

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL MUESTREO Y
DIAGNÓSTICO DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV.
ACTINIDIAE (PSA) EN EL MARCO DEL CONTROL OFICIAL
DE LA PLAGA EN KIWI**

TABLA DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁGINA
1 OBJETIVOS Y ALCANCE	4
2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS	4
3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	5
4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN	6
4.1 Requisitos de personal de laboratorio.....	6
4.2 Requisitos del personal para muestreo	7
4.3 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos	7
4.4 Requisitos específicos	10
4.5 Medios de verificación de requisitos.....	10
5 ASPECTOS GENERALES DEL MUESTREO Y ANÁLISIS	11
5.1 Captación de las muestras.....	11
5.2 Incorporación como usuario al SISVEG.....	12
5.3 Traslado o envío de muestras desde el huerto o el vivero	12
5.4 Recepción y manejo de la muestra/contramuestra	12
5.5 Metodología de diagnóstico	13
5.6 Interpretación de Resultados.....	13
5.7 Esterilización y eliminación de material de desecho	13
5.8 Variación de la metodología.....	13
5.9 Registros.....	13
6 REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS.....	14
7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS	14
8 INFORMES DE AVANCE DE MUESTREO E INFORME FINAL	15
9 OBLIGACIONES	15
10 PROTOCOLO DE MUESTREO.....	15
10.1 Protocolo de muestreo de plantas madres de kiwi	15
10.2 Protocolo de muestreo de partidas de plantas en viveros de kiwi	19
10.3 Protocolo de muestreo para monitoreo de huertos	21
11. METODOLOGÍA DE DIAGNÓSTICO	22
11.1 Esquema Análisis	22
11.2 Tratamiento previo de la muestra y tejido a analizar.....	23
11.3 Extracción de ADN.....	25
11.4 PCR convencional	25

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL MUESTREO Y
DIAGNÓSTICO DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV.
ACTINIDIAE (PSA) EN EL MARCO DEL CONTROL
OFICIAL DE LA PLAGA EN KIWI**

11.5 PCR en tiempo real..... 31
11.6 Variaciones de los Métodos..... 33
11.7 Formulación de tampones 34
12. FORMULARIOS.....34

1 OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo de este documento es establecer los requisitos y procedimientos que deberán cumplir los(as) interesados(as) que, voluntariamente, postulen ante el SAG, para operar como laboratorio autorizado en la ejecución de la toma de muestras vegetales y del diagnóstico de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa).

El alcance de la autorización corresponderá a la colecta de muestras en:

- Huertos de kiwi (*Actinidia* spp.), cuando un particular requiera monitorear o conocer la situación fitosanitaria de un huerto determinado.
- Plantas madres para la extracción de material de propagación sano.
- Partidas de plantas en viveros de kiwi.

Cabe señalar que en el presente documento se establecen dos procedimientos de diagnóstico, y el laboratorio interesado puede optar por uno o los dos, adjuntando el formulario F-GF-CGP-PT-129 a la respectiva solicitud.

Sin perjuicio de lo anterior, en caso de que el Servicio lo requiera, podrá ampliar el número 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.

Las actividades relacionadas al proceso de muestreo, para la realización de las técnicas de diagnóstico de laboratorio, son la colecta, conservación, almacenamiento, envío y entrega de las muestras al laboratorio, las cuales deberán ser desarrolladas de acuerdo a los métodos y procedimientos específicos establecidos por el SAG en los protocolos de muestreo de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, indicados en el numeral 10 del presente instructivo.

Esta autorización se otorgará con carácter nacional, aun cuando las actividades involucradas son ejecutadas en zonas geográficas definidas por el SAG.

Las disposiciones del presente instructivo serán aplicables a todas las personas que voluntariamente postulen a la autorización referida en este documento.

2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Servicio Agrícola y Ganadero. 2013. Resolución Exenta del Director Nacional N° 2.151 de abril del 2013. Establece medidas fitosanitarias para el control obligatorio de la plaga *Pseudomonas syringae* pv, *actinidiae* (Psa), en las áreas reglamentadas y deroga la Resolución N° 5.655 del 2011.
- Servicio Agrícola y Ganadero. 2013. Resolución Exenta del Director Nacional N° 2.152 de abril del 2013. Establece medidas para combatir la dispersión de la plaga cuarentenaria bajo control obligatorio *Pseudomonas syringae* pv, *actinidiae* (Psa), fuera de las áreas reglamentadas.
- Servicio Agrícola y Ganadero. 2012. Resolución Exenta del Director Nacional del SAG N° 529, del 30 de enero del 2012, que norma el Sistema Nacional de Autorización de Terceros.

- Servicio Agrícola y Ganadero. 2014. Resolución Exenta del Director Nacional N° 90 del 06 de enero de 2014, que aprueba Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos, versión vigente.
- Donoso, E. 2013. Presentación "Avances en estudios de epidemiología de Psa en Chile y Técnica de Monitoreo en huertos", en el marco del Proyecto FIA "Desarrollo de un modelo de determinación de riesgo de infección de la bacteriosis del Kiwi causada por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*". Taller Técnico "Situación actual y estrategias en relación a Psa en Chile. 24 de mayo de 2013, Curicó.
- Gallelli, A.; L`Aurora, A.; Loreti, S. 2011. Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols. *Journal of Plant Pathology* 93 (2) 425-435.
- Lloop, P.; Caruso, P.; Cubero, J.; Morente, C.; López, M.M. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Meth.* 37:23-31.
- Ministry of Agriculture and Forestry (MAF). 2011. Diagnostic Protocol for Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) in Leaf Samples. MAF Biosecurity New Zealand. Protocol Version: 18 March 2011, 16p.
- Pitman, A.; Drayton, G.; Kraberger, J.; Genet, R. 2011. Tuber transmission of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" and its association with zebra chip on potato in New Zealand. *Eur. J. Plant Pathol.* 129: 389-398.
- Rees-George, J.; Vanneste, J.; Cornish, D.; Pushparajah, I.; Yu, J.; Templeton, M.; Everett, K. 2010. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathology* 59:453-464.
- Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* Third Edition. APS PRESS. 2001. 373p.
- Takikawa, Y.; Serizawa, S.; Ichikawa, T.; Tsuyumu, S.; Goto, M. 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Nov.: The Causal Bacterium of Canker of Kiwifruit in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 55:437-444.

3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Analista	Persona designada por el laboratorio autorizado, para desempeñarse en temas técnicos asociados a su actividad y que cumple con el perfil definido por el SAG para este cargo.
Autorización	Acto mediante el cual el Servicio autoriza a un tercero para que ejecute una o más actividades en el marco de programas oficiales del Servicio, bajo condiciones definidas en el Reglamento específico de autorización de cada actividad.
Psa	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>

Pss	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
BPL o 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.
Laboratorio Autorizado	Persona natural o jurídica reconocida y aprobada por el Servicio para ejecutar uno o más análisis/ensayos determinados, en el marco de programas oficiales del SAG, bajo condiciones definidas por el Reglamento específico de autorización de laboratorios de análisis/ensayos y los correspondientes instructivos técnicos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Plantas madres	Planta a partir de la cual se obtiene material de propagación, previamente autorizado por el Servicio, para producir plantas de vivero o para obtener nuevas plantas.
Servicio/SAG	Servicio Agrícola y Ganadero
SISVEG	Sistema de Información de Sanidad Vegetal.
Vivero	Lugar o conjunto de instalaciones para multiplicar o reproducir plantas para plantar (a partir de yemas, estacas, esquejes, meristemas, semillas, bulbos, rizomas y otras estructuras geófitas), por métodos tradicionales (siembra, plantación en suelo o sustrato) o micropropagación (siembra o plantación en geles u otros medios de cultivo), para después de criadas ser transplantadas a su lugar definitivo. Sinónimo: Criadero de plantas.

4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN

4.1 Requisitos de personal de laboratorio

El postulante debe contar con el siguiente personal para las labores de diagnóstico:

4.1.1 RESPONSABLE TÉCNICO

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

- Poseer título profesional otorgado por una entidad reconocida por el Estado, correspondiente a una de las siguientes carreras: Bioquímico, Biotecnólogo, Ingeniero Agrónomo, Ingeniero Forestal o Biólogo. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Experiencia laboral comprobable en el área de laboratorios de al menos dos (2) años.
- Tener competencia técnica o experiencia laboral (de al menos 1 año) comprobable en diagnósticos de fitopatología, bacteriología y/o técnicas moleculares.

4.1.2 ANALISTAS

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

- Contar con título profesional o técnico o ser egresado, de una carrera correspondiente al área biológica o afín, impartida por una entidad de enseñanza superior reconocida por el Estado. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Tener competencia técnica o experiencia laboral (de al menos 6 meses) comprobable en diagnósticos de fitopatología, bacteriología y/o técnicas moleculares.

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

4.2 Requisitos del personal para muestreo

El postulante deberá contar con el siguiente personal para las labores de muestreo:

4.2.1 EQUIPO DE MUESTREO

Deberá contar con 1 o más equipos de muestreo, los cuales estarán conformados por a lo menos 2 personas, a saber:

a) Jefe de equipo, quién deberá cumplir con el siguiente perfil:

- Poseer título profesional otorgado por una entidad reconocida por el Estado o, en caso de extranjeros, revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación, correspondiente a una de las siguientes carreras del área de las Ciencias Agrícolas: Ingeniero Agrónomo, Ingeniero Agrícola, Ingeniero de Ejecución Agrícola, en cuya malla curricular se incluya cursos de fundamentos de fruticultura o fruticultura general, entomología agrícola y fitopatología agrícola.
- Haber aprobado un curso de adiestramiento para postulantes, dictado por el SAG u otra institución aceptada por éste, en materias referentes a la ejecución de las actividades oficiales comprendidas en este instructivo.

b) Personal de apoyo, que deberá cumplir con lo siguiente:

- Poseer título profesional/ técnico o ser egresado de una entidad reconocida por el Estado o, en caso de extranjeros, revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación, de una carrera del área agrícola.
- Haber aprobado un curso de adiestramiento para postulantes, dictado por el SAG u otra institución aceptada por éste, en materias referentes a la ejecución de las actividades oficiales comprendidas en este instructivo.

4.3 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos

4.3.1 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 para

desarrollar en forma óptima las actividades.

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

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

Además, dependiendo del tipo de análisis que se solicite autorización, el laboratorio deberá contar con lo siguiente:

- **PCR convencional o punto final:** salas separadas de preparación de muestras, lavado y esterilización, extracción de ADN, de amplificación y/o electroforesis.
- **PCR tiempo real:** salas separadas de preparación de muestras, lavado y esterilización, extracción de ADN y de amplificación.

Respecto del muestreo, debe contar con infraestructura destinada a:

- Disposición de equipos o instalaciones
- Mantención de registros documentales

4.3.2 REQUISITOS DE EQUIPAMIENTO

El laboratorio debe contar con los equipos necesarios, acordes al volumen de muestras, que garanticen el correcto desarrollo de la metodología de análisis a realizar. Deben contar con su certificado de mantención y/o calibración al día, efectuado a lo menos una vez cada 2 años por una empresa pertinente y reconocida en el área, y un programa de mantención y calibración de éstos de acuerdo a las necesidades y requerimientos del laboratorio.

