

A continuación se indican los requisitos que deben cumplir los huertos, packings y frigoríficos para la exportación de manzanas desde Chile a China, establecidos por el "ADDENDUM DEL PROTOCOLO DE REQUISITOS FITOSANITARIOS PARA LA EXPORTACIÓN DE MANZANAS CHILENAS A CHINA ACORDADO ENTRE EL MINISTERIO DE AGRICULTURA DE CHILE Y LA DIRECCIÓN GENERAL DE CUARENTENA, INSPECCIÓN Y SUPERVISIÓN DE CALIDAD DE LA REPÚBLICA POPULAR CHINA", a fin de evitar el riesgo de presencia del hongo *Neofabraea alba*.

1. Inscripción de participantes

- 1.1. Los códigos otorgados por el Sistema de Registro Agrícola para huertos (CSG) y empacadoras (CSP) deben utilizarse en el etiquetado del producto.

2. Medidas a nivel de huerto

Todo huerto de manzanas que dese exportar a China debe:

- 2.1. Disponer de certificación internacional en Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Esta certificación debe estar vigente, al menos, mientras los frutos se encuentren en el huerto.
- 2.2. Realizar un manejo fitosanitario en pre cosecha, mediante la aplicación de fungicidas autorizados por el SAG para control de este hongo (enumerados en el anexo 1). El tratamiento debe efectuarse a partir de 30 días antes de la cosecha y repetirse en caso de lluvia. Debe existir registro de la aplicación realizada para posterior verificación de parte de AQSIQ o SAG (en el anexo 2 se presenta un formato referencial, con la información mínima requerida).
- 2.3. Cada participante debe hacer llegar a la Oficina SAG correspondiente a su ubicación, la información de la certificación en BPA y planilla de aplicaciones, a fin de elaborar un listado de huertos autorizados para exportación a China.

3. Medidas a nivel de planta empacadora

- 3.1. Toda manzana debe recibir un tratamiento post-cosecha antes o durante su embalaje, con alguno de los fungicidas indicados en el anexo 1. Debe existir registro de la aplicación realizada para posterior verificación de parte de AQSIQ o SAG (en el anexo 5 se presenta un formato referencial, con la información mínima requerida). Se recuerda que en el caso de manzanas cuyo almacenaje será menor a 60 días previo a su exportación, se debe tomar una muestra en forma previa a la realización de este tratamiento, de acuerdo a lo indicado en el numeral 3.4 de este capítulo.

- 3.2. Contar con un análisis de residuos de pesticidas de cada huerto.
- 3.3. Contar con salas especialmente acondicionadas en la planta empacadora o en instalaciones independientes a temperaturas de $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ y alta humedad relativa. En forma previa al inicio de su utilización, cada sala de mantención debe solicitar una visita a la oficina SAG correspondiente a la ubicación de la sala, a fin de que SAG verifique que se cuente con un sistema de registro de temperaturas sin adulteraciones (no se permite registro manual de temperatura).

3.4. Para manzanas con menos de 60 días de almacenamiento previo a su exportación, se debe cumplir lo siguiente:

- 3.4.1. Se debe tomar una muestra de al menos 300 manzanas de cada huerto (CSG) almacenado en la Planta o a almacenar en la Planta, esto puede ser realizado en el huerto desde 10 días antes de la cosecha o al ingreso de la fruta a la planta frutícola, las muestras deben ser tomadas al azar de los distintos bins que contengan fruta del mismo CSG). Esta muestra debe comprender un mismo manejo fitosanitario, por lo cual, si en un mismo CSG existen variedades con diferente manejo fitosanitario, se debe colectar la muestra para cada una de ellas. Un ejemplo de esto lo constituye el caso de variedades con diferente fecha de cosecha y con diferente manejo fitosanitario.

Adicionalmente, la muestra debe ser colectada antes de recibir el tratamiento con un fungicida post-cosecha. Este muestreo no será válido si la fruta se almacena por un plazo mayor al definido.

Esta actividad debe quedar registrada en un documento foliado de acuerdo al ejemplo del anexo 3.

Cada establecimiento debe avisar a la oficina SAG correspondiente a la ubicación del establecimiento o del huerto (según sea el lugar en que se recolecta la muestra) al menos un día antes la realización de esta actividad a fin de que pueda ser supervisada por SAG.

