

Comité Técnico

TC/57/17

Quincuagésima séptima sesión
Ginebra, 25 y 26 de octubre de 2021

Original: Inglés
Fecha: 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

1. 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.).
2. En su quincuagésima quinta sesión,¹ 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”
3. Los cambios propuestos se indican a continuación como texto resaltado y subrayado (inserción) y ~~tachado~~ (eliminación).

¹ Organizada por Turquía y celebrada por medios electrónicos del 3 al 7 de mayo de 2021.

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	<i>Lettuce mosaic virus</i>
2. Estado de cuarentena	no
3. Especie huésped	lechuga: <i>Lactuca sativa</i> L.
4. Fuente del inóculo	GEVES ² (FR) o <i>Naktuinbouw</i> ³ (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 Na ₂ SO ₃ , 0,5% C ₅ H ₁₀ NNaS ₂ .3H ₂ O, 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.

² matref@geves.fr

³ resistentie@naktuinbouw.nl

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).

i) Ensayo biológico

1.	Agente patógeno	<i>Lettuce mosaic virus</i>
2.	Estado de cuarentena	no
3.	Especie huésped	lechuga: <i>Lactuca sativa</i> L.
4.	Fuente del inóculo	GEVES ⁴ (FR) o <i>Naktuinbouw</i> ⁵ (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 Na ₂ SO ₃ 0,5% C ₅ H ₁₀ NNaS ₂ .3H ₂ O, 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) <u>Multired 80 (roja)</u>
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

⁴ matref@geves.fr

⁵ resistentie@naktuinbouw.nl

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

<u>Sonda</u>	<u>Secuencia de ADN '5-'3</u>	<u>Color fluoróforo (opcional)</u>
<u>Pr-del-<i>mo1</i></u>	<u>GGCTCAAGGAGCTGACTTCTATTG</u>	<u>Texas Red (susceptible)</u>
<u>Pr-del-<i>mo1¹</i></u>	<u>GGCTCATGACTTCTATTG</u>	<u>6FAM-MGB (resistente <i>mo1¹</i>)</u>

<u>Cebadores</u>	<u>Secuencia de ADN '5-'3</u>
<u>Fw-del-<i>mo1</i></u>	<u>CAACAACATACATCGACCAA</u>
<u>Rev-del-<i>mo1</i></u>	<u>CTTCCCACTTAGGCTCGAT</u>

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 <i>mo1²</i> de los genotipos <i>mo1⁰</i> y <i>mo1¹</i> (SNP en la posición de nucleótido 228):															
	<table border="1"> <tr> <td>Sonda</td> <td>Secuencia de ADN '5-'3</td> <td>Color fluoróforo (opcional)</td> </tr> <tr> <td>Pr-SNP228-<i>mo1</i></td> <td>CTCCCTCTGCTAAGTC</td> <td>6FAM-MGB (susceptible)</td> </tr> <tr> <td>Pr-SNP228-<i>mo1²</i></td> <td>ACTCCCTCTCCTAAGT</td> <td>VIC-MGB (resistente <i>mo1²</i>)</td> </tr> </table> <table border="1"> <tr> <td>Cebadores</td> <td>Secuencia de ADN '5-'3</td> </tr> <tr> <td>Fw-SNP228-<i>mo1</i></td> <td>GCATCCGCTCGAGCATTC</td> </tr> <tr> <td>Rev-SNP228-<i>mo1</i></td> <td>CTACCCCAAGCGACTTGCTT</td> </tr> </table>	Sonda	Secuencia de ADN '5-'3	Color fluoróforo (opcional)	Pr-SNP228- <i>mo1</i>	CTCCCTCTGCTAAGTC	6FAM-MGB (susceptible)	Pr-SNP228- <i>mo1²</i>	ACTCCCTCTCCTAAGT	VIC-MGB (resistente <i>mo1²</i>)	Cebadores	Secuencia de ADN '5-'3	Fw-SNP228- <i>mo1</i>	GCATCCGCTCGAGCATTC	Rev-SNP228- <i>mo1</i>	CTACCCCAAGCGACTTGCTT	
Sonda	Secuencia de ADN '5-'3	Color fluoróforo (opcional)															
Pr-SNP228- <i>mo1</i>	CTCCCTCTGCTAAGTC	6FAM-MGB (susceptible)															
Pr-SNP228- <i>mo1²</i>	ACTCCCTCTCCTAAGT	VIC-MGB (resistente <i>mo1²</i>)															
Cebadores	Secuencia de ADN '5-'3																
Fw-SNP228- <i>mo1</i>	GCATCCGCTCGAGCATTC																
Rev-SNP228- <i>mo1</i>	CTACCCCAAGCGACTTGCTT																
<p>Amplicón de secuencia: '5-'3</p> <p>Secuencia del amplicón de los alelos <i>mo1⁰</i> y <i>mo1¹</i>:</p> <p>TCAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAGCAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCC</p> <p>Secuencia del amplicón del alelo de resistencia <i>mo1²</i>:</p> <p>TCAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTCCTAAGTCCAAGCAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCC</p>																	
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 <i>mo1⁰</i> : Sprinter, Sucrine Presencia del alelo homocigótico de resistencia <i>mo1¹</i> : Capitan, Kanaryole Presencia del alelo homocigótico de resistencia <i>mo1²</i> : Corianas Mezclar 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 <i>Naktuinbouw</i> ⁶ (NL))															
	Ensayo 1:	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>temperatura</th> <th>tiempo</th> <th>velocidad de aumento</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Activación inicial de la enzima</td> <td>95 °C</td> <td>2' 00"</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">40 ciclos</td> <td>95 °C</td> <td>0' 15"</td> <td>5 °C/s</td> </tr> <tr> <td>65 °C</td> <td>0' 48"</td> <td>5 °C/s</td> </tr> </tbody> </table>		temperatura	tiempo	velocidad de aumento	Activación inicial de la enzima	95 °C	2' 00"		40 ciclos	95 °C	0' 15"	5 °C/s	65 °C	0' 48"	5 °C/s
	temperatura	tiempo	velocidad de aumento														
Activación inicial de la enzima	95 °C	2' 00"															
40 ciclos	95 °C	0' 15"	5 °C/s														
	65 °C	0' 48"	5 °C/s														
	Ensayo 2:	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>temperatura</th> <th>tiempo</th> <th>velocidad de aumento</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>95 °C</td> <td>2' 00"</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">40 ciclos</td> <td>95 °C</td> <td>0' 15"</td> <td>5 °C/s</td> </tr> <tr> <td>60 °C</td> <td>0' 48"</td> <td>5 °C/s</td> </tr> </tbody> </table> <p>Análisis de unidades de fluorescencia relativas (RFU) en el punto final.</p>		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
	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														