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

- Sensor de temperatura que permita verificar la temperatura de las muestras al momento del ingreso, el rango de trabajo debe ser de 0 a 30°C, con una división de 1°C y un error máximo de 0,5°C.
- Balanza analítica con una resolución de 0,001 gramo.
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 µl, o equivalente.
- Peachímetro.
- Agitador magnético.
- Freezer que alcance temperaturas de -20±2°C o menores.
- Refrigerador que alcance una temperatura de 6±2°C.
- Conservadora de muestras que alcance una temperatura de 6±2°C.
- Autoclave para esterilización de material.
- Autoclave para esterilización de tampones y material limpio.
- Cámara de flujo laminar o gabinete de bioseguridad Clase II.
- Micro-Centrífuga (hasta 14000 r.p.m.).
- Baño de agua termoregulado.
- Agitador de tubos o Vortex.
- Termociclador para PCR convencional o tiempo real.
- Fuente de poder (solo PCR convencional).

- Cámara de electroforesis horizontal (solo PCR convencional).
- Transiluminador UV (solo PCR convencional).
- Sistema fotográfico para registro de geles (solo PCR convencional).
- Campana extracción de gases.

Asimismo, para las labores de muestreo se debe contar con lo siguiente:

- Vehículo adecuado para las labores relacionadas al muestreo.
- Computador.
- GPS, uno por cada equipo de muestreo.
- Equipo e instalaciones de refrigeración de uso exclusivo.
- Conservadora de muestras que alcance una temperatura de $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ (de uso exclusivo para terreno).

4.3.3 REQUISITOS DE MATERIALES Y REACTIVOS

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

A continuación se detallan los materiales y reactivos que se deben considerar como mínimo:

Generales de laboratorio:

- Bolsas plásticas transparentes, selladas de fondo, de 200 micras de densidad.
- Etanol 95%, Hipoclorito de sodio y Agua destilada.
- Controles positivos de referencia.
- Puntas para micropipetas con y sin filtro.

Específicas según técnica diagnóstica:

a) PCR convencional:

- Isopropanol.
- Tampón extracción ADN (Anexo N° 9.2).
- Tampón AFT.
- dNTP 's.
- Taq polimersa platinum o similar.
- Partidores específicos.
- Tubos de PCR de 0,2 mL libres de nucleasas.
- Tubos eppendorf de 1,5 mL libres de nucleasas.
- Agua Libre de nucleasas.
- Marcador de peso molecular 50 y 100 pb.
- Buffer TAE (Tris- acetato-EDTA).
- Bromuro de Etidio (10 mg/ml) o Gel red.
- Agarosa grado molecular.

b) PCR en tiempo real:

- Isopropanol.

- Tampón o kits de extracción ADN
- Tampón AFT.
- Eva Green reaction mix o similar.
- Agua libre de nucleasas.
- BSA.
- Tampón CTAB.
- Partidores específicos.

c) Muestreo:

Se debe contar con los siguientes materiales para el muestreo, como mínimo:

- Bolsas plásticas de alta densidad de 25 X 15 cm.
- Bolsas plásticas de alta densidad de 50 X 75 cm.
- Plumón permanente.
- Papel absorbente.
- Corchetera / corchetes.
- Caja conservadora.
- Ice pack activos (congelados).
- Cinta de papel engomada de 1 cm. de ancho a lo menos.
- Desinfectante de herramientas (cloro, alcohol, permanganato de potasio, etc.).
- SERRUCHO.
- Tijera de podar.

4.4 Requisitos Específicos

A esta autorización podrán postular los terceros que deseen ejecutar directamente las labores relacionadas con el proceso de muestreo y diagnóstico, en el marco del Control Obligatorio de Psa, 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 describa 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.
- Sin perjuicio de lo anterior, el laboratorio también deberá contar con los procedimientos que consideren la metodología a autorizar.
- El laboratorio deberá contar con timbres en que consigne el nombre del laboratorio para ser utilizados en el marco de la autorización.
- Respecto de las labores relacionadas con el proceso de muestreo (toma, conservación, almacenamiento, envío y entrega de las muestras al laboratorio), deberán seguir las actividades descritas en el numeral 10 del presente instructivo.

4.5 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 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, en el marco del control oficial de esta plaga, deben

presentar, **junto a la solicitud de autorización**, los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG:

- Los antecedentes generales del laboratorio que se establecen en el numeral 6.1 del Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.
- Formulario anexo para el diagnóstico de *Pseudomonas syringae pv. actinidiae*, según formato establecido en el formulario F-GF-CGP-PT-129 de este instructivo.
- Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas y ubicación de equipos.
- Lista de equipos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio y capacidad cuando corresponda.
- Lista de materiales, reactivos y material de referencia requeridos tanto para el diagnóstico como el muestreo.
- Formulario de identificación del responsable técnico, según formato establecido en el formulario F-GF-CGP-PT-069 del Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.
- Formulario de identificación de analistas y personal de los equipos de muestreo, según formato establecido en el formulario F-GF-CGP-PT-023 de este instructivo.
- Certificado de título del responsable técnico identificado en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
- Certificado de título o de egreso de los/las analistas identificados en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
- Documentos que garanticen la competencia técnica y/o experiencia laboral del/la responsable técnico en las áreas de fitopatología, bacteriología y/o técnicas moleculares según corresponda.
- Documentos que acrediten la competencia técnica y/o experiencia laboral de los/las analistas en las áreas de fitopatología, bacteriología y/o técnicas moleculares según corresponda.
- Manual de procedimientos de acuerdo a lo señalado en el numeral 4.4 de este instructivo.

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. Asimismo, en la visita de verificación, el SAG solicitará al postulante, el análisis de muestras control, mediante la ejecución de la o las técnica(s) solicitadas a autorizar ya sea por parte del responsable técnico o de uno o más analistas del laboratorio, según determine el verificador.

5 ASPECTOS GENERALES DEL MUESTREO Y ANÁLISIS

5.1 Captación de las muestras

El muestreo debe realizarse por el laboratorio autorizado que seleccione el productor o el viverista, de acuerdo a los procedimientos establecidos por el Servicio y según el alcance de la autorización, que en el marco del Control Oficial de Psa corresponde a los siguientes ámbitos:

- Muestreo de plantas madres de kiwi, previa declaración autorizada por el SAG.
- Muestreo de plantas a la venta en viveros de kiwi, previa declaración autorizada por el SAG.

- Muestreo en huertos de kiwi, a petición de productores, para monitorear un huerto y determinar la condición fitosanitaria respecto de Psa.

En el ingreso a huertos y viveros de kiwi, los muestreadores deberán adoptar las medidas de profilaxis y seguridad personal, del medio de transporte, así como de desinfección de herramientas de corte utilizadas para el muestreo, con el fin de mitigar el riesgo de dispersión de la plaga.

Todos los cuarteles de kiwi o unidades productivas deben georreferenciarse con un equipo GPS, tomando la coordenada en el centro del cuartel de un punto (x,y), correspondiente a la coordenada este y norte, respectivamente. La coordenada debe expresarse en unidades UTM, en datum WGS 84, indicando el Huso en el que fue capturado. El tipo y la cantidad de muestras para cada ámbito del alcance se señalan en el numeral 10 "Protocolo de Muestreo" del presente instructivo.

5.2 Incorporación como usuario al SISVEG

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

5.3 Traslado o envío de muestras desde el huerto o el vivero

El despacho o traslado de la(s) muestra(s) será de responsabilidad del laboratorio autorizado a cargo del muestreo. Sin perjuicio de lo anterior, podrá utilizar los servicios de una empresa de transporte de encomiendas o courier reconocida a nivel nacional y establecida legalmente y que garantice el envío en el tiempo y las condiciones de temperatura adecuados (mantención de cadena de frío de ser necesario), según los requerimientos específicos establecidos en el presente instructivo.

5.4 Recepción y manejo de la muestra/contramuestra

5.4.1 RECEPCIÓN DE LA MUESTRA

El ingreso de los datos de la muestra al sistema debe realizarse como máximo al día hábil siguiente de la fecha de muestreo. El plazo para recepcionar la muestra en el sistema no debe superar los 3 días, contados desde la fecha de muestreo.

Posteriormente, el responsable técnico del laboratorio deberá evaluar la aptitud de la muestra para el análisis, considerándose como muestra apta, aquella que no presenta signos evidentes de deshidratación y/o descomposición, además de ser representativa en cantidad y tamaño. Si la muestra presenta condiciones de embalaje inadecuadas o no apta para análisis, ésta debe ser rechazada.

Una vez que el laboratorio autorizado ha verificado lo anterior y considerado que la(s) muestra(s) son apta(s) para su análisis, debe aceptarlas ingresándolas al sistema SISVEG en el módulo laboratorio/recepción de muestras.

Las muestras deberán ser conservadas, hasta el momento del análisis, a una temperatura de $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.4.2 MANEJO DE LA CONTRAMUESTRA

El laboratorio autorizado deberá mantener al menos 2 tubos (1,5 o 2 ml) con la suspensión de extracción bacteriana inicial, por al menos 6 meses, luego del análisis. Esta conservación deberá realizarse a una temperatura de $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Además, el tejido vegetal no utilizado en la extracción debe ser eliminado, solamente, una vez que se finalice el análisis y el resultado sea negativo, para las muestras con diagnóstico probablemente positivas se deberá conservar tejido sin macerar y sin buffer, a -20°C durante, al menos 3 meses posteriores a la recepción de la muestra.

5.5 Metodología de diagnóstico

Para determinar la ausencia o presencia de Psa se procederá a desarrollar la metodología de análisis, de acuerdo a la técnica autorizada, las cuales se describen en el numeral 11 del presente instructivo.

El material vegetal no utilizado en el análisis se debe guardar como contramuestra a $6\pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.6 Interpretación de Resultados

El cálculo y expresión de resultados para las metodologías de diagnóstico y los lineamientos para considerar una muestra positiva o negativa a Psa, están indicados en el numeral 11 del presente instructivo.

5.7 Esterilización y eliminación de material de desecho

Todo material de laboratorio utilizado en las diferentes etapas de la metodología de diagnóstico debe ser esterilizado mediante autoclavado.

El material que no se pueda reutilizar, debe ser autoclavado y desechado a la basura normal. El proceso de autoclavado debe ser controlado mediante cintas de esterilización y termómetro de máxima instalado al interior del autoclave. Además, el proceso debe ser verificado en forma periódica mediante control biológico de esterilidad de autoclave.

El material vegetal, suelo y/o sustrato de desecho, o material vegetal correspondiente a contramuestras para eliminar, debe ser desechado en bolsas claramente identificadas, para su posterior incineración.

5.8 Variación de la metodología

Los laboratorios podrán presentar para la evaluación, por parte del Servicio, otras metodologías o variantes de las indicadas en este instructivo, las que una vez evaluadas y aprobadas podrán ser implementadas por los laboratorios autorizados.