- 3.4.2. En caso de que la fruta de un huerto sea procesada en diferentes establecimientos, cada uno de ellos debe realizar el muestreo de los 300 frutos por CSG. Se recuerda que en caso de que se detecte la presencia del hongo *Neofabraea alba*, el CSG de origen de la fruta será suspendido para exportación a China durante el resto de la temporada.
- 3.4.3. Dicha muestra será almacenada durante 15 días en salas de mantención (ver numeral 3.3).

El ingreso de la muestra a la sala de mantención debe ser avisado por cada establecimiento al menos con un día de anticipación a la Oficina SAG

correspondiente a su ubicación a fin de que la actividad pueda ser supervisada por SAG.

Los datos de ingreso de la muestra a la sala de mantención deben consignarse en un documento foliado de acuerdo al ejemplo del anexo 4.

La temperatura de almacenamiento debe mantenerse en los niveles indicados en el 3.3. No se considerarán válidas para China salas de mantención en las cuales se verifique que la temperatura no se mantuvo en dicho margen durante 48 horas en el plazo de 15 días.

- 3.4.4. Finalizado el plazo de 15 días, la totalidad de la muestra será inspeccionada por personal del SAG o bajo la supervisión del mismo en busca de síntomas o signos sospechosos del hongo. Para esto, cada sala de mantención debe avisar a la oficina SAG correspondiente a su ubicación, al menos un día antes, la fecha en que finalizará el periodo de mantención y se realizará la revisión.

La muestra podrá ser analizada por la Contraparte Profesional, Contraparte Técnica o personal con conocimientos del área fitosanitaria.

El resultado de la inspección de la muestra debe ser registrado en un documento foliado de acuerdo al ejemplo del anexo 4.

- 3.4.5. En caso de determinarse la presencia de síntomas o signos del hongo, la fruta afectada y correctamente identificada será remitida al laboratorio SAG (Lo Aguirre) o a laboratorios autorizados por SAG para verificar si se trata o no de *N. alba*.
- 3.4.6. Si el análisis de laboratorio confirma la presencia de *N. alba*, la fruta no podrá exportarse a China y el huerto será suspendido del programa de exportación a China por el resto de la temporada. Las manzanas de huertos que hayan aprobado la inspección podrán continuar con el proceso de exportación.
- 3.4.7. La empresa debe disponer de un resumen de las muestras ingresadas a la sala de mantención, de acuerdo al formato disponible en el anexo 7.
- 3.4.8. En caso de que la muestra sea almacenada en una sala de mantención externa a la Planta, el responsable de la sala de mantención debe disponer de un resumen de las muestras ingresadas a la sala de mantención, de acuerdo al formato del anexo 8.

3.5. Para manzanas con 60 o más días de almacenamiento previo a su exportación, se debe cumplir lo siguiente:

- 3.5.1. Las manzanas deben encontrarse almacenadas en cámaras a temperaturas entre -1°C y $+1^{\circ}\text{C}$.
- 3.5.2. A lo menos 15 días antes de la apertura de la cámara se debe obtener una muestra de al menos 300 frutos de cada huerto (CSG) almacenado en la Planta. La muestra debe incluir fruta almacenada en las distintas cámaras de la Planta embaladora.

En caso de que lo anteriormente señalado no sea operativamente factible de realizar, la empresa podrá proponer al SAG un esquema distinto (ej. recolectar 300 frutos por huerto por cada cámara en la que se encuentre un determinado CSG), pero que cumpla con el mínimo exigido por China.

Esta actividad debe quedar registrada en un documento foliado de acuerdo al ejemplo del anexo 3. Cada establecimiento debe avisar previamente (al menos un día) la realización de esta actividad a fin de que pueda ser supervisada por SAG.

- 3.5.3. La muestra será almacenada durante 15 días en salas de mantención (ver numeral 3.3).

El ingreso de la muestra a la sala de mantención debe ser avisado por cada establecimiento al menos con un día de anticipación a la Oficina SAG correspondiente a su ubicación a fin de que la actividad pueda ser supervisada por SAG.

Los datos de ingreso de la muestra a la sala de mantención deben consignarse en un documento foliado de acuerdo al ejemplo del anexo 4.

