

Comité de Redacción Ampliado

TC-EDC/Mar18/9

Ginebra, 26 y 27 de marzo de 2018

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*

1. 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).

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)):

- a) Cambiar el método de observación de los caracteres 24.1 y 24.2:
 - i) carácter 24.1 "Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* – Raza 0 (ex 1)"
 - ii) carácter 24.2 "Resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* – Raza 1 (ex 2)"
- b) 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.
- c) Cambiar el método de observación de los caracteres 27.1, 27.2 y 27.3:
 - i) Carácter 27.1 "Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) – Cepa 0"
 - ii) Carácter 27.2 "Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) – Cepa 1"
 - iii) Carácter 27.3 "Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) – Cepa 2"
- d) 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.
- e) 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.
- f) Cambiar el método de observación del carácter 31 "Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)".
- g) Modificar la explicación Ad. 31 mediante el añadido de un método alternativo de observación de la resistencia.
- h) En el capítulo 9 "Bibliografía", añadir una referencia a la bibliografía relativa a los cambios indicados en los puntos a) - h).

3. 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 <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)		
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 <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)		
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 Naktuinbouw¹ (NL) y GEVES² (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 inóculofiltrar 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 ensayoinvernadero 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 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

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

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.

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	(<i>Solanum lycopersicum</i>) 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	(<i>Solanum lycopersicum</i>) 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	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Marmande verte, Cherry Belle, Roma, Marporum, Ranco
	Resistentes únicamente a la raza 0	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Marporum, Ranco
	Resistentes a las razas 0 y 1	Emperador, Colosus y (<i>Solanum lycopersicum</i>) 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 (<i>Solanum lycopersicum</i>) Marmande verte, Motelle, Marporum

³ Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl

⁴ GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr

⁵ INIA: cardaba@inia.sp

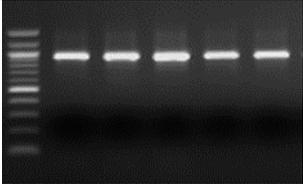
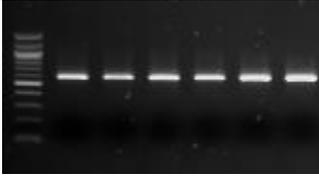
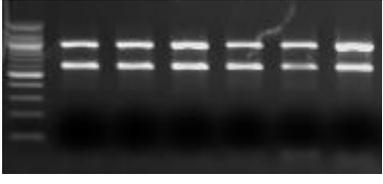
	<u>Resistentes a las razas 0, 1 y 2</u>	<u>Colosus y (<i>Solanum lycopersicum</i>) Tributes, Murdoch, "Marmande verte x Florida"</u>
9.4	Diseño del ensayo	>20 plantas; p. ej., 35 semillas para 24 plantas (incluidas 2 de control)
9.5	Instalación del ensayo	invernadero o sala climatizada
9.6	Temperatura	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 10 ⁶ 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.

<u>1.</u>	<u>Agentes patógenos</u>	<u><i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i></u>
<u>2.</u>	<u>Gen funcional</u>	<u>I2</u>
<u>3.</u>	<u>Iniciadores</u>	
<u>3.1</u>	<u>Alelo susceptible</u>	<u>Z1063-i2-F 5'-GTT TGA CAG CTT GGT TTT GT-3'</u> <u>Z1063-i2-R 5'-CTC AAA CTC ACC ATC ATT GA-3'</u>
<u>3.2</u>	<u>Alelo resistente</u>	<u>TFusF1 5'-CTG AAA CTC TCC GTA TTT C-3'</u> <u>TFusRR1 5'-CGA AGA GTG ATT GGA GAT-3'</u>
<u>4.</u>	<u>Formato del examen</u>	
<u>4.1</u>	<u>Número de plantas por genotipo</u>	<u>20 plantas como mínimo</u>
<u>4.2</u>	<u>Variedades de control</u>	<u>presencia del alelo susceptible homocigótico:</u> <u>(<i>Solanum lycopersicum</i>) Moneymaker</u> <u>presencia del alelo resistente homocigótico: (<i>Solanum lycopersicum</i>) Tradiro</u>

