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

|  |  |
| --- | --- |
| Comité de Redacción Ampliado  Ginebra, 26 y 27 de marzo de 2018 | TC-EDC/Mar18/9  Original: Inglés  Fecha: 8 de marzo de 2018 |

REVISIÓN PARCIAL DE LAS DIRECTRICES DE EXAMEN DEL PORTAINJERTOS DE TOMATE

Documento preparado por un experto de los Países Bajos

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

El presente documento tiene por finalidad exponer una propuesta de revisión parcial de las directrices de examen del portainjertos de tomate (documento TG/294/1 Corr. 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 portainjertos de tomate (documento TG/294/1 Corr. Rev.) conforme a los documentos TG/294/1 Corr. Rev. y TWV/51/11 “*Partial Revision of the Test Guidelines for Tomato Rootstocks*” (Revisión parcial de las directrices de examen del portainjertos de tomate) y propuso efectuar una revisión de dichas directrices según se indica a continuación (véase el párrafo 115 del documento TWV/51/16 “*Report*” (Informe)):

1. Cambiar el método de observación de los caracteres 24.1 y 24.2:
   1. carácter 24.1 “Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici –* Raza 0 (ex 1)”
   2. carácter 24.2 “Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici –* Raza 1 (ex 2)”
2. Modificar la explicación Ad. 24 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 27.1, 27.2 y 27.3:
   1. Carácter 27.1 “Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) – Cepa 0”
   2. Carácter 27.2 “Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) – Cepa 1”
   3. Carácter 27.3 “Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) – Cepa 2”
4. Modificar la explicación Ad. 27 mediante el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia y la introducción de cambios tipográficos menores en el método actual.
5. Modificar la explicación Ad. 30 “Resistencia al virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV)” mediante la revisión del método actual y el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia.
6. Cambiar el método de observación del carácter 31 “Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)”.
7. Modificar la explicación Ad. 31 mediante el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia.
8. En el capítulo 9 “Bibliografía”, añadir una referencia a la bibliografía relativa a los cambios indicados en los puntos a) - h).

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

Propuesta de cambio del método de observación de los caracteres 24.1 y 24.2

*Texto actual*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 24.  (+) |  | 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) |  |  |
| 24.1 (\*) | VG | – Race 0 (ex 1) | – Pathotype 0 (ex 1) | – Pathotyp 0 (ex 1) | – Raza 0 (ex 1) |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente |  | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Emperador | 9 |
| 24.2 (\*) | VG | – Race 1 (ex 2) | – Pathotype 1 (ex 2) | – Pathotyp 1 (ex 2) | – Raza 1 (ex 2) |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente |  | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Emperador | 9 |
| 24.3 (\*) | VG | – Race 2 (ex 3) | – Pathotype 2 (ex 3) | – Pathotyp 2 (ex 3) | – Raza 2 (ex 3) |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Emperador | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Colosus | 9 |

*Nuevo texto propuesto*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 24.  (+) |  | 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) |  |  |
| 24.1 (\*) | VG/ VS | – Race 0 (ex 1) | – Pathotype 0 (ex 1) | – Pathotyp 0 (ex 1) | – Raza 0 (ex 1) |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente |  | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Emperador | 9 |
| 24.2 (\*) | VG/ VS | – Race 1 (ex 2) | – Pathotype 1 (ex 2) | – Pathotyp 1 (ex 2) | – Raza 1 (ex 2) |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente |  | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Emperador | 9 |
| 24.3 (\*) | VG | – Race 2 (ex 3) | – Pathotype 2 (ex 3) | – Pathotyp 2 (ex 3) | – Raza 2 (ex 3) |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Emperador | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Colosus | 9 |

## Propuesta de modificación de la explicación Ad. 24 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. 24: 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……………………………… (*Solanum lycopersicum*) Marmande, Marmande verte, Resal

Resistentes únicamente a la raza 0………………(*Solanum lycopersicum*) Marporum, Larissa, “Marporum x Marmande verte”, Marsol, Anabel

Resistentes a las razas 0 y 1 ……… (*Solanum lycopersicum*) Motelle, Gourmet, Mohawk

Variedades de control para el ensayo con la raza 1 (ex 2)

Susceptibles ………………………… (*Solanum lycopersicum*) Marmande verte, Cherry Belle, Roma

Resistentes únicamente a la raza 0 …………(*Solanum lycopersicum*) Marporum, Ranco

Resistentes a las razas 0 y 1 ………….… (*Solanum lycopersicum*) Tradiro, Odisea

Observación: Ranco es ligeramente menos resistente que Tradiro

Variedades de control para el ensayo con la raza 2 (ex 3)

Susceptible a la raza 2………. Emperador

Resistente a las razas 0, 1 y 2…….……. Colosus

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 esporas 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 5-15 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

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

ausentes ………………………… [1] síntomas intensos

presentes …………………… [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. Las variedades estándar cercanas al límite entre la resistencia y la susceptibilidad serán útiles para las comparaciones entre laboratorios.

