

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO
DE HONGOS Y SIMILARES EN SEMILLEROS DE
EXPORTACIÓN**

Código: D-GF-CGP-PT-045
Versión:02

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE HONGOS Y
SIMILARES EN SEMILLEROS DE EXPORTACIÓN**

CONTENIDOS

1. OBJETIVOS Y ALCANCE.....	3
2. REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS.....	6
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS.....	7
4. REQUISITOS.....	9
4.1. REQUISITOS DE INFRAESTRUCTURA, EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	9
4.1.1. REQUISITOS DE INFRAESTRUCTURA.....	9
4.1.2. REQUISITOS DE EQUIPAMIENTO.....	9
4.1.3. REQUISITOS DE MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	11
4.1.4. REQUISITOS DE ESTÁNDARES.....	11
4.2. REQUISITOS DE PERSONAL.....	12
4.2.1. RESPONSABLE TÉCNICO.....	12
4.2.2. ANALISTA.....	12
4.2.3. PERSONAL DE APOYO.....	13
4.3. REQUISITOS ESPECÍFICOS.....	13
4.4. MEDIOS DE VERIFICACIÓN DE REQUISITOS.....	14
4.5 CAPACIDAD ANALÍTICA DEL LABORATORIO.....	15
5. ASPECTOS GENERALES DEL ANÁLISIS.....	15
5.1. CONDICIONES PREVIAS.....	15
5.2. CAPTACIÓN Y TRASLADO DE LAS MUESTRAS.....	15
5.3. RECEPCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA/CONTRAMUESTRA.....	16
5.3.1. RECEPCIÓN DE LA MUESTRA.....	16
5.3.2. MANEJO DE CONTRAMUESTRAS.....	17
5.4. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS.....	17
5.4.1. PROCEDIMIENTO GENERAL EN PLANTAS.....	17
5.4.2. PROCEDIMIENTO GENERAL EN SEMILLAS.....	18
5.4.3. DETECCIÓN MEDIANTE TÉCNICA MOLECULAR.....	19
5.4.4. PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO.....	21
5.5. METODOLOGÍA DE DIAGNÓSTICO.....	28
5.6. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.....	28
5.7. VARIACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS.....	28
5.8. REGISTROS.....	28
6. COMUNICACIÓN Y REGISTRO DE RESULTADOS.....	29
7. SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS.....	30
8. OBLIGACIONES.....	30
9. FORMULARIOS Y ANEXOS.....	31

1. OBJETIVOS Y ALCANCE

El presente documento establece requisitos y procedimientos que deberán cumplir por los/as interesados/as que voluntariamente postulen ante el SAG, para ser parte de los laboratorios autorizados en la ejecución de los análisis y ensayos para el diagnóstico de hongos y similares fitopatógenos en material de propagación vegetal en crecimiento activo en los semilleros de exportación de las siguientes familias. Adicionalmente, en casos excepcionales se considera el análisis en semillas botánicas:

- Aliaceae
- Apiaceae
- Asparagaceae
- Asteraceae
- Brassicaceae
- Chenopodeaceae
- Cucurbitaceae
- Fabaceae
- Oleaginosas
- Poaceae
- Solanaceae

El alcance de la autorización será de carácter nacional y se otorgará por familia (grupo hospedante). El laboratorio autorizado deberá realizar la totalidad de los diagnósticos micológicos definidos para cada familia en la tabla N° 1.

Tabla N° 1. Hongos a determinar en hortalizas y cultivos del programa de semilleros de exportación

FAMILIA/GRUPO HOSPEDANTE	HONGO o SIMILAR
<p>Aliaceae: <i>Allium</i> spp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Botrytis aclada</i> (<i>Botrytis allii</i>) · <i>Botrytis byssoidea</i> · <i>Botrytis squamosa</i> · <i>Colletotrichum circinans</i> · <i>Fusarium avenaceum</i> · <i>Fusarium oxysporum</i> · <i>Peronospora destructor</i> · <i>Puccinia allii</i> · <i>Pyrenochaeta terrestris</i> · <i>Rhizoctonia solani</i> · <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> · <i>Sclerotium cepivorum</i> · <i>Sclerotium rolfsii</i> (= <i>Corticium rolfsii</i>) · <i>Urocystis cepulae</i> · <i>Verticillium albo-atrum</i>

<p>Apiaceae: <i>Apium</i> spp. <i>Daucus</i> spp. <i>Foeniculum</i> spp. <i>Petroselinum</i> spp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Alternaria alternata</i> · <i>Alternaria dauci</i> · <i>Alternaria radicina</i> · <i>Cercospora carotae</i> · <i>Fusarium avenaceum</i> · <i>Fusarium oxysporum</i> · <i>Macrophomina phaseolina</i> · <i>Mycocentrospora acerina</i> · <i>Rhizoctonia solani</i> · <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> · <i>Septoria apiicola</i> · <i>Septoria petroselini</i>
<p>Asparagaceae: <i>Asparagus</i> spp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Fusarium moniliforme</i> var. <i>intermedium</i> · <i>Fusarium oxysporum</i> · <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>asparagi</i> · <i>Phytophthora sojae</i> · <i>Stemphylium botryosum</i> · <i>Stemphylium versicarium</i>
<p>Asteraceae: <i>Cichorium</i> spp. <i>Cynara</i> spp. <i>Lactuca</i> spp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Botrytis cinerea</i> · <i>Bremia lactucae</i> · <i>Fusarium avenaceum</i> (= <i>Gibberella avenacea</i>) · <i>Marssonina panattoniana</i> (= <i>Microdochium panattonianum</i>) · <i>Mycocentrospora acerina</i> · <i>Plasmopara halstedii</i> · <i>Puccinia helianthi</i> · <i>Sclerotinia minor</i> · <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> · <i>Verticillium albo-atrum</i> · <i>Verticillium dahliae</i>
<p>Brassicaceae: <i>Brassica</i> spp. <i>Raphanus</i> spp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Albugo candida</i> · <i>Alternaria brassicae</i> · <i>Alternaria brassicicola</i> · <i>Chalara elegans</i> · <i>Fusarium avenaceum</i> (<i>Gibberella avenacea</i>) · <i>Fusarium oxysporum</i> · <i>Macrophomina phaseolina</i> · <i>Mycosphaerella brassicicola</i> (= <i>Phyllosticta brassicae</i>) · <i>Phoma lingam</i> (= <i>Leptosphaeria maculans</i>) · <i>Phytophthora megasperma</i> · <i>Plasmodiophora brassicae</i> · <i>Pseudocercospora capsellae</i> · <i>Pythium aphanidermatum</i> · <i>Rhizoctonia solani</i> (= <i>Thanatephorus cucumeris</i>) · <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> · <i>Verticillium albo-atrum</i> · <i>Verticillium dahliae</i>
<p>Chenopodeaceae: <i>Beta</i> spp. <i>Chenopodium</i> spp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Alternaria brassicae</i> · <i>Cercospora beticola</i> · <i>Fusarium oxysporum</i>

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO
DE HONGOS Y SIMILARES EN SEMILLEROS DE
EXPORTACIÓN**

Código: D-GF-CGP-PT-045
Versión:02

<p><i>Spinacia</i> spp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> . <i>Mycosphaerella brassicicola</i> (= <i>Phyllosticta brassicae</i>) . <i>Peronospora farinosa</i> . <i>Phoma betae</i> (= <i>Phoma betae</i>) . <i>Phoma lingam</i> (= <i>Leptosphaeria maculans</i>) . <i>Phytophthora megasperma</i> . <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . <i>Uromyces beticola</i> . <i>Verticillium dahliae</i>
<p>Cucurbitaceae: <i>Cucumis</i> spp. <i>Cucurbita</i> spp. <i>Citrulus</i> spp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> . <i>Alternaria alternata</i> . <i>Alternaria brassicicola</i> . <i>Cladosporium cucumerinum</i> . <i>Didymella bryoniae</i> (= <i>Mycosphaerella melonis</i>) . <i>Fusarium avenaceum</i> . <i>Fusarium oxysporum</i> <i>solani</i> . <i>Macrophomina phaseolina</i> . <i>Peronospora farinosa</i> . <i>Phytophthora capsici</i> . <i>Pyrenochaeta terrestris</i> . <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . <i>Sclerotium rolfsii</i> (= <i>Corticium rolfsii</i>) . <i>Verticillium albo-atrum</i> . <i>Verticillium dahliae</i>
<p>Fabaceae: <i>Medicago</i> spp. <i>Phaseolus</i> spp. <i>Pisum</i> spp. <i>Vicia</i> spp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> . <i>Alternaria alternata</i> . <i>Alternaria brassicicola</i> . <i>Ascochyta fabae</i> (= <i>Didymella fabae</i>) . <i>Ascochyta pinodes</i> (= <i>Didymella pinodes</i>) . <i>Ascochyta pisi</i> . <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . <i>Fusarium solani</i> . <i>Macrophomina phaseolina</i> . <i>Phoma medicaginis</i> . <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . <i>Uromyces viciae-fabae</i>
<p>Oleaginosas: <i>Glycine</i> spp. <i>Helianthus</i> spp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> . <i>Botrytis cinerea</i> . <i>Fusarium avenaceum</i> (= <i>Gibberella avenacea</i>) . <i>Phytophthora sojae</i> . <i>Plasmopara halstedii</i> . <i>Puccinia helianthi</i> . <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . <i>Verticillium albo-atrum</i> . <i>Verticillium dahliae</i>
<p>Poaceae: <i>Avena sativa</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Secale cereale</i> <i>Triticum</i> spp. <i>Zea mays</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> . <i>Alternaria triticina</i> . <i>Cephalosporium maydis</i> . <i>Colletotrichum graminicola</i> . <i>Fusarium avenaceum</i> (= <i>Gibberella avenaceae</i>) . <i>Fusarium graminearum</i> (= <i>Gibberella zeae</i>) . <i>Fusarium oxysporum</i> . <i>Fusarium subglutinans</i> . <i>Fusarium verticillioides</i> (= <i>F. moniliforme</i>) . <i>Helminthosporium pedicellatum</i>

