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

|  |  |
| --- | --- |
| Comité de Redacción AmpliadoGinebra, 26 y 27 de marzo de 2018 | TC-EDC/Mar18/8Original: InglésFecha: 8 de marzo de 2018 |

Revisión parcial de las directrices de examen del tomate

Documento preparado por la Oficina de la Unión

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

 El presente documento tiene por finalidad exponer una propuesta de revisión parcial de las directrices de examen del tomate (documento TG/44/11 Rev.).

 En su quincuagésima primera reunión, celebrada en Roelofarendsveen (Países Bajos), del 3 al 7 de julio de 2017, el Grupo de Trabajo Técnico sobre Hortalizas (TWV) examinó una propuesta de revisión parcial de las directrices de examen del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) conforme a los documentos TG/44/11 Rev. y TWV/51/11 “*Partial Revision of the Test Guidelines for tomato*” (Revisión parcial de las directrices de examen del tomate) y propuso efectuar una revisión de dichas directrices según se expone a continuación (véase el párrafo 114 del documento TWV/51/16 “Report” (Informe)):

 Se proponen las siguientes modificaciones:

1. Cambiar el método de observación de los caracteres 48.1 y 48.2:
	1. Carácter 48.1 “Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) - Raza 0 (ex 1)”
	2. Carácter 48.2 “Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) - Raza 1 (ex 2)”
2. Modificar la explicación Ad. 48 mediante el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia y la introducción de cambios menores en el método actual
3. Cambiar el método de observación de los caracteres 51.1, 51.2 y 51.3:
	1. Carácter 51.1 “Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV), Cepa 0”
	2. Carácter 51.2 “Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV), Cepa 1”
	3. Carácter 51.3 “Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV), Cepa 2”
4. Modificar la explicación Ad. 51 mediante el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia y la introducción de cambios tipográficos menores en el método actual
5. Cambiar el método de observación del carácter 58 “Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV) - Raza 0”
6. Modificar la explicación Ad. 58 mediante el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia
7. En el capítulo 9 “Bibliografía”, añadir una referencia a la bibliografía relativa a los cambios indicados en los puntos a) – f).

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

## Propuesta de cambio del método de observación de los caracteres 48.1 y 48.2:

*Texto actual*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 48. (+) | VG | Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) | Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) | Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) | Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) |  |  |
| **48.1 (\*)** | **VG** | **– Race 0 (ex 1)** | **– Pathotype 0 (ex 1)** | **– Pathotyp 0 (ex 1)** | **– Raza 0 (ex 1)** |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Marmande verte | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Anabel, Marporum, Marsol | 9 |
| **48.2 (\*)** | **VG** | **– Race 1 (ex 2)** | **– Pathotype 1 (ex 2)** | **– Pathotyp 1 (ex 2)** | **– Raza 1 (ex 2)** |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Marmande verte | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Motelle, Walter | 9 |
| **48.3**  | **VG** | **– Race 2 (ex 3)** | **– Pathotype 2 (ex 3)** | **– Pathotyp 2 (ex 3)** | **– Raza 2 (ex 3)** |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Marmande verte, Motelle | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Alliance, Florida, Ivanhoé, Tributes | 9 |

*Nuevo texto propuesto*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 48. (+) | VG | Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) | Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) | Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) | Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) |  |  |
| **48.1 (\*)** | **VG/VS** | **– Race 0 (ex 1)** | **– Pathotype 0 (ex 1)** | **– Pathotyp 0 (ex 1)** | **– Raza 0 (ex 1)** |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Marmande verte | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | ~~Anabel~~, Marporum~~, Marsol~~ | 9 |
| **48.2 (\*)** | **VG/VS** | **– Race 1 (ex 2)** | **– Pathotype 1 (ex 2)** | **– Pathotyp 1 (ex 2)** | **– Raza 1 (ex 2)** |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Marmande verte | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Motelle~~, Walter~~ | 9 |
| **48.3**  | **VG** | **– Race 2 (ex 3)** | **– Pathotype 2 (ex 3)** | **– Pathotyp 2 (ex 3)** | **– Raza 2 (ex 3)** |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Marmande verte, Motelle | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Alliance, Florida, Ivanhoé, Tributes | 9 |

## Propuesta de modificación de la explicación Ad. 48 mediante el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia y la introducción de cambios menores en el método actual

*Texto actual*

Ad. 48: Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

1. Agentes patógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

3. Especies huéspedes *Solanum lycopersicum*

4. Fuente del inóculo Naktuinbouw[[1]](#footnote-2) (NL) y GEVES[[2]](#footnote-3) (FR)

5. Aislado Raza 0 (ex 1) (p. ej., cepas Orange 71 o PRI 20698 o Fol 071 1 (ex 2) (p. ej., cepas 4152 o PRI40698 o RAF 70 y 2 (ex 3)

 La capacidad patógena puede variar de una cepa a otra

6. Establecimiento de la identidad del aislado utilizar variedades diferenciales (véase 9.3)

7. Establecimiento de la capacidad patógena en variedades de tomate susceptibles

8. Multiplicación del inóculo

8.1 Medio de multiplicación papa-dextrosa-agar, medio “S” de Messiaen

8.4 Medio de inoculación agua para raspar las placas de agar o medio de cultivo Czapek-Dox

 (cultivo aireado de 7 días)