*Nuevo texto propuesto*

Ad. 24: Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

La resistencia a la raza 0 (ex 1) y a 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 | (*Solanum lycopersicum*) Marmande, Marmande verte, Resal |
|  | Resistentes ~~únicamente a la raza 0~~ | “Marporum x Marmande verte”, ~~Marsol, Anabel~~ Motelle, Gourmet, Mohawk, Ranco, Tradiro |
|  | ~~Resistentes a las razas 0 y 1~~ | ~~(~~*~~Solanum lycopersicum~~*~~) 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 | (*Solanum lycopersicum*) Marmande verte, Cherry Belle, Roma, Marporum, Ranco |
|  | ~~Resistentes únicamente a la raza 0~~ | ~~(Solanum lycopersicum) Marporum, Ranco~~ |
|  | Resistentes ~~a las razas 0 y 1~~ | Emperador, Colosus y (*Solanum lycopersicum*) 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) |  |
|  | Susceptibles ~~a la raza 2~~ | Emperador y (*Solanum lycopersicum*) Marmande verte, Motelle, Marporum |
|  | Resistentes ~~a las razas 0, 1 y 2~~ | Colosus y (*Solanum lycopersicum*) 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 esporas 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 5-15 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 |
| 12. | Interpretación de los resultados del ensayo en comparación con las variedades de control: |  |
|  | ausentes [1] | síntomas intensos |
|  | presentes [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. Las variedades estándar cercanas al límite entre la resistencia y la susceptibilidad serán útiles para las comparaciones entre laboratorios. | |

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. | Gen funcional | 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:  (*Solanum lycopersicum*) Moneymaker  presencia del alelo resistente homocigótico: (*Solanum lycopersicum*) 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 * MgCl22 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 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. | Observaciones |  |
| 7.1 | Método | visual |
| 7.2 | Escala de observación |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| amplicón de 940 bp (solo | amplicón de 600 bp (solo | amplicones de 940 y 600 bp |
| está presente el alelo susceptible homocigótico) | está presente el alelo resistente homocigótico) | (está 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 |  |
|  | 24.1 Raza 0 (ex 1) |  |
|  | presentes [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. |
|  | 24.2 Raza 1 (ex 2) |  |
|  | ausentes [1] | susceptible homocigótico en el análisis de marcadores de ADN |
|  | presentes [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 27.1, 27.2 y 27.3

*Texto actual*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 27.  (+) |  | Resistance to Tomato mosaic virus (ToMV) | Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) | Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) | Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) |  |  |
| 27.1 | VG | – Strain 0 | – Souche 0 | – Pathotyp 0 | – Cepa 0 |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente |  | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Emperador | 9 |
| **27.2** |  | – Strain 1 | – Souche 1 | – Pathotyp 1 | – Cepa 1 |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente |  | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente |  | 9 |
| **27.3** |  | – Strain 2 | – Souche 2 | – Pathotyp 2 | – Cepa 2 |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente |  | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente |  | 9 |

*Nuevo texto propuesto*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 27.  (+) |  | Resistance to Tomato mosaic virus (ToMV) | Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) | Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) | Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) |  |  |
| 27.1 | VG/ VS | – Strain 0 | – Souche 0 | – Pathotyp 0 | – Cepa 0 |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente |  | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Emperador | 9 |
| **27.2** | VG/ VS | – Strain 1 | – Souche 1 | – Pathotyp 1 | – Cepa 1 |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente |  | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente |  | 9 |
| **27.3** | VG/ VS | – Strain 2 | – Souche 2 | – Pathotyp 2 | – Cepa 2 |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente |  | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente |  | 9 |

## Propuesta de modificación de la explicación Ad. 27 mediante el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia y la introducción de cambios tipográficos menores en el método actual

*Texto actual*

Ad. 27: 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 (*Solanum lycopersicum*) Marmande, Monalbo

Resistentes al ToMV: 0 y 2 (*Solanum lycopersicum*) Mobaci

Resistentes al ToMV: 0 y 1 (*Solanum lycopersicum*) Moperou

Resistentes con necrosis (*Solanum lycopersicum*) “Monalbo x Momor”

Resistentes (*Solanum lycopersicum*) 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 h 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:

ausentes …………………………[1] síntomas de susceptibilidad

presentes …………………………[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 temperatura superior a los 26°C, la resistencia puede desaparecer.