	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Puccinia sorghi</i> · <i>Sclerophthora macrospora</i> · <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> · <i>Sphacelotheca reiliana</i> · <i>Urocystis agropyri</i> · <i>Ustilago maydis</i> · <i>Ustilago nuda</i> · <i>Septoria nodorum</i>
<p>Solanaceae: <i>Capsicum</i> spp. <i>Lycopersicon</i> spp. <i>Solanum</i> spp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> · <i>Alternaria brassicicola</i> · <i>Alternaria radicina</i> · <i>Alternaria solani</i> · <i>Chalara elegans</i> · <i>Colletotrichum coccodes</i> · <i>Fusarium oxysporum</i> · <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> · <i>Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici</i> · <i>Fusarium solani</i> · <i>Macrophomina phaseolina</i> · <i>Phytophthora capsici</i> · <i>Phytophthora infestans</i> · <i>Phytophthora nicotianae (=P. parasitica)</i> · <i>Rhizoctonia solani</i> · <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> · <i>Veticillium albo-atrum</i> · <i>Verticillium dahliae</i>

Sin perjuicio de lo anterior, en caso de que el Servicio lo requiera, podrá ampliar el número de plagas y/o técnicas diagnósticas que forman parte del alcance de esta autorización SAG, frente a lo cual, los laboratorios que deseen mantener su autorización en esta categoría, deberán postular a la ampliación de su autorización de acuerdo al procedimiento descrito en el numeral 13 del Reglamento Específico de Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos.

Asimismo, este documento entrega los deberes y obligaciones que deben cumplir estos laboratorios, una vez autorizados. Resolución Exenta N° 529 de 2012, del Director Nacional del Servicio Agrícola y Ganadero, que norma el Sistema Nacional de Autorización de Terceros.

2. REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Resolución Exenta N° 90 de 2014, del Director Nacional del Servicio Agrícola y Ganadero, que aprueba el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos.
- Resolución Exenta del Director Nacional N° 2.455 de 2013, del Director Nacional del Servicio Agrícola y Ganadero, que oficializa sistema y requisitos para la certificación fitosanitaria de material de propagación de exportación.
- Carder JH, Morton A, Tabrett AM & Barbara DJ (1994) Detection and differentiation by PCR of subspecific groups within two *Verticillium* 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., Williams, N. A., Weerdt, M. H. 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.
- Cullen D.W., Lees A. K., Toth I. K. and Duncan J. M. Detection of Colletotrichum coccodes from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. Plant Pathology (2002) 51, 281-292.
- Decreto Supremo N° 66 y sus versiones, del 2 de Julio de 2007. Aprueba Reglamento de Instalaciones Interiores y Medidores de Gas.
- Decreto Supremo N° 10 y sus versiones, del 2 de marzo de 2012. Aprueba el Reglamento de calderas, autoclaves y equipos que utilizan vapor de agua.
- Grote D., Olmos A., Kofoet A., Tuset J.J., Bertolini E. and Cambra M. Specific and sensitive detection of Phytophthora nicotianae by simple and nested-PCR. European Journal of Plant Pathology (2002) 108: 197-207.
- OEPP/EPPO, Bulletin (2007), 37, 528-535.
- OEPP/EPPO, Bulletin (2014) 44(3), 350-359
- Hirano Y. and Arie T. PCR-based differentiation of Fusarium oxysporum ff.sp. lycopersici and radices-lycopersici and races of Fusarium oxysporum ff.sp. lycopersici. J Gen Plant Pathol (2006) 72:273-283.
- Ioos R., Laugustin L., Rose S., Tourvieille J. & Tourvieille de Labrouhe D. (2007) Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent Plasmopara halstedii in sunflower seeds. Plant Pathology 56, 209-218.
- Mathur S.B. and Kongsdal Olga, 2003. Common Laboratory Seed Health Testing Methods for detecting fungi. ISTA.
- Nazar R. N., Hu X., Schmidt J., Culham D. and Robb J. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of Verticillium wilt pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology (1991) 39, 1-11.
- Robb et al. Physiological and molecular plant pathology. 1993. 43: 423 436.
- SAG. Manual de reconocimiento de síntomas/signos de enfermedades en semilleros de exportación de solanáceas. Documento Interno.
- Silvar C., Duncan J.M., Cooke D.E.L., Williams N.A., Díaz J. and Merino F. Development of specific PCR primers for identification and detection of Phytophthora capsici Leon. European Journal of Plant Pathology (2005) 112: 43-52.
- White et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.

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.
Colonia	Grupo de hifas (frecuentemente con esporas), las cuales si provienen de una espora o célula, pueden corresponder a un solo individuo.
Forma especial (f.sp.)	Categoría taxonómica intraespecífica, establecida para diferenciar ciertos hongos fitopatógenos en virtud de las especies hospedantes capaces de infectar.
ISTA	International Seed testing Association (Asociación Internacional de Ensayos de Semillas).
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.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa. Técnica con la cual se obtiene un gran número de copias de un fragmento de ADN.
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.
Patógeno	Agente virulento que es capaz de infectar una planta.
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 este cargo.

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism.
Servicio/SAG	Servicio Agrícola y Ganadero.
Signo	Presencia del agente causal en una planta enferma.
Similar	Organismo que posee características similares a los hongos y que es tratado como tal, pero pertenece a otro reino (p.ej. <i>Albugo</i> sp., <i>Peronospora</i> sp., <i>Phytophthora</i> sp., <i>Plasmodiophora</i> sp., <i>Plasmopara</i> sp., <i>Pythium</i> sp., entre otros).
Síntoma	Expresión externa o interna de alteraciones morfológicas por la acción de un agente causal en una planta enferma.
SISVEG	Sistema de Información de Sanidad Vegetal.

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, disponiendo de áreas con suficiente espacio y buenas condiciones de iluminación para desarrollar en forma óptima las diferentes 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 y para evitar contaminación cruzada. Las superficies de muros, cielos, pisos y mesones deben ser lisas, de fácil limpieza e impermeables.

Las áreas mínimas que se requieren son:

- Área administrativa;
- Área de recepción, mantención, lavado y preparación de muestras;
- Área de siembra, preparación de medios de cultivo y esterilización;
- Área de análisis o trabajo (microscopía, incubación);
- Área de limpieza, esterilización, secado de material y eliminación de residuos.

En caso de realizar análisis molecular, además deberá considerar disponer de un área Pre y Post-PCR, es decir, una zona de extracción de ADN/ARN separada del área de amplificación y electroforesis, organizados de manera (separación espacial y temporal) que se evite el riesgo de contaminación por aerosoles de amplicones de PCR.

El laboratorio deberá cumplir con la reglamentación nacional vigente en lo que se refiere a instalaciones de interior de gas y electricidad (D.S. 66/2007), así como también de manejo de calderas, autoclaves y equipos que utilizan vapor de agua (D.S. N°10/2012).

4.1.2 Requisitos de equipamiento

El laboratorio postulante debe contar con los equipos necesarios acordes al volumen de muestras a procesar, que garanticen el correcto desarrollo de la metodología de análisis a realizar.

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

- Agitador de tubos o Vortex.
- Autoclave para esterilización de material.
- Autoclave para esterilización de tampones y material limpio.
- Balanza analítica de 0.001 a 100 gr. con una resolución de 0.001 gr.
- Balanza de precisión.
- Baño de agua termoregulado (30-80°C).
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Cámara de flujo laminar o Gabinete de bioseguridad Clase II.
- Conservadora de muestras que alcance una temperatura de 6°C ± 2°C.
- Estufa de incubación que alcance una temperatura de a lo menos 37°C, con rango de trabajo regulable entre 22-24°C con un error máximo de ± 1°C.
- Freezer o congelador que alcance temperaturas de -20°C o menores.
- Fuente de poder para cámara de electroforesis.
- Lupa estereoscópica (bi o trinocular). Zoom o aumento regulable de 1x a 4.5x como mínimo, con fuente de iluminación incidente incorporada o externa. Oculares de 10x como mínimo.
- Micro-Centrífuga* (hasta 14000 r.p.m. como mínimo).
- Micropipetas de 0.5-10µl, 2-20µl, 20-200µl y 100-1000µl. Un set de uso exclusivo para PCR.
- Microscopio óptico binocular (ideal trinocular) con objetivos de 4x, 10x, 40x y 100x (inmersión) de aumento, construidos siguiendo norma DIN o similar, plan acromáticos y corrección al infinito. Sistema de iluminación Köhler. Oculares de 10X como mínimo y con reglilla de medición o sistema de adquisición y medición de imágenes microscópicas digitales. Perilla con enfoque macro y micrométrico.
- Peachímetro digital.
- Refrigerador que alcance una temperatura de 6°C±2°C.
- Termociclador.
- Transiluminador UV o similar que emita longitud de onda de 250-310nm aprox.

Se hace presente, que los equipos subrayados que tengan más de dos (2) años desde su fabricación, al momento de la postulación, deben contar con un certificado de verificación efectuado por el servicio técnico de la empresa representante en Chile de la marca del equipo o por una empresa acreditada o certificada a nivel nacional para la realización de mantención de equipos, el que, al momento de la postulación, renovación o ampliación del alcance, deberá estar vigente.

Otros complementarios:

- Sala de Incubación con sistema de temperatura con rango de trabajo regulable entre 22-24°C con un error máximo de ± 1°C y con luz controlada idealmente (tubos de luz negra que emitan luz cercana a la ultravioleta, ej. Philips TLD 36W/08 o tubos de luz día, ej. Philips TLD 36W/84 De Luxe que emite algo de luz cercana a la ultravioleta). En el caso de análisis de semillas, el sistema de luz controlada es mandatorio.
- Centrífuga (hasta 5000 rpm y rotor para tubos de 15mL como mínimo) para análisis de semillas.

