, 12, pp Sheet 111. *Phytophthora cactorum*

IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 1970, 26, pp Sheet 255. *Verticillium albo-atrum*

IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 1970, 26, pp Sheet 256. *Verticillium dahliae*

12. FORMULARIOS Y ANEXOS

F-GF-CGP-PT-156	Formulario anexo para el diagnóstico de hongos y oomycetes en material vegetal de propagación y sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales
F-GF-CGP-PT-157	Formulario de identificación del personal vinculado al/los análisis
F-GF-CGP-PT-085	Empresa(s) de transporte de encomiendas o courier en convenio
F-GF-CGP-PT-158	Planilla semanal con resultados de análisis de hongos y oomycetes en muestras de plantas de frutillas, hongos y sustrato del programa de certificación de plantas frutales.
F-GF-CGP-PT-159	Formulario tipo para registro de fotodocumentación de geles
ANEXO 1	Medios de cultivos y su formulación
ANEXO 2	Protocolo de extracción de ADN sugerido
ANEXO 3	Lista de partidores sugeridos a utilizar como control interno de amplificación

Formulario anexo para el Diagnóstico de Hongos y Oomycetes en material vegetal de propagación y Sustratos para el Programa de Certificación de Plantas Frutales

Código: F-GF-CGP-PT-156
Versión:01

Identificación del laboratorio:
Nombre/razón social:
Cédula de identidad N°/RUT:

Marcar con una "X" la/las actividades que solicita la autorización:

Actividades a los que postula	
5. <i>Phytophthora cactorum</i>	
6. <i>Phytophthora fragariae var. fragariae</i>	
7. <i>Veticillium albo-atrum</i>	
8. <i>Verticillium dahliae</i>	

Marcar con una "X" la/s matriz a diagnosticar para la/s cual/es solicita la autorización:

MATRIZ DE DIAGNÓSTICO	
FRUTILLAS	
OLIVOS	
SUSTRATO	

Firma del postulante o representante legal

Fecha,.....



**FORMULARIO DE IDENTIFICACIÓN DEL PERSONAL
VINCULADO AL/LOS ANÁLISIS**

Código: F-GF-CGP-PT-157
Versión:01

Identificación del laboratorio:

Nombre/razón social:

Cédula de identidad N°/RUT:

Nombre Completo	N° Cédula de Identidad	Firma	Técnica que realiza

Firma del postulante o representante legal

Fecha,.....

**EMPRESA(S) DE TRANSPORTE DE
ENCOMIENDAS O COURIER EN CONVENIO**

F-GF-CGP-PT-085
Versión 01

Identificación del laboratorio:

Nombre/razón social:

Cédula de identidad N°/RUT:

Nombre Empresa	Número de Cuenta	Fecha de convenio	Fono contacto

Firma del postulante o representante legal

Fecha,.....

	FORMULARIO TIPO PARA REGISTRO DE FOTODOCUMENTACIÓN DE GELES	F-GF-CGP-PT-158 Versión 01
--	--	-------------------------------

Identificación del laboratorio:

Nombre/razón social:

Cédula de identidad N°/RUT:

Con fecha (dd/mm/aaaa) adjunto envío los diagnósticos actualizados de los siguientes análisis:

N° de Solicitud	N° Correlativo	Fecha de Recepción	Patógeno	RESULTADO (Positivo/Negativo/Pendiente)	Fecha Análisis	Fecha de Ingreso al Sistema

Firma del postulante o representante legal

Fecha,.....



**FORMULARIO TIPO PARA REGISTRO DE
FOTODOCUMENTACIÓN DE GELES**

F-GF-CGP-PT-159
Versión 01

RESPONSABLE : _____

FECHA : ____/____/____

PATOGENO : _____

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:

1.1.1. Agar Papa Dextrosa acidificado (PDA/a)

- 39 gramos de PDA.
- Vaciar en Matraz Erlenmeyer u otro de 1L.
- Aforar a 1000 mL con agua destilada.
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

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 20ml en cada Placa Petri.
 Dejar enfriar las placas, identificarlas con las iniciales del medio.
 Guardar en conservadora a 6°C ± 2°C.