8.6 Cosecha del inóculo filtrar a través de una capa doble de muselina

8.7 Comprobación del inóculo cosechado recuento de esporas (ajustar a 106 por ml)

8.8 Período de conservación/viabilidad
 del inóculo de 4 a 8 horas (mantener a baja temperatura para evitar la germinación de las esporas)

9. Formato del examen

9.1 Número de plantas por genotipo 20 plantas como mínimo

9.2 Número de réplicas 1 réplica

9.3 Variedades de control para el ensayo con la

 raza 0 (ex 1)

Susceptibles Marmande, Marmande verte, Resal

Resistentes únicamente a la raza 0 Marporum, Larissa, “Marporum x Marmande verte”, Marsol, Anabel

Resistentes a las razas 0 y 1 Motelle, Gourmet, Mohawk

Variedades de control para el ensayo con la

 raza 1 (ex 2)

Susceptibles Marmande verte, Cherry Belle, Roma

Resistentes únicamente a la raza 0 Marporum, Ranco

Resistentes a las razas 0 y 1 Tradiro, Odisea

Observación: Ranco es ligeramente menos resistente que Tradiro

Variedades de control para el ensayo con la

 raza 2 (ex 3)

Susceptible a las razas 0, 1 y 2 Marmande verte, Motelle, Marporum

Resistente a las razas 0, 1 y 2 Tributes, Murdoch, Marmande verte x Florida

9.4 Diseño del ensayo >20 plantas; p. ej., 35 semillas para 24 plantas (incluidas 2 de control)

9.5 Instalación del ensayo invernadero o sala climatizada

9.6 Temperatura de 24 a 28°C (ensayo severo, con aislado moderado)

 de 20 a 24°C (ensayo moderado, con aislado severo)

9.7 Luz 12 horas por día o más

9.8 Estación cualquier estación

9.9 Medidas especiales una tierra de turba ligeramente ácida resulta óptima;

 mantener la tierra húmeda pero evitar el estrés hídrico

10. Inoculación

10.1 Preparación del inóculo Messiaen aireado o PDA o medio Agar S de Messiaen o

 cultivo Czapek Dox o raspado de placas

10.2 Cuantificación del inóculo recuento de esporas (ajustar a 106 por ml).

 Una concentración más baja para un aislado muy agresivo

10.3 Estado de desarrollo en el momento de la inoculación de 10 a 18 días (de cotiledón a primera hoja)

10.4 Método de inoculación inmersión de las raíces y los hipocótilos en una suspensión de esporas durante 5 a 15 minutos; opcionalmente se pueden trocear las raíces

10.7 Observaciones finales de 14 a 21 días después de la inoculación

11. Observaciones

11.1 Método visual

11.2 Escala de observación síntomas:

 retraso del crecimiento, marchitez, amarilleo, pardeamiento de los vasos extendido por encima del cotiledón

11.3 Validación del ensayo………………… la evaluación de la resistencia de la variedad deberá calibrarse con los resultados de los controles resistentes y susceptibles. Las variedades estándar cercanas al límite entre la resistencia y la susceptibilidad serán útiles para las comparaciones entre laboratorios.

12. Interpretación de los resultados del ensayo en comparación con las variedades de control:

 ausente [1] síntomas intensos

 presente [9] síntomas leves o ausentes

13. Puntos de control esenciales:

Los resultados de los ensayos pueden variar ligeramente en cuanto a la presión del inóculo debido a las diferencias relativas a los aislados, la concentración de esporas, la humedad de la tierra y la temperatura.

*Nuevo texto propuesto*

Ad. 48: Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

La resistencia a la raza 0 (ex 1) y la raza 1 (ex 2) ha de examinarse mediante bioensayo (método i) y/o mediante análisis de marcadores de ADN (método ii). La resistencia a la raza 2 (ex 3) ha de examinarse mediante bioensayo (método i). El bioensayo corresponde a una observación de tipo VG. El análisis de marcadores de ADN corresponde a una observación de tipo VS.