5.9 Registros

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

- Registro de temperatura para cada equipo de frío. Considerar en el caso de los refrigeradores, al freezer como equipo aparte.
- Registro de verificación de termómetros.
- Registro de autoclavado, que considere temperaturas y tiempos.
- Registro control biológico del autoclave.

- Registro de mantención de equipos.
- Registro de materiales enviados a incineración.
- Registros de resultados de PCR o qPCR.
- Registros de muestreo: Informe final y Calendario de muestreo.

6 REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos del análisis de muestras tanto procedentes de viveros como huertos de kiwi, deberán ser ingresados al sistema de información de sanidad vegetal SISVEG u otro, en un plazo máximo de 10 días hábiles, desde la fecha de recepción de la(s) muestra(s) por parte del laboratorio autorizado.

Cualquier atraso en el tiempo de respuesta, deberá ser informado por el responsable técnico del laboratorio autorizado, con 2 días hábiles de anticipación a la fecha límite de respuesta, vía correo electrónico, al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio.

La autorización de resultados, en el sistema, será por parte del responsable técnico, quien los dejará disponibles para el sistema en caso de ser negativos, o en calidad de Reservados, en caso de ser positivos a Psa.

Los informes fitosanitarios con muestras negativas a Psa pueden ser impresos o almacenados como archivo digital y deberán ser informados y enviados al contratante del servicio, en un plazo no superior a un (1) día hábil después de ingresado el resultado al sistema e informar al SAG Sectorial en copia digital.

Los informes fitosanitarios con muestras positivas a Psa deben ser informados en un plazo máximo de un (1) día hábil, vía correo electrónico, al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio. Estos Informes tienen el carácter de confidencial entre el laboratorio autorizado y el SAG y no pueden ser impresos o almacenados como archivo digital, y tampoco pueden ser enviados o informados al contratante del servicio de las muestras. 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. La liberación del Informe Fitosanitario, con resultado positivo, solo podrá realizarse cuando el Encargado de Supervisión SAG así lo instruya, procediendo el responsable técnico a ingresar al Sisveg y dejando el diagnóstico disponible.

7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS

Todo laboratorio autorizado será supervisado, al menos una (1) vez al año. Sin embargo, deberá estar dispuesto a recibir supervisiones adicionales, en cualquier momento. Asimismo, podrá recibir supervisiones del personal del SAG de regiones o del Nivel Central, durante la ejecución del muestreo, al menos una (1) vez por Oficina SAG, en cuya jurisdicción se encuentre el huerto o el vivero muestreado.

El Encargado de Supervisión SAG del laboratorio autorizado, podrá solicitar a este último, en cualquier momento, el envío de contramuestras, ya sea ADN y/o cepas, 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.

El Encargado de Supervisión SAG del laboratorio autorizado, podrá solicitar a este último, en cualquier momento, analizar un set de muestras, tanto positivas como negativas a Psa, para verificar la conducción del ensayo. Los resultados de este set de muestras debe coincidir en un 100% para las muestras positivas, 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 un 100%.

Si producto de las acciones de supervisión, el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias o el personal del SAG que supervise las actividades de muestreo, detectan faltas en el desempeño del laboratorio autorizado, consideradas como no conformidades críticas, el SAG, de acuerdo con lo dispuesto en la cláusula sexta del correspondiente convenio de autorización, podrá instruir al laboratorio autorizado, mediante una carta suscrita por el/la Jefa del Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias o un Director/a Regional o un Jefe/a de Oficina, el cese inmediato de prestaciones de servicios ejecutados en el alcance de su autorización.

8 INFORMES DE AVANCE DE MUESTREO E INFORME FINAL

El laboratorio autorizado deberá enviar un programa de toma de muestras a cada región, con al menos cinco (5) días hábiles de anticipación a la toma de muestras, y deberá actualizarlo cada vez que se produzcan cambios e informarlo con al menos un (1) día hábil de anticipación utilizando el formulario F-GF-CGP-PT-130. Este registro deberá enviarse en forma electrónica a los Encargados(as) Regional y Sectorial Agrícola y Forestal del Servicio Agrícola y Ganadero, en cuya jurisdicción se encuentren ubicadas las plantas que serán objeto de muestreo. Además, este registro deberá ser mantenido en forma documental, en las dependencias del tercero autorizado y deberá estar disponible para las supervisiones que realicen los inspectores(as) del Servicio. También se deberá contar con un Informe de N° de Folios ingresados mensualmente.

Por otro lado, el laboratorio autorizado deberá enviar un informe final sobre las actividades realizadas en la temporada, utilizando el formulario F-GF-CGP-PT-131. La frecuencia de entrega de este informe será al menos 2 veces al año, antes del 31 de agosto para informar, principalmente, los muestreos realizados en plantas madres y en viveros, y antes del 31 de diciembre, para actualizar lo correspondiente al año.

9 OBLIGACIONES

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

- 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.
- Ante cualquier modificación de infraestructura, personal, procedimientos o equipamiento, el Laboratorio autorizado deberá solicitar su evaluación por escrito a la(el) Jefa(e) Departamento Control de Gestión y Proyectos Transversales del SAG. Solamente una vez autorizada la modificación, ésta podrá ser realizada.

10 PROTOCOLO DE MUESTREO

10.1 Protocolo de muestreo de plantas madres de kiwi

10.1.1 CONDICIONES PREVIAS PARA MUESTREO DE PLANTAS MADRES

El laboratorio autorizado no podrá realizar el muestreo de plantas madres si no cuenta con el formulario visado y autorizado por el SAG: Declaración de muestreo de plantas madres para diagnóstico de Psa, código F-GF-CGP-PT-025.

La Declaración debe ser presentada por los viveristas en los plazos definidos en las Resoluciones del Control Oficial de Psa, a través de un medio escrito (vía correo electrónico, fax u otro), en la Oficina SAG sectorial donde se ubique la oficina comercial de la empresa. En este formulario, el Viverista individualiza al laboratorio autorizado seleccionado para tomar las muestras y realizar los análisis correspondientes, y además, indica las variedades, cantidades de plantas y ubicación de éstas. Se presenta un formulario por cada huerto que se requiera muestrear.

10.1.2 PERÍODO DE MUESTREO

El muestreo de plantas madres podrá realizarse en época de otoño-invierno, previo a la extracción del material vegetal para la injertación de invierno o en la primavera, previo a la extracción de material vegetal para las injertaciones de primavera-verano, según el calendario específico dispuesto en la normativa del control oficial de Psa.

Se podrá considerar una época diferente para muestreo, si las técnicas de diagnóstico vigentes y las estructuras vegetales disponibles, permiten lograr un diagnóstico confiable y previa autorización de la declaración de muestreo.

10.1.3 VERIFICACIÓN DE LA CONDICIÓN DE LOS CUARTELES Y DE LAS PLANTAS MADRES DE KIWI, PREVIO AL MUESTREO

Se deberá proceder, en primer lugar, a verificar en el huerto, la ausencia de síntomas asociados a bacteriosis; si éstos se encuentran presentes, se podrá rechazar ese mecanismo de muestreo, pero deberán colectarse muestras para detectar Psa. En este caso, el viverista deberá considerar otro huerto para el muestreo, previa autorización de la nueva declaración de muestreo.

Los siguientes síntomas, detectados en el huerto, constituyen una causal de rechazo:

- Manchas angulares con halo clorótico en hojas.
- Cancros en brazos, ramillas.
- Presencia de exudaciones rojizas o anaranjadas.
- Atizonado de botones y flores.

En caso de que el equipo de muestreo detecte en el huerto, síntomas que no pueda definir con certeza que corresponden a bacteriosis, podrá realizar el muestreo de las plantas madres, sin embargo, deberá tomar en paralelo tres (3) muestras adicionales del huerto, dirigidas a síntomas, con costo al viverista. El laboratorio autorizado deberá informar de esta modalidad al viverista, como caso excepcional, previo al muestreo, para evitar atrasos en la toma de muestras.

En caso de que el SAG, en la misma temporada, en sus actividades de Vigilancia o supervisión del muestreo, detecte síntomas sospechosos en el huerto y éstos resulten positivos a Psa, deberá verificar si el laboratorio autorizado colectó las muestras adicionales. La falta de toma de muestras adicionales en un huerto con síntomas sospechosos a bacteriosis se considera como no conformidad crítica, la cual es causal de suspensión inmediata del laboratorio autorizado.

Además de la ausencia de síntomas sospechosos de bacteriosis en el huerto, se deberán verificar las siguientes condiciones:

• **En el cuartel o huerto**

- El cuartel o huerto deberá estar con las condiciones que permitan realizar las labores asociadas al proceso de muestreo, permitiendo el libre desplazamiento del equipo muestreador, así como un acceso integral a la planta que será sometida a muestreo, de manera de facilitar su identificación, marcaje y extracción de la muestra de acuerdo a las disposiciones establecidas por el SAG.
- No se deberá ingresar a un cuartel donde se estén realizando aplicaciones de plaguicidas o se encuentre sin cumplir el periodo de reingreso de éstos.

• **En la planta(s) madre(s)**

- Debe estar incluida en la declaración de muestreo.
- Debe corresponder a la especie, variedad (si esta información se encuentra incluida en la declaración) y ubicación, indicada en la declaración de muestreo.
- Debe estar libre de problemas fitosanitarios evidentes que puedan ser transmitidos por material de propagación.
- Debe disponer del crecimiento vegetativo suficiente para conformar la muestra.

• **En la muestra**

- Debe estar libre de problemas fitosanitarios (artrópodos, hongos, u otros).

10.1.4 TIPO Y CANTIDAD DE MUESTRAS

Si las plantas no presentan síntomas sospechosos de Psa, o hay síntomas que no se pueden definir con certeza que corresponden a bacteriosis, se deberán coleccionar muestras asintomáticas, en número de acuerdo a lo indicado en la siguiente tabla:

TABLA: Muestreo asintomático en plantas madres

Nº DE PLANTAS DECLARADAS	% DE PLANTAS A MUESTREAR
1-10	100
11-100	20
101-1000	5
Más de 1000	2 (de cada cuartel, en el caso de haber más de dos en un mismo huerto)

La muestra que se envíe al laboratorio estará constituida de tres submuestras de tres diferentes plantas asintomáticas.

En plantas asintomáticas, se debe coleccionar:

- Para muestreo de otoño-invierno, al menos 2 trozos de rama, de mínimo 50cm, tomados de dos sectores distintos de la planta, desde el extremo apical de cada rama. Eliminando en el mismo huerto, si se considera necesario, las hojas y ramillas secundarias, dejando solamente los trozos de ramas apicales de 50cm.
- Para muestreo de primavera, al menos 2 ramillas por árbol (ramillas o brotes con 10 a 15 hojas, con un mínimo de 30cm de madera del año anterior), tomadas de dos sectores distintos de la planta, desde el extremo apical de cada rama. Si se considera necesario, las hojas y ramillas secundarias, se pueden eliminar en el mismo huerto,

dejando solamente el trozo de madera de 30cm del año anterior, junto con 20cm de brote de la temporada, sumando en total 50cm de tejido no trozado.

