



# INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNOSTICO DE FORMAS ESPECIALES DE *FUSARIUM OXYSPORUM* EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACION

## Tabla de Contenidos

| <u>Contenido</u>   | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| 1 OBJETIVOS Y ALCANCE .....  | 2             |
| 2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS .....                            | 2             |
| 3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS .....                                      | 2             |
| 4 REQUISITOS .....   | 3             |
| 4.1 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos. .... | 3             |
| 4.1.1 Requisitos de Infraestructura .....                                | 3             |
| 4.1.2 Requisitos de Equipamiento .....                                   | 3             |
| 4.1.3 Requisitos de Materiales y Reactivos .....                         | 3             |
| 4.2 Requisitos de personal .....   | 3             |
| 4.3 Requisitos Específicos. ....   | 4             |
| 4.4 Medios de verificación de requisitos. ....                           | 4             |
| 5 ANÁLISIS/ENSAYO .....  | 4             |
| 5.1 Captación y envío de la muestra. ....                                | 4             |
| 5.2 Recepción y manejo de la muestra/contramuestra .....                 | 4             |
| 5.3 Metodología. ....  | 5             |
| 5.4 Cálculo y Expresión de Resultados .....                              | 5             |
| 6 REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS .....                               | 6             |
| 7 ANEXOS .....   | 7             |



## 1 OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo de este documento es establecer los requisitos que deberán cumplir los interesados que voluntariamente postulen ante el SAG para ser laboratorios acreditados en la ejecución de análisis de diagnóstico de formas especiales de *Fusarium oxysporum* en material de propagación de exportación. Asimismo entrega las directrices para que estos laboratorios, una vez acreditados, realicen estos análisis.

El laboratorio interesado en obtener la acreditación, podrá postular a los siguientes análisis de diagnóstico según cultivo:

| Forma Especial                    | Tipo de cultivo |
|-----------------------------------|-----------------|
| Lycopersici y radicis-lycopersici | Tomate          |
| Fragariae                         | Frutilla        |

## 2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- BOOTH, C. 1971 The Genus *Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureaux. 237p.
- COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE 1983 Plant Pathologist's Pocketbook. Second Edition. Commonwealth Agricultural Bureaux. 439p.
- MATHUR, S.B.; KONGSDAL, O. 2003 Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi. International Seed Testing Association. 425p.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA PESCA Y ALIMENTACION 1991 Manual de Laboratorio. Diagnóstico de Hongos, Bacterias y Nemátodos fitopatógenos. España. 472p.
- NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. 1983 *Fusarium* Species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University. 266p.
- SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO 2004 Reglamento General del Sistema Nacional de Acreditación.
- SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO 2004 Reglamento Específico para la Acreditación de Laboratorios de Análisis/Ensayos.
- SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO 2004 Protocolo para la Determinación de Formas Especiales de *Fusarium oxysporum* en Semilleros de Exportación de Tomate.
- SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO 2004 Protocolo para la Determinación de *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae* en Plantas de Exportación de Frutilla.
- WALLER, J.M.; LENNE, J.M.; WALLER, S.J. 2002 Plant Pathologist's Pocketbook. 3<sup>rd</sup> Edition. CAB International. 516p.

## 3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

No aplica.



## 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.

El laboratorio debe contar al menos con salas separadas de preparación de muestras, lavado y esterilización, amplificación y electroforesis.

Debe existir una separación efectiva entre las áreas vecinas 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.

#### 4.1.2 **Requisitos de Equipamiento**

El laboratorio debe contar con los equipos necesarios que garanticen el correcto desarrollo de la metodología de análisis a realizar.

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

- Microscopio
- Microscopio estereoscópico
- Autoclave
- Cámara flujo laminar
- Balanza
- Estufa de incubación y de esterilización
- Conservadora de muestras a 4°C?1°C
- Campana de extracción de gases
- Centrífuga
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Sistema de fotodocumentación

#### 4.1.3 **Requisitos de Materiales y Reactivos**

El laboratorio debe contar con los materiales y reactivos necesarios que garanticen el correcto desarrollo de la metodología de análisis a realizar.

### 4.2 Requisitos de personal

El laboratorio debe contar con analistas en número adecuado de acuerdo al número de análisis y diagnósticos a realizar, los cuales deben cumplir el siguiente perfil:

Contar con título profesional ó técnico correspondiente a una carrera del área biológica o afín, de al menos seis semestres académicos de duración, otorgado por alguna Institución de Educación Superior chilena reconocida por el Estado o, en caso de título extranjero, revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.