En las variedades heterocigóticas 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.

Nota: Se recomienda la cepa INRA Avignon 6-5-1-1 para ToMV: 0. Dicha cepa produce un llamativo mosaico Aucuba de color amarillo.

*Nuevo texto propuesto*

Ad. 27: 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) o GEVES[[9]](#footnote-10) (FR) |
| 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 (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 | (*Solanum lycopersicum*) Marmande, Monalbo |
|  | Resistentes al ToMV: 0 y 2 | (*Solanum lycopersicum*) Mobaci |
|  | Resistentes al ToMV: 0 y 1 | (*Solanum lycopersicum*) Moperou |
|  | Resistentes con necrosis | (*Solanum lycopersicum*) “Monalbo x Momor” |
|  | Resistentes | (*Solanum lycopersicum*) 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 h 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: |  |
|  | ausentes [1] | síntomas de susceptibilidad |
|  | presentes [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 temperatura superior a los 26°C, la resistencia puede desaparecer.  En las variedades heterocigóticas 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.  Nota: Se recomienda la cepa INRA Avignon 6-5-1-1 para ToMV: 0. Dicha cepa produce un llamativo mosaico Aucuba de color amarillo. | |

1. 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 o resistente | 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:  (*Solanum lycopersicum*) Moneymaker  presencia del alelo resistente Tm2: (*Solanum lycopersicum*) Moperou  presencia del alelo resistente Tm22: (*Solanum lycopersicum*) Momor, Persica, Campeon |
| 6. | Condiciones de la PCR | 1. ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos  2. 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, a 55°C durante 1 minuto y a 72°C durante 2 minutos  3. 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 27.1, 27.2 y 27.3 (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) |  |
| 27.1 Cepa 0 | [1] ausente | [9] resistente | [9] resistente |
| 27.2 Cepa 1 | [1] ausente | [9] resistente | [9] resistente |
| 27.3 Cepa 2 | [1] ausente | [1] ausente | [9] resistente |

## Propuesta de modificación de la explicación Ad. 30 “Resistencia al virus del enrollamiento del bronceado de la hoja (TYLCV)” mediante la revisión del método actual y el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia

*Texto actual*

Ad. 30: Resistencia al virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV)

1. Agentes patógenos Virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) (véase la nota que figura más adelante)

2. Estado de cuarentena sí

3. Especies huéspedes *Solanum lycopersicum*

4. Fuente del inóculo -

5. Aislado -

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: (*Solanum lycopersicum*) Montfavet H 63.5

Resistentes: (*Solanum lycopersicum*) TY 20, Anastasia, Mohawk

9.5 Instalación del ensayo campo con presión natural de la enfermedad

9.9 Medidas especiales evitar la propagación de moscas blancas

10. Inoculación

10.3 Estado de desarrollo en el momento de la inoculación de 6 a 12 semanas (plantas adultas)

10.4 Método de inoculación vector (moscas blancas Bemisia portadoras del TYLCV)

10.7 Observaciones finales de 1 a 2 meses después de la inoculación

11. Observaciones

11.1 Método visual

11.2 Escala de observación Síntomas: amarilleo y rizado de las hojas

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:

ausentes………………………… [1] síntomas intensos

presentes ………………… [9] síntomas ausentes o leves

13. Puntos de control esenciales:

El TYLCV es endémico en muchas zonas tropicales y subtropicales y está sujeto a cuarentena en muchos países de clima templado. El TYLCV figura en la lista de alertas de la EPPO. Algunas variedades resistentes al TYLCV pueden ser susceptibles a otro virus estrechamente relacionado, el de la hoja en cuchara de Cerdeña (TYLCSV).