10.1.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS PLANTAS MADRES MUESTREADAS

La(s) planta(s) madre(s), que hayan sido muestreadas, deberán ser marcadas con pintura indeleble ubicada en el eje central de la planta a una altura mínima de 20 cm. La marca deberá rodear toda la circunferencia del eje central de la planta y deberá ser de una dimensión que permita la fácil identificación de la planta muestreada.

10.1.6 Envío de Muestras al Laboratorio

- **Identificación:** Indicar localidad, empresa, nombre predio, cuartel, hilera y número de planta de hilera. Indicar además las coordenadas en UTM.
- **Envases:** El envase ideal es una bolsa plástica cerrable (ziploc o similar), con toalla de papel, no debe quedar agua libre dentro de la bolsa.
- **Ingreso de muestras al SISVEG:** El laboratorio autorizado creará en el Sistema computacional SISVEG un folio por cada sitio muestreado, y un número correlativo por cada muestra, la cual está compuesta por tres submuestras que provienen de 3 plantas madres y son tomadas del mismo sitio. Las muestras deben indicar la especie y variedad específica de kiwi que corresponda, así como también deben indicar la plaga específica *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. En caso de haber considerado el muestreo de 3 plantas adicionales debido a presencia de síntomas que no se pueden definir con certeza que corresponden a bacteriosis, éstas se deben considerar en un folio distinto con 3 correlativos distintos, indicando en observaciones complementa a Folio XXXX o Folios XXXX que corresponde(n) a las plantas madres del mismo vivero, para tener una trazabilidad al respecto.
- **Condiciones de almacenamiento y despacho:** Las muestras deben almacenarse en frío hasta su análisis, manteniendo temperaturas de entre 10°C y 4°C, sin congelar.

10.1.7 REGISTRO DE LA INFORMACIÓN

El laboratorio autorizado deberá enviar un programa de toma de muestras a cada región, con al menos cinco (5) días hábiles de anticipación a la toma de muestras, y deberá actualizarlo cada vez que se produzcan cambios e informarlo con al menos un (1) día hábil de anticipación utilizando el formulario F-GF-CGP-PT-130. Este registro deberá enviarse en forma electrónica al Encargado(a) Regional y Sectorial Agrícola y Forestal del Servicio Agrícola y Ganadero, en cuya jurisdicción se encuentren ubicadas las plantas que serán objeto de muestreo. Además, este registro deberá ser mantenido en forma documental, en las dependencias del tercero autorizado y deberá estar disponible para las supervisiones que realicen los inspectores(as) del Servicio. Por otra parte, la información sobre la identificación de las muestras (folios) para proceso en laboratorio, debe consignarse en la declaración de muestreo plantas madres utilizando el formulario F-GF-CGP-PT-025 y mantener este tipo de registro por al menos dos (2) años.

Los muestreos realizados semanalmente deben ser informados (vía fax o electrónica) a la(s) Oficina(s) SAG en cuya(s) jurisdicción(es) se hayan realizado los muestreos, con copia al/la coordinador/a nacional del Programa.

10.2 Protocolo de muestreo de partidas de plantas en viveros de kiwi

De acuerdo a lo establecido en las normas del control oficial de Psa, los viveros ubicados dentro de áreas reglamentadas tienen la obligación de realizar muestreo de las partidas de plantas de kiwi, antes de la época de venta o transferencia de éstas, para acreditar que las plantas producidas se encuentran negativas a Psa.

10.2.1 CONDICIONES PREVIAS PARA MUESTREO DE PARTIDAS DE KIWI, PREVIO A LA VENTA

El laboratorio autorizado no podrá realizar el muestreo de las partidas de plantas de kiwi si no cuenta con la lista de variedades de kiwi al expendio y el detalle de la cantidad por cada partida; esta información podrá obtenerse desde el formulario Declaración de existencia de variedades frutales al expendio, código F-GF-CGP-PT-132, sin perjuicio de que el SAG establezca un formulario específico para mejorar la identificación del universo muestreable.

La declaración de partidas de plantas a la venta, ver formulario Declaración de muestreo de plantas en viveros de kiwi para diagnóstico de Psa, código F-GF-CGP-PT-025, debe ser presentada por los viveristas a través de un medio escrito (vía correo electrónico, fax u otro), en la Oficina SAG sectorial donde se ubique la oficina comercial de la empresa, al menos un (1) mes antes de iniciar la venta. En este formulario el Viverista individualiza la lista de variedades y cantidad de plantas de kiwi que se tiene en existencia.

10.2.2 PERÍODO DE MUESTREO

El muestreo de plantas a la venta deberá realizarse previo a la venta. De acuerdo al sistema de producción utilizado por el viverista, este período puede extenderse por todo el año, con énfasis en las épocas de invierno y primavera. Es requisito contar con la declaración autorizada por el SAG.

10.2.3 VERIFICACIÓN DE LA CONDICIÓN DE LAS PARTIDAS DE PLANTAS EN EL VIVERO

- **En el vivero**

- El vivero deberá presentar las condiciones que permitan realizar las labores asociadas al proceso de muestreo, permitiendo el libre desplazamiento del equipo muestreador, así como un acceso integral al lote o partida que será muestreada, de manera de facilitar su identificación, marcaje y extracción de la muestra de acuerdo a las disposiciones establecidas por el SAG.
- No se deberá ingresar a un vivero en el cual se estén realizando aplicaciones de plaguicidas o se encuentre sin cumplir el período de reingreso de éstos.

- **En la partida**

- Que exista un mecanismo de señalética que facilite la identificación de las partidas o variedades.
- Las plantas deben disponer del crecimiento vegetativo suficiente para conformar la muestra.

- **En la muestra**

- Debe estar libre de problemas fitosanitarios (artrópodos, hongos, u otros).
- Si hay síntomas sospechosos de Psa, las plantas con síntomas deben ser parte de la muestra.

10.2.4 TIPO Y CANTIDAD DE MUESTRAS

El muestreo de las plantas en el vivero, se deberá realizar por partida de plantas, entendiéndose como tal el grupo de plantas de una misma variedad, injertadas o plantadas en una época similar y sometida al mismo manejo en relación a su grado de confinamiento. Considerando que las plantas madres son analizadas para Psa, el muestreo de plantas en un vivero de propagación tradicional se regirá con una tabla de muestreo referencial indicada en el cuadro inferior; donde cada muestra estará compuesta de material vegetal de al menos cinco (5) plantas asintomáticas (submuestras), cuando en la inspección no se hayan detectado síntomas. De existir sintomatología sospechosa a Psa, tal material debe incluirse en el muestreo y de no existir material suficiente, se deberá completar el número de muestras con material asintomático.

Tamaño de la partida	Tamaño muestral	N° submuestras
1 a 1.000 plantas	3 muestras	15
1.001 a 10.000 plantas	6 muestras	30
Más de 10.000 plantas	9 muestras	45

Respecto de la submuestra: Como se trata de plantas juveniles, que tienen tamaños que van desde pocos centímetros hasta 1,5 metros aproximadamente, se deberá coleccionar material vegetal correspondiente al menos a 1 planta completa, constituyendo así una (1) submuestra y deberá enviarse al laboratorio sin suelo ni raíces. De no existir síntomas foliares sospechosos, se pueden eliminar las hojas en el mismo vivero.

Si el vivero produce plantas por micropropagación, el número de submuestras deberá duplicarse (una (1) muestra equivale a diez (10) submuestras). Cada submuestra corresponderá a diez (10) frascos o contenedores con plántulas. Es recomendable muestrear las plantas en el proceso de aclimatación.

10.2.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS PARTIDAS MUESTREADAS

Se deberá dibujar un croquis de muestreo para identificar la ubicación de las partidas muestreadas.

10.2.6 ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO

- **Identificación:** Marcar las bolsas indicando vivero, nombre de la variedad, fecha de plantación/injertación, cuartel. Indicar además las coordenadas en UTM.
- **Envases:** El envase ideal es una bolsa plástica cerrable (ziploc o similar), con toalla de papel, no debe quedar agua libre dentro de la bolsa.
- **Ingreso de muestras al SISVEG:** El laboratorio autorizado creará en el sistema computacional SISVEG un folio por cada partida muestreada, y un número correlativo por cada muestra, la cual está compuesta por las submuestras indicadas en tabla. Las muestras deben indicar la especie y variedad específica de kiwi que corresponda, así como también deben indicar la plaga específica *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.
- **Condiciones de almacenamiento y despacho:** Las muestras deben almacenarse en frío hasta su análisis, manteniendo temperaturas de entre 10°C y 4°C, sin congelar.

10.2.7 REGISTRO DE LA INFORMACIÓN

El laboratorio autorizado deberá enviar un programa de toma de muestras a cada región, con al menos cinco (5) días hábiles de anticipación a la toma de muestras, y deberá actualizarlo cada vez que se produzcan cambios e informarlo con al menos un (1) día hábil

de anticipación utilizando el formulario F-GF-CGP-PT-130. Este registro deberá enviarse en forma electrónica al Encargado(a) Regional y Sectorial Agrícola y Forestal del Servicio Agrícola y Ganadero, en cuya jurisdicción se encuentren ubicadas las plantas que serán objeto de muestreo. Además, este registro deberá ser mantenido en forma documental, en las dependencias del tercero autorizado y deberá estar disponible para las supervisiones que realicen los inspectores(as) del Servicio.

10.3 Protocolo de muestreo para monitoreo de huertos

Un productor que desee conocer la situación fitosanitaria de un huerto y obtener un resultado oficial sobre *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, deberá contratar los servicios, para el muestreo y el diagnóstico, de un laboratorio autorizado por el SAG, los que tendrán un carácter oficial si se realizan bajo los parámetros establecidos en este instructivo. Cabe destacar que la información de los resultados obtenidos debe ser puesta en conocimiento inmediato al Servicio, sea cual sea su resultado.

Los resultados negativos a Psa, en muestras provenientes de huertos de kiwi, no serán condición suficiente para permitir la multiplicación de tales plantas, si es que éstas no fueron declaradas para tal uso y muestreados bajo los estándares establecidos para este tipo de plantas.

10.3.1 TIPO Y CANTIDAD DE MUESTRAS

a) Huertos con síntomas

Las muestras deben colectarse de plantas con sintomatología. Se deben enviar al laboratorio los siguientes órganos vegetales:

- Al menos dos (2) ramillas por árbol (brotes de 30 cm) con diez (10) a quince (15) hojas que presenten síntomas de puntuaciones necróticas rodeadas de halo clorótico.
- Madera, con zona de avance de ataque bacteriano, exudación rojiza en madera y/o presencia de canchales, ramas entre 40 y 60 cm. considerando dos (2) a cuatro (4) ramas por muestra, de un mismo árbol.

Cada órgano vegetal constituye una muestra independiente y se ingresará al SISVEG o al sistema informático vigente, bajo un mismo folio, con distintos números correlativos.

b) Huertos sin síntomas

Si el cuartel es homogéneo en manejo agronómico, de una misma especie y variedad, se deberán colectar muestras al azar, siguiendo un recorrido en zigzag, esto es avanzando en diagonal entre las hileras del cuartel, y se deberá colectar muestras cada tres (3) plantas. En una unidad homogénea de aproximadamente 4 ha. Se requiere tomar muestras de al menos diez (10) plantas, para determinar la presencia de una (1) planta positiva a Psa (Donoso, 2013).

