

Comité de Redacción Ampliado

TC-EDC/Mar18/8

Ginebra, 26 y 27 de marzo de 2018

Original: Inglés

Fecha: 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*

1. El presente documento tiene por finalidad exponer una propuesta de revisión parcial de las directrices de examen del tomate (documento TG/44/11 Rev.).
2. 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)):
3. Se proponen las siguientes modificaciones:
 - a) Cambiar el método de observación de los caracteres 48.1 y 48.2:
 - i) Carácter 48.1 "Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) - Raza 0 (ex 1)"
 - ii) Carácter 48.2 "Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) - Raza 1 (ex 2)"
 - b) 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
 - c) Cambiar el método de observación de los caracteres 51.1, 51.2 y 51.3:
 - i) Carácter 51.1 "Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV), Cepa 0"
 - ii) Carácter 51.2 "Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV), Cepa 1"
 - iii) Carácter 51.3 "Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV), Cepa 2"
 - d) 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
 - e) Cambiar el método de observación del carácter 58 "Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV) - Raza 0"
 - f) Modificar la explicación Ad. 58 mediante el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia
 - g) En el capítulo 9 "Bibliografía", añadir una referencia a la bibliografía relativa a los cambios indicados en los puntos a) – f).
4. 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 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Résistance à <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Resistenz gegen <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (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 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Résistance à <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Resistenz gegen <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (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 | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> |
| 3. Especies huéspedes..... | <i>Solanum lycopersicum</i> |
| 4. Fuente del inóculo | Naktuinbouw ¹ (NL) y GEVES ² (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 10 ⁶ 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 aislamiento moderado)
de 20 a 24°C (ensayo moderado, con aislamiento 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 10 ⁶ por ml).
Una concentración más baja para un aislamiento muy agresivo |
| 10.3 Estado de desarrollo en el momento de la inoculación | de 10 a 18 días (de cotiledón a primera hoja) |

¹ Naktuinbouw: resistantie@naktuinbouw.nl² GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

- 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.

i) Bioensayo

1.	Agentes patógenos	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
3.	Especies huéspedes	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Fuente del inóculo	Naktuinbouw ³ (NL), GEVES ⁴ (FR) o INIA ⁵ (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 10 ⁶ 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)

³ Naktuinbouw: resistantie@naktuinbouw.nl

⁴ GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr

⁵ INIA: cardaba@inia.sp

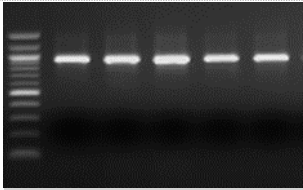
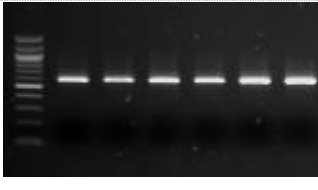
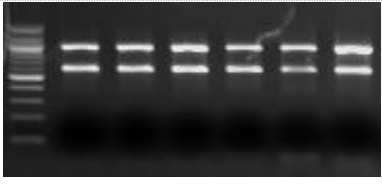
9.5	Instalación del ensayo	invernadero o sala climatizada
9.6	Temperatura	de 24 a 28°C (ensayo severo, con aislado moderado) de 20 a 24°C (ensayo moderado, con aislado severo)
9.7	Luz	12 horas por día o más
9.8	Estación	cualquier estación
9.9	Medidas especiales	una tierra de turba ligeramente ácida resulta 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 10 ⁶ 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	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
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: Moneymaker presencia del alelo resistente homocigótico: Tradiro
5.	Preparación:	

5.1	<u>Preparación del ADN</u>	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 T ₁₀ E _{0.1} . Diluir el ADN total a 1/10 (H ₂ O) para obtener una concentración de ADN de 1-10 ng/µl.
5.2	<u>Preparación de la PCR</u>	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: <ul style="list-style-type: none"> • 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.	<u>Condiciones de la PCR</u>	1. ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos 2. 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, a 56°C durante 1 minuto y a 72°C durante 2 minutos 3. ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos
7.	<u>Observaciones</u>	
7.1	<u>Método</u>	visual
7.2	<u>Escala de observación</u>	

		
<u>amplicón de 940bp solo</u>	<u>amplicón de 600bp solo</u>	<u>amplicones de 940bp y 600bp</u>
<u>está presente el alelo susceptible homocigótico</u>	<u>está presente el alelo resistente homocigótico</u>	<u>están presentes el alelo susceptible y el resistente: resistente heterocigótico</u>