1. Bioensayo

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agentes patógenos | *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* |
| 3. | Especies huéspedes | *Solanum lycopersicum* |
| 4. | Fuente del inóculo | Naktuinbouw[[3]](#footnote-4) (NL), GEVES[[4]](#footnote-5) (FR) o INIA[[5]](#footnote-6) (ES) |
| 5. | Aislado | Raza 0 (ex 1) (p. ej., cepas Orange 71 o PRI 20698 o Fol 071), raza 1 (ex 2) (p. ej., cepas 4152 o PRI40698 o RAF 70) y raza 2 (ex 3)La capacidad patógena puede variar de una cepa a otra  |
| 6. | Establecimiento de la identidad del aislado | utilizar variedades diferenciales (véase 9.3) |
| 7. | Establecimiento de la capacidad patógena | en variedades de tomate susceptibles |
| 8. | Multiplicación del inóculo |  |
| 8.1 | Medio de multiplicación | papa-dextrosa-agar, medio “S” de Messiaen |
| 8.4 | Medio de inoculación | agua para raspar las placas de agar o medio de cultivo Czapek-Dox (cultivo aireado de 7 días) |
| 8.6 | Cosecha del inóculo | filtrar a través de una capa doble de muselina |
| 8.7 | Comprobación del inóculo cosechado | recuento de esporas (ajustar a 106 por ml) |
| 8.8 | Período de conservación/viabilidad del inóculo | de 4 a 8 horas (mantener a baja temperatura para evitar la germinación de las esporas) |
| 9. | Formato del examen |  |
| 9.1 | Número de plantas por genotipo | 20 plantas como mínimo |
| 9.2 | Número de réplicas | 1 réplica |
| 9.3.1 | Variedades de control para el ensayo con la raza 0 (ex 1) |  |
|  | Susceptibles | Marmande, Marmande verte, Resal |
|  | Resistentes ~~únicamente a la raza 0~~ | Marporum, Larissa, “Marporum x Marmande verte”, ~~Marsol, Anabel,~~ Motelle, Gourmet, Mohawk, Tradiro |
|  | ~~Resistentes a las razas 0 y 1~~ | ~~Motelle, Gourmet, Mohawk~~ |
|  | ~~Observación:~~ | ~~Ranco es ligeramente menos resistente que Tradiro~~ |
| 9.3.2 | Variedades de control para el ensayo con la raza 1 (ex 2) |  |
|  | Susceptibles | Marmande verte, Cherry Belle, Roma, Marporum, Ranco |
|  | ~~Resistentes únicamente a la raza 0~~ | ~~Marporum, Ranco~~ |
|  | Resistentes ~~a las razas 0 y 1~~ | Tradiro, Odisea, “Motelle x Marmande verte” |
|  | ~~Observación~~ | ~~Ranco es ligeramente menos resistente que Tradiro~~ |
| 9.3.3 | Variedades de control para el ensayo con la raza 2 (ex 3) |  |
|  | Susceptible ~~a las razas 0, 1 y 2~~ | Marmande verte, Motelle, Marporum |
|  | Resistente ~~a las razas 0, 1 y 2~~ | Tributes, Murdoch, “Marmande verte x Florida” |
| 9.4 | Diseño del ensayo | >20 plantas; p. ej., 35 semillas para 24 plantas (incluidas 2 de control) |
| 9.5 | Instalación del ensayo | invernadero o sala climatizada |
| 9.6 | Temperatura | de 24 a 28°C (ensayo severo, con aislado moderado)de 20 a 24°C (ensayo moderado, con aislado severo) |
| 9.7 | Luz | 12 horas por día o más |
| 9.8 | Estación | cualquier estación |
| 9.9 | Medidas especiales | una tierra de turba ligeramente ácida resulta óptima; mantener la tierra húmeda pero evitar el estrés hídrico |
| 10. | Inoculación |  |
| 10.1 | Preparación del inóculo | Messiaen aireado o PDA o medio Agar S de Messiaen o cultivo Czapek Dox o raspado de placas |
| 10.2 | Cuantificación del inóculo | recuento de esporas (ajustar a 106 por ml). Una concentración más baja para un aislado muy agresivo |
| 10.3 | Estado de desarrollo en el momento de la inoculación | de 10 a 18 días (de cotiledón a primera hoja) |
| 10.4 | Método de inoculación | inmersión de las raíces y los hipocótilos en una suspensión de esporas durante 5 a 15 minutos; opcionalmente se pueden trocear las raíces |
| 10.7 | Observaciones finales | de 14 a 21 días después de la inoculación |
| 11. | Observaciones |  |
| 11.1 | Método | visual |
| 11.2 | Escala de observación | síntomas: retraso del crecimiento, marchitez, amarilleo, pardeamiento de los vasos extendido por encima del cotiledón |
| 11.3 | Validación del ensayo | la evaluación de la resistencia de la variedad deberá calibrarse con los resultados de los controles resistentes y susceptibles. Las variedades estándar cercanas al límite entre la resistencia y la susceptibilidad serán útiles para las comparaciones entre laboratorios. |
| 12. | Interpretación de los resultados del ensayo en comparación con las variedades de control: |  |
|  | ausente | [1] síntomas intensos |
|  | presente | [9] síntomas leves o ausentes |
| 13. | Puntos de control esenciales: | Los resultados de los ensayos pueden variar ligeramente en cuanto a la presión del inóculo debido a las diferencias relativas a los aislados, la concentración de esporas, la humedad de la tierra y la temperatura. |