La cantidad de muestras a colectar, según la superficie es la siguiente:

Superficie del cuartel (ha)	Nº plantas muestras
≤ 1	3
1,1 - 2,5	5
2,5 - 4,5	10
4,5 - 10	15

Para cuarteles con superficie superior a 10 ha. se deberá subdividir en lotes menores o igual a 10 ha. y aplicar la tabla anterior.

Cada muestra debe estar compuesta por:

- **Muestreo de otoño-invierno:** al menos dos (2) trozos de rama, de mínimos 50 cm, tomados de dos sectores distintos de la planta, desde el extremo apical de cada rama. Eliminando en el mismo huerto, si se considera necesario, las hojas y ramillas secundarias, dejando solamente los trozos de ramas apicales de 50cm.
- **Muestreo de primavera:** al menos dos (2) ramillas por árbol (ramillas o brotes con diez (10) a quince (15) hojas expandidas, con un mínimo de 30cm de madera del año anterior), tomadas de dos sectores distintos de la planta, desde el extremo apical de cada rama. De ser necesario se pueden eliminar, en el mismo huerto, las hojas y ramillas secundarias, dejando el trozo de madera de 30cm del año anterior, junto con 20cm de brote de la temporada, sumando en total 50cm de tejido no trozado.
- Los resultados del muestreo en huertos, realizado bajo este protocolo y de acuerdo a la época establecida por la normativa correspondiente, puede servir para acreditar la condición fitosanitaria de un cuartel que será presentado como postulante a la extracción de polen o de botones florales. En tal situación, la tabla de muestreo indicada precedentemente, debe aplicarse a plantas machos principalmente.

10.3.2 IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de madera deben ser puestas en bolsas de plástico y las de ramilla con o sin follaje deben ser envueltas en papel absorbente, previamente, antes de colocar en las bolsas. Todas las muestras deben ser identificadas con el código de barras que entregará el SISVEG al momento de ingresar la muestra en el sistema.

Las plantas muestreadas deberán ser identificadas con pintura indeleble o indicar el número de hilera y planta, en los documentos de muestreo.

10.3.3 REGISTRO DE LA INFORMACIÓN

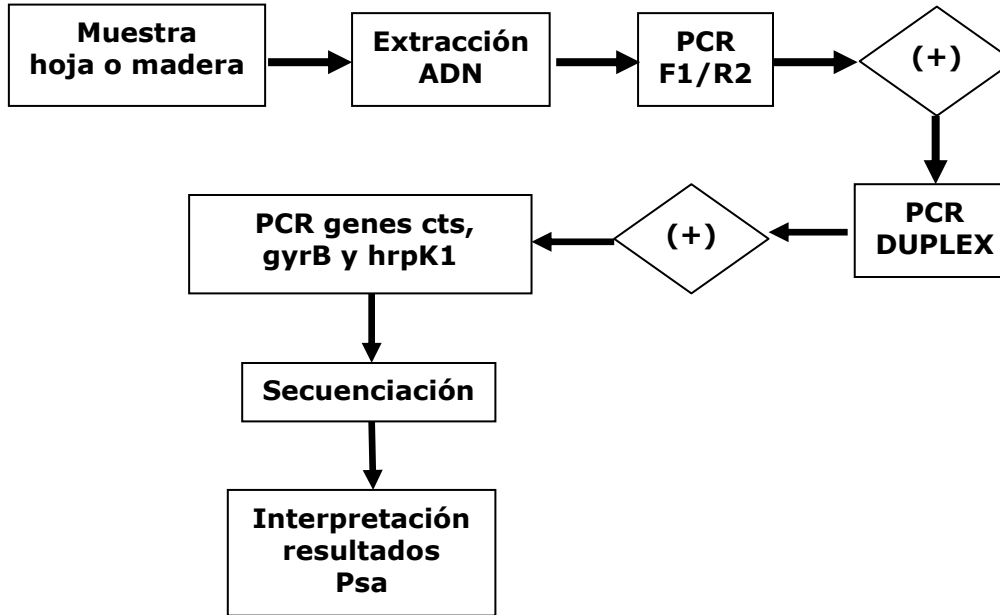
El laboratorio autorizado deberá enviar un programa de toma de muestras a cada región, con al menos cinco (5) días hábiles de anticipación a la toma de muestras, y deberá actualizarlo cada vez que se produzcan cambios e informarlo con al menos un (1) día hábil de anticipación utilizando el formulario F-GF-CGP-PT-130. Este registro deberá enviarse en forma electrónica al Encargado(a) Regional y Sectorial Agrícola y Forestal del Servicio Agrícola y Ganadero, en cuya jurisdicción se encuentren ubicadas las plantas que serán objeto de muestreo. Además, este registro deberá ser mantenido en forma documental, en las dependencias del tercero autorizado y deberá estar disponible para las supervisiones que realicen los inspectores(as) del Servicio.

11. METODOLOGÍA DE DIAGNÓSTICO

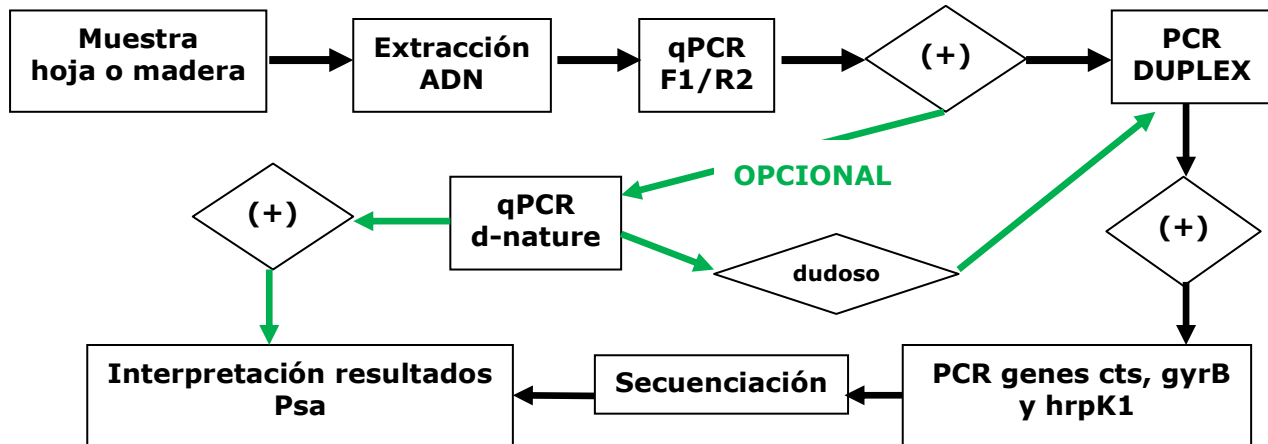
11.1 Esquema Análisis

El esquema de análisis, tanto para muestras con o sin síntomas, de acuerdo a la metodología a autorizar, es el siguiente:

a) PCR Convencional:



b) PCR en Tiempo Real:



11.2 Tratamiento previo de la muestra y tejido a analizar

Para muestras de madera, o madera con tejido verde, asintomáticas, con el fin de dar condiciones favorables para Psa, se realizará un tratamiento previo que permitirá aumentar el nivel poblacional de Psa, en caso que esté presente al interior de la planta, ya sea en condiciones de latencia o bajo nivel de título.

Este tratamiento previo consiste en:

- Colocar la muestra al interior de una bolsa plástica transparente de alta densidad.
- Llevar a frío, a una temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por un período de 4hrs.
- Dejar a temperatura ambiente por aproximadamente 48hrs.

El tipo de tejido a analizar dependerá si la muestra viene con o sin síntomas:

a) Muestras con síntomas

Se analizarán las muestras de acuerdo a su sintomatología en forma separada y según el material vegetal a analizar (brotes herbáceos, hojas o tejido leñoso).

Para el caso de tejido leñoso, se tomarán secciones de tejidos a partir de la zona de avance de la lesión. Posteriormente se realizará lo siguiente:

- Dilacerar o machacar las muestras y agregar dos veces el peso de la muestra en tampón AFT.
- Mantener en hielo y agitación por 20 a 45 minutos.
- Guardar a -20°C dos viales con 1,5ml de suspensión como contramuestra.
- Tomar 1 ml del macerado y centrifugar a 13.000rpm/5min.
- Proceder a la extracción de ADN.

Para el caso de brotes herbáceos, se tomarán secciones de tejidos a partir de la zona de avance de la lesión. Para el caso de las hojas, se tomarán las manchas foliares completas, privilegiando las manchas incipientes. Posteriormente se realizará el mismo proceder que para los tejidos leñosos.

Las secciones tomadas de los distintos tipos de tejidos se colocan en las bolsas plásticas de polietileno transparente y se identifican con el correlativo de la muestra y el tipo de tejido tomado.

b) Muestras sin síntomas

Las muestras se tomarán en forma separada de acuerdo al material a analizar (madera, madera con tejido verde, plantas a comercio herbáceas, plantas in vitro).

En el caso de madera o madera con tejido verde, se tomarán secciones transversales de aproximadamente 0,2-0,5 cm de ancho, siempre y cuando éstos tejidos puedan ser cortados a este grosor. Los cortes se realizarán en los nudos de la rama o ramilla, considerándose al menos tres (3) nudos por rama o ramilla.

En caso de tejido que no pueda ser cortado en forma transversal se tomarán secciones longitudinales de hasta 1,5 cm de largo, considerando dentro del corte principalmente el tejido xilemático.

En caso de plantas a comercio herbáceas se tomarán secciones de tallo transversales de aprox. 0,5cm de grosor, al menos dos por planta, idealmente de la zona del nudo.

En caso de plantas in vitro se tomará la planta completa, eliminando las raíces.

Inmediatamente realizados los cortes de tejidos transversales o longitudinales, se procede de la siguiente forma:

- Agregar a la bolsa, tampón AFT, en una proporción de dos veces el peso de la muestra (no dilacerar o machacar).
- Mantener en hielo y agitación por 30-45 minutos.
- Tomar dos viales con 1,5ml de suspensión como contramuestra y guardar a -20°C.
- Tomar 1 ml de la bolsa en un vial y centrifugar a 13.000rpm/5min.
- Proceder inmediatamente a la extracción de ADN.

Los distintos tipos de tejidos se colocan en bolsas plásticas de polietileno transparente, acordes al tamaño de la muestra, y se identifican con el correlativo de la muestra y el tipo de tejido tomado.

11.3 Extracción de ADN

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

No obstante lo anterior y de acuerdo a los buenos resultados obtenidos, a continuación se detalla el procedimiento sugerido, para realizar la extracción de ADN (protocolo de extracción de ADN publicado por Llop et al., 1999).