⁶ *Naktuinbouw*. resistentie@naktuinbouw.nl

7.	Observaciones																								
7.1	Escala de observación																								
Ensayo 1:																									
	Fluoróforo emisor de señal FAM (mo^{1^1})	Texas Red (mo^{1^0} o mo^{1^2})																							
	-	x																							
	x	-																							
	x	x																							
	-	-																							
		Homocigóticos mo^{1^0} o mo^{1^2} o heterocigóticos $mo^{1^0} mo^{1^2}$																							
		Homocigóticos mo^{1^1}																							
		Heterocigóticos mo^{1^0} y mo^{1^1} y heterocigóticos mo^{1^2} y mo^{1^1}																							
		Sin resultado, repetir el análisis																							
Ensayo 2:																									
	Fluoróforo emisor de señal FAM (mo^{1^0} o mo^{1^1})	VIC (mo^{1^2})																							
	(x) (RFU de FAM << RFU de VIC)	x																							
	x	-																							
	x	(x) (RFU de FAM >> RFU de VIC)																							
	-	-																							
		Homocigóticos mo^{1^2}																							
		Homocigóticos mo^{1^0} o mo^{1^1} o heterocigóticos $mo^{1^0} mo^{1^1}$																							
		Heterocigóticos mo^{1^0} y mo^{1^2} y heterocigóticos mo^{1^1} y mo^{1^2}																							
		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 ($mo^{0+}mo^{1^1}$ 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:																							
		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th colspan="3">Ensayo 2 (mo^{1^2})</th> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th>ausente</th> <th>homocigóticas presentes</th> <th>heterocigóticas</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th rowspan="3">Ensayo 1 (mo^{1^1})</th> <th>ausente</th> <td>susceptible (mo^{1^0})</td> <td>resistente (mo^{1^2})</td> <td>susceptible (mo^{1^0}/mo^{1^2})</td> </tr> <tr> <th>homocigóticas presentes</th> <td>resistente (mo^{1^1})</td> <td>no es posible (inválido)</td> <td>no es posible (inválido)</td> </tr> <tr> <th>heterocigóticas</th> <td>susceptible (mo^{1^0}/mo^{1^1})</td> <td>no es posible (inválido)</td> <td>se prevé que sea resistente, pero todavía no se ha validado</td> </tr> </tbody> </table>			Ensayo 2 (mo^{1^2})					ausente	homocigóticas presentes	heterocigóticas	Ensayo 1 (mo^{1^1})	ausente	susceptible (mo^{1^0})	resistente (mo^{1^2})	susceptible (mo^{1^0}/mo^{1^2})	homocigóticas presentes	resistente (mo^{1^1})	no es posible (inválido)	no es posible (inválido)	heterocigóticas	susceptible (mo^{1^0}/mo^{1^1})	no es posible (inválido)	se prevé que sea resistente, pero todavía no se ha validado
		Ensayo 2 (mo^{1^2})																							
		ausente	homocigóticas presentes	heterocigóticas																					
Ensayo 1 (mo^{1^1})	ausente	susceptible (mo^{1^0})	resistente (mo^{1^2})	susceptible (mo^{1^0}/mo^{1^2})																					
	homocigóticas presentes	resistente (mo^{1^1})	no es posible (inválido)	no es posible (inválido)																					
	heterocigóticas	susceptible (mo^{1^0}/mo^{1^1})	no es posible (inválido)	se prevé que sea resistente, pero todavía no se ha validado																					
		<p>Las plantas heterocigóticas (mo^{1^0}/mo^{1^1} o mo^{1^2}) son susceptibles en un ensayo biológico, dado que mo^1 es un gen recesivo. Para las plantas heterocigóticas ($[mo^{1^1}] + [mo^{1^2}]$) se necesita una conclusión de un ensayo biológico.</p> <p>Se prevé que las variedades que presentan una mezcla de genotipos (plantas heterocigóticas, plantas homocigóticas mo^{1^0} (fenotipo previsto susceptible) y plantas homocigóticas mo^{1^1} o mo^{1^2} (fenotipo previsto resistente)) no sean uniformes en el ensayo biológico.</p> <p>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.</p>																							