1.1.2. Agar Maíz (CMA)

- Agar Maíz 17 gr.
- Agua destilada 1000 mL
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

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.

1.1.3. Medio Selectivo de *Phytophthora* (MSP)

Medio BNP

- Agar Maíz 17 gr.
- Agua destilada 1000 mL

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.
 Dejar enfriar ± 45-50°C y agregar los siguientes aditivos:

- Benomyl 10 mg/L
- PCNB 25 mg/L
- Nystatin 25 mg/L
- Ampicillin 500mg/L
- Rifampicin 10 mg/L

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 y oscuridad.

Medio Selectivo de *Verticillium* (MSV)

i. EPPA

- Agar Maíz 17 gr.
- Agua destilada 1000 mL
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Dejar enfriar \pm 45-50°C y agregar los siguientes aditivos:

- Benomyl 10 mg/L
- PCNB 25 mg/L
- Nystatin 25 mg/L
- Ampicillin 500mg/L
- Rifampicin 10 mg/L

Vaciar 20 ml en cada Placa Petri.

Dejar enfriar las placas, identificarlas con las iniciales del medio.

Guardar en conservadora a $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y oscuridad.

ii. Sorensen´s NP-10 (SNP)

1a Fase:

- Ácido poligacturónico PGA (P-3889) 5 g
- NaOH 0,025 N

Aforar a 500 mL con agua destilada y esterilizar. Enfriar a 45-50 °C.

2a Fase:

- Bacto Agar (Difco) 15 g
- KNO₃ 1 g
- KH₂PO₄ 1 g
- KCL 0,5g
- MgSO₄ x 7H₂O 0,5g
- Tergitol (NP-10) 0,5mL

Aforar a 500 mL con agua destilada, disolver con magneto y esterilizar. Enfriar a 45-50 °C antes de agregar a la segunda fase:

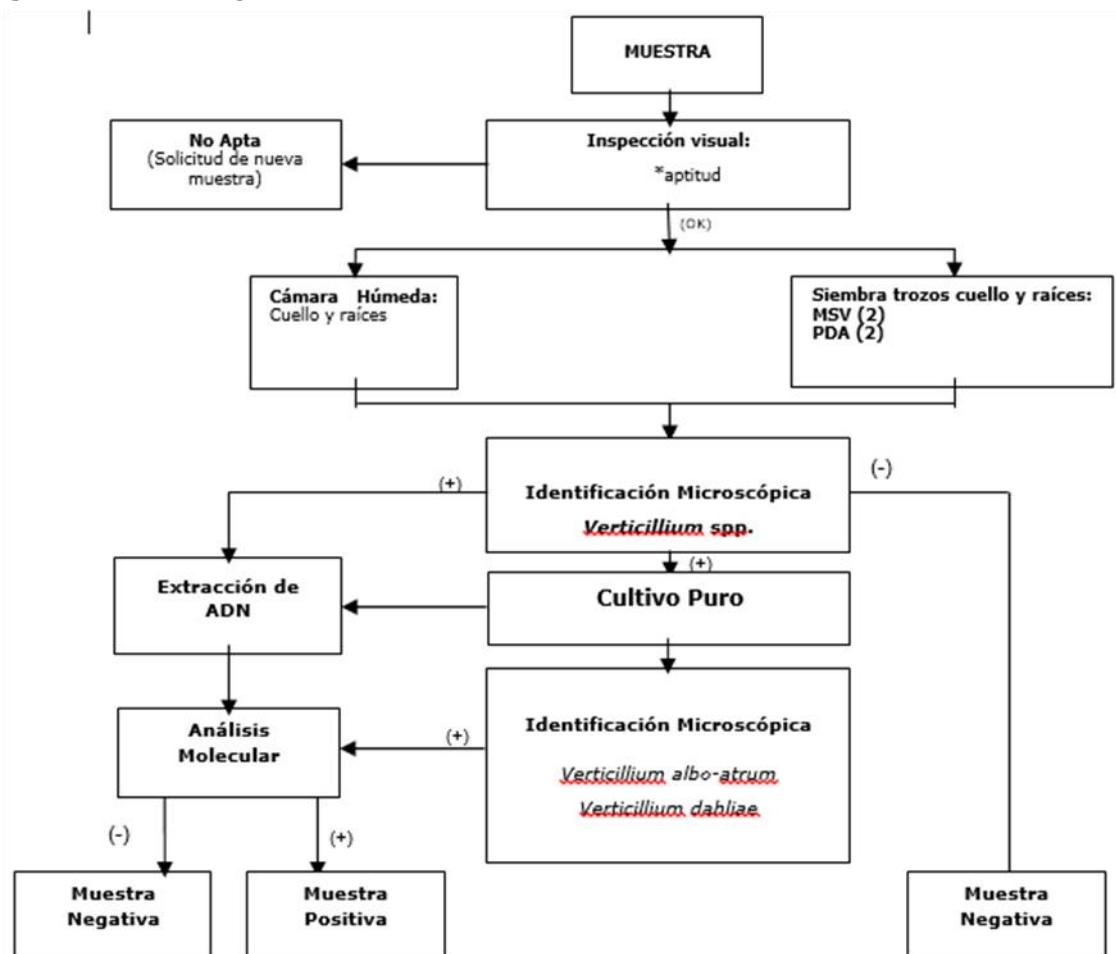
- Cloranfenicol 0,05 g
- Estreptomicina sulfato 0,05 g
- Clorotetraciclina HCl 0,05 g