La temperatura de almacenamiento debe mantenerse en los niveles indicados en el 3.3. No se considerarán válidas para China salas de mantención en las cuales se verifique que la temperatura no se mantuvo en dicho margen durante 48 horas en el plazo de 15 días.

- 3.5.4. Finalizado el plazo de 15 días, la totalidad de la muestra será inspeccionada por personal del SAG o bajo la supervisión del mismo en busca de síntomas o signos sospechosos del hongo. Para esto, cada sala de mantención debe avisar a la oficina SAG correspondiente a su ubicación, al menos un día antes, la fecha en que finalizará el análisis y se realizará la revisión.

La muestra podrá ser analizada por la Contraparte Profesional, Contraparte Técnica o personal con conocimientos del área fitosanitaria.

El resultado de la inspección de la muestra debe ser registrado en un documento foliado de acuerdo al ejemplo del anexo 4.

- 3.5.5. En caso de determinarse la presencia de síntomas o signos del hongo, la fruta afectada y correctamente identificada será remitida al laboratorio SAG (Lo Aguirre) o a laboratorios autorizados por SAG para verificar si se trata o no de *N. alba*.
 - 3.5.6. Si el análisis de laboratorio confirma la presencia de *N. alba*, la fruta no podrá exportarse a China y el huerto será suspendido del programa de exportación a China por el resto de la temporada. Las manzanas de huertos que hayan aprobado la inspección podrán continuar con el proceso de exportación.
 - 3.5.7. La empresa debe disponer de un resumen de las muestras ingresadas a la sala de mantención, de acuerdo al formato disponible en el anexo 7.
 - 3.5.8. En caso de que la muestra sea almacena en una sala de mantención externa a la Planta, el responsable de la sala de mantención debe disponer de un resumen de las muestras ingresadas a la sala de mantención, de acuerdo al formato del anexo 8.
- 3.6. Se recuerda que toda manzana debe recibir un tratamiento post-cosecha antes o durante su embalaje (ver numeral 3.1).

4. ANALISIS DE MUESTRA EN LABORATORIO

- 4.1. Un resumen con la descripción de las actividades requeridos para el análisis de la muestra en laboratorio y tiempos estimados de análisis se encuentran en el anexo 9 de este documento.
- 4.2. Si el análisis de laboratorio confirma la presencia de *N. alba*, la fruta no podrá exportarse a China y el huerto será suspendido del programa de exportación a China por el resto de la temporada.

5. INSPECCIÓN SAG

- 5.1. Durante la inspección la inspección fitosanitaria oficial, las empresas deben presentar la siguiente información, la cual será verificada:
 - 5.1.1. Análisis de residuos de pesticidas.
 - 5.1.2. Planilla de registro de muestreo de 300 frutos.
 - 5.1.3. Registro de resultados de análisis del hongo *Neofabraea alba*.
 - 5.1.4. Planilla de registro de tratamiento de fungicida de post-cosecha (en el establecimiento).

- 5.2. Una vez verificado lo anterior se procederá con la inspección oficial SAG, la cual debe considerarse un nivel de inspección del 2% del lote presentado, con un mínimo de 1200 frutos a inspeccionar.
- 5.3. Solamente lotes que aprueben esta inspección podrán ser exportados a China.
- 5.4. La inspección fitosanitaria del SAG tendrá una vigencia de 30 días. Finalizado dicho plazo, debe solicitarse una nueva inspección fitosanitaria oficial para exportación a China si la fruta aún se mantiene en cámara. La nueva inspección debe cumplir con el mismo nivel de inspección establecido por China.