Se hace presente que, como parte de un sistema de gestión de calidad o aseguramiento de calidad basado en buenas prácticas de laboratorio, se solicita el envío junto al dossier técnico, de un programa de mantención preventiva/correctiva y de verificación/ calibración interna y externa de

los equipos, especialmente aquellos asociados a temperatura, pesaje, esterilización, asepsia y óptica, el que será sometido a evaluación por parte de la unidad técnica respectiva y formará parte del proceso de supervisiones posteriores una vez obtenida la autorización del laboratorio.

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 los materiales, reactivos y medios de cultivo que se deben considerar como mínimo:

- Agarosa grado molecular libre de nucleasas.
- Agua destilada o desionizada.
- Antibióticos.
- Bisturí.
- Buffer TAE o TBE (Tris- acetato-EDTA, Tris-borato-EDTA).
- Cajas plásticas transparentes con tapa (medidas mínimas 200x200x15 mm.)
- Etanol 95%.
- Guantes de látex u otros.
- Hipoclorito de sodio.
- Hojas de bisturí.
- Marcador de peso molecular 100pb.
- Medios de Cultivo en polvo.
- Papel absorbente (tipo Anchor Paper Co. para germinación de semillas, papel azul blotter o similar) y/o Papel filtro circular estéril de 88mm. aprox. (ej. Whatman N° 1 o similar).
- Partidores específicos y universales.
- Pinzas.
- Placas de Petri de 90mm de diámetro (plásticas o de vidrio Petri).
- Porta y cubreobjetos.
- Puntas para micropipetas con y sin filtro.
- Solución de tinción de ADN (bromuro de etidio u otro).
- Soluciones o kit para extracción de ADN.
- Taq polimersa y reactivos asociados.
- Tubos de PCR de 0.2 mL libres de nucleasas.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL libres de nucleasas.

4.1.4 Requisitos de estándares

Podrá utilizarse como estándares o material de referencia, dependiendo de cada caso, aislado(s), preparaciones microscópicas y/o muestras (vegetal, tubos con ADN, otro) que contenga alguno de los patógenos a diagnosticar señalados en el alcance, los que podrán ser proporcionados por el Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio. Los estándares disponibles, serán utilizados para el control del método de ensayo durante la visita de verificación y podrán ser entregados una vez que el laboratorio postulante haya sido aceptado como laboratorio autorizado. En caso que el laboratorio ya autorizado adquiera nuevos estándares que no provengan de los entregados por el servicio y quiera utilizar como control de alguno de los ensayos, deberá enviarse la consulta formal al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, para su evaluación y posterior aprobación o rechazo. Será considerado como una falta grave y por ende causal de suspensión del laboratorio,

si se detectase la utilización de controles que no tengan el consentimiento por parte del servicio. Será responsabilidad del laboratorio autorizado, la conservación en condiciones apropiadas de los estándares entregados por el servicio.

4.2 REQUISITOS DE PERSONAL

El laboratorio debe contar con el siguiente personal:

4.2.1 Responsable Técnico

Según se indica en el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios análisis/ensayo (Numeral 4.2), el laboratorio debe contar con un responsable técnico, quien será la contraparte del SAG, en temas técnicos asociados a su actividad como laboratorio autorizado. Este responsable técnico, debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- i. Nivel de Estudios:
 - Poseer título profesional de Ingeniero Agrónomo, Ingeniero Forestal, Biólogo y/o Bioquímico otorgado por una entidad reconocida por el Estado.
- ii. Experiencia Profesional:
 - Experiencia laboral en el área de laboratorios de al menos cinco (5) años.
 - Tener competencia técnica o experiencia laboral comprobable de al menos cinco (5) años en un cargo de analista o investigación de patógenos en vegetales, realizando labores de ejecución de técnicas microbiológicas, técnicas moleculares, análisis microscópico y de observación de síntomas y signos de enfermedades en vegetales.
 - Haber realizado y aprobado cursos de identificación taxonómica de hongos y similares de vegetales, que en total sumen a lo menos 50 horas, comprobable mediante certificado correspondiente.
 - Haber realizado y aprobado cursos de buenas prácticas de laboratorio y gestión de calidad en normas ISO NCh 17025, comprobable mediante certificado correspondiente.

4.2.2 Analistas

El laboratorio deberá contar con personal profesional y/o técnico en número adecuado, de acuerdo a la cantidad de análisis a realizar. Los analistas serán responsables de los diagnósticos finales emitidos en el correspondiente informe fitosanitario, para lo cual deberá reunir las competencias que a continuación se detallan:

- i. Nivel de Estudios:
 - Título Profesional de una carrera del área agrícola de preferencia Ingeniero Agrónomo, o Técnico nivel superior del área silvoagrícola, impartida por una entidad de enseñanza superior reconocida por el Estado.
- ii. Experiencia laboral:
 - En caso de poseer Título Profesional, tener competencia técnica o experiencia laboral comprobable de al menos 3 años y para el caso de poseer Título Técnico de 5 años, en un cargo de analista de laboratorios del área fitopatológica o en investigación enfocada en la disciplina de Micología, realizando labores de ejecución de técnicas microbiológicas, técnicas moleculares

y de observación de síntomas de enfermedades en vegetales en laboratorio y diagnóstico e identificación morfológica de diferentes géneros y especies de hongos y similares fitopatógenos mediante microscopía.

- Haber realizado y aprobado cursos de identificación taxonómica de hongos y similares de vegetales, que en total sumen a lo menos 50 horas, comprobable mediante certificado correspondiente.

4.2.3 Personal de apoyo

Personas que ejecutarán actividades técnicas involucradas en los análisis descritos en el o los procedimientos establecidos en este instructivo, sin embargo, no están habilitados para efectuar ni firmar como responsable de los diagnósticos. Deberán reunir las competencias que a continuación se detallan:

- Nivel de Estudios:
 - Título Profesional o Título Técnico o egresado del área de las Ciencias Biológicas, Bioquímicas, o área Silvoagropecuaria, impartida por una entidad de enseñanza superior reconocida por el Estado.
- Experiencia laboral:
 - Tener competencia técnica o experiencia laboral comprobable de al menos 6 meses, en un cargo de analista de laboratorios o en investigación, realizando labores de ejecución de técnicas microbiológicas como esterilización de material, preparación de medios de cultivo, entre otras.

Para todos los casos, si el título es obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.

El laboratorio previendo una eventual ausencia del personal 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.

A esta autorización podrán postular los terceros que deseen ejecutar directamente las labores relacionadas con el proceso de diagnóstico, debiendo cumplir con los siguientes requisitos específicos:

- El laboratorio debe contar con un sistema de gestión de calidad o aseguramiento de calidad implementado basado en buenas prácticas de laboratorio. En este sentido, debe contar con un manual de procedimientos que describan en forma detallada el proceso de análisis, el manejo de los controles, el manejo de las contramuestras, la preparación de las soluciones y la eliminación de residuos.
- Será responsabilidad del laboratorio mantener los respectivos registros asociados a los procesos descritos anteriormente, así como también de los registros metrológicos de cada uno de ellos cuando corresponda.

- El laboratorio también deberá contar con instructivos o procedimientos técnicos específicos para cada hongo o similar asociado al alcance de autorización, describiendo: el tipo de material vegetal a analizar, detallando la técnica y proceso de análisis a utilizar, la descripción taxonómica completa en español (a partir de la publicación original de los autores o de fuentes validadas por la comunidad científica internacional como la International Mycological Association, Commonwealth Mycological Institute, American Phytopathological Society, entre otros), incluyendo imágenes y/o ilustraciones del patógeno a identificar.

Estos instructivos o procedimientos técnicos de diagnóstico, deberán ser enviados para su evaluación como parte del proceso de verificación documental, los que podrán ser aceptados, sujetos a corrección o rechazados por el supervisor evaluador, basados en la referencia bibliográfica que ampare el procedimiento.

Es obligación y responsabilidad del laboratorio postulante, acceder y disponer de literatura y/o publicaciones, validada por la comunidad científica del área fitopatológica, de descripción morfológica, de síntomas y signos de enfermedades que causan los hongos y similares señalados en el alcance, así como también de los artículos científicos señalados como referencia en éste Instructivo.

Además de la literatura de referencia indicada en este instructivo, el laboratorio debe contar con literatura relacionada a técnicas de laboratorio enfocado al área fitopatológica y microbiológica, teniendo como base las normas establecidas de acuerdo a las buenas prácticas de laboratorio.

La disponibilidad de literatura, así como también de su pertinencia, será evaluada como parte del proceso de postulación, durante la visita de verificación y posteriores supervisiones.

4.4 MEDIOS DE VERIFICACIÓN DE REQUISITOS.

De acuerdo a lo dispuesto en el Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos, los interesados en autorizarse para realizar el diagnóstico de hongos y similares, en material de propagación de exportación, deben presentar junto a la solicitud de autorización (F-GF-CGP-PT-068), los antecedentes 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 autorización de laboratorios de análisis/ensayos.
2. Croquis o plano 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. Registros o certificados de calibración o verificación de los equipos, según corresponda.
6. Formulario anexo para postular al diagnóstico de hongos y similares en semilleros de exportación, código, F-GF-CGP-PT-209 del presente en el presente instructivo.
7. Formulario de identificación del responsable técnico, según formato establecido en el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos (F-GF-CGP-PT-069).
8. Certificado de título del responsable técnico identificado en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
9. Formulario de identificación del personal que se desempeña como analista y personal de apoyo, según formato adjunto (F-GF-CGP-PT-210).