ii) Análisis de marcadores de ADN

Por lo general, la resistencia a la raza 0 (ex 1) y a la raza 1 (ex 2) la confiere el gen de resistencia I2. La presencia del alelo resistente y/o del alelo susceptible del gen I2 puede detectarse mediante el marcador codominante como se describe en este método.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agentes patógenos | *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* |
| 2. | Estado de cuarentena | I2 |
| 3. | Iniciadores |  |
| 3.1 | Alelo susceptible | Z1063-i2-F 5’-GTT TGA CAG CTT GGT TTT GT-3’Z1063-i2-R 5’-CTC AAA CTC ACC ATC ATT GA-3’ |
| 3.2 | Alelo resistente | TFusF1 5’-CTG AAA CTC TCC GTA TTT C-3’TFusRR1 5’-CGA AGA GTG ATT GGA GAT-3’ |
| 4. | Formato del examen |  |
| 4.1 | Número de plantas por genotipo | 20 plantas como mínimo |
| 4.2 | Variedades de control | presencia del alelo susceptible homocigótico: Moneymakerpresencia del alelo resistente homocigótico: Tradiro |
| 5. | Preparación: |  |
| 5.1 | Preparación del ADN | recolectar una parte de una hoja joven de cada planta. Extraer el ADN total siguiendo un protocolo estándar de extracción de ADN (basado en el uso de CTAB/SDS). Resuspender en 100 µl de T10E0,1. Diluir el ADN total a 1/10 (H2O) para obtener una concentración de ADN de 1-10 ng/µl. |
| 5.2 | Preparación de la PCR | utilizar 3 µl de cada muestra de ADN diluido en cada reacción de PCR.Preparar la mezcla maestra de PCR para un volumen de reacción de 20 µl:* 3 µl de ADN diluido 1/10
* 2,5 µl de tampón de reacción 10x
* MgCl2 2 mM
* 0,1 µM de cada iniciador para resistencia
* 0,2 µM de cada iniciador para susceptibilidad
* 200 µM de cada uno de los cuatro dNTP
* 1 unidad de Taq-ADN polimerasa
 |
| 6. | Condiciones de la PCR | 1. ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos2. 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, a 56°C durante 1 minuto y a 72°C durante 2 minutos3. ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos |
| 7. | Observaciones |  |
| 7.1 | Método | visual |
| 7.2 | Escala de observación |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| amplicón de 940bp solo | amplicón de 600bp solo | amplicones de 940bp y 600bp |
| está presente el alelo susceptible homocigótico | está presente el alelo resistente homocigótico | están presentes el alelo susceptible y el resistente: resistente heterocigótico |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 7.3 | Validación del ensayo | las variedades de control han de producir la(s) banda(s) prevista(s). |
| 8. | Interpretación de los resultados del ensayo |  |
|  | 48.1 Resistencia a la raza 0 (ex 1) |  |
|  | presente | [9] resistente homocigótico o heterocigótico en el análisis de marcadores de ADN.Si hay presencia del alelo susceptible homocigótico, deberá realizarse un bioensayo con la raza 0 (ex 1).Si el resultado del análisis de marcadores de ADN no confirma lo declarado en el cuestionario técnico, deberá realizarse un bioensayo para determinar si la variedad es resistente (por otro mecanismo, p. ej., el gen I2 sin I) o no. |
|  | 48.2 Resistencia a la raza 1 (ex 2) |  |
|  |  ausente | [1] susceptible homocigótico en el análisis de marcadores de ADN |
|  |  presente | [9] resistente homocigótico o heterocigótico en el análisis de marcadores de ADN.Si el resultado del análisis de marcadores de ADN no confirma lo declarado en el cuestionario técnico, deberá realizarse un bioensayo para determinar si la variedad es resistente (por otro mecanismo, p. ej., el gen I3) o no. |

## Propuesta de cambio del método de observación de los caracteres 51.1, 51.2 y 51.3

*Texto actual*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 51.(+) | VG | Resistance to Tomato mosaic virus (ToMV) | Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) | Resistenz gegen das Tomatenmosaik‑virus (ToMV) | Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) |  |  |
| **51.1** | **VG** | **– Strain 0** | **– Souche 0** | **– Pathotyp 0** | **– Cepa 0** |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Monalbo | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Mobaci, Mocimor, Moperou | 9 |
| **51.2** | **VG** | **– Strain 1** | **– Souche 1** | **– Pathotyp 1** | **– Cepa 1** |  |  |
| QL |  | absent | absente | fehlend | ausente | Monalbo | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Mocimor, Moperou | 9 |
| **51.3** | **VG** | **– Strain 2** | **– Souche 2** | **– Pathotyp 2** | **– Cepa 2** |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Monalbo | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Mobaci, Mocimor | 9 |

*Nuevo texto propuesto*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 51.(+) | VG | Resistance to Tomato mosaic virus (ToMV) | Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) | Resistenz gegen das Tomatenmosaik‑virus (ToMV) | Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) |  |  |
| **51.1** | **VG/VS** | **– Strain 0** | **– Souche 0** | **– Pathotyp 0** | **– Cepa 0** |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Monalbo | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Mobaci, Mocimor, Moperou | 9 |
| **51.2** | **VG/VS** | **– Strain 1** | **– Souche 1** | **– Pathotyp 1** | **– Cepa 1** |  |  |
| QL |  | absent | absente | fehlend | ausente | Monalbo | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Mocimor, Moperou | 9 |
| **51.3** | **VG/VS** | **– Strain 2** | **– Souche 2** | **– Pathotyp 2** | **– Cepa 2** |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Monalbo | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Mobaci, Mocimor | 9 |

## Propuesta de modificación de la explicación Ad. 51 mediante el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia y la introducción de cambios menores en el método actual

*Texto actual*

Ad. 51: Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV)

1. Agentes patógenos Virus del mosaico del tomate

3. Especies huéspedes *Solanum lycopersicum*

4. Fuente del inóculo Naktuinbouw[[6]](#footnote-7) (NL) o GEVES[[7]](#footnote-8) (FR)

5. Aislado Cepa 0 (p.ej., aislado INRA Avignon 6-5-1-1) 1 y 2

6. Establecimiento de la identidad del aislado variedades estándar de tomate genéticamente definidas

 Mobaci (Tm1), Moperou (Tm2), Momor (Tm22)