*Nuevo texto propuesto*

Ad. 30: Resistencia al virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV)

1. Método de agroinoculación

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agentes patógenos | Cepa IL del virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) (véase la nota que figura más adelante) |
| 2. | Estado de cuarentena | sí (véase el punto 13) |
| 3. | Especies huéspedes | *Solanum lycopersicum* |
| 4. | Fuente del inóculo | Dr. Eduardo R. Bejarano, Laboratorio de Fitogenética del IHSM‑UMA‑CSIC)[[10]](#footnote-11) |
| 5. | Aislado | Alm:Pep:99 (cepa IL) |
| 6. | Establecimiento de la identidad del aislado |  |
| 7. | Establecimiento de la capacidad patógena |  |
| 8. | Multiplicación del inóculo |  |
| 8.1 | Medio de multiplicación | extracto de levadura-peptona (YEP)/kanamicina |
| 8.2 | Variedad para la multiplicación |  |
| 8.3 | Estado de desarrollo en el momento de la inoculación | 3-4 hojas |
| 8.4 | Medio de inoculación | YEP |
| 8.5 | Método de inoculación | Agroinfiltración por punción del tallo. Para la agroinoculación de las plantas se emplea la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, transformada con plásmidos que contienen los clones infecciosos (Morilla et al. 2005. Phytopathology 95: 1089-1097)  La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* transformada es un organismo modificado genéticamente y ha de cumplir con la legislación relativa a la protección del medio ambiente y la salud humana y animal. |
| 8.6 | Cosecha del inóculo |  |
| 8.7 | Comprobación del inóculo cosechado |  |
| 8.8 | Período de conservación/viabilidad del inóculo | Para su almacenamiento a largo plazo, la solución madre de *A. tumefaciens* ha de mantenerse congelada a -80ºC en glicerol al 15‑20%. Los cultivos destinados al almacenamiento se inician generalmente a partir de una única colonia y se dejan crecer en 5 ml de YEP + 2,5 µl de kanamicina (100 mg/ml) durante 48 horas a 28°C. |
| 9. | Formato del examen |  |
| 9.1 | Número de plantas por genotipo | 20 |
| 9.2 | Número de réplicas | 2 |
| 9.3 | Variedades de control | Susceptibles: Big Power, (*Solanum lycopersicum*) Moneymaker, Marmande  Resistentes: (*Solanum lycopersicum*) Delyca, Montenegro, Anastasia, TY20, Mohawk |
| 9.4 | Diseño del ensayo |  |
| 9.5 | Instalación del ensayo | invernadero o cámara climatizada con autorización para la utilización confinada de organismos modificados genéticamente, nivel de confinamiento 1 (N‑1) |
| 9.6 | Temperatura | de 23 a 25°C |
| 9.7 | Luz | 16 h |
| 9.8 | Estación |  |
| 9.9 | Medidas especiales | autorización para la utilización confinada de organismos modificados genéticamente (N‑1 como mínimo) |
| 10. | Inoculación |  |
| 10.1 | Preparación del inóculo | Raspar la superficie del tubo que contiene la solución madre de *A. tumefaciens* congelada y sumergir en 5 ml de YEP + 2,5 µl de kanamicina (100 mg/ml) durante 48 horas a 28°C, con agitación. Tomar 100 µl y añadirlos a 100 ml de YEP con 50 µl de kanamicina (100 mg/ml). Agitar durante 48 horas a 28ºC. Centrifugar el cultivo saturado a 3500 rpm durante 20 minutos y desechar el sobrenadante. |
| 10.2 | Cuantificación del inóculo | disolver en agua desionizada esterilizada hasta alcanzar una densidad óptica (DO600) de 1 |
| 10.3 | Estado de desarrollo en el momento de la inoculación | 3-4 hojas |
| 10.4 | Método de inoculación | Con una jeringa de 1 ml provista de una aguja de calibre 27G, depositar unas gotas del inóculo (aproximadamente 20 µl del cultivo) en 10-15 punciones efectuadas con la aguja en el tallo de las plantas de tomate objeto del ensayo. Mantener en hielo durante la inoculación de las plantas. |
| 10.5 | Primera observación | 20 días después de la inoculación |
| 10.6 | Segunda observación | 30 días después de la inoculación |
| \*10.7 | Observaciones finales | 45 días después de la inoculación |
| 11. | Observaciones |  |
| 11.1 | Método | visual |
| 11.2 | Escala de observación | Síntomas: amarilleo y rizado de las hojas |
| 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 datos en función de los niveles de los caracteres de la UPOV |  |
|  | ausentes [1] | síntomas intensos |
|  | presentes [9] | ausencia de síntomas |
| 13. | Puntos de control esenciales:  El TYLCV es endémico en muchas zonas tropicales y subtropicales y está sujeto a cuarentena en muchos países de clima templado.  La cepa TYLCV-IL es la más extendida en todo el mundo. Las variedades con Ty-1 o Ty-2 infectadas por esta cepa no presentan síntomas.  El TYLCV figura en la lista de alertas de la EPPO. Algunas variedades resistentes al TYLCV pueden ser susceptibles a otro virus estrechamente relacionado, el de la hoja en cuchara de Cerdeña (TYLCSV). | |