10. Certificado de título y/o de egreso de los/las analistas y especialista/s micológicos identificados en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
11. Documentos que acrediten la competencia o experiencia del todo el personal en el área de fitopatología y técnicas moleculares.
12. Currículo del Responsable Técnico, analistas y personal de apoyo, involucrados en el alcance de autorización.
13. Manual de Procedimiento General del Laboratorio e Instructivos Técnicos para cada hongo y/o similar asociado a la familia hospedante que se solicite autorizar.

Sin perjuicio de lo anterior, 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.

4.5 CAPACIDAD ANALÍTICA DEL LABORATORIO

El Laboratorio una vez autorizado y con los antecedentes recopilados por el encargado supervisor SAG, en base a la capacidad de los equipos, del personal disponible, entre otros, será notificado de la capacidad analítica máxima que posee, es decir, el número de muestras que puede recibir semanalmente y que es capaz de analizar sin mermar la confiabilidad de los diagnósticos y los tiempos de respuesta.

Sin perjuicio de lo anterior, el laboratorio una vez autorizado podrá solicitar al Servicio la posibilidad de modificar su capacidad analítica enviando una carta al Servicio, mediante la cual explique los motivos de la solicitud y adjunte los antecedentes técnicos que den cuenta de la nueva capacidad.

5. ASPECTOS GENERALES DEL ANÁLISIS

5.1 CONDICIONES PREVIAS

Cada laboratorio autorizado deberá suscribir con los productores un acuerdo previo, para la realización de los análisis, mediante la firma simple del formulario "Declaración jurada para la designación del laboratorio autorizado" (F-GF-CGP-PT-206). Copia de este acuerdo debe enviarse en forma electrónica, al correo electrónico exportaciones.mapro@sag.gob.cl, dirigido al Subdepartamento de Requisitos Fitosanitarios de Exportación, Unidad que publicará en intranet el listado actualizado de laboratorios.

Además, cada laboratorio autorizado deberá designar una empresa de transporte de encomiendas o Courier para el traslado de las muestras tomadas el SAG, lo cual debe ser informado al Subdepartamento de Requisitos Fitosanitarios de Exportación, al correo electrónico exportaciones.mapro@sag.gob.cl, mediante el formulario "Empresa(s) de transporte de encomiendas o Courier en convenio" (F-GF-CGP-PT-208) para su publicación en la Intranet del Servicio.

5.2 CAPTACIÓN Y TRASLADO DE LAS MUESTRAS

El muestreo será realizado de acuerdo lo establecido en el Procedimiento "Certificación Fitosanitaria de Productos Agrícolas y Forestales de Exportación" P-CER-CER-PA-001, por lo tanto, no es una actividad de competencia de los laboratorios autorizados en esta especialidad

Las muestras, previo a su envío, deben ser ingresadas por el/la inspector SAG al Sistema de Información de Sanidad Vegetal (SISVEG) u otro sistema informático que el SAG determine, y el código de barra que se genera, se adjuntará a cada muestra.

El despacho de la(s) muestra(s), será de responsabilidad del funcionario de la oficina SAG sectorial a cargo del muestreo. Sin perjuicio de lo anterior, el establecimiento podrá utilizar los servicios de una empresa de transporte de encomiendas o courier, con costo al Laboratorio autorizado, reconocida a nivel nacional y establecida legalmente y que garantice el envío en el tiempo y las condiciones de temperatura adecuadas (mantención de cadena de frío de ser necesario), según los requerimientos específicos de las muestras.

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 (de acuerdo a documento según formato establecido en el formulario F-GF-CGP-PT-208 sistema de envío de muestras de este instructivo), en caso de existir un convenio entre el laboratorio autorizado y una empresa de transporte de encomiendas.
- 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 obligatoriedad por parte del laboratorio, recepcionar la(s) muestra(s).

5.3 RECEPCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA/CONTRAMUESTRA

5.3.1 Recepción de la muestra

El SAG incorporará como usuario del Sistema de Información de Sanidad Vegetal (SISVEG) o en otro sistema informático que el SAG determine, al laboratorio autorizado y le proporcionará los nombres de usuarios y las contraseñas correspondientes para la correcta gestión de la recepción y seguimiento de las muestras, ingreso y autorización de los diagnósticos.

El laboratorio autorizado deberá informar por correo electrónico al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, la recepción de muestras asociadas al alcance de la autorización ante el SAG. Este aviso deberá ser realizado el mismo día de recepción de las muestras, utilizando un documento según formato establecido en el formulario F-GF-CGP-PT-207 de recepción de muestras.

Las muestras deben ser recibidas en el Laboratorio Autorizado acompañadas de un documento que contenga como mínimo, la siguiente información:

- Nombre del establecimiento
- Detalle de los Folios SISVEG
- Oficina SAG que realizó el muestreo y fecha del muestreo

El responsable técnico del laboratorio deberá verificar, adicionalmente, la aptitud de la muestra para el análisis, considerándose como muestra apta, aquella que no presenta signos evidentes de haber sido tratada con algún tipo de producto químico, que viene en condiciones adecuadas de hidratación, fue tomada en el estado fenológico adecuado, además de corresponder al tipo y

tamaño de muestra determinado en los procedimientos establecidos por el servicio. 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 u otro) y de manera simultánea, tanto a la Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra (inspector muestreador), como al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio. En este documento se deberá indicar el problema, identificando el N° de Folio del Protocolo, el o los números correlativos de las muestras (esto dentro de un plazo máximo de 2 días 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 lo anterior y considerado que la(s) muestra(s) es(son) apta(s) para análisis, debe aceptarla(s) ingresándola(s) al sistema SISVEG en el módulo laboratorio/recepción de muestras. El plazo para recepcionar la muestra en el sistema no debe superar los 2 días, contados desde la fecha de muestreo.

La muestra debe ser analizada en búsqueda de los síntomas y/o signos característicos de la enfermedad a analizar, los cuales se encuentran descritos en el "Manual de Reconocimiento de Enfermedades causados por hongos y similares en Material de Propagación de Exportación".

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 $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.3.2 Manejo de contramuestras

El laboratorio deberá mantener como contramuestras, planta o parte de esta y/o semillas según corresponda, 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 .

5.4 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:

5.4.1 Procedimiento General en Plantas

5.4.1.1 Aptitud de la muestra, observación directa de síntomas y/o signos

- a) Al recibir una muestra, deberá realizarse una inspección visual general de esta, estableciéndose inicialmente si esta cumple o no con el tipo de muestra necesario para el análisis respectivo (planta completa, follaje u otro).

- b) Posteriormente, la muestra se examina mediante lupa estereoscópica, en búsqueda de síntomas y/o signos característicos del o los patógenos solicitados en la orden de análisis respectiva;
- c) De no observarse síntomas de la enfermedad y/o signos (esporulación, micelio, cuerpos fructíferos u otro) característicos del patógeno, se considerará el diagnóstico como negativo. De lo contrario, continuar con el siguiente paso;
- d) Si en el tejido vegetal se observan síntomas, se procede a realizar aislamientos a partir de la zona de avance de manchas asociadas a la enfermedad, tal como se señala en la letra j), así como también, de observarse signos de alguno de los patógenos solicitados, se puede aislar en forma directa el patógeno efectuando un repique con una aguja desinfectada, transfiriendo estructuras fúngicas al centro de cada placa con medio de cultivo PDA (2 placas como mínimo).
- e) En forma paralela al punto anterior, se realiza una preparación microscópica para la caracterización morfológica de las estructuras fúngicas, que permitan la identificación del o los patógenos solicitados, de acuerdo a la descripción taxonómica citada y validada a nivel científico;
- f) De no ser posible realizar la identificación del patógeno en forma directa en el tejido vegetal, el análisis se realiza a partir de los aislados obtenidos de los repiques efectuados en medios de cultivo;
- g) Para cumplir con los puntos b, c y d, podrá tomarse como referencia lo descrito en el "Manual de reconocimiento de síntomas/signos de enfermedades en semilleros de exportación" y la(s) clave(s) de descripción morfológica del o los patógeno(s) solicitado(s), así como también, publicaciones nacionales e internacionales especializadas en el tema.
- h) Si la observación de síntomas y/o signos no es suficiente para un diagnóstico final del o los patógenos solicitados, de ser necesario, la muestra se lava con agua corriente para eliminar restos de suelo o sustrato (principalmente de la zona del cuello y raíces, si corresponde).
- i) La muestra ya limpia, se troza separando la parte aérea del cuello y las raíces de la planta, se deposita dentro de una o varias cámaras húmedas siguiendo el procedimiento estándar de método de cámara.
- j) Posteriormente, si el procedimiento específico de análisis para el/los patógenos solicitados lo indica, se extraen trozos de tejido de 1-1,5 cm² de la zona de avance de la lesión y/o de raíces con o sin síntomas, los que se depositan en uno o varios vasos de precipitado identificados, siguiendo el procedimiento estándar de método de siembra en medios de cultivo.

5.4.1.2 Cámara húmeda

Los laboratorios podrán presentar para la evaluación por parte del Servicio, el procedimiento interno que utilizan para el normar el uso de la cámara húmeda, y en caso que sea necesario, deberán realizar los ajustes solicitados por el SAG.

5.4.1.3 Siembra en medios de cultivos general y/o específico (selectivo)

Los laboratorios podrán presentar para la evaluación por parte del Servicio, el procedimiento interno que utilizan para realizar la siembra en medios de cultivos, y en caso que sea necesario, deberán realizar los ajustes solicitados por el SAG.