Tener competencia técnica ó experiencia laboral comprobable en laboratorio de fitopatología y técnicas moleculares.

#### **4.3 Requisitos Específicos.**

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

El laboratorio debe contar con un manual de procedimiento, el cual, además de considerar la metodología indicada en el punto 5.3, debe describir en forma detallada el proceso de análisis, el manejo de las cepas control y el manejo de las contramuestras.

#### **4.4 Medios de verificación de requisitos.**

El laboratorio postulante debe adjuntar a la solicitud de Acreditación, además de los antecedentes establecidos en el numeral 6.1 del Reglamento para la Acreditación de Laboratorios de Análisis /Ensayo del Servicio Agrícola y Ganadero, los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG en este capítulo.

- i) Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas y ubicación de equipos
- ii) Lista de equipos, indicando nombre e identificar serie, fabricante y fecha de puesta en servicio.
- iii) Lista de Materiales y Reactivos.
- iv) Identificación del personal que se desempeña como analista indicando nombre completo, Número de Cédula de identidad y firma.
- v) Certificado de título de los analistas y documentos que acrediten la experiencia o capacitación de los analistas en el área de la fitopatología y técnicas moleculares.

### **5 ANÁLISIS/ENSAYO**

#### **5.1 Captación y envío de la muestra.**

El muestreo será realizado por personal del SAG o personal externo acreditado por el SAG para este fin, por lo tanto no es una actividad incluida en la competencia del laboratorio acreditado para este análisis

Las muestras deben ser despachadas al laboratorio acreditado acompañadas del “formulario oficial para el envío de muestras vegetales y de suelo” (Anexo N° 1).

#### **5.2 Recepción y manejo de la muestra/contramuestra**

La muestra debe ingresar al laboratorio con el “formulario oficial para el envío de muestras vegetales y de suelo”. Una vez recibida la muestra en el laboratorio, el responsable técnico debe evaluar la aptitud de ésta, tanto sintomatológica como de calidad para el análisis. Se considera muestra apta aquella que mantiene las características de un cultivo normal, de manera que refleje la sintomatología observada a nivel de campo. No debe estar deshidratada, descompuesta o seca, y ser representativa en cantidad y tamaño. Si la muestra llega en condiciones de embalaje inadecuadas o no apta para análisis, ésta debe ser rechazada.

La muestra debe presentar los síntomas característicos de la enfermedad a analizar, los cuales se encuentran descritos en los protocolos por cultivo del Departamento de Protección Agrícola del SAG, los cuales se detallan en el numeral 2. Si la muestra no presenta síntomas o éstos no son atribuibles a la forma especial de *Fusarium oxysporum* requerida, ésta debe ser rechazada, a menos que en el formulario de envío de muestras, el inspector indique que se está en conocimiento de tal situación.

En caso de rechazo de muestras, se debe avisar vía Fax a la oficina SAG correspondiente, tal situación y solicitar nueva muestra.



El laboratorio debe mantener las contramuestras vegetales por un período mínimo de dos meses a contar de la fecha de emisión del informe final y de un año para las extracciones de ADN. En ambos casos las condiciones de almacenamiento deben ser adecuadas para su correcta mantención.

### 5.3 Metodología.

El diagnóstico de formas especiales de *Fusarium oxysporum* debe realizarse de acuerdo al siguiente procedimiento:

#### - Aislamiento e identificación taxonómica de la especie *Fusarium oxysporum*:

La metodología de aislamiento de formas especiales de *Fusarium oxysporum* debe realizarse utilizando como referencia el método de Nelson et al, 1983.

- i) Extraer trozos de tejido desde la zona de avance de la enfermedad.
- ii) Almacenar el resto de la muestra a 4°C? 1°C.
- iii) Esterilizar los trozos de tejido en forma superficial.
- iv) Proceder a realizar aislamiento en medio de cultivo selectivo.
- v) Incubar a 25°C? 1°C por 4-5 días.
- vi) Revisar las placas de cultivo por microscopía para determinar presencia de *Fusarium oxysporum*.
- vii) Realizar siembra de conidias por dilución seriada en agar agua, e incubar a 25°C? 1°C por 24 horas.
- viii) Observar presencia de conidias germinadas bajo microscopio.
- ix) Transferir mediante aguja histológica conidios a medio de cultivo agar clavel y agar papa dextrosa.
- x) Incubar a 25°C? 1°C por 4 días.

