|  |  |
| --- | --- |
|  | S |
| Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales |  |

|  |  |
| --- | --- |
| Comité TécnicoQuincuagésima séptima sesiónGinebra, 25 y 26 de octubre de 2021 | TC/57/17Original: InglésFecha: 6 de septiembre de 2021 |

Revisión parcial de las directrices de examen de la lechuga

Documento preparado por un experto de los Países Bajos

Descargo de responsabilidad: el presente documento no constituye un documento de política u orientación de la UPOV

 El presente documento tiene por objeto exponer una propuesta de revisión parcial de las directrices de examen de la lechuga (documento TG/13/11 Rev.).

 En su quincuagésima quinta sesión,[[1]](#footnote-2) el Grupo de Trabajo Técnico sobre Hortalizas (TWV) examinó una propuesta de revisión parcial de las directrices de examen de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) sobre la base de los documentos TG/13/11 Rev. y TWV/55/11 “*Partial Revision of the Test Guidelines for Lettuce*” y propuso efectuar las modificaciones que se exponen a continuación (véase el párrafo 121 del documento TWV/55/16 “*Report*”):

a) Cambio en el punto 9.3 “Variedades de control” del actual método de ensayo biológico de la Ad. 53 “Resistencia al *Lettuce mosaic virus* (LMV), Patotipo II”

b) Añadido de un nuevo método para el análisis de marcadores de ADN a la Ad. 53 “Resistencia al *Lettuce mosaic virus* (LMV), Patotipo II”

 Los cambios propuestos se indican a continuación como texto resaltado y subrayado (inserción) y ~~tachado~~ (eliminación).

## Cambios propuestos para la Ad. 53 “Resistencia al *Lettuce mosaic virus* (LMV), Patotipo II”

*Texto actual*

Ad. 53: “Resistencia al *Lettuce mosaic virus* (LMV), Patotipo II”

|  |  |
| --- | --- |
| 1. Agente patógeno | *Lettuce mosaic virus* |
| 2. Estado de cuarentena | no |
| 3. Especie huésped | lechuga: *Lactuca sativa* L. |
| 4. Fuente del inóculo | GEVES[[2]](#footnote-3) (FR) o *Naktuinbouw*[[3]](#footnote-4) (NL) |
| 5. Aislado | patotipo II (los aislados LMV-0 y Ls1 pertenecen al mismo patotipo) |
| 6. Establecimiento de la identidad del aislado | controles resistentes y susceptibles |
| 7. Establecimiento de la capacidad patógena | inoculación del control susceptible |
| 8. Multiplicación del inóculo |   |
|  8.2 Variedad de multiplicación | control susceptible |
|  8.3 Estado de desarrollo en el momento de la inoculación | 2-3 hojas |
|  8.4 Medio de inoculación | 0,05 M de PBS, 0,25% (p/v) de Na2SO3 0,5% C5H10NNaS2.3H2O, 4% de carborundo y 5% de carbón activado |
|  8.5 Método de inoculación | frotación; se puede repetir 4 días después; tras la inoculación, mantener la humedad elevada durante 1-2 horas |
|  8.6 Cosecha del inóculo | hoja fresca homogeneizada en un tampón (50% p/v);las hojas liofilizadas se pueden conservar menos de 1 año almacenadas; conservación a largo plazo a –80°C. |
|  8.7 Comprobación del inóculo cosechado | comparar con una inoculación simulada con “tampón LMV” + carborundo + carbón |
|  8.8 Período de conservación/viabilidad del inóculo | 2 h a 4°C o sobre hielo |
| 9. Formato del examen |   |
|  9.1 Número de plantas por genotipo | 20 como mínimo |
|  9.2 Número de repeticiones | 1 |
|  9.3 Variedades de control | susceptibles: Bijou (roja), Hilde II (verde), Sprinter (verde), Sucrine (verde)resistentes: Capitan (verde), Corsica (verde), Diveria (roja)  |
|  9.4 Diseño del ensayo | en la misma bandeja varias plantas en las que se ha simulado la inoculación |
|  9.5 Lugar del ensayo | cámara climática |
|  9.6 Temperatura | 15-22°C tras la inoculación |
|  9.7 Luz | 12-16 horas de luz, aprox. 5.000 lux |
| 10. Inoculación |   |
|  10.1 Preparación del inóculo | hojas frescas trituradas en “tampón LMV” reciente, sin olvidar el carborundo y el carbón activado |
|  10.3 Estado de desarrollo en el momento de la inoculación | 1ª hoja bien desarrollada en el momento de la 1ª inoculación; 4 días después se puede realizar una 2ª inoculación |
|  10.4 Método de inoculación | frotación; enjuagar para eliminar el carborundo |
|  10.7 Observaciones finales | 21 días después de la inoculación  |
| 11. Observaciones |   |
|  11.1 Método | valoración visual de la intensidad del mosaico; comparar con las variedades estándar, preferiblemente del mismo tipo de crecimiento. |
|  11.2 Escala de observación | resistente = sin síntomas |
|   | susceptible = retraso del crecimiento, hojas jóvenes con mosaico, rizado de las hojas |
|  11.3 Validación del ensayo | las variedades estándar deben ajustarse a la descripción |
| 12. Interpretación de los datos en función de los niveles de los caracteres de la UPOV  | clasificar cada planta en resistente o susceptible, véase 11.2.  |
| 13. Puntos de control esenciales | la variedad Sprinter es menos susceptible que muchas otras variedades susceptibles; se la puede emplear para detectar una presión baja de inoculación en un experimento en concreto. la pigmentación antociánica de las hojas puede ocultar los síntomas del mosaico y para las variedades verdes la fecha de observación puede ser más temprana, según la reacción de las variedades estándar en el ensayo.  |