1. Método de inoculación por moscas blancas

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agentes patógenos | Cepa IL del virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) |
| 2. | Estado de cuarentena | sí (véase el punto 13) |
| 3. | Especies huéspedes | *Solanum lycopersicum* |
| 4. | Fuente del inóculo | -España[[11]](#footnote-12) |
| 5. | Aislado | -TYLCV-IL La Mayora |
| 8. | Multiplicación del inóculo | moscas blancas |
| 8.6 | Cosecha del inóculo |  |
| 9. | Formato del examen |  |
| 9.1 | Número de plantas por genotipo | 20 |
| 9.2 | Número de réplicas | dos réplicas |
| 9.3 | Variedades de control |  |
|  | Resistentes | TY 20, Anastasia, Mohawk |
|  | Susceptibles | Big Power, (*Solanum lycopersicum*) ~~Montfavet H 63.5~~ Moneymaker, Marmande |
|  | Resistentes | (*Solanum lycopersicum*) Delyca, Montenegro, Anastasia, TY20, Mohawk |
| 9.5 | Instalación del ensayo | ~~campo con presión natural de la enfermedad~~ invernadero o túnel de plástico |
| 9.9 | Medidas especiales | evitar la propagación de moscas blancas |
| 10. | Inoculación |  |
| 10.3 | Estado de desarrollo en el momento de la inoculación | ~~de 6 a 12 semanas (plantas adultas)~~ de 2 a 4 semanas |
| 10.4 | Método de inoculación | vector (moscas blancas Bemisia portadoras del TYLCV-IL) |
| 10.7 | Observaciones finales | de 1 a 2 meses después de la inoculación |
| 11. | Observaciones |  |
| 11.1 | Método | visual |
| 11.2 | Escala de observación | Síntomas: amarilleo y rizado de las hojas |
| 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 datos en función de los niveles de los caracteres de la UPOV |  |
|  | ausentes [1] | síntomas intensos |
|  | presentes [9] | síntomas ausentes o leves |
| 13. | Puntos de control esenciales:  El TYLCV es endémico en muchas zonas tropicales y subtropicales y está sujeto a cuarentena en muchos países de clima templado. ~~El TYLCV figura en la lista de alertas de la EPPO.~~  La cepa TYLCV-IL es la más extendida en todo el mundo. Las variedades con Ty-1 o Ty-2 infectadas por esta cepa no presentan síntomas.  Algunas variedades resistentes al TYLCV pueden ser susceptibles a otro virus estrechamente relacionado, el de la hoja en cuchara de Cerdeña (TYLCSV). | |

## Propuesta de cambio del método de observación del carácter 31 “Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)”

*Texto actual*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 31.  (+) | VG | Resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV) | Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate(TSWV) | Resistenz gegen das gefleckte Tomaten-bronzenfleckenvirus (TSWV) | Resistencia al virus del bronceado de tomate(TSWV) |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Big Power | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Enpower | 9 |

*Nuevo texto propuesto*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 31.  (+) | VG/ VS | Resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV) | Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate(TSWV) | Resistenz gegen das gefleckte Tomaten-bronzenfleckenvirus (TSWV) | Resistencia al virus del bronceado de tomate(TSWV) |  |  |
| **QL** |  | absent | absente | fehlend | ausente | Big Power | 1 |
|  |  | present | présente | vorhanden | presente | Enpower | 9 |

## Propuesta de modificación de la explicación Ad. 31 mediante el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia

*Texto actual*

Ad. 31: Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)