5.4.2 Procedimiento General en Semillas

Si bien el alcance de este instructivo técnico se encuentra asociado a la ejecución de análisis y ensayos para el diagnóstico de hongos y similares en material vegetal en crecimiento activo, también debe considerarse la realización de análisis en semillas en aquellos casos en los que así está establecido en este instructivo o en aquellos casos excepcionales, donde por diversos motivos no fuese posible enviar muestra vegetal para análisis. Para esto, el funcionario inspector encargado

de ese semillero, previo a la toma de muestra, deberá consultar y enviar la respectiva solicitud de análisis en semilla vía correo electrónico al laboratorio autorizado con copia al supervisor SAG de ese laboratorio, siendo éste último el encargado de autorizar o rechazar dicha solicitud.

La cantidad de semillas a enviar a análisis estará asociado a un peso máximo de lote y especie vegetal, tal como lo establece la tabla 2A de "Pesos de Lote y muestras" del Anexo del Capítulo 2 del International Rules for Seed Testing del International Seed Testing Association (ISTA).

La cantidad de muestra enviada, deberá ser suficiente para el análisis micológico a realizar en el laboratorio, así como también, para conservar una cantidad de a lo menos el mismo tamaño de la muestra analizada, la cual podrá ser solicitada como contramuestra dentro del proceso de supervisión del laboratorio autorizado por parte del supervisor SAG respectivo.

La muestra de semillas a analizar deberá prescindir de tratamiento alguno, de lo contrario el análisis no podrá realizarse.

Los procedimientos de análisis, deberán basarse en las metodologías validadas por ISTA u otra asociación reconocida o aceptada por ésta, como, por ejemplo:

5.4.2.1 Observación Macroscópica

Los laboratorios podrán presentar para la evaluación por parte del Servicio, el procedimiento interno que utilizan para realizar la observación macroscópica, y en caso que sea necesario, deberán realizar los ajustes solicitados por el SAG.

5.4.2.2 Método Blotter

Los laboratorios podrán presentar para la evaluación por parte del Servicio, el procedimiento interno que utilizan para realizar el método Blotter, y en caso que sea necesario, deberán realizar los ajustes solicitados por el SAG.

5.4.2.3 Siembra en medios de cultivo general y/o específico (selectivo)

Los laboratorios podrán presentar para la evaluación por parte del Servicio, el procedimiento interno que utilizan para realizar la siembra en medios de cultivo, y en caso que sea necesario, deberán realizar los ajustes solicitados por el SAG.

5.4.2.4 Método de Lavado (Sedimentación)

Los laboratorios podrán presentar para la evaluación por parte del Servicio, el procedimiento interno que utilizan para realizar el método de lavado, y en caso que sea necesario, deberán realizar los ajustes solicitados por el SAG.

5.4.3 Detección Mediante Técnica 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 similares que requieran de esta metodología y que son detallados en el procedimiento específico de cada patógeno.

5.4.3.1 Extracción de ADN

a) Estructuras fúngicas (micelio, cuerpos fructíferos u otros)

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

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 en este tipo de microorganismos, en el Anexo 3 se detalla el procedimiento sugerido para realizar la extracción de ADN.

b) Semillas

Cuando el procedimiento lo indique, se deberá extraer ADN a partir de semillas para la detección de hongos o similares, utilizando el kit de extracción y purificación de ADN DNeasy Plant Mini kit, de la marca Qiagen.

5.4.3.2 Amplificación mediante partidores específicos.

El procedimiento se basa en:

- 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 detalladas.
- 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.

5.4.3.3 Electroforesis

Se debe cargar un volumen de 10 μ L de cada muestra (mezclado con buffer de carga) en gel de agarosa al 1.5% en Buffer TAE o TBE al 1X (teñido con Bromuro de etidio u otra tinción de ADN, por ej. Gel Red). 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 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 el anexo 5 de este instructivo).

El gel se corre en buffer TAE o TBE al 1X por un tiempo que permita una buena resolución o separación de la(s) bandas (aprox. 40-80 minutos a 80V).

5.4.3.4 Digestión enzimática (RFLP)

Para la diferenciación de especies dentro de un grupo de individuos, se recurre a la metodología PCR-RFLP, mediante la cual se amplifica un fragmento específico del ADN para ese grupo (género en este caso), el cual 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).

5.4.3.5 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 y documento impreso en forma clara y ordenada (en archivador de Informes Fitosanitarios), de acuerdo al formato señalado en el Anexo 4 de este instructivo.

5.4.4 Procedimiento Específico

El laboratorio postulante, deberá enviar un manual de procedimiento de análisis específico para cada hongo o similar asociado al alcance de su postulación. En este manual, deberá describir en forma detallada cada uno de las etapas involucradas en el análisis (señalado en el punto 4.3), considerando además de lo señalado en el procedimiento general, las condiciones específicas (si las tuviere) para cada patógeno en forma individual.

a) Análisis en Planta

Tanto el tipo de muestra, como el procedimiento de análisis a utilizar, se detallan en las tablas 1, 2 y 3 para el diagnóstico de cada uno de los patógenos asociados al listado de hongos y similares en semilleros de exportación:

Tabla N° 2. Tejido a analizar para cada hongo y/o similar solicitado en muestras de plantas.

Hongo/Similar	Tejido a Analizar
<i>Albugo candida</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Alternaria alternata</i> ; <i>A. brassicae</i> ; <i>A. brassicicola</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Alternaria dauci</i>	Follaje (hojas, tallos)
<i>Alternaria radicina</i>	Raíces
<i>Alternaria triticina</i>	Follaje (hojas, tallos) e inflorescencia
<i>Ascochyta fabae</i> ; <i>A. pinodes</i> ; <i>A. pisi</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Botrytis aclada</i> (= <i>Botrytis allii</i>); <i>B. byssoidea</i> ; <i>B. cinerea</i> ; <i>B. squamosa</i>	Follaje (Hojas, tallo) y frutos o bulbo si posee
<i>Bremia lactucae</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Cephalosporium maydis</i>	Raíces y Mazorca si posee
<i>Cercospora beticola</i> ; <i>C. carotae</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Chalara elegans</i>	Raíces
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Colletotrichum circinans</i>	Raíces y bulbo si posee
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Raíces y fruto si posee
<i>Colletotrichum graminicola</i> ; <i>C. lindemuthianum</i>	Follaje (hojas, tallos)
<i>Didymella bryoniae</i> (= <i>Mycosphaerella melonis</i>)	Follaje (hojas, tallos, cuello) y fruto si posee
<i>Fusarium avenaceum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. moniliforme</i> var. <i>intermedium</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>F. solani</i> ; <i>F. subglutinans</i> ; <i>F. verticillioides</i>	Raíces y cuello (fruto o mazorca si posee)
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> ;	Raíces y cuello

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE HONGOS Y SIMILARES EN SEMILLEROS DE EXPORTACIÓN

Código: D-GF-CGP-PT-045
Versión:02

<i>F. oxysporum</i> f.sp. radicle-lycopersici	
<i>Helminthosporium pedicellatum</i>	Raíces
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Raíces y cuello
<i>Marssonina panattoniana</i>	Follaje (hojas, tallos)
<i>Mycocentrospora acerina</i>	No (sólo en lote)
<i>Mycosphaerella brassicicola</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Peronospora destructor</i> ; <i>P. farinosa</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Phoma betae</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Phoma lingam</i> ; <i>P. medicaginis</i>	Follaje, cuello y fruto si posee
<i>Phytophthora capsici</i> ; <i>P. megasperma</i> ; <i>P. nicotianae</i> ; <i>P. sojae</i>	Raíces y cuello
<i>Phytophthora infestans</i>	Follaje (hojas, tallo y cuello)
<i>Plasmopara halstedii</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Plasmodiophora brassicae</i>	Raíces y cuello
<i>Puccinia allii</i> ; <i>P. helianthi</i> ; <i>P. sorghi</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Pyrenochaeta terrestres</i>	Raíces
<i>Pseudocercospora capsellae</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Raíces y cuello
<i>Rhizoctonia solani</i>	Raíces y cuello
<i>Sclerophthora macrospora</i>	Follaje
<i>Sclerotinia minor</i> ; <i>S. sclerotiorum</i>	Raíces, cuello y fruto si posee
<i>Sclerotium rolfsii</i> ; <i>S. cepivorum</i>	Raíces y cuello (fruto o bulbo si posee)
<i>Septoria apiicola</i> ; <i>S. nodorum</i> ; <i>S. petroselini</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Sphacelotheca reiliana</i>	Panoja y mazorca si posee
<i>Stemphyllium botryosum</i> ; <i>S. versicarium</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Urocystis agropyri</i> ; <i>U. cepulae</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Uromyces viciae-fabae</i> ; <i>U. beticola</i>	Follaje (hojas, tallos) y fruto si posee
<i>Ustilago maydis</i>	Mazorca
<i>Ustilago nuda</i>	Inflorescencia
<i>Verticillium albo-atrum</i> ; <i>V. dahliae</i>	Raíces y cuello

Tabla N° 3. Técnica específica de análisis de hongos y similares en plantas.