6. CERTIFICACIÓN FITOSANITARIA

- 6.1. Los puertos de ingreso autorizados para el ingreso de manzanas a China corresponden a los siguientes: Dalian, Tianjin, Shanghai, Nansha (Guangdong), Shekou (Shenzhen), Yantian (Shenzhen) y Huang pu (Guangdong).
- 6.2. La siguiente declaración adicional debe consignarse en el Certificado Fitosanitario:
"THE FRUITS HAVE BEEN THOROUGHLY INSPECTED AND FOUND FREE FROM THE MEDITERRANEAN FRUIT FLY AND OTHER QUARANTINE PESTS"
"THIS IS TO FURTHER CERTIFY THAT THIS APPLE BATCH HAS BEEN INSPECTED AND TREATED IN COMPLIANCE WITH THE PROTOCOL AND ADDENDUM BETWEEN CHINA AND CHILE".
- 6.3. Debe consignarse en el campo "Declaración Adicional" del certificado fitosanitario los códigos (CSG y CSP) de huertos y empacadoras correspondientes en el envío, lo cual debe ser realizado con el siguiente formato (cada empresa es responsable de comunicar dichos antecedentes a su agencia de aduana para que la información sea ingresada en el certificado fitosanitario):
"PACKING CODE: 111111, 222222 / ORCHARD CODE: 333333, 444444, etc."

Dicha información debe encontrarse en el campo observaciones de la planilla de despacho o en un documento adjunto a la planilla (en anexo 6 se encuentra un formato de ejemplo).


7. OTROS

- 7.1. Tanto SAG como inspectores de AQSIQ, podrán realizar supervisiones en cualquier momento sobre los participantes con el fin de verificar el cumplimiento de lo establecido en el *addendum*. En caso de que AQSIQ solicite efectuar una supervisión al programa, será avisado oportunamente.

	LINEAMIENTOS PARA EXPORTACIÓN DE MANZANAS A CHINA	Fecha: 14-09-2020
--	--	-------------------

ANEXO 1. Listado de productos autorizados, con registro SAG, para el control de la enfermedad "ojo de buey", para exportación de manzanas a China.

Nº SAG	NOMBRE COMERCIAL	INGREDIENTE ACTIVO*	TIPO DE FORMULACIÓN	GRUPO QUÍMICO
2041	CAPTAN 80 WP	CAPTAN	POLVO MOJABLE	FTALIMIDAS
2185	CUPRODUL WG	ÓXIDO CUPROSO	GRANULADO DISPERSABLE	COMPUESTOS DE COBRE
2322	PHYTON-27	SULFATO DE COBRE PENTAHIDRATADO	CONCENTRADO SOLUBLE	COMPUESTOS DE COBRE
2357	SWITCH 62,5 WG	CIPRODINILO / FLUDIOXONILO	GRANULADO DISPERSABLE	ANILINOPIRIMIDINAS / FENILPIRROLES
2379	STROBY SC	KRESOXIM-METILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	ESTROBILURINAS
2456	SCHOLAR 50 WP	FLUDIOXONILO	POLVO MOJABLE	FENILPIRROLES
2463	COMET	PIRACLOSTROBINA	CONCENTRADO EMULSIONABLE	METOXICARBAMATOS
2490	CHAMP DP	HIDRÓXIDO DE COBRE	GRANULADO DISPERSABLE	COMPUESTOS DE COBRE
2545	MASTERCOP	SULFATO DE COBRE PENTAHIDRATADO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	COMPUESTOS DE COBRE
2559	HIDRO-CUP WG	HIDRÓXIDO DE COBRE	GRANULADO DISPERSABLE	COMPUESTOS DE COBRE
2567	PENBOTEC 400 SC	PIRIMETANILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	ANILINOPIRIMIDINAS
2568	ORTHOCLIDE	CAPTAN	POLVO MOJABLE	FTALIMIDAS
2642	MYSTIC 520 SC	TRIFLOXISTROBINA / PIRIMETANILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	OXIMINO ACETATOS / ANILINO PIRIMIDINAS
2648	KREXIM 50 SC	KRESOXIM-METILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	OXIMINOACETATOS
2670	HIDROCOB 77 WP	HIDRÓXIDO DE COBRE	POLVO MOJABLE	CÚPRICOS
2679	SCHOLAR 230 SC	FLUDIOXONILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	FENILPIRROLES
2681	ECOFOG 160	PYRIMETHANIL	TERMONEBULIZABLE	ANILINOPIRIMIDINAS
2697	BONNUS 400 SC	PIRIMETANILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	ANILINOPIRIMIDINAS
2699	PYREMPOST 400 SC	PIRIMETANILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	ANILINOPIRIMIDINAS
2702	HIDROXICOBRE 50 WP	HIDRÓXIDO DE COBRE	POLVO MOJABLE	COMPUESTOS DE COBRE
2717	KOCIDE 2000	HIDRÓXIDO DE COBRE	GRANULADO DISPERSABLE	COMPUESTOS DE COBRE
2728	CUPRODUL FLO	ÓXIDO CUPROSO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	COMPUESTOS DE COBRE
2749	KRYMET 50 SC	KRESOXIM-METILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	OXIMINOACETATOS
2784	HIDROXICOBRE 35 WG	HIDRÓXIDO DE COBRE	GRANULADO DISPERSABLE	COMPUESTOS DE COBRE
2812	SHIELD BRITE PYR 400 SC	PIRIMETANILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	ANILINOPIRIMIDINAS