#### - Identificación de formas especiales mediante técnicas moleculares

- i) Realizar extracción de ADN a partir de micelio.
- ii) Almacenar contramuestra de extracto de ADN a 20°C bajo cero ? 1°C.
- iii) Proceder a la amplificación de ADN utilizando para ello iniciadores específicos para la forma especial a analizar.
- iv) Además de las muestras, se debe ocupar un control negativo blanco, un control negativo de *Fusarium oxysporum* distinto a la forma especial a analizar y un control positivo del mismo.
- v) Realizar electroforesis y fotodocumentarla.
- vi) Realizar, a partir del producto amplificado, digestión enzimática utilizando la(s) enzima(s) requerida(s) para la forma especial a analizar.
- vii) Realizar electroforesis y fotodocumentarla.

La metodología específica adicional a lo indicado en este punto, tal como técnicas moleculares utilizadas para determinar cada forma especial en el ámbito de la acreditación a que postula, debe contar con un respaldo técnico, como publicaciones científicas, y en el caso de metodologías validadas, contar con los registros respectivos. En caso de tratarse de métodos internos del laboratorio o métodos adoptados por éste, éstos deben ser validados a través de controles de referencia.

### 5.4 Cálculo y Expresión de Resultados

Las muestras positivas de la forma especial a analizar deben dar bandas de amplificación y de digestión enzimática que correspondan con las bandas de los controles positivos.



## **6 REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS**

El laboratorio debe contar con un sistema de registro de resultados que incluya la clave de la muestra, fecha y número de informe, resultado, identificación y firma del analista.

El informe de resultados original debe ser remitido a la oficina SAG que envió la muestra.

Las copias de informes de resultados deben ser enviadas mensualmente, en duplicado, al Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias del SAG.

Adicionalmente, cada vez que se obtenga un resultado de análisis, ya sea positivo o negativo, el laboratorio debe comunicarlo vía correo electrónico, al laboratorio de Fitopatología del Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias del SAG en el formato que se entrega en el Anexo N° 2.



## 7 ANEXOS

### 7.1 Anexo Nº 1: Formulario oficial para el envío de muestras vegetales y de suelo



#### FORMULARIO PARA ENVÍO DE MUESTRAS VEGETALES Y DE SUELO

Región .....  
Oficina .....  
Clave .....  
Fecha de Muestreo .....  
Documento .....

USO INTERNO LABORATORIO

Nº Muestra   
Fecha de Ingreso

#### IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Hospedero .....  
Variedad .....  
Portainjerto .....  
Productor .....  
Dirección .....

Cultivo   
Forestal   
Frutal   
Maleza   
Ornamental

Otro .....

#### TIPO DE ANÁLISIS

Acarológico  Micológico  
 Bacteriológico  Nematológico  
 Entomológico  Tax. Malezas  
 Fitoplasma  Viroológico

Organismo a identificar  
.....  
.....  
.....

#### TIPO DE MUESTRA

Follaje  Rama  
 Fruto  Ramilla  
 Insecto  Semilla  
 Madera  Suelo  
 Planta  Tallo  
 Raíz  Tubérculo/bulbo

Otros .....  
.....  
.....

#### ACTIVIDAD DE ORIGEN

Cuarentena Nº de Resolución .....  
 Vivero Nombre .....  
Registro .....

Denuncia  Prospección plagas  
 Prospección Cultivo  Seguimientos  
 Particular  Semillero Exportación  
 Inspección Exportación  Proyecto 335  
 Trampeos

#### SÍNTOMAS O DAÑOS

Anillos Mosaico Moicado  Entre nudos cortos  
 Caneros o lesiones corteza  Galerías  
 Defoliación  Manchas foliares  
 Deformación  Marchites  
 Comeduras  Pudrición  
 Detención crecimiento  Tumores o agallas

Otros .....  
.....  
.....

#### EVALUACIÓN DE LA PLAGA (Importancia del daño)

Distribución  P.I.   
% Plantas Afectadas  I.A.

Observaciones .....  
.....  
.....

NOMBRE INSPECTOR

FIRMA

