

Comité Técnico

TC/59/13

**Quincuagésima novena sesión
Ginebra, 23 y 24 de octubre de 2023**

Original: Inglés
Fecha: 13 de septiembre de 2023

REVISIÓN PARCIAL DE LAS DIRECTRICES DE EXAMEN DE LA COLIFLOR

Documento preparado por de los Países Bajos

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

Este documento se ha generado mediante traducción automática y no puede garantizarse su exactitud. Por lo tanto, el texto en el idioma original es la única versión auténtica.

1. El presente documento tiene por finalidad exponer una propuesta de revisión parcial de las directrices de examen de la coliflor (documento TG/45/7 Rev.).

2. En su quincuagésima séptima sesión¹, el Grupo de Trabajo Técnico sobre Hortalizas (TWV), examinó una propuesta de revisión parcial de las directrices de examen de la coliflor (*Brassica oleracea* L. convar *botrytis* (L.) Alef. var. *botrytis* L.) conforme a los documentos TG/45/7 Rev. y TWV/57/20 “*Partial revision of the Test Guidelines for Cauliflower*” y propuso los siguientes cambios (véase el párrafo 63 del documento TWV/57/26 “*Report*”):

- (a) Revisión del carácter 25 "Flor: color"
- (b) Adición de una nueva explicación Ad. 25 “Flor: color”
- (c) Revisión de la explicación Ad. 28 “Androesterilidad”
- (d) Adición de referencias al capítulo 9. "Bibliografía"

3. A continuación, se presenta la nueva redacción propuesta. Los cambios propuestos se indican como texto resaltado y subrayado (inserción) y ~~tachado~~ (eliminación) en el Anexo de este documento (sólo en inglés).

Propuesta de revisión del carácter 25 "Flor: color"

	English	français	deutsch	español	Example Varieties/ Exemples/ Beispielsorten/ Variedades ejemplo	Note/ Nota
25. (*) (+)	VG/ MS	Flower: color	Fleur : couleur	Blüte: Farbe	Flor: color	
QL	white	blanche	weiß	blanco	Bruce, Ecrin	1
	yellow	jaune	gelb	amarillo	Flora Blanca, Lecerf	2

¹ celebrada en Antalya (Türkiye) del 1 al 5 de mayo de 2023.

Propuesta de adición de una nueva explicación Ad. 25 “Flor: color”

Ad 25: Flor: color

Ha de examinarse en un ensayo de campo y/o mediante un análisis de marcadores de ADN.

El ensayo de campo corresponde a una observación de tipo VG. El análisis de marcadores de ADN corresponde a una observación de tipo MS.

Ensayo de campo:

Comprobar el color de las flores.



Análisis de marcadores de ADN:

El gen CCD4 es el responsable del color blanco de los pétalos de *Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *botrytis* L. El color amarillo de los pétalos se debe a la pérdida de la función de ese gen. Los marcadores correspondientes al gen funcional y al gen no funcional se basan en tres SNP en la posición ~1296 pb de los genes (Han et al. 2019).

El análisis de los marcadores se puede realizar en formato multiplex con el marcador de androesterilidad (Ad. 28).

La presencia del gen CCD4 funcional o no funcional puede detectarse mediante los marcadores codominantes descritos.

Aspectos específicos:

1.	Carácter	Flor: color
2.	Gen funcional	Gen CCD4 funcional: blanco Gen CCD4 no funcional: amarillo
3.1	Iniciadores	La Tm de los iniciadores es de 57°C aproximadamente. Iniciador directo: '5-CTGGATTCAACATCATTACG CT-3' Iniciador inverso: '5-CGGTGACGAGATCGATCTTCA-3'
3.2	Sondas	Sonda para el color blanco: '5-fluoróforo-ATCGTCCAAATATTATGT-extintor-3' Sonda para el color amarillo: '5-fluoróforo-GTCCGAACGTTATGT-extintor-3'
		Se utilizan sondas MGB (Applied biosystems) o XS (Biologio). La Tm de las sondas debe ser de 67°C. Los fluoróforos pueden modificarse según su compatibilidad con los filtros en el termociclador en tiempo real.
4.	Formato del examen	
4.1	Número de plantas por genotipo	20 plantas como mínimo
4.2	Variedades de control	Presencia del alelo homocigótico del gen CCD4 funcional (pétalos de color blanco): Ecrin Presencia del gen CCD4 heterocigótico, funcional y no funcional (variedad de color blanco): Bruce Presencia del alelo homocigótico del gen CCD4 no funcional (pétalos de color amarillo): Magnifico
6.	Condiciones de la PCR (en función de la mezcla maestra)	1. Ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos 2. 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y a 60°C durante 1 minuto. Todos los ciclos finalizan con una lectura de la placa.
8.	Interpretación de los resultados del ensayo	
	Blanco (1)	Presencia de la sonda para el gen CCD4 funcional (pétalos de color blanco) en homocigosis, la variedad tiene flores blancas. Presencia de las dos sondas (heterocigosis), la variedad tiene flores blancas.
	Amarillo (2)	Presencia de la sonda para el gen CCD4 no funcional (pétalos de color amarillo) en homocigosis, la variedad tiene flores amarillas. Si el análisis de marcadores de ADN no confirma lo declarado en el cuestionario técnico, deberá realizarse un ensayo de campo para determinar si la variedad tiene flores blancas o amarillas a causa de otro mecanismo.

El ensayo de campo corresponde a una observación de tipo VS. El análisis de marcadores de ADN corresponde a una observación de tipo MS.

Propuesta de revisión de la explicación Ad. 28 “Androesterilidad”

Ad. 28: Androesterilidad

Ha de examinarse en un ensayo de campo y/o mediante un análisis de marcadores de ADN.²

El ensayo de campo corresponde a una observación de tipo VS. El análisis de marcadores de ADN corresponde a una observación de tipo MS.

Ensayo de campo:

Ausente: >70% de las plantas fértiles (variedades de fecundación libre o variedades híbridas producidas utilizando el sistema de autoincompatibilidad)
Parcial: 30% a 70% de las plantas fértiles (variedades híbridas producidas con androesterilidad genética en condición heterocigota)
Total: <30% de las plantas fértiles (variedades híbridas producidas con androesterilidad citoplásmica)



androfétil (presencia de polen)



androestéril (ausencia de polen)

Análisis de marcadores de ADN y/o ensayo de campo:

Las variedades de las que el solicitante haya declarado en el cuestionario técnico que son androfértiles (nivel 1) o totalmente androestériles (nivel 3) pueden examinarse en un ensayo de campo o mediante un análisis de marcadores de ADN.

En las variedades con androesterilidad parcial (nivel 2) y de multiplicación vegetativa, las líneas totalmente androestériles (nivel 3) no pueden examinarse mediante un análisis de marcadores de ADN pero deberán observarse en un ensayo de campo.

Cabe señalar que existen líneas que son androestériles debido al gen homocigótico recesivo de androesterilidad monogénica (GMS). Dichas líneas se utilizan para la producción de híbridos que son, por consiguiente, androfértiles. Sin embargo, cuando se utiliza una línea madre heterocigótica, los híbridos producidos son parcialmente androestériles (nivel 2). Dada su naturaleza, esas líneas han de multiplicarse de manera vegetativa. Son androestériles, pero carecen del marcador de ADN para la presencia de androesterilidad citoplasmática (CMS). Por ese motivo, las líneas androestériles de multiplicación vegetativa no pueden examinarse mediante un análisis de marcadores de ADN pero deberán observarse en un ensayo de campo.

En aquellos casos en los que solo se permita un análisis de marcadores de ADN (variedades de reproducción sexuada de nivel 1 y nivel 3), si el marcador de CMS parece no estar presente, es previsible que la variedad tenga flores androfértiles. Si el marcador de CMS está presente, es previsible que la variedad tenga flores androestériles. Todas las variedades en cuya solicitud se declare que son parcialmente estériles (nivel 2) y las líneas de multiplicación vegetativa en cuya solicitud se declare que son totalmente androestériles (nivel 3) deberán examinarse en un ensayo de campo.