7. Establecimiento de la capacidad patógena en plantas susceptibles

8. Multiplicación del inóculo

8.1 Medio de multiplicación planta viva

8.2 Variedad para la multiplicación p. ej., Moneymaker, Marmande

8.7 Comprobación del inóculo cosechado opcionalmente: en *Nicotiana tabacum* “Xanthi”;

 comprobar las lesiones al cabo de 2 días

8.8 Período de conservación/viabilidad
 del inóculo fresco, más de 1 día; desecado, más de 1 año

9. Formato del examen

9.1 Número de plantas por genotipo 20 plantas como mínimo

9.2 Número de réplicas 1 réplica

9.3 Variedades de control

Susceptibles Marmande, Monalbo

Resistentes al ToMV: 0 y 2 Mobaci

Resistentes al ToMV: 0 y 1 Moperou

Resistentes con necrosis “Monalbo x Momor”

Resistentes Gourmet

9.4 Diseño del ensayo tratamiento de control con PBS y carborundo, o tampón similar

9.5 Instalación del ensayo invernadero o sala climatizada

9.6 Temperatura de 24 a 26°C

9.7 Luz 12 horas como mínimo

9.8 Estación los síntomas son más notorios en verano

10. Inoculación

10.1 Preparación del inóculo 1 g de hojas con síntomas y 10 ml de PBS, o tampón similar.

 Homogeneizar y añadir carborundo al tampón (1 g/30 ml)

10.3 Estado de desarrollo en el momento de la inoculación cotiledones o 2 hojas

10.4 Método de inoculación frotar suavemente

10.7 Observaciones finales de 11 a 21 días después de la inoculación

11. Observaciones

11.1 Método visual

11.2 Escala de observación síntomas de susceptibilidad:

 mosaico apical, deformación de las hojas;

 síntomas de resistencia (debida a hipersensibilidad):

 necrosis local, necrosis apical, necrosis sistémica

11.3 Validación del ensayo la evaluación de la resistencia de la variedad deberá calibrarse con los resultados de los controles resistentes y susceptibles.

Observación: En algunas variedades heterocigóticas, es posible que una proporción variable de plantas presenten una intensa necrosis sistémica o algunas manchas necróticas y otras plantas no presenten síntomas. Dicha proporción puede variar de un experimento a otro.

12. Interpretación de los resultados del ensayo en comparación con las variedades de control:

 ausente [1] síntomas de susceptibilidad

 presente [9] sin síntomas, o con síntomas de resistencia por hipersensibilidad

13. Puntos de control esenciales:

La temperatura y la luz pueden influir en el grado de necrosis. Cuanta más luz, mayor será el grado de necrosis. A temperaturas por encima de los 26°C la resistencia puede quebrantarse.

En las variedades heterocigotas resistentes puede haber plantas sin síntomas y plantas con necrosis intensa; a pesar de esta aparente segregación, la muestra puede considerarse homogénea con respecto a la resistencia.

Observación: Para el ToMV: 0 se recomienda la cepa INRA Avignon 6-5-1-1. Dicha cepa produce un llamativo mosaico Aucuba de color amarillo.

*Nuevo texto propuesto*

Ad. 51: Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV)

La resistencia a las cepas 0, 1 y 2 ha de examinarse mediante bioensayo (método i) y/o mediante análisis de marcadores de ADN (método ii). El bioensayo corresponde a una observación de tipo VG. El análisis de marcadores de ADN corresponde a una observación de tipo VS.