- Al tubo procedente de la extracción bacteriana, descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 500 µl de tampón de extracción de ADN. Agitar mediante vortex y mantener en agitación durante una (1) hora a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 5.000rpm/5min. Tomar 450 µl del sobrenadante y colocar en un nuevo tubo. Agregar igual volumen de isopropanol. Invertir varias veces y dejar una (1) hora a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 13.000rpm/5min. Descartar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente. Resuspender el pellet en 200 µl de agua.
- Verificar la calidad del ADN extraído (mantener registros al respecto). Las lecturas deseables son del rango de 1,7 a 2 (260/280) para la pureza y mayor a 5ng/µl para la concentración de ADN total.

11.4 PCR convencional

En primer lugar se debe verificar que la extracción de ADN fue correctamente realizada, para ello se utilizan primer universales para Eucariotas.

11.4.1 PCR CON PRIMER UNIVERSALES PARA EUCARIOTAS

Este PCR se realiza para verificar que la extracción de ADN total está correcta.

- La amplificación del ADN se realiza utilizando el par de primers 28Sf (CCC TGT TGA GCT TGA CTC TAG TCT GGC) y 28Sr (AAG AGC CGA CAT CGA AGG ATC).
- Proceder a preparar el mix PCR de acuerdo al siguiente esquema (µl):

Agua Mq	18,25
dNTPs 10mM	0,50
Buffer 10x	2,50
MgCl ₂ 50mM	1,50
Primer 10pmol	0,50
Primer 10pmol	0,50
Taq platinum	0,25
Muestra 5ng	1,00

- La mezcla se prepara considerando el volumen por tubo y la cantidad de muestras y controles a amplificar.
- Los controles negativos a utilizar para esta reacción son un control negativo blanco (control agua) y un control de bacteria proveniente de un aislado puro.
- Realizar la amplificación de acuerdo a los siguientes ciclos:

94°C	5 min	} 35 ciclos
94°C	30seg	
66°C	30seg	
72°C	60seg	
72°C	10 min	

- Proceder a realizar la electroforesis, con el fin de visualizar si hubo amplificación de muestras y controles.
- Preparar el gel de electroforesis disolviendo, en tampón TAE, agarosa al 2% y agregando gel red a una concentración aproximada de 0,005%.
- Tomar 5 a 10 µl de cada tubo amplificado y mezclar con tampón de carga.
- Cargar en cada bolsillo del gel 5 a 10 µl de la mezcla obtenida en el punto anterior.
- Tomar aproximadamente 2 µl de marcador de peso molecular 50bp y mezclar con tampón de carga. Cargar esta mezcla en el gel.
- Proceder a correr el gel a 80 o más Volts. Observar bajo luz UV la presencia de bandas luminosas y obtener registro fotográfico.
- En primer lugar se deben examinar los controles negativos, los cuales no deberán presentar bandas. Si hay presencia de bandas de amplificación se debe repetir el proceso de amplificación.
- Una vez verificados los controles se observa en los carriles de las muestras la presencia o ausencia de bandas de amplificación de aprox. 600bp.
- La ausencia de banda de amplificación en cualquier muestra determina que se debe repetir la extracción para esa muestra.
- La presencia de banda determina el PCR positivo, permitiendo continuar con el proceso de análisis.
- Ingresar los correlativos de las muestras en el registro de PCR, adjuntando el registro fotográfico.

11.4.2 PCR CON PRIMER F1/R2

Esta etapa del análisis está condicionada a si el PCR de ADN total de la muestra dio positivo con los partidores universales para eucariotas.

La amplificación del ADN se realiza utilizando el par de primers PsaF1 (TTT TGC TTT GCA CAC CCG ATT TT) y PsaR2 (CAC GCA CCC TTC AAT CAG GAT G).

- Proceder a preparar el mix PCR de acuerdo al siguiente esquema (µl):

Agua Mg	7,70
dNTPs 10mM	0,50
Buffer 10x	2,50
MgCl ₂ 50mM	1,50
Primer PsaF1 10pmol	1,25
Primer PsaR2 10pmol	1,25
Taq platinum	0,30
Muestra 5ng	10,00

- La mezcla se prepara considerando el volumen por tubo y la cantidad de muestras y controles a amplificar.
- Además de las muestras a analizar, en cada reacción de amplificación se debe incorporar un control negativo blanco (control agua), un control negativo de Pss y un control positivo de Psa.
- Realizar la amplificación de acuerdo a los siguientes ciclos:

95°C	2 min	} 30 ciclos
95°C	30 seg	
65°C	30 seg	
72°C	30 seg	
72°C	5 min	

- Proceder a realizar la electroforesis, con el fin de visualizar si hubo amplificación de muestras y controles.
- Preparar el gel de electroforesis disolviendo, en tampón TAE, agarosa al 2% y agregando gel red a una concentración aproximada de 0,005%.
- Tomar 5 a 10 µl de cada tubo amplificado y mezclar con tampón de carga.
- Cargar en cada bolsillo del gel 5 a 10 µl de la mezcla obtenida en el punto anterior.
- Tomar aproximadamente 2 µl de marcador de peso molecular 50 bp y mezclar con tampón de carga. Cargar esta mezcla en el gel.
- Proceder a correr el gel a 80 o más Volts. Observar bajo luz UV la presencia de bandas luminosas y obtener registro fotográfico.
- Primero se debe examinar el control negativo, no debe presentar bandas. Si hay presencia de bandas de amplificación se debe repetir el proceso de amplificación.
- Posteriormente se debe comparar el marcador molecular con la posición de la banda obtenida por el control positivo. Si no hay presencia de banda de amplificación de 280 bp se debe repetir el proceso de amplificación.
- Una vez verificados los controles se observa en los carriles de las muestras la presencia o ausencia de bandas de amplificación de 280 bp.
- La presencia de banda determina el PCR positivo, sin ser necesariamente la muestra positiva a Psa.
- Ingresar los correlativos de las muestras en el registro de PCR, adjuntando el registro fotográfico.

11.4.3 PCR DUPLEX

Esta etapa del análisis está condicionada a que la muestra analizada mediante PCR con primers F1/R2 presentó banda de amplificación a la altura de los 280bp.

- La amplificación del ADN se realiza utilizando los primers KNF (CAC GAT ACA TGG GCT TAT GC), KNR (CTT TTC ATC CAC ACA CTC CG), AvrD1F (TTT CGG TGG TAA CGT TGG CA) y AvrD1R (TTC CGC TAG GTG AAA AAT GGG).
- Proceder a preparar el mix PCR de acuerdo al siguiente esquema (µl):

Mg	28
dNTPs 10mM	1,00
Buffer 10x	5
MgCl2 50mM	1,5
Primer KNF 10pmol	2,50

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL MUESTREO Y
DIAGNÓSTICO DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV.
ACTINIDIAE (PSA) EN EL MARCO DEL CONTROL
OFICIAL DE LA PLAGA EN KIWÍ**

Primer KNR 10pmol	2,50
Primer AvrD1 F 10pmol	2,00
Primer AvrD1 R 10pmol	2,00
Taq platinum	0,50
Muestra 5ng	5,00

- La mezcla se prepara considerando el volumen por tubo y la cantidad de muestras y controles a amplificar.
- Además de las muestras a analizar, en cada reacción de amplificación se debe incorporar un control negativo blanco (control agua), un control negativo de Pss y un control positivo de Psa.
- Realizar la amplificación de acuerdo a los siguientes ciclos:

95°C	3 min	} 30 ciclos
94°C	30 seg	
63°C	45 seg	
72°C	50 seg	
72°C	5 min	

- Proceder a realizar la electroforesis, con el fin de visualizar si hubo amplificación de muestras y controles.
- Preparar el gel de electroforesis disolviendo, en tampón TAE, agarosa al 2% y agregando gel red a una concentración aproximada de 0,005%.
- Tomar 5 a 10 µl de cada tubo amplificado y mezclar con tampón de carga.
- Cargar en cada bolsillo del gel 5 a 10 µl de la mezcla obtenida en el punto anterior.
- Tomar aproximadamente 2 µl de marcador de peso molecular 50 bp y mezclar con tampón de carga. Cargar esta mezcla en el gel.
- Proceder a correr el gel a 80 o más Volts. Observar bajo luz UV la presencia de bandas luminosas y obtener registro fotográfico.
- En primer lugar se debe examinar el control negativo, el cual no deberá presentar bandas. Si hay presencia de bandas de amplificación se debe repetir el proceso de amplificación.
- Posteriormente se debe comparar el marcador molecular con la posición de las bandas obtenidas por el control positivo. Si no hay presencia de bandas de amplificación de 502bp (KNF/KNR) y de 226bp (AvRD1F/AvrD1R) se debe repetir el proceso de amplificación.
- Una vez verificados los controles se observa en los carriles de las muestras la presencia o ausencia de bandas de amplificación de 502bp (KNF/KNR) y de 226bp (AvRD1F/AvrD1R).
- La presencia de ambas bandas determina el PCR positivo, lo que indica una alta probabilidad de que la muestra sea positiva a Psa.
- Ingresar los correlativos de las muestras en el registro de PCR, adjuntando el registro fotográfico.

11.4.4 PRESENCIA GENES CONSTITUTIVOS Y EFECTORES

Esta etapa del análisis está condicionada a que la muestra analizada mediante PCR duplex presente bandas de amplificación a la altura de los 502bp (KNF/KNR) y de 226bp (AvRD1F/AvrD1R).

a) Gen constitutivo cts

- La amplificación de ADN se realiza mediante los primers cts-Fp (AGT TGA TCA TCG AGG GCG CWG CC) y cts-Rp (TGA TCG GTT TGA TCT CGC ACG G).
- Proceder a preparar el mix PCR de acuerdo al siguiente esquema (µl):

Agua Mq	10,7
dNTPs 10mM	0,5
Buffer 10x	2,5
MgCl ₂ 50mM	1,0
Primer cts-Fp 10pmol	2,5
Primer cts-Rp 10pmol	2,5
Taq platinum	0,3
Muestra 5ng	5,0

- La mezcla se prepara considerando el volumen por tubo y la cantidad de muestras y controles a amplificar.
- Además de las muestras a analizar, en cada reacción de amplificación se debe incorporar un control negativo blanco (control agua) y un control positivo de Psa.
- Realizar la amplificación de acuerdo a los siguientes ciclos:

94°C	3 min	} 35 ciclos
94°C	2 min	
56,5°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

- A partir de los amplificados realizar un nuevo PCR con los primers cts-Fs (CCC GTC GAG CTG CCA ATW CTG A) y cts-Rs (ATC TCG CAC GGS GTR TTG AAC ATC).
- Proceder a preparar el mix PCR de acuerdo al siguiente esquema (µl):

Agua Mq	14,7
dNTPs 10mM	0,5
Buffer 10x	2,5
MgCl ₂ 50mM	1,0
Primer cts-Fs 10pmol	2,5
Primer cts-Rs 10pmol	2,5
Taq platinum	0,3
Amplificado PCR cts	1,0

- La mezcla se prepara considerando el volumen por tubo y la cantidad de muestras y controles a amplificar.
- Además de las muestras a analizar, en cada reacción de amplificación se debe incorporar un control negativo blanco (control agua).
- Una vez preparado el mix proceder a realizar la amplificación de acuerdo a los ciclos indicados para el gen cts.