1. Agentes patógenos Virus del bronceado del tomate (véase la nota que figura más adelante)

2. Estado de cuarentena sí (véase la nota que figura más adelante)

3. Especies huéspedes *Solanum lycopersicum*

4. Fuente del inóculo Naktuinbouw [[12]](#footnote-13) (NL), GEVES[[13]](#footnote-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: Big Power y (*Solanum lycopersicum*) Monalbo, Momor,

Montfavet H 63.5

Resistentes: Enpower y (*Solanum lycopersicum*) Tsunami, Bodar, Mospomor,

Lisboa

9.5 Instalación del ensayo invernadero o sala 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 del 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:

ausentes………………………… [1] síntomas

presentes……………………… [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. 31: Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)

1. Bioensayo

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agentes patógenos | Virus del bronceado del tomate (véase la nota que figura más adelante) |
| 2. | Estado de cuarentena | sí (véase la nota que figura más adelante) |
| 3. | Especies huéspedes | *Solanum lycopersicum* |
| 4. | Fuente del inóculo | Naktuinbouw [[14]](#footnote-15) (NL), GEVES [[15]](#footnote-16) (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 | Big Power y (*Solanum lycopersicum*) Monalbo, Momor, Montfavet H 63.5 |
|  | Resistentes | Enpower y (*Solanum lycopersicum*) Tsunami, Bodar, Mospomor, Lisboa |
| 9.5 | Instalación del ensayo | invernadero o sala 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 del 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: |  |
|  | ausentes [1] | síntomas |
|  | presentes [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. | |

1. Análisis de marcadores de ADN

Por lo general, la resistencia a la cepa 0 del TSWV la confiere el gen de resistencia Sw-5. La presencia del alelo resistente y/o del (de los) alelo(s) 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:  (*Solanum lycopersicum*) Moneymaker  presencia del alelo susceptible homocigótico 2:  (*Solanum lycopersicum*) Mountain Magic  presencia del alelo resistente homocigótico:  (*Solanum lycopersicum*) 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 |  |
|  | ausentes [1] | presencia del (de los) alelo(s) susceptible(s) y ausencia del alelo resistente |
|  | presentes [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) – h) 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), pp. 133-142.

[Fin del documento]

1. Naktuinbouw: [resistentie@naktuinbouw.nl](mailto:resistentie@naktuinbouw.nl) [↑](#footnote-ref-2)
2. GEVES: [Valerie.GRIMAULT@geves.fr](mailto:Valerie.GRIMAULT@geves.fr) [↑](#footnote-ref-3)
3. Naktuinbouw: [resistentie@naktuinbouw.nl](mailto:resistentie@naktuinbouw.nl) [↑](#footnote-ref-4)
4. GEVES: [Valerie.GRIMAULT@geves.fr](mailto:Valerie.GRIMAULT@geves.fr) [↑](#footnote-ref-5)
5. INIA: cardaba@inia.sp [↑](#footnote-ref-6)
6. Naktuinbouw: [resistentie@naktuinbouw.nl](mailto:resistentie@naktuinbouw.nl) [↑](#footnote-ref-7)
7. GEVES: [Valerie.GRIMAULT@geves.fr](mailto:Valerie.GRIMAULT@geves.fr) [↑](#footnote-ref-8)
8. Naktuinbouw: [resistentie@naktuinbouw.nl](mailto:resistentie@naktuinbouw.nl) [↑](#footnote-ref-9)
9. GEVES: [Valerie.GRIMAULT@geves.fr](mailto:Valerie.GRIMAULT@geves.fr) [↑](#footnote-ref-10)
10. Fuente del inóculo: IHSM‑UMA‑CSIC (edu\_rodri@uma.es); INIA (Cardaba@inia.es). [↑](#footnote-ref-11)
11. IHSM‑CSIC (guillamon@eelm.csic.es) o INIA (cardaba@inia.es) [↑](#footnote-ref-12)
12. Naktuinbouw: [resistentie@naktuinbouw.nl](mailto:resistentie@naktuinbouw.nl) [↑](#footnote-ref-13)
13. GEVES; [Valerie.GRIMAULT@geves.fr](mailto:Valerie.GRIMAULT@geves.fr) [↑](#footnote-ref-14)
14. Naktuinbouw: [resistentie@naktuinbouw.nl](mailto:resistentie@naktuinbouw.nl) [↑](#footnote-ref-15)
15. GEVES: [Valerie.GRIMAULT@geves.fr](mailto:Valerie.GRIMAULT@geves.fr) [↑](#footnote-ref-16)