	LINEAMIENTOS PARA EXPORTACIÓN DE MANZANAS A CHINA	Fecha: 14-09-2020
--	--	-------------------

Nº SAG	NOMBRE COMERCIAL	INGREDIENTE ACTIVO*	TIPO DE FORMULACIÓN	GRUPO QUÍMICO
2823	KENBYO	KRESOXIM-METILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	OXIMINO ACETATOS
2826	KRESOXIM METIL 500 SC AGROSPEC	KRESOXIM-METILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	OXIMINO ACETATOS
2839	KRESOX	KRESOXIM-METILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	OXIMINO ACETATOS
2841	PYRUS 400 SC	PRIMETANILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	ANILINOPIRIMIDINAS
2848	HIDROXICOBRE 50 WG	HIDRÓXIDO DE COBRE	GRANULADO DISPERSABLE	COMPUESTOS DE COBRE
2881	EFOG 80 FDL	FLUDIOXONILO	TERMONEBULIZABLE	FENILPIRROLES
2886	SHIELD BRITE FDL 230 SC	FLUDIOXONILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	FENILPIRROLES
2966	ActiSeal PYR	PRIMETANILO	SUSPENSIÓN CONCENTRADA	ANILINOPIRIMIDINAS
2967	SCHOLAR RTU	FLUDIOXONILO	TERMONEBULIZABLE	FENILPIRROLES

Información referencial, pudiendo este listado ser actualizado por el SAG.

Es responsabilidad de cada empresa cumplir los LMR establecidos por la autoridad oficial del país de destino.



LINEAMIENTOS PARA EXPORTACIÓN DE MANZANAS A CHINA

Fecha: 14-09-2020

ANEXO 2. DECLARACION DE APLICACIONES PRECOSECHA

Nombre huerto:	
Código huerto (CSG):	
Comuna:	
Fecha inicio cosecha:	

Yo, _____ en mi calidad de
_____ declaro que he realizado los
siguientes tratamientos químicos para el control de ***Neofabraea alba***.

Fecha Aplicación	Producto Comercial	Ingrediente Activo	Dosis/100 L	Vol. Agua/ha.

Certifico que lo anterior se ajusta a la realidad

NOMBRE

FIRMA

Nota: (1) Este formato es meramente referencial, pudiendo la empresa emplear otro formato que contenga la misma información.



LINEAMIENTOS PARA EXPORTACIÓN DE MANZANAS A CHINA

Fecha: 14-09-2020

ANEXO 3. REGISTRO DE TOMA DE MUESTRA DE 300 FRUTOS

Datos generales:

Folio	
Nombre huerto	
Código huerto (CSG)	
Nombre Central Frutícola o empacadora	
Código (CSP) Central Frutícola o empacadora	
Cantidad de frutos colectados	
Fecha recolección muestra	
Observaciones	

La muestra será almacenada en la siguiente sala de mantención para revisión de *Neofabraea alba*:

(Indicar el lugar en donde se almacenará la muestra por 15 días)

**Nombre y firma
personal responsable muestreo**



LINEAMIENTOS PARA EXPORTACIÓN DE MANZANAS A CHINA

Fecha: 14-09-2020

ANEXO 4. MANTENCIÓN Y RESULTADO ANÁLISIS DE 300 FRUTOS

DATOS INGRESO MUESTRA

Folio	
Nombre sala de mantención realización de análisis	
Código (CSP) Central Frutícola o empacadora	
Nombre Central Frutícola o empacadora de la fruta	
Código huerto (CSG) de origen de la fruta	
Nombre huerto de origen de la fruta	
Cantidad de frutos ingresados	
Fecha de ingreso de muestra a sala de mantención	
Fecha de recolección de la muestra	