- Realizar electroforesis y enviar a secuenciar.
- Ingresar los correlativos de las muestras en el registro de PCR, adjuntando el registro fotográfico.

b) Gen constitutivo gyrB

- La amplificación del ADN se realiza mediante un PCR utilizando los primers gyrB-Fps (MGG CGG YAA GTT CGA TGA CAA YTC) y gyrB-Rps (TRA TBK CAG TCA RAC CTT CRC GSG C).
- Proceder a preparar el mix PCR de acuerdo al siguiente esquema (µl):

Agua Mq	10,7
dNTPs 10mM	0,5
Buffer 10x	2,5
MgCl ₂ 50mM	1,0
Primer cts-Fp 10pmol	2,5
Primer cts-Rp 10pmol	2,5
Taq platinum	0,3
Muestra 5ng	5,0

- La mezcla se prepara considerando el volumen por tubo y la cantidad de muestras y controles a amplificar.
- Además de las muestras a analizar, en cada reacción de amplificación se debe incorporar un control negativo blanco (control agua) y un control positivo de Psa.
- Proceder a realizar la amplificación de acuerdo a los siguientes ciclos:

94°C	3 min	} 35 ciclos
94°C	2 min	
63°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

- Realizar electroforesis y enviar a secuenciar.
- Ingresar los correlativos de las muestras en el registro de PCR, adjuntando el registro fotográfico.

c) Gen efector hrpK1

- La amplificación del ADN se realiza mediante un PCR utilizando los primers hrpK1-F (GAC ART GCC GAC AAG GAC K) y hrpK1-R (ATC KGC GGT TTG CAG AGA CT).
- Proceder a preparar el mix PCR de acuerdo al siguiente esquema (µl):

Agua Mq	5,75
dNTPs 10mM	0,50
Buffer 10x	2,50
MgCl ₂ 50Mm	1,00
Primer hrpK1-F 10pmol	5,00

Primer hrpK1-R 10pmol	5,00
Taq platinum	0,25
Muestra 5ng	5,00

- La mezcla se prepara considerando el volumen por tubo y la cantidad de muestras y controles a amplificar.
- Además de las muestras a analizar, en cada reacción de amplificación se debe incorporar un control negativo blanco (control agua), y un control positivo de Psa.
- Una vez preparado el mix proceder a realizar la amplificación de acuerdo a los siguientes ciclos:

95°C	5 min	} 35 ciclos
95°C	2 min	
64°C	30 seg	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

- Realizar electroforesis y enviar a secuenciar
- Ingresar los correlativos de las muestras en el registro de PCR, adjuntando el registro fotográfico.

11.4.5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Se considerará un **diagnóstico negativo** a Psa si no hay presencia de banda de amplificación de 280bp para los primers PsaF1/R2 y el PCR de ADN total de la muestra resulte positivo con los partidores universales para eucariotas.
- Se considerará un **diagnóstico probablemente positivo** a Psa cuando exista presencia de banda de amplificación de 280 bp para los primers PsaF1/R2 y doble banda de amplificación para PCR dúplex de 502bp (KNF/KNR) y de 226bp (AvRD1F/AvrD1R).

11.4.6 DIAGNÓSTICO FINAL

- Se considerará un **diagnóstico positivo** a Psa cuando los resultados de secuenciación de genes constitutivos y efectores se correspondan con un haplotipo de Psa.

11.5 PCR en tiempo real

11.5.1 AMPLIFICACIÓN

- La amplificación del ADN se realiza utilizando el par de primers PsaF1 (TTT TGC TTT GCA CAC CCG ATT TT) y PsaR2 (CAC GCA CCC TTC AAT CAG GAT G) y los controles internos COX-F (CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA) y COX-R (CAA CTA CGG ATA TAT AAG AGC CAA AAC TG).
- Proceder a preparar el mix PCR de acuerdo al siguiente esquema (µl):

Agua Mq	2,5
EvaGreen Reaction Mix	5,0
Primer PsaF1 5µM	0,5
Primer PsaR2 5µM	0,5

BSA 10mg/ml	0,5
Muestra 5ng	1,0

- Realizar el mismo mix, en paralelo para las mismas muestras, pero reemplazando los primer PsaF1/R2 por los partidores internos COX.
- El EvaGreen Reaction Mix puede ser reemplazado por un reactivo similar, por ejemplo Sybergreen, siempre y cuando se realice un ajuste previo de la reacción.
- Además de las muestras a analizar, en cada reacción de amplificación se debe incorporar un control negativo blanco (control agua), otro negativo de tejido vegetal, un control negativo de Pss y un control positivo de Psa.
- Realizar la amplificación de acuerdo a los siguientes ciclos:

95°C	15seg
60°C	1min
95°C	15seg
60°C	15seg

- En primer lugar se debe examinar el control negativo de agua, el cual no deberá amplificar, tanto para Psa como para los controles internos Cox. En caso contrario se debe repetir el proceso de amplificación.
- Luego verificar para el control negativo de planta que la amplificación sea negativa para Psa y positiva para los controles internos.
- Posteriormente verificar, para el control negativo Pss, que la amplificación sea negativa para Psa y negativa para los controles internos. En caso de existir amplificación para los primers F1/R2, la curva de disociación debe presentar un punto de fusión distinto a Psa.
- El control positivo de Psa debe presentar un punto de fusión cercano a los 86°C en la curva de disociación y un ciclo de amplificación de corte de hasta 28.
- Una vez verificados los controles se observa si hubo o no amplificación en las muestras. En caso de existir amplificación con los primers F1/R2, se debe verificar si la curva de disociación se corresponde al control positivo de Psa.
- Para los controles internos la amplificación siempre debe ser positiva, en caso contrario se debe repetir la extracción de la muestra y realizar una nueva amplificación, tanto para Psa como para el control interno. La curva de disociación para los primers Cox debe presentar un punto de fusión aproximado a 75°C.
- La presencia de amplificación, con curva de disociación presentando un punto de fusión igual al control positivo de Psa (aprox. 86°C), determina el PCR positivo, sin ser necesariamente la muestra positiva a Psa., siempre y cuando el ciclo de amplificación de corte no sobrepase los 34 ciclos.

11.5.2 PCR DUPLEX

Esta etapa del análisis está condicionada a que la muestra analizada mediante qPCR con primers F1/R2, presente una curva de disociación con un punto de fusión igual al control positivo de Psa (aprox. 86°C), y un ciclo de amplificación de corte de hasta 34.

Para mayor detalle del PCR dúplex ver punto 11.4.3 de este instructivo.

11.5.3 PCR EN TIEMPO REAL D-NATURE

En forma opcional se puede utilizar el kits comercial de amplificación para qPCR denominado d-nature, el cual es específico para Psa-V, este se puede utilizar como paso previo al PCR dúplex.

Esta etapa del análisis está condicionada a que la muestra analizada mediante qPCR con primers F1/R2, presente una curva de disociación con un punto de fusión igual al control positivo de Psa (aprox. 86°C), y un ciclo de amplificación de corte de hasta 34.

En caso de que qPCR d-nature resulte positivo a Psa-V bajo el ciclo 29, no se requiere enviar a secuenciación. En caso de que qPCR d-nature resulte positivo a Psa-V entre ciclos 30 al 35, o negativo, se debe seguir el procedimiento de PCR dúplex y luego secuenciación si los resultados de los análisis así lo indican.

11.5.4 PRESENCIA GENES CONSTITUTIVOS Y EFECTORES

Esta etapa del análisis está condicionada a que la muestra analizada mediante PCR duplex presente bandas de amplificación a la altura de los 502bp (KNF/KNR) y de 226bp (AvRD1F/AvrD1R). Para mayor detalle del procedimiento a desarrollar para Presencia de genes constitutivos y efectores ver punto 11.5.4 de este instructivo.

11.5.5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Se considerará un **diagnóstico negativo** a Psa si en el qPCR no hay amplificación con los primers PsaF1/R2, o el punto de fusión es muy distinto a Psa (aprox. 86°C) y hay amplificación con los partidores internos COX.
- Se considerará un **diagnóstico dudoso** a Psa si en el qPCR hay amplificación con los primers PsaF1/R2, la curva de disociación presenta un punto de fusión igual al control positivo de Psa (aprox. 86°C), y el ciclo de amplificación de corte está entre el ciclo 30 y 34; además, el PCR dúplex debe presentar doble banda de amplificación, y los partidores internos COX deben presentar amplificación.
- Se considerará un **diagnóstico probablemente positivo** a Psa si en el qPCR hay amplificación con los primers PsaF1/R2, la curva de disociación presenta un punto de fusión igual al control positivo de Psa (aprox. 86°C), y el ciclo de amplificación de corte es menor o igual a 29; además, el PCR dúplex debe presentar doble banda de amplificación, y los partidores internos COX deben presentar amplificación.

11.5.6 DIAGNÓSTICO FINAL

- Se considerará un **diagnóstico positivo** a Psa cuando la secuenciación de genes constitutivos y efectores, de una muestra con diagnóstico probablemente positivo o dudoso a Psa, se corresponde con un haplotipo de Psa.
- Se considerará un **diagnóstico positivo** a Psa si en el qPCR hay amplificación con los primers PsaF1/R2, la curva de disociación presenta un punto de fusión igual al control positivo de Psa (aprox. 86°C), y el ciclo de amplificación de corte es menor o igual a 29; y el qPCR d-nature resulte positivo a Psa-V bajo el ciclo 29.

11.6 Variaciones de los Métodos

Los PCR se deben ajustar a las condiciones en donde se van a desarrollar los análisis y a los reactivos a utilizar. El ajuste del Laboratorio debe contar con registros que demuestren su especificidad y sensibilidad. En ningún caso se pueden utilizar primers distintos a los ya indicados, a menos que estos sean validados por el SAG.

11.7 Formulación de tampones

a) AFT

- NaCl 8 g
- NaH₂PO₄*2H₂O 0,4 g
- Na₂HPO₄*12H₂O 2,7 g
- Agua 1 Lt

b) Tampón extracción de ADN para PCR Convencional

- Tris HCL, pH 7,5 24,2g
- NaCl 14,6 g
- EDTA 9,3 g
- SDS 5 g
- Polyvinilpyrrolidone PVP-10 20 g
- Agua destilada ajustar volumen a 1 Lt.

c) Tampón CTAB

- CTAB 2,5% (w/v) 25 g
- Tris-HCl 100mM 100 ml de Tris-HCL 1M, pH 8,0
- EDTA 50mM 100 ml de EDTA 0,5M, pH 8,0
- NaCl 1,4M 82 g
- PVP-40 1% (w/v) 10 g

12. FORMULARIOS

- F-GF-CGP-PT-023, identificación de personal que conforma equipos de muestreo y de analista(s) del laboratorio vinculado(s) al diagnóstico.
- F-GF-CGP-PT-129, formulario anexo para el diagnóstico de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.
- F-CGP-PT-024, declaración jurada para la designación del laboratorio autorizado que prestará servicios al vivero de kiwis.
- F-GF-CGP-PT-025, declaración de muestreo anual de plantas madres para diagnóstico de Psa.
- F-GF-CGP-PT-130, programa de toma de muestras para diagnóstico de Psa.
- F-GF-CGP-PT-131, informe final de muestreo y diagnóstico de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa).
- F-GF-CGP-PT-132, declaración de existencia de variedades frutales al expendio.
- F-GF-CGP-PT-133, declaración de muestreo de plantas en viveros de kiwi para diagnóstico de Psa.