*Nuevo texto propuesto*

Ad. 53: “Resistencia al *Lettuce mosaic virus* (LMV), Patotipo II”

La resistencia al patotipo II se ha de evaluar en un ensayo biológico (método i) o en un análisis de marcadores de ADN (método ii).

1. Ensayo biológico

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agente patógeno | *Lettuce mosaic virus* |
| 2. | Estado de cuarentena | no |
| 3. | Especie huésped | lechuga: *Lactuca sativa* L. |
| 4. | Fuente del inóculo | GEVES[[4]](#footnote-5) (FR) o *Naktuinbouw*[[5]](#footnote-6) (NL) |
| 5. | Aislado | patotipo II (los aislados LMV-0 y Ls1 pertenecen al mismo patotipo) |
| 6. | Establecimiento de la identidad del aislado | controles resistentes y susceptibles |
| 7. | Establecimiento de la capacidad patógena | inoculación del control susceptible |
| 8. | Multiplicación del inóculo |  |
| 8.2 | Variedad para la multiplicación | control susceptible |
| 8.3 | Estado de desarrollo en el momento de la inoculación | 2-3 hojas |
| 8.4 | Medio de inoculación | 0,05 M de PBS, 0,25% (p/v) de Na2SO3 0,5% C5H10NNaS2.3H2O, 4% de carborundo y 5% de carbón activado  |
| 8.5 | Método de inoculación | frotación; se puede repetir 4 días después; tras la inoculación, mantener la humedad elevada durante 1-2 horas  |
| 8.6 | Cosecha del inóculo | hoja fresca homogeneizada en un tampón (50% p/v);las hojas liofilizadas se pueden conservar menos de 1 año almacenadas; conservación a largo plazo a –80°C. |
| 8.7 | Comprobación del inóculo cosechado | comparar con una inoculación simulada con “tampón LMV” + carborundo + carbón |
| 8.8 | Período de conservación/viabilidad del inóculo | 2 h a 4°C o sobre hielo |
| 9. | Formato del examen |  |
| 9.1 | Número de plantas por genotipo | 20 como mínimo |
| 9.2 | Número de repeticiones | 1 |
| 9.3 | Variedades de control | susceptibles: Bijou (roja), Hilde II (verde), Sprinter (verde), Sucrine (verde)resistentes: Capitan (verde), Corsica (verde), ~~Diveria (roja)~~ Multired 80 (roja) |
| 9.4 | Diseño del ensayo | en la misma bandeja varias plantas en las que se ha simulado la inoculación |
| 9.5 | Lugar del ensayo | cámara climática |
| 9.6 | Temperatura | 15-22°C tras la inoculación |
| 9.7 | Luz | 12-16 horas de luz, aprox. 5.000 lux |
| 10. | Inoculación |  |
| 10.1 | Preparación del inóculo | hojas frescas trituradas en “tampón LMV” reciente, sin olvidar el carborundo y el carbón activado |
| 10.3 | Estado de desarrollo en el momento de la inoculación | 1ª hoja bien desarrollada en el momento de la 1ª inoculación; 4 días después se puede realizar una 2ª inoculación |
| 10.4 | Método de inoculación | frotación; enjuagar para eliminar el carborundo |
| 10.7 | Observaciones finales | 21 días después de la inoculación  |
| 11. | Observaciones |  |
| 11.1 | Método | valoración visual de la intensidad del mosaico; comparar con las variedades estándar, preferiblemente del mismo tipo de crecimiento. |
| 11.2 | Escala de observación | resistente = sin síntomassusceptible = retraso del crecimiento, hojas jóvenes con mosaico, rizado de las hojas |
| 11.3 | Validación del ensayo | las variedades estándar deben ajustarse a la descripción |
| 12. | Interpretación de los datos en función de los niveles de expresión de los caracteres de la UPOV | clasificar cada planta en resistente o susceptible, véase 11.2. |
| 13. | Puntos de control esenciales | la variedad Sprinter es menos susceptible que muchas otras variedades susceptibles; se la puede emplear para detectar una presión baja de inoculación en un experimento en concreto. la pigmentación antociánica de las hojas puede ocultar los síntomas del mosaico y para las variedades verdes la fecha de observación puede ser más temprana, según la reacción de las variedades estándar en el ensayo. |