1. Bioensayo

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agentes patógenos | Virus del mosaico del tomate |
| 3. | Especies huéspedes | *Solanum lycopersicum* |
| 4. | Fuente del inóculo | Naktuinbouw[[8]](#footnote-9) (NL), GEVES[[9]](#footnote-10) (FR) o INIA[[10]](#footnote-11) (ES, cepa 0) |
| 5. | Aislado | Cepa 0 (p.ej., aislado INRA Avignon 6-5-1-1), cepa 1 y cepa 2 |
| 6. | Establecimiento de la identidad del aislado | variedades estándar de tomate genéticamente definidasMobaci (Tm1), Moperou (Tm2), Momor (Tm22) |
| 7. | Establecimiento de la capacidad patógena | en plantas susceptibles |
| 8. | Multiplicación del inóculo |  |
| 8.1 | Medio de multiplicación | planta viva |
| 8.2 | Variedad para la multiplicación | p. ej., Moneymaker, Marmande |
| 8.7 | Comprobación del inóculo cosechado | opcionalmente: en *Nicotiana tabacum* “Xanthi”; comprobar las lesiones al cabo de 2 días |
| 8.8 | Período de conservación/viabilidad del inóculo | fresco, más de 1 día; desecado, más de 1 año |
| 9. | Formato del examen |  |
| 9.1 | Número de plantas por genotipo | 20 plantas como mínimo |
| 9.2 | Número de réplicas | 1 réplica |
| 9.3 | Variedades de control |  |
|  | Susceptibles | Marmande, Monalbo |
|  | Resistentes al ToMV: 0 y 2 | Mobaci |
|  | Resistentes al ToMV: 0 y 1 | Moperou |
|  | Resistentes con necrosis | “Monalbo x Momor” |
|  | Resistentes | Gourmet |
| 9.4 | Diseño del ensayo | tratamiento de control con PBS y carborundo, o tampón similar |
| 9.5 | Instalación del ensayo | invernadero o sala climatizada |
| 9.6 | Temperatura | de 24 a 26°C |
| 9.7 | Luz | 12 horas como mínimo |
| 9.8 | Estación | los síntomas son más notorios en verano |
| 10. | Inoculación |  |
| 10.1 | Preparación del inóculo | 1 g de hojas con síntomas y 10 ml de PBS, o tampón similar.Homogeneizar y añadir carborundo al tampón (1 g/30 ml) |
| 10.3 | Estado de desarrollo en el momento de la inoculación | cotiledones o 2 hojas |
| 10.4 | Método de inoculación | frotar suavemente |
| 10.7 | Observaciones finales | de 11 a 21 días después de la inoculación |
| 11. | Observaciones |  |
| 11.1 | Método | visual |
| 11.2 | Escala de observación | síntomas de susceptibilidad:mosaico apical, deformación de las hojas;síntomas de resistencia (debida a hipersensibilidad):necrosis local, necrosis apical, necrosis sistémica |
| 11.3 | Validación del ensayo | la evaluación de la resistencia de la variedad deberá calibrarse con los resultados de los controles resistentes y susceptibles. |
|  | Observación: | En algunas variedades heterocigóticas, es posible que una proporción variable de plantas presenten una intensa necrosis sistémica o algunas manchas necróticas y otras plantas no presenten síntomas. Dicha proporción puede variar de un experimento a otro. |
| 12. | Interpretación de los resultados del ensayo en comparación con las variedades de control: |  |
|  | ausente | [1] síntomas de susceptibilidad |
|  | presente | [9] sin síntomas, o con síntomas de resistencia por hipersensibilidad |
| 13. | Puntos de control esenciales: | La temperatura y la luz pueden influir en el grado de necrosis. Cuanta más luz, mayor será el grado de necrosis. A temperaturas por encima de los 26°C la resistencia puede quebrantarse.En las variedades heterocigotas resistentes puede haber plantas sin síntomas y plantas con necrosis intensa; a pesar de esta aparente segregación, la muestra puede considerarse homogénea con respecto a la resistencia.Observación: Para el ToMV: 0 se recomienda la cepa INRA Avignon 6-5-1-1. Dicha cepa produce un llamativo mosaico Aucuba de color amarillo. |

 ii) Análisis de marcadores de ADN

Por lo general, la resistencia al ToMV la confiere el gen de resistencia Tm2 (alelos Tm2 o Tm22). La presencia de los alelos resistentes Tm2 y Tm22 o del alelo susceptible tm2 puede detectarse mediante el marcador codominante como se describe en Arens, P. *et al* (2010). Aspectos específicos:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agentes patógenos | Virus del mosaico del tomate |
| 2. | Gen funcional | Tm2/22 |
| 3. | Iniciadores |  |
| 3.1 | Ensayo 1 para comprobación del alelo resistente Tm2 o Tm22 | Iniciador exterior TMV-2286F: 5’GGGTATACTGGGAGTGTCCAATTC3’Iniciador exterior TMV-2658R: 5’CCGTGCACGTTACTTCAGACAA3’Tm22 SNP2494F: 5’CTCATCAAGCTTACTCTAGCCTACTTTAGT3’Tm2 SNP2493R: 5’CTGCCAGTATATAACGGTCTACCG3’ |
| 3.2 | Ensayo 2 para comprobación del alelo susceptible oresistente | Iniciador exterior TM2-748F: 5’CGGTCTGGGGAAAACAACTCT3’Iniciador exterior TM2-1256R: 5’CTAGCGGTATACCTCCACATCTCC3’TM2-SNP901misR: 5’GCAGGTTGTCCTCCAAATTTTCCATC3’TM2-SNP901misF: 5’CAAATTGGACTGACGGAACAGAAAGTT3’ |
| 4. | Formato del examen |  |
| 4.1 | Número de plantas por genotipo | 20 plantas como mínimo |
| 4.2 | Variedades de control | presencia del alelo susceptible homocigótico tm2: Moneymakerpresencia del alelo resistente Tm2: Moperoupresencia del alelo resistente Tm22: Momor, Persica, Campeon |
| 6. | Condiciones de la PCR | 1. ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos2. 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, a 55°C durante 1 minuto y a 72°C durante 2 minutos3. ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos |
| 8. | Interpretación de los resultados del ensayo | La presencia de los alelos tm2, Tm2 o Tm22 da lugar a distintas interpretaciones de los caracteres 51.1, 51.2 y 51.3 (véase el cuadro). Si el resultado del análisis de marcadores de ADN no confirma lo declarado en el cuestionario técnico, deberá realizarse un bioensayo para determinar si la variedad es resistente (por otro mecanismo, p. ej., el gen Tm1) o no. |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Resultado del análisis de marcadores de ADN | tm2/tm2 | Tm2/tm2 o Tm2/Tm2 | Tm22/tm2 o Tm22/Tm22 oTm22/Tm2 |
|  |  | (se produce ocasionalmente) |  |
| 51.1 Cepa 0 | [1] ausente | [9] resistente | [9] resistente |
| 51.2 Cepa 1 | [1] ausente | [9] resistente | [9] resistente |
| 51.3 Cepa 2 | [1] ausente | [1] ausente | [9] resistente |