² La descripción del método de examen de la androesterilidad en *Brassica* (marcador CMS) está amparada por el secreto comercial. Syngenta Seeds B.V., el propietario del secreto comercial, ha dado su consentimiento para que se utilice el marcador CMS únicamente a los fines del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad (DHE) y de la elaboración de descripciones de variedades por la UPOV y las autoridades de los miembros de la UPOV. Syngenta Seeds B.V. declara que ni a la UPOV ni a aquellas autoridades de miembros de la UPOV que utilicen el marcador CMS para esos fines se les exigirán responsabilidades por la posible utilización (indebida) del marcador CMS por parte de terceros. Si desea obtener el método e información sobre el marcador CMS para los fines mencionados, sírvase ponerse en contacto con el Naktuinbouw (Países Bajos).

Si el análisis de marcadores de ADN no confirma lo declarado en el cuestionario técnico, deberá realizarse un ensayo de campo para determinar si la variedad tiene flores androfértiles o androestériles o está segregando a causa de otro mecanismo.

El análisis del marcador se puede realizar en formato multiplex con los marcadores del color de la flor (Ad. 25).

Propuesta de adición de referencias al capítulo 9. "Bibliografía"

9. Bibliografía

Fengqing Han, Huilin Cui, Bin Zhang, Xiaoping Liu, Limei Yang, Mu Zhuang, Honghao Lv, Zhansheng Li, Yong Wang, Zhiyuan Fang, Jianghua Song and Yangyong Zhang, 2019: Map-based cloning and characterization of BoCCD4, a gene responsible for white/yellow petal color in *B. oleracea* BMC Genomics. 20:242

Fujime, Y., 1983: Studies on Thermal Conditions of Curd Formation and Development in Cauliflower and Broccoli, with Special Reference to Abnormal Curd Development. Memoires of Faculty of Agriculture, Kagawa University, No. 40, February 1983, pp. 1-123, JP.

Gray, A.R., 1989: Taxonomy and Evolution of Broccoli and Cauliflower. Bailey 23 (1), pp. 28-46.

Nieuwhof, M., 1969: Cole Crops. World Crops Books: Leonard Hill, London, GB.

Sadik, S., 1962: Morphology of the curd of cauliflower. Amer. Bot. 49, pp. 290-297.

Tsunoda, S., Hinata, K., and Gomez-Campo, C., 1980: Brassica Crops and Wild Allies. Biology and Breeding, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, JP.

Wiebe, H.J., 1972/73: Wirkung von Temperatur und Licht auf Wachstum und Entwicklung von Blumenkohl. Gartenbauwissenschaft 37, pp. 165-178, 37, pp. 293-303, 37, pp. 455-469, 38, pp. 263-279, 38, pp. 433-440.

Wiebe, H.J., 1975: The Morphological development of cauliflower and broccoli cultivars depending on temperature. Sci. Hort. 3, pp. 95-101.

Wiebe, H.J., 1981: Influence of transplant characteristics and growing conditions on curd size (buttoning) of cauliflower. Acta Hort. 122, pp. 99-105.

[Sigue el Anexo]

CAMBIOS PROPUESTOS RESALTADOS
(sólo en inglés)

Proposed revision of Characteristic 25 “Flower: color”

	English	français	deutsch	español	Example Varieties/ Exemples/ Beispielsorten/ Variedades ejemplo	Note/ Nota
25. VG/ (*) MS (+)	Flower: color	Fleur : couleur	Blüte: Farbe	Flor: color		
QL	white	blanche	weiß	blanco	Bruce, Ecrin	1
	yellow	jaune	gelb	amarillo	Flora Blanca, Lecerf	2

Proposed addition of new explanation Ad. 25 Characteristic 25 “Flower: color”

Ad 25: Flower: color

To be tested in a field and/or in a DNA marker test.