**Nombre y firma
personal responsable ingreso**

RESULTADO ANÁLISIS (seleccionar alternativa correspondiente si corresponde)

Fecha revisión de la muestra	
Presenta síntomas sospechosos de <i>Neofabraea alba</i> (Si / No):	
Indicar cantidad de frutos con síntomas:	
Envía muestra a laboratorio (Si / No)	
Indicar folio identificación muestra laboratorio (si corresponde)	

**Nombre y firma
personal responsable revisión**



LINEAMIENTOS PARA EXPORTACIÓN DE MANZANAS A CHINA

Fecha: 14-09-2020

ANEXO 5. DECLARACION DE APLICACIONES POST-COSECHA

Información huerto de origen de la fruta

Nombre huerto:	
Código huerto (CSG):	

Información establecimiento en donde se realiza el tratamiento

Nombre Establecimiento:	
Código establecimiento (CSP):	

Descripción tratamiento

Fecha	Producto Comercial	Ingrediente activo	Dosis	Otros

Certifico que lo anterior se ajusta a la realidad

NOMBRE

FIRMA

Nota: Este formato es meramente referencial, pudiendo la empresa emplear otro formato que contenga la misma información.



LINEAMIENTOS PARA EXPORTACIÓN DE MANZANAS A CHINA

Fecha: 14-09-2020

ANEXO 6. INFORMACIÓN CSP y CSG PARA INCORPORAR AL CERTIFICADO FITOSANITARIO

Información despachador

Nombre establecimiento:	
Código establecimiento (CSP):	

Información para certificado fitosanitario

PACKING CODE: 111111, 222222

ORCHARD CODE: 333333, 444444, 555555

Nota: Formato referencial, pudiendo la empresa emplear otro formato que contenga la misma información.

ANEXO 9. PROTOCOLO IDENTIFICACIÓN *NEOFABRAEA ALBA*

A continuación, se describen los principales pasos que sigue el laboratorio Lo Aguirre para analizar las muestras sospechosas de *Neofabrea alba* que se captan en el Programa Origen por el proceso de certificación de manzanas destinadas a China.

1. Aislamiento

- a) Muestras con síntomas y/o signos de Bull's eye rot, serán depositadas en cámaras húmedas (cajas plásticas transparentes limpias, previamente desinfectadas con alcohol al 70%), mantenidas a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 días como mínimo.
- b) En forma paralela a lo anterior, del margen de la(s) lesión(es) se seleccionarán pequeños trozos (3-4 de $5\text{-}6\text{mm}^2$ c/u), los que se desinfectarán superficialmente (alcohol al 70% o NaOCl al 1.5% por 30-60 segundos) y sembrarán en medio de cultivo PDA (39g/L, Difco Lab.).
- c) Las placas que se generen de la siembra serán incubadas a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 15 días como mínimo, período en el cual se revisará visualmente el desarrollo de colonias características del hongo (color, forma, etc.). De ser necesario, se realizarán subcultivos para obtener aislados puros.

2. Identificación *Neofabraea* sp.

- a) Tanto en frutos, como en cultivo, la identificación del género *Neofabraea* se realizará microscópicamente, comparando la descripción morfológica descrita en la literatura para este patógeno, con el aislado analizado (Verkley et al. 1999 y Henríquez et al. 2004).
- b) Todos los aislados sospechosos o similares a *Neofabraea* sp., serán analizados molecularmente por PCR.

3. Identificación *Neofabraea alba*

A partir de aislados caracterizados como *Neofabraea* sp. (desde fruto y/o cultivo), se extraerá ADN y realizará análisis de PCR con partidores específicos, según lo descrito por Soto-Alvear et al. (2013).

4. Protocolo de PCR

4.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se utilizará la metodología descrita por Soto-Alvear S. et al. (2013) con algunas modificaciones, sin perjuicio que pueda utilizarse kit comercial para obtención de ADN de microorganismos.