Hongo/Similar	Metodología de análisis	Procedimiento Asociado
<i>Albugo candida</i>	Observación Directa	5.4.1
<i>Alternaria alternata</i> ; <i>A. brassicae</i> ; <i>A. brassicicola</i> ; <i>A. dauci</i> ; <i>A. radicina</i> ; <i>A. triticina</i>	Observación Directa	5.4.1
<i>Ascochyta fabae</i> (= <i>Didymella fabae</i>); <i>A. pinodes</i> (= <i>D. pinodes</i>); <i>A. pisi</i>	Observación Directa	5.4.1
<i>Botrytis aclada</i> (= <i>Botrytis allii</i>); <i>B. byssoidea</i> ; <i>B. cinerea</i> ; <i>B. squamosa</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Bremia lactucae</i>	Observación Directa	5.4.1
<i>Cephalosporium maydis</i>	Cámara Húmeda y Cultivo en medios	5.4.1
<i>Cercospora beticola</i> ; <i>C. carotae</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO
DE HONGOS Y SIMILARES EN SEMILLEROS DE
EXPORTACIÓN**

Código: D-GF-CGP-PT-045
Versión:02

<i>Chalara elegans</i>	Cultivo en medios	5.4.1.1 y 5.4.1.3
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Colletotrichum circinans</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Cámara Húmeda y Cultivo en medios	5.4.1.1 y 5.4.1.3
<i>Colletotrichum graminicola</i> ; <i>C. lindemuthianum</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Didymella bryoniae</i> (= <i>Mycosphaerella melonis</i>)	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Fusarium avenaceum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. moniliforme</i> var. <i>intermedium</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>F. solani</i> ; <i>F. subglutinans</i> ; <i>F. verticillioides</i>	Cámara Húmeda y Cultivo en medios	5.4.1
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> ; <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Cultivo en medios y PCR	5.4.1 y 5.4.3
<i>Helminthosporium pedicellatum</i>	Cámara Húmeda y Cultivo en medios	5.4.1
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Cultivo en medios	5.4.1.1 y 5.4.1.3
<i>Marssonina panattoniana</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Mycocentrospora acerina</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Mycosphaerella brassicicola</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Peronospora destructor</i> ; <i>P. farinosa</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Phoma betae</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Phoma lingam</i> (= <i>Leptosphaeria maculans</i>); <i>P. medicaginis</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Phytophthora capsici</i> ; <i>P. nicotianae</i>	Cámara Húmeda, Cultivo en medios y PCR	5.4.1 y 5.4.3
<i>Phytophthora megasperma</i> ; <i>P. sojae</i>	Cámara Húmeda, Cultivo en medios y PCR-RFLP	5.4.1 y 5.5.3.4
<i>Phytophthora infestans</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Plasmopara halstedii</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Plasmodiophora brassicae</i>	Observación Directa	5.4.1
<i>Puccinia allii</i> ; <i>P. helianthi</i> ; <i>P. sorghi</i>	Observación Directa	5.4.1
<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	Cultivo en medios	5.4.1.1 y 5.4.1.3
<i>Pseudocercospora capsellae</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Cultivo en medios y PCR	5.4.1 y 5.4.3

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE HONGOS Y SIMILARES EN SEMILLEROS DE EXPORTACIÓN

Código: D-GF-CGP-PT-045
Versión:02

<i>Rhizoctonia solani</i>	Cultivo en medios	5.4.1.1 y 5.4.1.3
<i>Sclerophthora macrospora</i>	Observación Directa	5.4.1
<i>Sclerotinia minor</i> ; <i>S. sclerotiorum</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Sclerotium rolfsii</i> ; <i>S. cepivorum</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Septoria apiicola</i> ; <i>S. nodorum</i> ; <i>S. petroselini</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Sphacelotheca reiliana</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Stemphyllium botryosum</i> ; <i>S. versicarium</i>	Observación Directa y Cámara Húmeda	5.4.1
<i>Urocystis agropyri</i> ; <i>U. cepulae</i>	Observación Directa	5.4.1
<i>Uromyces viciae-fabae</i> ; <i>U. beticola</i>	Observación Directa	5.4.1
<i>Ustilago maydis</i> ; <i>U. nuda</i> ; <i>U. tritici</i>	Observación Directa	5.4.1
<i>Verticillium albo-atrum</i> ; <i>V. dahliae</i>	Cultivo en medios y PCR	5.4.1 y 5.4.3

Tabla N° 4. Metodología de diagnóstico para análisis de hongos y similares en plantas.

Hongo/Similar	Metodología de diagnóstico
<i>Albugo candida</i>	Identificación morfológica
<i>Alternaria alternata</i> ; <i>A. brassicae</i> ; <i>A. brassicicola</i> ; <i>A. dauci</i> ; <i>A. radicina</i> ; <i>A. triticina</i>	Identificación morfológica
<i>Ascochyta fabae</i> (= <i>Didymella fabae</i>); <i>A. pinodes</i> (= <i>D. pinodes</i>); <i>A. pisi</i>	Identificación morfológica
<i>Botrytis aclada</i> (= <i>Botrytis allii</i>); <i>B. byssoidea</i> ; <i>B. cinerea</i> ; <i>B. squamosa</i>	Identificación morfológica
<i>Bremia lactucae</i>	Identificación morfológica
<i>Cephalosporium maydis</i>	Identificación morfológica
<i>Cercospora beticola</i> ; <i>C. carotae</i>	Identificación morfológica
<i>Chalara elegans</i>	Identificación morfológica
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Identificación morfológica
<i>Colletotrichum circinans</i>	Identificación morfológica
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Identificación morfológica y PCR
<i>Colletotrichum graminicola</i> ; <i>C. lindemuthianum</i>	Identificación morfológica
<i>Didymella bryoniae</i> (= <i>Mycosphaerella melonis</i>)	Identificación morfológica
<i>Fusarium avenaceum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. moniliforme</i> var. <i>intermedium</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>F. solani</i> ; <i>F. subglutinans</i> ; <i>F. verticillioides</i>	Identificación morfológica
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> ; <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Identificación morfológica y PCR
<i>Helminthosporium pedicellatum</i>	Identificación morfológica
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Identificación morfológica

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO
DE HONGOS Y SIMILARES EN SEMILLEROS DE
EXPORTACIÓN**

Código: D-GF-CGP-PT-045
Versión:02

<i>Marssonina panattoniana</i>	Identificación morfológica
<i>Mycocentrospora acerina</i>	Identificación morfológica
<i>Mycosphaerella brassicicola</i>	Identificación morfológica
<i>Peronospora destructor</i> ; <i>P. farinosa</i>	Identificación morfológica
<i>Phoma betae</i>	Identificación morfológica
<i>Phoma lingam</i> ; <i>P. medicaginis</i>	Identificación morfológica
<i>Phytophthora capsici</i> ; <i>P. nicotianae</i>	Identificación morfológica y PCR
<i>P. megasperma</i> ; <i>P. sojae</i>	Identificación morfológica y PCR-RFLP
<i>Phytophthora infestans</i>	Identificación morfológica
<i>Plasmopara halstedii</i>	Identificación morfológica
<i>Plasmodiophora brassicae</i>	Sintomatología
<i>Puccinia allii</i> ; <i>P. helianthi</i> ; <i>P. sorghi</i>	Identificación morfológica
<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	Identificación morfológica
<i>Pseudocercospora capsellae</i>	Identificación morfológica
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Identificación morfológica y PCR
<i>Rhizoctonia solani</i>	Identificación morfológica
<i>Sclerophthora macrospora</i>	Sintomatología
<i>Sclerotinia minor</i> ; <i>S. sclerotiorum</i>	Identificación morfológica
<i>Sclerotium rolfsii</i> ; <i>S. cepivorum</i>	Identificación morfológica
<i>Septoria apiicola</i> ; <i>S. nodorum</i> ; <i>S. petroselini</i>	Identificación morfológica
<i>Sphacelotheca reiliana</i>	Identificación morfológica
<i>Stemphyllium botryosum</i> ; <i>S. versicarium</i>	Identificación morfológica
<i>Urocystis agropyri</i> ; <i>U. cepulae</i>	Identificación morfológica
<i>Uromyces viciae-fabae</i> ; <i>U. beticola</i>	Identificación morfológica
<i>Ustilago maydis</i> ; <i>U. nuda</i> ; <i>U. tritici</i>	Identificación morfológica
<i>Verticillium albo-atrum</i> ; <i>V. dahliae</i>	Identificación morfológica y PCR

b) Análisis en Semillas (casos excepcionales señalado en numeral 5.5.2)

A continuación, se detalla la metodología de análisis y diagnóstico de cada uno de los patógenos asociados al listado de hongos y similares en semilleros de exportación en semillas:

Tabla N° 5. Técnica específica de análisis de hongos y similares en semillas.

Hongo/Similar	Metodología de análisis	Procedimiento Asociado
<i>Alternaria alternata</i> ; <i>A. brassicae</i> ; <i>A. brassicicola</i> ; <i>A. dauci</i> ; <i>A. radicina</i> ; <i>A. triticina</i>	Blotter y/o Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y/o 5.4.2.2.2
<i>Ascochyta fabae</i> (= <i>Didymella fabae</i>); <i>A. pinodes</i> (= <i>D. pinodes</i>); <i>A. pisi</i>	Cultivo en medios	5.4.2.2.2
<i>Botrytis aclada</i> (= <i>Botrytis allii</i>); <i>B. byssoidea</i> ; <i>B. cinerea</i> ; <i>B. squamosa</i>	Blotter y/o Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y/o 5.4.2.2.2
<i>Cephalosporium maydis</i>	Blotter y/o Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y/o 5.4.2.2.2