In the case of a field trial, the type of observation is VG. In the case of a DNA marker test, the type of observation is MS.

Field trial:

Check de color of flowers.



1
white

2
yellow

DNA marker test:

The gene CCD4 is responsible for the white petal color in *Brassica oleracea* L. convar *botrytis* (L.) Alef. var. *botrytis* L. Functional loss of this gene is responsible for the yellow petal color. The markers corresponding with the functional gene and nonfunctional gene are based on 3 SNP's on position ~1296bp in the genes (Han et al. 2019).

The markers can be performed in multiplex with the marker for male sterility (Ad. 28).

The presence of the functional or nonfunctional CCD4 gene can be detected by the described co-dominant markers.

Specific aspects:

1.	<u>Characteristic</u>	<u>Flower: color</u>
2.	<u>Functional gene</u>	<u>Functional CCD4 gene : white</u> <u>Nonfunctional CCD4 gene: yellow</u>
3.1	<u>Primers</u>	<u>Tm of the primers is ~57°C</u> <u>Forward Primer: "5-CTGGATTCAACATCATTACAG CT-3"</u> <u>Reverse Primer: '5-CGGTGACGAGATCGATCTTCA-3'</u>
3.2	<u>Probes</u>	<u>White Probe: '5-Fluorophore-ATCGCTCCAATATTATGT-Quencer-3'</u> <u>Yellow Probe: '5-Fluorophore-GTCCGAACGTTATGT-Quencer-3'</u>
		<u>The probes are MGB probes (Applied biosystems) or XS probes (Biolegio). The Tm of the probes must be ordered at 67°C.</u> <u>Fluorophores can be modified according to compatibility with the filters on the real-time PCR machine.</u>
4.	<u>Format of the test</u>	
4.1	<u>Number of plants per genotype</u>	<u>at least 20 plants</u>
4.2	<u>Control varieties</u>	<u>Homozygous allele for functional CCD4 gene (white petal color) present: Ecrin</u> <u>Heterozygous functional and nonfunctional CCD4 gene present (variety is white): Bruce</u> <u>Homozygous allele for nonfunctional CCD4 gene (yellow petal color) present: Magnifico</u>
6.	<u>PCR conditions</u> <u>(mastermix dependent)</u>	<u>1. Initial denaturation step 10 min 95 °C</u> <u>2. 40 cycles 15 sec 95 °C and 1 min 60°C. Every cycle ends with a plate reading.</u>
8.	<u>Interpretation of test results</u>	
	<u>White (1):</u>	<u>Probe for functional CCD4 gene (white petal color) is homozygous present, variety has white flowers.</u> <u>Both probes are present (heterozygous), the variety has white flower.</u>
	<u>Yellow (2)</u>	<u>Probe for nonfunctional CCD4 gene (yellow petal color) is homozygous present, the variety has yellow flowers.</u> <u>In case the DNA marker test result does not confirm the declaration in the TQ, a field trial should be performed to observe whether the variety has white or yellow flowers due to another mechanism.</u>

In case of a field trial, type of observation is VS. In case of a DNA marker test, type of observation is MS.

Proposed revision of explanation Ad. 28 “Male sterility”

Ad. 28: Male sterility

To be tested in a field trial and/or in a DNA marker test³.

In the case of a field trial, the type of observation is VG VS. In the case of a DNA marker test, the type of observation is MS.

Field trial:

Absent: >70% of the plants fertile (open-pollinated varieties or hybrid varieties produced with self-incompatibility system)
Partial: 30% to 70% of the plants fertile (hybrid varieties produced with genic male sterility, in heterozygous state)
Total: < 30% of the plants fertile (hybrid varieties produced with cytoplasmic male sterility)



male fertile (pollen present)



male sterile (pollen absent)

DNA marker test and/or field trial:

All Varieties declared male fertile (state 1) or total male sterile (state 3) in the TQ, can be examined in a field trial or in a DNA marker test.