7.3	<u>Validación del ensayo</u>	las variedades de control han de producir la(s) banda(s) prevista(s).
8.	<u>Interpretación de los resultados del ensayo</u>	
	<u>48.1 Resistencia a la raza 0 (ex 1)</u>	
	<u>presente</u>	<u>[9] resistente homocigótico o heterocigótico en el análisis de marcadores de ADN.</u> <u>Si hay presencia del alelo susceptible homocigótico, deberá realizarse un bioensayo con la raza 0 (ex 1).</u> <u>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.</u>
	<u>48.2 Resistencia a la raza 1 (ex 2)</u>	
	<u>ausente</u>	<u>[1] susceptible homocigótico en el análisis de marcadores de ADN</u>
	<u>presente</u>	<u>[9] resistente homocigótico o heterocigótico en el análisis de marcadores de ADN.</u> <u>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.</u>

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/ VS	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 Naktuinbouw⁶ (NL) o GEVES⁷ (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.

⁶ Naktuinbouw: resistantie@naktuinbouw.nl

⁷ GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr

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.

i) Bioensayo

1.	Agentes patógenos	Virus del mosaico del tomate
3.	Especies huéspedes	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Fuente del inóculo	Naktuinbouw ⁸ (NL), GEVES ⁹ (FR) o INIA ¹⁰ (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 definidas Mobaci (Tm1), Moperou (Tm2), Momor (Tm2 ²)
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 <i>Nicotiana tabacum</i> "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

⁸ Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl

⁹ GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr

¹⁰ INIA: cardaba@inia.sp

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	Tm2/2 ²
3.	Iniciadores	
3.1	Ensayo 1 para comprobación del alelo resistente Tm2 o Tm2 ²	Iniciador exterior TMV-2286F: 5'GGGTATACTGGGAGTGTCCAATTC3' Iniciador exterior TMV-2658R: 5'CCGTGCACGTTACTTCAGACAA3' Tm2 ² SNP2494F: 5'CTCATCAAGCTTACTCTAGCCTACTTTAGT3' Tm2 SNP2493R: 5'CTGCCAGTATATAACGGTCTACCG3'
3.2	Ensayo 2 para comprobación del alelo susceptible o resistente	Iniciador exterior TM2-748F: 5'CGGTCTGGGGAAAACAACCTCT3' Iniciador exterior TM2-1256R: 5'CTAGCGGTATACCTCCACATCTCC3' TM2-SNP901misR: 5'GCAGGTTGTCTCCAAATTTTCCATC3' TM2-SNP901misF: 5'CAAATTGGACTGACGGAACAGAAAGTT3'
4.	Formato del examen	
4.1	Número de plantas por genotipo	20 plantas como mínimo

4.2	<u>Variedades de control</u>	<u>presencia del alelo susceptible homocigótico tm2: Moneymaker</u> <u>presencia del alelo resistente Tm2: Moperou</u> <u>presencia del alelo resistente Tm2²: Momor, Persica, Campeon</u>
6.	<u>Condiciones de la PCR</u>	<u>1. ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos</u> <u>2. 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, a 55°C durante 1 minuto y a 72°C durante 2 minutos</u> <u>3. ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos</u>
8.	<u>Interpretación de los resultados del ensayo</u>	<u>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.</u>

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

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)	Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV)	Resistenz gegen das Tomatenbronzefleckenvirus (TSWV)	Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)		
		- Race 0	- Pathotype 0	- Pathotyp 0	- 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)	Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV)	Resistenz gegen das Tomatenbronzefleckenvirus (TSWV)	Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)		
		- Race 0	- Pathotype 0	- Pathotyp 0	- 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 Naktuinbouw¹¹ (NL) o GEVES¹² (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 inóculopresionar 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 observaciónsíntomas: 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.

¹¹ Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl¹² GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

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	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Fuente del inóculo	Naktuinbouw ¹³ (NL) o GEVES ¹⁴ (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 Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl

¹⁴ GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

13.	Puntos de control esenciales:	El TSWV está sujeto a cuarentena en algunos países. El TSWV se transmite mediante <i>Thrips tabaci</i> y el trips occidental de las flores (<i>Frankliniella occidentalis</i>). 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: Moneymaker presencia del alelo susceptible homocigótico 2: Mountain Magic presencia del alelo resistente homocigótico: Montealto
6.	Condiciones de la PCR	1. ciclo inicial de desnaturalización durante 10 minutos a 95°C 2. 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]