 ii) Análisis de marcadores de ADN

El gen recesivo *mo1* (con sus alelos *mo11*o *mo12*) confiere resistencia al patotipo II del LMV. Los alelos de resistencia *mo11* y *mo12* y la presencia del alelo de susceptibilidad *mo10* pueden detectarse mediante el marcador codominante como se describe en V. Nicaise *et al.* (2003). Aspectos específicos:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agente patógeno | *Lettuce mosaic virus,* Patotipo II |
| 2. | Gen funcional | *mo1* (con dos alelos de resistencia *mo11*y *mo12*y un alelo de susceptibilidad *mo10*) |
| 3. | Sondas y cebadores para la PCR de Taqman  |  |
| 3.1 | Ensayo 1 | distinguir los genotipos *mo11* de los genotipos *mo10* y *mo12* (deleción de 6 bases en las posiciones de nucleótidos 344-349): |
|

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Sonda | Secuencia de ADN ‘5-‘3 | Color fluoróforo (opcional) |
| Pr-del-mo1 | GGCTCAAGGAGCTGACTTCTATTG | Texas Red (susceptible) |
| Pr-del-mo11 | GGCTCATGACTTCTATTG | 6FAM-MGB (resistente *mo11*) |

|  |  |
| --- | --- |
| Cebadores | Secuencia de ADN ‘5-‘3 |
| Fw-del-mo1  | CAACAACATACATCGACCAA |
| Rev-del-mo1 | CTTCCCACTTAGGCTCGAT |

 Amplicón de secuencia: ‘5-‘3 Amplicón de secuencia de los alelos *mo10*y*mo12*TTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTATTGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACC Secuencia del amplicón del alelo de resistencia *mo11*: TTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCATGACTTCTATTGTTTCAAGAATAAAATCGAGCC |
| 3.2. | Ensayo 2 | distinguir los genotipos *mo12* de los genotipos *mo10* y *mo11* (SNP en la posición de nucléotido 228): |
|

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Sonda | Secuencia de ADN ‘5-‘3 | Color fluoróforo (opcional) |
| Pr-SNP228-*mo1* | CTCCCTCT**G**CTAAGTC | 6FAM-MGB (susceptible) |
| Pr-SNP228-*mo12* | ACTCCCTCT**C**CTAAGT  | VIC-MGB (resistente *mo12*) |

|  |  |
| --- | --- |
| Cebadores | Secuencia de ADN ‘5-‘3 |
| Fw-SNP228-*mo1*  | GCATCCGCTCGAGCATTC |
| Rev-SNP228-*mo1* | CTACCCCAAGCGACTTGCTT |

 |
|  Amplicón de secuencia: ‘5-‘3 Secuencia del amplicón de los alelos *mo10*y*mo11:*TCAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCT**G**CTAAGTCCAAGCAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCC Secuencia del amplicón del alelo de resistencia *mo12*:TCAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCT**C**CTAAGTCCAAGCAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCC |
| 4. | Formato del análisis |  |
| 4.1 | Número de plantas por genotipo | 20 plantas como mínimo |
| 4.2 | Variedades de control  | Portadoras del alelo homocigótico de susceptibilidad *mo10:* Sprinter, SucrinePresencia del alelo homocigótico de resistencia *mo11:* Capitan, KanaryolePresencia del alelo homocigótico de resistencia *mo12:* CorianasMezclar ADN para tener un control heterocigótico |
| 5. | Preparación |  |
| 5.1 | Preparación del ADN | Recolectar una parte de una hoja joven de cada planta. Extraer el ADN total con un protocolo estándar de extracción de ADN. |
| 5.2 | Preparación de la PCR | Con una pipeta, trasvasar cada muestra de ADN y una mezcla maestra comercial para PCR en tiempo real a pocillos individuales para el ensayo 1 y para el ensayo 2. Analizar las muestras en un termociclador en tiempo real idóneo para leer los fluoróforos de todas las sondas en condiciones de reacción adecuadas para la mezcla maestra utilizada. |
| 6. | Condiciones de la PCR | (los interesados pueden solicitar el protocolo de análisis detallado al *Naktuinbouw*[[6]](#footnote-7) (NL)) |
|  | Ensayo 1: |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | temperatura | tiempo | velocidad de aumento |
| Activación inicialde la enzima | 95 °C | 2' 00" |  |
| 40 ciclos | 95 °C | 0' 15" | 5 °C/s |
|  | 65 °C | 0' 48" | 5 °C/s |