En resumen, la metodología consiste en: de cada aislado sospechoso desarrollado en PDA y/o fruto sospechoso, se toma aproximadamente 0.1g de micelio/espores y se deposita en tubo eppendorf o mortero estéril, el cual contiene aproximadamente 1-2mL

de buffer de extracción/lisis (200 mM de Tris HCl [pH 7.5], 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA, and 0.5% de sodium dodecyl sulfato).

Se macera u homogeniza con pistilo, se recupera 1mL en un tubo eppendorf nuevo y se le agregan 2 μ L de proteinasa K, el tubo se incuba a 65°C por 1 hora, luego se centrifuga a 13000 rpm por 5 minutos. Se recuperan 750 μ L de sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo, se mezcla con 750 μ L de isopropanol frío y se deja incubar a temperatura ambiente (20-22°C) por 15 minutos, luego se centrifuga a 13000 rpm por 10 minutos. Se desecha el isopropanol y se lava el pellet obtenido con 1mL de Etanol al 70%, se centrifuga nuevamente a 13000 rpm durante 2 minutos y se elimina el etanol, dejando secar el pellet durante 30-40 minutos a 30-40°C. Posteriormente, se hidrata el pellet con 100 μ L de agua destilada estéril grado molecular agregándole 1 μ L de RNAsa (1mg/mL) y se incuba a 37°C por 10-15 minutos. El ADN obtenido se almacena a -20°C o se utiliza inmediatamente como templado de PCR.

4.2. PCR

Para el desempeño de la técnica de PCR, se utilizarán los reactivos y concentraciones especificadas por Soto-Alvear S. et al 2013: cada reacción considera un volumen total de 25 μ L conteniendo 0.2 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl₂, 0.6 μ M de cada primer específico a *N. alba* (Forward: 5'-TGA TGA GAC CTT CTG TAT CG-3'; Reverse: 5'-AGC AGA GCA GGT CAA GTA A-3') y 2 unidades de Taq DNA polymerase en Buffer Taq PCR 1x. Se utilizará 1 a 10 ng de ADN purificado.

Para cada ensayo, se contemplará el uso de ADN de un control positivo a *N. alba*, control negativo correspondiente a ADN de cualquier otro hongo y un control negativo absoluto o agua.

La amplificación se realizará en un termociclador, bajo las siguientes condiciones: 3 min a 96°C; seguido de 35 ciclos de amplificación de 1 min a 96°C, 1 min a 58°C y 2 min a 72°C y una temperatura de extensión final de 72°C por 10 min. Terminados los ciclos, los tubos son mantenidos a una temperatura de 4°C.

Los resultados se visualizarán en agarosa al 1.5% teñido con GelRed y bandas serán visualizadas en transiluminador con luz UV. Una muestra se considerará positiva, si se observa una banda específica única de 358 pares de base.

Resumen del Proceso Total (tiempo requerido para obtención de análisis)

Proceso	Tiempo Requerido
Captación y envío de muestra	1-2 días
Recepción muestras en Laboratorio	1-2 días
Cámara Húmeda y/o Aislamiento	10-15 días
Identificación Morfológica y por PCR	2-3días
Total Días para Análisis en laboratorio (desde la recepción de la muestra)	13-20 días
Comunicación de resultados	1-2 días
Total Proceso desde Toma de muestra hasta comunicación resultados	15-24 días

Los tiempos de diagnóstico varían dependiendo de la cantidad de muestras a analizar y el tipo de análisis que se realice, aumentando en el caso de ser necesario realizar siembra en medio de cultivo (el crecimiento del patógeno es bastante lento).

Referencias

Garipey, T. D., Levesque, C. A., de Jong, S. N., and Rahe, J. E. 2003. Species-specific identification of the *Neofabraea* pathogen complex associated with pome fruits using PCR and multiplex DNA amplification. *Mycol. Res.* 107:528-536.

Henríquez, J. L., Sugar, D., and Spotts R. A. 2004. Etiology of bull's eye rot of pear caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington and California. *Plant Disease* 88:1134-1138.

Soto-Alvear, S., Lolas, M., Rosales, I. M., Chávez, E. R., and Latorre, B. A. 2013. Characterization of the bull's eye rot of apple in Chile. *Plant Disease* 97:485-490.

Verkley, G. J. 1999. A monograph of the genus *Pezicula* and its anamorphs. *Stud. Mycol.* 44:1-176.