Varieties with partial male sterility (state 2) and vegetatively propagated, total male sterile lines (state 3) cannot be examined in a DNA marker test but must be observed in a field trial.

It should be noted that lines exist which are male sterile due to the homozygous recessive monogenic male sterility (GMS) gene. These lines are used for the production of hybrids which then normally will be male fertile. However when a heterozygous mother line is used, the produced hybrids will be partially male sterile (state 2). Due to their nature these lines have to be propagated vegetatively. They are male sterile but do not have the DNA marker for the presence of CMS male sterility. So vegetatively propagated male sterile lines cannot be examined in a DNA marker test but must be observed in a field trial.

For the cases where only a DNA marker test is allowed (state 1 and state 3 seed propagated varieties), if the CMS marker appears to be not present, a field trial should be performed to observe whether the variety is male sterile (on another mechanism) or fertile. the variety is expected to have male fertile flowers. In cases where the CMS marker is present, the variety is expected to have male sterile flowers. All varieties declared fertile are to be tested in a field trial. All varieties declared partially sterile (state 2) and vegetatively propagated lines declared total male sterile (state 3) should be tested in a field trial.

In case the DNA marker test result does not confirm the declaration in the TQ, a field trial should be performed to observe whether the variety has male fertile or male sterile flowers or is segregating due to another mechanism.

The marker can be performed in multiplex with the markers for flower color (Ad. 25).

³ The description of the method to test male sterility for *Brassica* (CMS marker) is covered by a trade secret. The owner of the trade secret, Syngenta Seeds B.V., has given its consent for the use of the CMS marker solely for the purposes of examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS) and for the development of variety descriptions by UPOV and authorities of UPOV members. Syngenta Seeds B.V. declares that neither UPOV, nor authorities of UPOV members that use the CMS marker for the above purposes will be held accountable for possible (mis)use of the CMS marker by third parties. Please contact Naktuinbouw, Netherlands, to obtain the method and information on the CMS marker for the purposes mentioned above.

Proposed addition of references to Chapter 9. "Literature"

9. Literature

Fengqing Han, Huilin Cui, Bin Zhang, Xiaoping Liu, Limei Yang, Mu Zhuang, Honghao Lv, Zhansheng Li, Yong Wang, Zhiyuan Fang, Jianghua Song and Yangyong Zhang, 2019: Map-based cloning and characterization of BoCCD4, a gene responsible for white/yellow petal color in *B. oleracea* BMC Genomics. 20:242

Fujime, Y., 1983: Studies on Thermal Conditions of Curd Formation and Development in Cauliflower and Broccoli, with Special Reference to Abnormal Curd Development. Memoires of Faculty of Agriculture, Kagawa University, No. 40, February 1983, pp. 1-123, JP.

Gray, A.R., 1989: Taxonomy and Evolution of Broccoli and Cauliflower. Bailey 23 (1), pp. 28-46.

Nieuwhof, M., 1969: Cole Crops. World Crops Books: Leonard Hill, London, GB.

Sadik, S., 1962: Morphology of the curd of cauliflower. Amer. Bot. 49, pp. 290-297.

Tsunoda, S., Hinata, K., and Gomez-Campo, C., 1980: Brassica Crops and Wild Allies. Biology and Breeding, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, JP.

Wiebe, H.J., 1972/73: Wirkung von Temperatur und Licht auf Wachstum und Entwicklung von Blumenkohl. Gartenbauwissenschaft 37, pp. 165-178, 37, pp. 293-303, 37, pp. 455-469, 38, pp. 263-279, 38, pp. 433-440.

Wiebe, H.J., 1975: The Morphological development of cauliflower and broccoli cultivars depending on temperature. Sci. Hort. 3, pp. 95-101.

Wiebe, H.J., 1981: Influence of transplant characteristics and growing conditions on curd size (buttoning) of cauliflower. Acta Hort. 122, pp. 99-105.

[Fin del documento]