 |
|  | Ensayo 2: |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | temperatura | tiempo | velocidad de aumento |
|  | 95 °C | 2' 00" |  |
| 40 ciclos | 95 °C | 0' 15" | 5 °C/s |
|  | 60 °C | 0' 48" | 5 °C/s |

Análisis de unidades de fluorescencia relativas (RFU) en el punto final.  |
| 7. | Observaciones |  |
| 7.1 | Escala de observación |  |
| Ensayo 1:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Fluoróforo emisor de señal |  |  |
| FAM (*mo11*) | Texas Red (*mo10* o *mo12*) |   |
| - | x | *Homocigóticos mo10* o *mo12* o heterocigóticos *mo10* *mo12* |
| x | - | Homocigóticos *mo11*  |
| x | x | Heterocigóticos *mo10* y *mo11*y heterocigóticos *mo12* y *mo11* |
| - | - | Sin resultado, repetir el análisis |

 |
| Ensayo 2:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Fluoróforo emisor de señal |  |  |
| FAM (*mo10* o *mo11*) | VIC (*mo12*) |   |
| (x) (RFU de FAM << RFU de VIC) | x | Homocigóticos *mo12*  |
| x | - | Homocigóticos mo10 o mo11 o heterocigóticos mo10 mo11 |
| x  | (x) (RFU de FAM >> RFU de VIC) | Heterocigóticos *mo10* y *mo12*y heterocigóticos *mo11* y *mo12* |
| - | - | Sin resultado, repetir el análisis |

 |
| 7.2  | Validación del análisis | Las variedades de control deben dar los resultados previstos. Una variedad uniforme no presenta plantas heterocigóticas excepto la variedad con combinaciones de alelos (*mo0*+*mo11* *o 2*). |
| 8. | Interpretación de los datos en función de los niveles de los caracteres de la UPOV | La combinación de los dos ensayos de PCR da lugar al siguiente resultado previsto en un ensayo biológico con el patotipo II del LMV: |
|

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|   |   | **Ensayo 2 (*mo1²*)** |
|   |   | **ausente** | **homocigóticas presentes**  | **heterocigóticas** |
| **Ensayo 1 (*mo11*)** | **ausente**  | susceptible (*mo10*) | resistente (*mo12*) | susceptible (*mo10*/*mo12*) |
| **homocigóticas presentes**  | resistente (*mo11*) | no es posible (inválido) | no es posible (inválido) |
| **heterocigóticas** | susceptible (*mo10*/ *mo11*) | no es posible (inválido) | se prevé que sea resistente, pero todavía no se ha validado |

 |
|  |  | Las plantas heterocigóticas (*mo10/mo11* o *mo12*) son susceptibles en un ensayo biológico, dado que mo1 es un gen recesivo.Para las plantas heterocigóticas ([*mo11*] + [*mo12*]) se necesita una conclusión de un ensayo biológico.Se prevé que las variedades que presentan una mezcla de genotipos (plantas heterocigóticas, plantas homocigóticas *mo10* (fenotipo previsto susceptible) y plantas homocigóticas *mo11* o *mo12*(fenotipo previsto resistente)) no sean uniformes en el ensayo biológico. En el caso de que el análisis de marcadores de ADN no confirme lo declarado en las directrices de examen, se ha de realizar un ensayo biológico para observar si la variedad es resistente debido a otro mecanismo. |

[Fin del documento]

1. Organizada por Turquía y celebrada por medios electrónicos del 3 al 7 de mayo de 2021. [↑](#footnote-ref-2)
2. matref@geves.fr [↑](#footnote-ref-3)
3. resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-4)
4. matref@geves.fr [↑](#footnote-ref-5)
5. resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-6)
6. *Naktuinbouw*: resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-7)