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE HONGOS Y SIMILARES EN SEMILLEROS DE EXPORTACIÓN

Código: D-GF-CGP-PT-045
Versión:02

<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Blotter y/o Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y/o 5.4.2.2.2
<i>Colletotrichum circinans</i>	Blotter y/o Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y/o 5.4.2.2.2
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Blotter y/o Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y/o 5.4.2.2.2
<i>Colletotrichum graminicola</i> ; <i>C. lindemuthianum</i>	Blotter y/o Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y/o 5.4.2.2.2
<i>Didymella bryoniae</i> (= <i>Mycosphaerella melonis</i>)	Blotter y/o Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y/o 5.4.2.2.2
<i>Fusarium avenaceum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. moniliforme</i> var. <i>intermedium</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>F. solani</i> ; <i>F. subglutinans</i> ; <i>F. verticillioides</i>	Cultivo en medios	5.4.2.2.2
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> ; <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Cultivo en medios y PCR	5.4.2.2.2 y 5.4.3 a
<i>Helminthosporium pedicellatum</i>	Blotter y/o Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y/o 5.4.2.2.2
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Cultivo en medios	5.4.2.2.2
<i>Mycocentrospora acerina</i>	Blotter y Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y 5.4.2.2.2
<i>Phoma betae</i>	Blotter y/o Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y/o 5.4.2.2.2
<i>Phoma lingam</i> (= <i>Leptosphaeria maculans</i>); <i>P. medicaginis</i>	Blotter y/o Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y/o 5.4.2.2.2
<i>Plasmopara halstedii</i>	PCR	5.4.3 b
<i>Puccinia allii</i> ; <i>P. helianthi</i> ; <i>P. sorghi</i>	Método de Lavado	5.4.2.2.3
<i>Pseudocercospora capsellae</i>	Blotter y Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y 5.4.2.2.2
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Cultivo en medios	5.4.2.2.2
<i>Rhizoctonia solani</i>	Cultivo en medios	5.4.2.2.2
<i>Sclerotinia minor</i> ; <i>S. sclerotiorum</i>	Obs. directa y Cultivo en medios	5.4.2.1 y 5.4.2.2.2
<i>Sclerotium rolfsii</i> ; <i>S. cepivorum</i>	Obs. directa y Cultivo en medios	5.4.2.1 y 5.4.2.2.2
<i>Septoria apiicola</i> ; <i>S. nodorum</i> ; <i>S. petroselini</i>	Blotter y Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y 5.4.2.2.2
<i>Sphacelotheca reiliana</i>	Método de Lavado	5.4.2.2.3
<i>Stemphyllium botryosum</i> ; <i>S. versicarium</i>	Blotter y/o Cultivo en medios	5.4.2.2.1 y/o 5.4.2.2.2
<i>Urocystis agropyri</i> ; <i>U. cepulae</i>	Obs. Directa y Método de Lavado	5.4.2.1 y 5.4.2.2.3
<i>Uromyces viciae-fabae</i> ; <i>U. beticola</i>	Obs. Directa y Método de Lavado	5.4.2.1 y 5.4.2.2.3
<i>Ustilago maydis</i> ; <i>U. nuda</i> ; <i>U. tritici</i>	Obs. Directa y Método de Lavado	5.4.2.1 y 5.4.2.2.3

<i>Verticillium albo-atrum; V. dahliae</i>	Blotter y Cultivo en medios y PCR	5.4.2.2.1 y 5.4.2.2.2 y 5.4.3 a y/o b
--	-----------------------------------	---

Tabla N° 6. Metodología de diagnóstico para análisis de hongos y similares en semillas.

Hongo/Similar	Metodología de diagnóstico
<i>Alternaria alternata; A. brassicae; A. brassicicola; A. dauci; A. radicina; A. triticina</i>	Identificación morfológica
<i>Ascochyta fabae (=Didymella fabae); A. pinodes (=D. pinodes); A. pisi</i>	Identificación morfológica
<i>Botrytis aclada (=Botrytis allii); B. byssoidea; B. cinerea; B. squamosa</i>	Identificación morfológica
<i>Cephalosporium maydis</i>	Identificación morfológica
<i>Cercospora beticola; C. carotae</i>	Identificación morfológica
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Identificación morfológica
<i>Colletotrichum circinans</i>	Identificación morfológica
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Identificación morfológica y PCR
<i>Colletotrichum graminicola; C. lindemuthianum</i>	Identificación morfológica
<i>Didymella bryoniae (=Mycosphaerella melonis)</i>	Identificación morfológica
<i>Fusarium avenaceum; F. graminearum; F. moniliforme var. intermedium; F. oxysporum; F. solani; F. subglutinans; F. verticillioides</i>	Identificación morfológica
<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici; F. oxysporum f.sp. radices-lycopersici</i>	Identificación morfológica y PCR
<i>Helminthosporium pedicellatum</i>	Identificación morfológica
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Identificación morfológica
<i>Mycocentrospora acerina</i>	Identificación morfológica
<i>Phoma betae</i>	Identificación morfológica
<i>Phoma lingam; P. medicaginis</i>	Identificación morfológica
<i>Plasmopara halstedii</i>	Identificación morfológica y PCR
<i>Puccinia allii; P. helianthi; P. sorghi</i>	Identificación morfológica
<i>Pseudocercospora capsellae</i>	Identificación morfológica
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Identificación morfológica y PCR
<i>Rhizoctonia solani</i>	Identificación morfológica
<i>Sclerotinia minor; S. sclerotiorum</i>	Identificación morfológica
<i>Sclerotium rolfsii; S. cepivorum</i>	Identificación morfológica
<i>Septoria apiicola; S. nodorum; S. petroselini</i>	Identificación morfológica

<i>Sphacelotheca reiliana</i>	Identificación morfológica
<i>Stemphyllium botryosum; S. versicarium</i>	Identificación morfológica
<i>Urocystis agropyri; U. cepulae</i>	Identificación morfológica
<i>Uromyces viciae-fabae; U. beticola</i>	Identificación morfológica
<i>Ustilago maydis; U. nuda; U. tritici</i>	Identificación morfológica
<i>Verticillium albo-atrum; V. dahliae</i>	Identificación morfológica y PCR

5.5 METODOLOGÍA DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico final, se basa principalmente en las características de desarrollo de las colonias en cultivo y/o en tejido vegetal e identificación morfológica mediante microscopía del hongo o similar a detectar, tomando como referencia la descripción taxonómica efectuada por los autores responsables de su identificación.

En aquellos casos donde no es posible observar ni aislar el patógeno y tampoco existe una técnica de detección directa en el tejido, el diagnóstico será a partir de la observación de síntomas descritos en la literatura especializada (ej. *Plasmodiophora brassicae* y *Sclerophthora macrospora* en planta).

En casos en los que no es posible obtener un resultado final mediante microscopía, principalmente porque sus características morfológicas no permiten o dificultan su diferenciación con otras especies similares, el diagnóstico final se obtiene mediante análisis complementario de PCR (y/o sus variantes).

5.6 CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Se considerará un **diagnóstico positivo o negativo** al patógeno solicitado, de acuerdo a los resultados del análisis detallado en el procedimiento específico elaborado por el laboratorio autorizado.

Para aquellos casos que se requiera análisis molecular, se considerará un **diagnóstico positivo o negativo**, de acuerdo a los resultados obtenidos en una misma reacción y a los productos de PCR observados en una sola corrida de gel, de acuerdo a lo especificado en el anexo correspondiente a cada patógeno en particular.

5.7 VARIACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

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 descripción de la metodología específica respectiva. Sin perjuicio de lo anterior, una vez recibida la muestra por parte del laboratorio autorizado, este debe informar en forma escrita (vía correo electrónico, fax u otro) de esta situación, a la oficina SAG de origen de la muestra con copia al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio.

5.8 REGISTROS

El laboratorio debe mantener por al menos dos años los siguientes registros:

- Registro de temperatura para cada equipo de frío (considerar en el caso de los refrigeradores, al freezer como equipo separado).
- Registro de temperatura para cada equipo de incubación.
- Registro de verificación de termómetros.
- Registro de autoclavado, que considere temperaturas y tiempos.
- Registro control biológico de autoclave.
- Registro de verificación/mantenimiento de equipos.
- Registros de resultados de PCR (según formato tipo de anexos 4 y 5).

6 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 SISVEG, en un plazo mínimo de 7 días (en el caso de muestras que no presentaron desarrollo del patógeno solicitado) y máximo de 20 días corridos, 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 (vía correo electrónico, fax u otro), 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 (con su correspondiente correlativo) que fueron ingresados al sistema. Además, en forma semanal, el laboratorio deberá enviar en forma escrita (vía correo electrónico, fax u otro) al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, un informe actualizado con el estado de los análisis efectuados a las muestras, indicando el número de folio de protocolo y correlativo de la muestra, fecha de recepción, nombre del hospedero, patógeno analizado, resultado positivo/negativo/pendiente, fecha de respuesta (ingreso a SISVEG), fecha de informe fitosanitario final.

Cabe hacer presente, que el informe emitido por SISVEG no será un documento válido para la emisión del certificado de exportación fitosanitario.

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 a la Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra y 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 y/o planilla digital formato tipo Excel 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 un archivador con una copia firmada de los Informes Fitosanitarios de los resultados ingresados y autorizados en el sistema computacional SISVEG, junto a la orden de análisis y al registro fotodocumentado del análisis molecular si es que correspondiera (según formato tipo de anexos 4 y 5).

Todos los registros y documentos se deben conservar al menos durante los 2 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 autorización.

7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS

Como señala el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo, todo laboratorio autorizado será supervisado por el SAG, a través de la realización de inspecciones al laboratorio, al menos una visita al año. El Servicio podrá realizar auditorías adicionales cuando lo estime conveniente. La respuesta a las No Conformidades y Observaciones encontradas durante la visita de supervisión, deberán ser contestadas por el Laboratorio Autorizado, en un plazo no superior a 10 días hábiles desde la recepción del informe de supervisión emitido por el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias. La renovación de la autorización quedará supeditada a la emisión de un informe realizado por el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias, que indique que el Laboratorio Autorizado no posee No Conformidades que afectan el desempeño, conforme a las especificaciones contenidas en los Instructivos Técnicos y Reglamento Específico de Autorización.

El Encargado de Supervisión SAG del laboratorio autorizado, podrá solicitar a este último, en cualquier momento lo siguiente:

- El envío de contramuestras, ya sea tejido vegetal, semillas, cepas y/o ADN, para ser analizados oficialmente 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.
- Analizar un set de muestras, tanto positivas como negativas, para verificar la conducción del ensayo. Los resultados de este set de muestras deben coincidir en al menos un 90%, de no ser así, el laboratorio quedaría suspendido momentáneamente mientras se realiza un segundo set de muestras ciegas, el cual, dependiendo de sus resultados, puede levantar la suspensión momentánea o pasarla a definitiva si nuevamente los resultados de las muestras positivas no coinciden en al menos un 90%.