## Propuesta de cambio del método de observación del carácter 58 “Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV) - Raza 0”

*Texto actual*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 58. (+) | VG | Resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV)- Race 0 | Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV) – Pathotype 0 | Resistenz gegen das Tomatenbronzen­fleckenvirus (TSWV) - Pathotyp 0 | Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)– Raza 1 |  |  |
| QL |  | absent | absente | fehlend | ausente | Montfavet H 63.5 | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Lisboa | 9 |

*Nuevo texto propuesto*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 58. (+) | VG/VS | Resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV)- Race 0 | Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV) – Pathotype 0 | Resistenz gegen das Tomatenbronzen­fleckenvirus (TSWV) - Pathotyp 0 | Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)– Raza ~~1~~ 0 |  |  |
| QL |  | absent | absente | fehlend | ausente | Montfavet H 63.5 | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Lisboa | 9 |

Propuesta de modificación de la explicación Ad. 58 mediante el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia

*Texto actual*

Ad. 58: Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)

1. Agentes patógenos Virus del bronceado del tomate

2. Estado de cuarentena sí

3. Especies huéspedes *Solanum lycopersicum*

4. Fuente del inóculo Naktuinbouw[[11]](#footnote-12) (NL) o GEVES[[12]](#footnote-13) (FR)

5. Aislado raza 0, preferiblemente una variante no transmisible por tisanópteros (trips)

7. Establecimiento de la capacidad
 patógena bioensayo

8. Multiplicación del inóculo

8.6 Cosecha del inóculo las hojas con síntomas pueden conservarse a -70°C

9. Formato del examen

9.1 Número de plantas por genotipo 20 plantas

9.2 Número de réplicas 1 réplica

9.3 Variedades de control

Susceptibles Monalbo, Momor, Montfavet H 63.5

Resistentes Tsunami, Bodar, Mospomor, Lisboa

9.5 Instalación del ensayo invernadero o cámara climatizada

9.6 Temperatura 20°C

9.7 Luz 12 horas como mínimo

9.9 Medidas especiales prevenir o combatir los trips

10. Inoculación

10.1 Preparación del inóculo presionar las hojas con síntomas en un tampón helado a PBS 0,01 M, pH 7,4, con sulfito de sodio 0,01 M o tampón similar

Opcionalmente: filtrar la savia de las hojas a través de una capa doble de muselina

10.3 Estado de desarrollo en el
 momento de la inoculación una o dos hojas desarrolladas

10.4 Método de inoculación mecánica, frotando los cotiledones con carborundo, suspensión de inóculo <10 C

10.7 Observaciones finales de 7 a 21 días después de la inoculación

11. Observaciones

11.1 Método visual

11.2 Escala de observación síntomas: mosaico apical, bronceado, diversas deformaciones, necrosis

11.3 Validación del ensayo la evaluación de la resistencia de la variedad deberá calibrarse con los resultados de los controles resistentes y susceptibles.

12. Interpretación de los resultados del ensayo en comparación con las variedades de control:

 ausente [1] síntomas

 presente [9] ausencia de síntomas

13. Puntos de control esenciales:

El TSWV está sujeto a cuarentena en algunos países. El TSWV se transmite mediante *Thrips tabaci* y el trips occidental de las flores (*Frankliniella occidentalis*). El patotipo 0 se caracteriza por su incapacidad para superar la resistencia en variedades de tomate portadoras del gen de resistencia Sw-5.

*Nuevo texto propuesto*

Ad. 58: Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)

La resistencia a la cepa 0 ha de examinarse mediante bioensayo (método i) y/o mediante análisis de marcadores de ADN (método ii). El bioensayo corresponde a una observación de tipo VG. El análisis de marcadores de ADN corresponde a una observación de tipo VS.