**FORMULARIO DE IDENTIFICACIÓN DE PERSONAL QUE CONFORMA
EQUIPOS DE MUESTREO Y DE ANALISTA(S) DEL LABORATORIO
VINCULADO(S) AL DIAGNÓSTICO**

Código: F-GF-CGP-PT-023
Versión:02

Identificación del Laboratorio:

Nombre/razón social:

Cédula de identidad N°/RUT:

Personal para las labores de muestreo:

<u>Nombre completo</u>	<u>N° de cédula de identidad</u>	<u>Cargo (Jefe equipo/apoyo)</u>	<u>Firma</u>

Identificación del analista(s):

<u>Nombre completo</u>	<u>N° de cédula de identidad</u>	<u>Firma</u>

Firma del postulante o su representante legal

Fecha recepción SAG:.....

Identificación del Laboratorio:

Nombre/razón social:

Cédula de identidad N°/RUT:

Marcar con una X el o los análisis para los cuales solicita la autorización:

Análisis a los que postula	
1. PCR convencional	
2. PCR en tiempo real	

Firma del postulante o del representante legal

Fecha:

**DECLARACIÓN JURADA PARA LA DESIGNACIÓN DEL LABORATORIO
AUTORIZADO QUE PRESTARÁ SERVICIOS AL VIVERO DE KIWIS**

Código: F-GF-CGP-PT-024
Versión:01

Por el presente instrumento, yo.....
..... Cédula de identidad N°.....,
de nacionalidad....., con domicilio en
.....,
comuna de, personal encargado del vivero de plantas de kiwis
de la empresa, declaro bajo juramento:

1- Que todas las muestras vegetales obtenidas de las plantas madres de kiwis inscritas por el vivero antes indicado para la certificación fitosanitaria libre de Psa, que están ubicadas en la comuna de deberán ser enviadas al siguiente laboratorio autorizado para que realice el diagnóstico de la bacteria Psa :

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

2- Que ante una modificación en la designación del laboratorio autorizado, informaré al SAG en un plazo no superior a 48 horas, el nombre del nuevo laboratorio acreditado al cual el Servicio deberá enviar las muestras.

Personal encargado Vivero

Nombre o representante legal
Laboratorio autorizado

Fecha recepción SAG:.....



**PROGRAMA DE TOMA MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE PSA
(USO EXCLUSIVO DEL LABORATORIO AUTORIZADO)**

Código: F-GF-CGP-PT-130
Versión:01

Logo Tercero Acreditado Toma de Muestra para Muestreo y diagnóstico de Psa

**PROGRAMA TOMA DE MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE
PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. ACTINIDIAE (PSA)**

Fecha:

ANTECEDENTES TERCERO AUTORIZADO (Emisor)	
Nombre Tercero Autorizado	
Nombre Responsable Técnico	
Dirección Oficina/ Comuna	
Correo electrónico	
Teléfono (s) (fijo/ móvil)	
Nombre del Muestreador/a (Jefe equipo)	
Teléfono (s) móvil de contacto	

IDENTIFICACION DE PREDIOS A MUESTREAR						TIPO MUESTREO (HUERTO/PLANTAS MADRES/VIVERO)	N° MUESTRAS
FECHA DE MUESTREO	REGION/COMUNA	NOMBRE DEL PREDIO/VIVERO	NOMBRE DEL PRODUCTOR/VIVERISTA	SUPERFICIE (Ha)	VARIEDAD		

INFORME FINAL DE MUESTREO Y DIAGNÓSTICO DE PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. ACTINIDAE (PSA)

Código: F-GF-CGP-PT-131
 Versión:01

Logo Tercero Acreditado
 Toma de Muestra para
 Muestreo y diagnóstico de
 Psa

INFORME FINAL DE MUESTREO Y DIAGNÓSTICO DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. ACTINIDAE*
 (PSA)

Fecha emisión:

ANTECEDENTES TERCERO AUTORIZADO (Emisor)	
Nombre Tercero Autorizado	
Nombre Responsable Técnico	
Dirección Oficina/ Comuna	
Correo electrónico	
Teléfono (s) (fijo/ móvil)	
Nombre del Muestreador/a (Jefe equipo)	
Teléfono (s) móvil de contacto	

MUESTREO Y DIAGNOSTICO PSA EN PLANTAS MADRES							
Nº PLANTELES MADRES (HUERTOS) MUESTREADOS	Nº PLANTELES MADRES (HUERTOS) MUESTREADOS	Nº PLANTELES MADRES (HUERTOS) POSITIVOS A PSA	Nº MUESTRAS COLECTADAS	Nº MUESTRAS POSITIVAS A PSA	Nº ANALISIS REALIZADOS	Nº ANALISIS POSITIVOS A PSA	OBSERVACIONES
VALPARAISO							
METROPOLITANA							
O'HIGGINS							
MAULE							
BIOBIO							
ARAUCANIA							
LOS RIOS							
LOS LAGOS							
TOTAL							

MUESTREO Y DIAGNOSTICO PSA EN VIVEROS							
REGION	Nº VIVEROS MUESTREADOS	Nº VIVEROS MUESTREADOS POSITIVOS A PSA	Nº PLANTAS MUESTREADAS	Nº PLANTAS POSITIVAS A PSA	Nº MUESTRAS COLECTADAS	Nº MUESTRAS POSITIVAS A PSA	OBSERVACIONES
VALPARAISO							
METROPOLITANA							
O'HIGGINS							
MAULE							
BIOBIO							
ARAUCANIA							
LOS RIOS							
LOS LAGOS							
TOTAL							

MUESTREO Y DIAGNOSTICO PSA EN HUERTOS (MONITOREO PARTICULAR)							
REGION	Nº HUERTOS MUESTREADOS	Nº HUERTOS POSITIVOS A PSA	Nº CUARTELES MUESTREADOS	Nº CUARTELES POSITIVOS A PSA	Nº MUESTRAS COLECTADAS	Nº MUESTRAS POSITIVAS A PSA	OBSERVACIONES
VALPARAISO							
METROPOLITANA							
O'HIGGINS							
MAULE							
BIOBIO							
ARAUCANIA							
LOS RIOS							
LOS LAGOS							
TOTAL							

OBSERVACIONES GENERALES:

**DECLARACIÓN DE EXISTENCIA DE VARIEDADES FRUTALES AL
EXPENDIO
(USO POR PARTE DEL VIVERISTA)**

Código: F-GF-CGP-PT-132
Versión:01



DECLARACIÓN DE EXISTENCIA DE VARIEDADES FRUTALES AL EXPENDIO
AÑO _____

ANTECEDENTES VIVERO	Fecha: _____
Nombre del vivero: _____	Uso Interno Of. SAG: _____
Nombre del (los) predio (s): _____	
Dirección Postal: _____	Ubicación: _____
N° Registro Vivero: _____ Teléfono/Fax: _____	Región: _____
Responsable Vivero: _____	Localidad: _____
Representante legal o propietario (a): _____	Comuna: _____
Rut Rep. Legal o propietario: _____ E-mail: _____	

Especie	Nombre de la variedad	Nombre del portainjerto	Cant. de plantas terminadas	Cantidad de plantas ojo dormido u otro material de propagación	Cantidad total de plantas	Variedad protegida SI / NO	Variedad protegida SI / NO

*Fecha de entrega: Plazo máximo 1° de junio, excepto plantas de kiwi, vides y berries, cuyo plazo máximo es el 1° de diciembre SI
 **Autorizo al SAG para la publicación de estos datos (Solo se publicará la especie, variedad y cant. declaradas de variedades conexas) NO

Nombre y Firma Representante Legal o Propietario

Fecha de recepción

Firma y Timbre SAG



DECLARACIÓN DE MUESTREO DE PLANTAS EN VIVEROS DE KIWI PARA DIAGNÓSTICO DE PSA

Código: F-GF-CGP-PT-133
Versión:01



DECLARACION DE MUESTREO DE PLANTAS EN VIVEROS DE KIWI PARA DIAGNOSTICO DE PSA (HOJA 1) TEMPORADA : 2015

USO EXCLUSIVO SAG	
FOLIO N°	
Fecha recepción	
Funcionario SAG recepción	
Funcionario SAG revisor	

REGION	
--------	--

OFICINA SAG	
-------------	--

A Antecedentes del Vivero			
Nombre vivero:			
N° Inscripción en SAG:			
Región:	Comuna	Fono	
Nombre(s) Propietario(s) Vivero:	Fono		
Nombre Contraparte técnica:	Fono		
Fax:			
E-Mail:			
Fecha declaración:			

B Antecedentes del predio (lugar donde están las plantas del vivero)			
Nombre del predio:			
N° Rol SI:			
Propietario:	Fono:		
Región:	Comuna:		
Arrendatario:	Fono		
Nombre potrero/cuartel/sector:			
Coordenadas UTM (Datum WGS 84)	HUSO		
Administrador predio:			

C. Tercero Toma de Muestra	
Nombre Tercero	
Nombre Responsable Técnico	
Dirección Comercial	
Fono/ Fax	
Firma Tercero	

SE DEBEN DECLARAR LAS PLANTAS DE VIVEROS QUE:
* SE ENCUENTREN UBICADAS EN DENTRO DE AREAS REGLAMENTADAS

ESTA DECLARACION, SOLO SERÁ VALIDADA SI ES ACOMPAÑADA POR:
CROQUIS PARA ACCEDER A VIVERO
CROQUIS DE LA DISPOSICION ESPACIAL DE LAS PARTIDAS

NOMBRE PROPIETARIO(S) VIVERO

FIRMA PROPIETARIO(S) VIVERO



DECLARACION DE MUESTREO DE PLANTAS EN VIVEROS DE KIWI PARA DIAGNOSTICO DE Psa. TEMPORADA : 2015

A. Antecedentes del Vivero	
Nombre:	
N° Inscripción SAG:	

USO EXCLUSIVO DEL VIVERISTA							USO EXCLUSIVO SAG			USO EXCLUSIVO LABORATORIO	
ESPECIE	VARIEDAD	TIPO O LUGAR DE CONFINAMIENTO	ORIGEN DEL MATERIAL	FECHA DE EXTRACCION DEL MATERIAL	N° DE PLANTAS DE LA PARTIDA	FECHA PROBABLE DE VENTA O MOVIMIENTO	N°	N°	NOMBRE	N°	N°
							MUESTRAS	ANALISIS	INSPECTOR	FOLIO	CORRELATIVO

NOMBRE PROPIETARIO(A) VIVERO

FIRMA PROPIETARIO(A) VIVERO