Finalmente se mezclan ambas fases.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN SUGERIDO

En resumen, la metodología consiste en: de cada aislado puro, sospechoso desarrollado en PDA y/o MEA, se toma aproximadamente 0.1g de micelio (aprox. del tamaño de una cabeza de fósforo) y se deposita en tubo eppendorf o mortero estéril, el cual contiene aproximadamente 1-2mL de buffer de extracción/lisis (200 mM de Tris HCl [pH 7.5], 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA, and 0.5% de sodium dodecyl sulfato). En forma adicional, al tubo eppendorf se le puede agregar una pequeña cantidad de perlititas de vidrio de 0.2-0.5mm de diámetro (glass beads). Se macera u homogeniza con pistilo, se recupera 1mL en un tubo eppendorf nuevo (opcionalmente agregar 2µL de proteinasa K), el tubo se incuba a 65°C por 1 hora, luego se centrifuga a 13000 rpm por 5 minutos. Se recuperan 750 µL de sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo, se mezcla con 750 µL de isopropanol frío y se deja incubar a temperatura ambiente (20-22°C) por 15 minutos, luego se centrifuga a 13000 rpm por 10 minutos. Se desecha el isopropanol y se lava el pellet obtenido con 1mL de Etanol al 70%, se centrifuga nuevamente a 13000 rpm durante 2 minutos y se elimina el etanol, dejando secar el pellet durante 30-40 minutos a 30-40°C. Posteriormente, se hidrata el pellet con 100 µL de agua destilada estéril grado molecular (agregar 1 µL de RNAsa (1mg/mL) en forma opcional) y se incuba a 37°C por 10-15 minutos. El ADN obtenido se almacena a -20°C o se utiliza inmediatamente como templado de PCR.

Flujograma de trabajo



LISTA DE PARTIDORES SUGERIDOS A UTILIZAR COMO CONTROL INTERNO DE AMPLIFICACIÓN Y/O SECUENCIACIÓN DE ADN

1.- Lista de Partidores.

Nombre del Partidor	Secuencia 5' a 3'	Locus	Combinación	Referencia
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Región ITS del rDNA	ITS1/ITS4 ITS4/ITS5 ITS4/ITS6	White et al. (1990)
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC			
ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G			
ITS6	GAA GGT GAA GTC GTA ACA AGG			Cooke et al. (1997)

2.- Secuenciación de ADN y/o Control Interno de Amplificación, junto al tamaño del fragmento esperado para cada combinación.

Nombre del Partidor	Fragmento (pb) aprox.	
	<i>Phytophthora</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.
ITS1+ITS4	900	600
ITS4+ITS5	900	600
ITS4+ITS6	900	600