i) Bioensayo

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agentes patógenos | Virus del bronceado del tomate |
| 2. | Estado de cuarentena | sí |
| 3. | Especies huéspedes | *Solanum lycopersicum* |
| 4. | Fuente del inóculo | Naktuinbouw[[13]](#footnote-14) (NL) o GEVES[[14]](#footnote-15) (FR) |
| 5. | Aislado | raza 0, preferiblemente una variante no transmisible por tisanópteros (trips) |
| 7. | Establecimiento de la capacidad patógena | bioensayo |
| 8. | Multiplicación del inóculo |  |
| 8.6 | Cosecha del inóculo | las hojas con síntomas pueden conservarse a -70°C |
| 9. | Formato del examen |  |
| 9.1 | Número de plantas por genotipo | 20 plantas |
| 9.2 | Número de réplicas | 1 réplica |
| 9.3 | Variedades de control |  |
|  | Susceptibles | Monalbo, Momor, Montfavet H 63.5 |
|  | Resistentes | Tsunami, Bodar, Mospomor, Lisboa |
| 9.5 | Instalación del ensayo | invernadero o cámara climatizada |
| 9.6 | Temperatura | 20°C |
| 9.7 | Luz | 12 horas como mínimo |
| 9.9 | Medidas especiales | prevenir o combatir los trips |
| 10. | Inoculación |  |
| 10.1 | Preparación del inóculo | presionar las hojas con síntomas en un tampón helado a PBS 0,01 M, pH 7,4, con sulfito de sodio 0,01 M o tampón similar Opcionalmente: filtrar la savia de las hojas a través de una capa doble de muselina |
| 10.3 | Estado de desarrollo en el momento de la inoculación | una o dos hojas desarrolladas |
| 10.4 | Método de inoculación | mecánica, frotando los cotiledones con carborundo, suspensión de inóculo <10 C |
| 10.7 | Observaciones finales | de 7 a 21 días después de la inoculación |
| 11. | Observaciones |  |
| 11.1 | Método | visual |
| 11.2 | Escala de observación | síntomas: mosaico apical, bronceado, diversas deformaciones, necrosis |
| 11.3 | Validación del ensayo | la evaluación de la resistencia de la variedad deberá calibrarse con los resultados de los controles resistentes y susceptibles. |
| 12. | Interpretación de los resultados del ensayo en comparación con las variedades de control: |  |
|  | ausente | [1] síntomas |
|  | presente | [9] ausencia de síntomas |
| 13. | Puntos de control esenciales: | El TSWV está sujeto a cuarentena en algunos países. El TSWV se transmite mediante *Thrips tabac*i y el trips occidental de las flores (*Frankliniella occidentalis*). El patotipo 0 se caracteriza por su incapacidad para superar la resistencia en variedades de tomate portadoras del gen de resistencia Sw-5. |

ii) Análisis de marcadores de ADN

Por lo general, la resistencia a la cepa 0 del TSVV la confiere el gen de resistencia Sw-5. La presencia del alelo resistente y/o del (de los) alelos susceptible(s) puede detectarse mediante el marcador codominante como se describe en Dianese, E.C. *et al* (2010). Aspectos específicos:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agentes patógenos | Virus del bronceado del tomate |
| 2. | Gen funcional | Sw-5b |
| 3. | Iniciadores |  |
| 3.1 | Alelos susceptibles | Sw5-Vat1-F: 5’-ACAACATCAAACAATGTTAGCC-3’ Sw5-Vat2-F: 5’-CATCAAACAATGCAGTTAGCC-3’ |
| 3.2 | Alelo resistente | Sw5-Res-F: 5’-ATCAACCAATACAGCCTAACC-3 |
| 3.3 | Inverso universal | Sw5-universal-R: 5’-TTTCTCCCTGCAAGTTCACC-3’ |
| 3.4 | Sondas para alelos específicos | Sw5-Sus1: 5’-VIC-TACATTATGAAGGGTTAACAAG-MGB-NFQ-3’Sw5-Sus2: 5’-6FAM-ACAACAGAGGGTTAACAAGTTTAGG-BHQ1-3’Sw5-Res: 5’-TEXAS RED-TGGGCGAAAATCCCAACAAG-BHQ2-3’ |
| 4. | Formato del examen |  |
| 4.1 | Número de plantas por genotipo | 20 plantas como mínimo |
| 4.2 | Variedades de control | presencia del alelo susceptible homocigótico 1: Moneymakerpresencia del alelo susceptible homocigótico 2: Mountain Magicpresencia del alelo resistente homocigótico: Montealto |
| 6. | Condiciones de la PCR | 1. ciclo inicial de desnaturalización durante 10 minutos a 95°C2. 40 ciclos durante 15 segundos a 95°C y durante 1 min a 60°C. Todos los ciclos finalizan con una lectura de la placa.  |
| 8. | Interpretación de los resultados del ensayo |  |
|  | ausente | [1] presencia del (de los) alelo(s) susceptible(s) y ausencia del alelo resistente |
|  | presente | [9] presencia del alelo resistente (homocigótico o heterocigótico)Si el resultado del análisis de marcadores de ADN no confirma lo declarado en el cuestionario técnico, deberá realizarse un bioensayo para determinar si la variedad es resistente (por otro mecanismo) o no. |

## Propuesta de adición de una referencia a la bibliografía relativa a los cambios indicados en los puntos a) – f) en el capítulo 9 “Bibliografía”

*Propuesta de adición al capítulo 9. Bibliografía*

Dianese, E.C. *et al*, 2010: Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the Sw-5 (Topovirus resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. Molecular Breeding, 25(1), págs. 133-142.

[Fin del documento]

1. Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-2)
2. GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr [↑](#footnote-ref-3)
3. Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-4)
4. GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr [↑](#footnote-ref-5)
5. INIA: cardaba@inia.sp [↑](#footnote-ref-6)
6. Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-7)
7. GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr [↑](#footnote-ref-8)
8. Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-9)
9. GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr [↑](#footnote-ref-10)
10. INIA: cardaba@inia.sp [↑](#footnote-ref-11)
11. Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-12)
12. GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr [↑](#footnote-ref-13)
13. Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-14)
14. GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr [↑](#footnote-ref-15)