8 OBLIGACIONES

Sin perjuicio de las obligaciones estipuladas en el capítulo 7 del Reglamento específico de autorización de laboratorios de análisis/ensayos vigentes, el laboratorio autorizado deberá cumplir con lo siguiente:

- i. No podrá ejercer como laboratorio autorizado cuando el representante legal, socios, directores, accionistas, gerentes, responsable técnico o analistas tengan un interés directo con la actividad para la cual el laboratorio está postulando u otras que determine el Servicio.
- ii. Ante cualquier modificación de infraestructura, personal, procedimientos o equipamiento, el Laboratorio autorizado deberá solicitar su evaluación por escrito a la(el) Jefa(e) Departamento Transacciones Comerciales y Autorización de Terceros del SAG. Solamente una vez autorizada la modificación, ésta podrá ser realizada.

9 FORMULARIOS Y ANEXOS

F-GF-CGP-PT-209	Formulario anexo para postular al diagnóstico de hongos y similares en semilleros de exportación
F-GF-CGP-PT-210	Identificación de analistas y personal de apoyo vinculados al análisis
F-GF-CGP-PT-206	Declaración jurada para la designación del laboratorio autorizado
F-GF-CGP-PT-207	Inicio recepción muestras semilleros de exportación
F-GF-CGP-PT-208	Empresa de transporte de encomiendas o courier en convenio

Anexo 1	Partidores y condiciones específicas para análisis molecular
Anexo 2	Listado de Partidores Universales
Anexo 3	Protocolo de extracción de ADN recomendada
Anexo 4	Formulario tipo para registro de Fotodocumentación de geles
Anexo 5	Formato carga de gel de agarosa para electroforesis



FORMULARIO ANEXO PARA EL DIAGNÓSTICO DE HONGOS Y SIMILARES EN SEMILLEROS DE EXPORTACIÓN

Código: F-GF-CGP-PT-209
Versión:01

Identificación del laboratorio:

Nombre/razón social:

Cédula de identidad N°/RUT:

Marque con una "X" el hospedero al que postula:

Familia/Grupo Hospedante	
Aliaceae	
Apiaceae	
Asparagaceae	
Asteraceae	
Brassicaceae	
Chenopodaceae	
Cucurbitaceae	
Fabaceae	
Oleaginosas	
Poaceae	
Solanaceae	

Nota: el laboratorio deberá realizar el diagnóstico de la totalidad de los hongos y similares considerados para cada uno de ellos en el presente instructivo.

Nombre o representante legal
Laboratorio postulante

Fecha: _____



IDENTIFICACIÓN DE ANALISTAS Y PERSONAL DE APOYO VINCULADOS AL ANÁLISIS

Código: F-GF-CGP-PT-210
Versión:01

Identificación del ente autorizado:

Nombre/razón social:

Cédula de identidad N°/RUT:

Identificación de los analistas:

Nombre completo	Cédula Identidad	Técnica que ejecuta	Firma

Identificación del personal de apoyo:

Nombre completo	Cédula Identidad	Actividades que ejecuta	Firma

.....
Firma del postulante o su representante legal

Fecha recepción SAG:.....



DECLARACIÓN JURADA PARA LA DESIGNACIÓN DEL LABORATORIO AUTORIZADO

Código: F-GF-CGP-PT-206
Versión:01

Por el presente instrumento, declaro bajo juramento que todas las muestras vegetales, captadas por el SAG en el marco del proceso de certificación fitosanitaria de material de propagación de exportación que correspondan al alcance de los instructivos técnicos para el diagnóstico de plagas en material de propagación de exportación deberán ser enviadas al siguiente laboratorio autorizado:

1. IDENTIFICACIÓN DEL LABORATORIO

Disciplinas:	
Nombre o Razón social:	
Número y año de su resolución de autorización vigente:	
Dirección:	
Correo electrónico:	
Teléfono:	

2. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTOR

Razón Social Productor:	
Representante del Productor:	
Cédula de identidad N°:	
Nacionalidad:	
Domicilio:	
Comuna:	
Teléfono:	

Que ante una modificación en la designación del laboratorio autorizado, informaré al Servicio al correo electrónico exportaciones.mapro@sag.gob.cl, en un plazo no superior a 48 horas, el nombre del nuevo laboratorio autorizado al cual el Servicio deberá enviar las muestras.

Personal encargado empresa

Nombre o representante legal
laboratorio autorizado

Fecha recepción SAG:.....



INICIO DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE SEMILLEROS DE EXPORTACIÓN

Código: F-GF-CGP-PT-207
Versión:01

Logo Laboratorio Autorizado

INICIO RECEPCION MUESTRAS

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

ANTECEDENTES TERCERO AUTORIZADO (Emisor)

Nombre Laboratorio Autorizado	
Nombre Responsable Técnico Indicar nombre completo del responsable técnico, designado por el laboratorio autorizado.	
Dirección Oficina/ Comuna Indicar el lugar donde se mantendrán/ analizarán las muestras y los registros documentales de las actividades que el laboratorio autorizado desarrollará.	
Correo electrónico	
Teléfono (s) (fijo/ móvil)	

ANTECEDENTES SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (Uso exclusivo SAG)

Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias – UNIDAD VIROLOGÍA			
Nombre Funcionario Receptor Funcionario SAG que recibe este documento			
Firma Funcionario Receptor		Fecha Recepción	


ANTECEDENTES RECEPCION MUESTRAS

Informo a Ud. que a partir de _____(indicar fecha) se han empezado a recepcionar muestras para el diagnóstico de hongos y similares fitopatógenos en semilleros de exportación, correspondientes a temporada_____/_____, de acuerdo al siguiente detalle:

N° Protocolo	N° de Folio	Región	Comuna	Oficina SAG que envía Muestra	

Nombre responsable técnico
laboratorio autorizado

Firma responsable técnico
laboratorio autorizado

	IDENTIFICACIÓN EMPRESA DE TRANSPORTE DE ENCOMIENDAS O COURIER	Código: F-GF-CGP-PT-208 Versión:01
--	--	---------------------------------------

Logo Laboratorio Autorizado

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

ANTECEDENTES TERCERO AUTORIZADO (Emisor)	
Nombre Laboratorio Autorizado	
Nombre Responsable Técnico Indicar nombre completo del responsable técnico, designado por el laboratorio autorizado.	
Dirección Oficina/Comuna Indicar el lugar donde se mantendrán/ analizarán las muestras y los registros documentales de las actividades que el laboratorio autorizado desarrollará.	
Fax	
Teléfono (fijo/móvil)	

Empresa de courier a utilizar	
Nº de cuenta a utilizar	

Nombre responsable técnico
laboratorio autorizado

Firma responsable técnico
laboratorio autorizado

ANEXO 1 PARTIDORES Y CONDICIONES ESPECÍFICAS PARA ANÁLISIS MOLECULAR

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

Especie a detectar	Nombre Partidor	Referencia
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Cc1F1	Cullen et al., 2002
	Cc2R1	
	CcNF1	
	CcNR1	
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	unif	Hirano Y. y Arie T., 2006
	unir	
	Sp13f	
	Sp13r	
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>	unif	
	unir	
	sprlf	
	sprlr	
<i>Phytophthora capsici</i>	CAPFW	Silvar et al., 2005
	CAPRV2	
<i>Phytophthora megasperma</i>	ITS4	Cooke et al., 2000
	ITS6	
<i>Phytophthora nicotianiae</i>	PNIC1	Grote et al., 2002
	PNIC2	
<i>Phytophthora sojae</i>	ITS4	Cooke et al., 2000
	ITS6	
<i>Plasmopara halstedii</i>	PHAL-F	Ioos et al., 2007; EPPO, 2014
	PHAL-R	

ANEXO 1 PARTIDORES Y CONDICIONES ESPECÍFICAS PARA ANÁLISIS MOLECULAR

Especie a detectar	Nombre Partidor	Referencia
<i>Verticillium albo-atrum</i>	2	Carder et al., 1994; EPPO, 2007
	3	
	Vaf	Nazar et al., 1991; Robb et al., 1993
	Var	
<i>Verticillium dahliae</i>	19	Carder et al., 1994; EPPO, 2007
	22	
	Vdf	Nazar et al., 1991; Robb et al., 1993
	Vdr	

Se considerará un **diagnóstico positivo** cuando colonias sospechosas del hongo o similar solicitado desarrolladas en el medio de cultivo, se analizan mediante técnica molecular de PCR y producto de este análisis se observa la(s) banda(s) de amplificación específica(s), según sea el caso para la técnica molecular utilizada (PCR primer específico o PCR-RFLP) y descrita por los autores de referencia.

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** si no hay desarrollo de colonias sospechosas del hongo o similar solicitado, en ninguna de las placas de medio de cultivo, o bien, si a partir de algún aislado sospechoso que se analiza mediante técnica molecular 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 o no se obtiene el patrón de digestión específico para el caso de la técnica PCR-RFLP.

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 propuestos (anexo 2) u otros a validar, 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.

Si el laboratorio lo considera necesario, los resultados obtenidos los puede complementar con análisis de secuencias de ADN de diferentes loci señalados en la literatura científica, además de los partidores específicos utilizados.

ANEXO 2
LISTADO DE PARTIDORES UNIVERSALES

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Referencia
ITS1 (Forward)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al., 1990
ITS2 (Reverse)	GAA GGT GAA GTC GTA ACA AGG	
ITS4 (Reverse)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
ITS5 (Forward)	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	
NS1 (Forward)	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	
NS2 (Reverse)	GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC	
NS4 (Reverse)	CTT CCG TCA ATT CCT TTA A	

ANEXO 3

PROCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN RECOMENDADA

- 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 termoregulado) 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 $\pm 1^{\circ}\text{C}$

ANEXO 4

FORMULARIO TIPO 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:

ANEXO 5 FORMATO CARGA DE GEL DE ARAGOSA PARA ELECTROFORESIS