<u>5.</u>	<u>Preparación</u>	
<u>5.1</u>	<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.
<u>5.2</u>	<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
<u>6.</u>	<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
<u>7.</u>	<u>Observaciones</u>	
<u>7.1</u>	<u>Método</u>	visual
<u>7.2</u>	<u>Escala de observación</u>	

		
amplicón de 940 bp (solo está presente el alelo susceptible homocigótico)	amplicón de 600 bp (solo está presente el alelo resistente homocigótico)	amplicones de 940 y 600 bp (está presentes el alelo susceptible y el resistente: resistente heterocigótico)

<u>7.3</u>	<u>Validación del ensayo</u>	las variedades de control han de producir la(s) banda(s) prevista(s)
<u>8.</u>	<u>Interpretación de los resultados del ensayo</u>	
	<u>24.1 Raza 0 (ex 1)</u> 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.
	<u>24.2 Raza 1 (ex 2)</u> ausentes.....[1] presentes[9]	susceptible homocigótico en el análisis de marcadores de ADN 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 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 (*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.

⁶ Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl

⁷ GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr

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.

i) Bioensayo

1.	Agentes patógenos	Virus del mosaico del tomate
3.	Especies huéspedes	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Fuente del inóculo	Naktuinbouw ⁸ (NL) o GEVES ⁹ (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 (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	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Marmande, Monalbo
	Resistentes al ToMV: 0 y 2	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Mobaci
	Resistentes al ToMV: 0 y 1	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Moperou
	Resistentes con necrosis	(<i>Solanum lycopersicum</i>) "Monalbo x Momor"
	Resistentes	(<i>Solanum lycopersicum</i>) 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

⁸ Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl

⁹ GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr

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.

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.	<u>Agentes patógenos</u>	<u>Virus del mosaico del tomate</u>
2.	<u>Gen funcional</u>	<u>Tm2/2²</u>
3.	<u>Iniciadores</u>	
3.1	<u>Ensayo 1 para comprobación del alelo resistente Tm2 o Tm2²</u>	Iniciador exterior TMV-2286F: 5'GGGTATACTGGGAGTGTCCAATTC3' Iniciador exterior TMV-2658R: 5'CCGTGCACGTTACTTCAGACAA3' Tm2 ² SNP2494F: 5'CTCATCAAGCTTACTCTAGCCTACTTTAGT3' Tm2 SNP2493R: 5'CTGCCAGTATATAACGGTCTACCG3'
3.2	<u>Ensayo 2 para comprobación del alelo susceptible o resistente</u>	Iniciador exterior TM2-748F: 5'CGGTCTGGGGAAAACAACACTCT3' Iniciador exterior TM2-1256R: 5'CTAGCGGTATACCTCCACATCTCC3' TM2-SNP901misR: 5'GCAGGTTGTCCTCCAAATTTTCCATC3' TM2-SNP901misF: 5'CAAATTGGACTGACGGAACAGAAAGTT3'
4.	<u>Formato del examen</u>	
4.1	<u>Número de plantas por genotipo</u>	<u>20 plantas como mínimo</u>
4.2	<u>Variedades de control</u>	<u>presencia del alelo susceptible homocigótico tm2: (Solanum lycopersicum) Moneymaker</u> <u>presencia del alelo resistente Tm2: (Solanum lycopersicum) Moperou</u> <u>presencia del alelo resistente Tm2²: (Solanum lycopersicum) Momor, Persica, Campeon</u>

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 55°C durante 1 minuto y a 72°C durante 2 minutos 3. ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos
8.	<u>Interpretación de los resultados del ensayo</u>	la presencia de los alelos tm2, Tm2 o Tm2 ² 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.

<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>
		(se produce ocasionalmente)	
<u>27.1 Cepa 0</u>	<u>[1] ausente</u>	<u>[9] resistente</u>	<u>[9] resistente</u>
<u>27.2 Cepa 1</u>	<u>[1] ausente</u>	<u>[9] resistente</u>	<u>[9] resistente</u>
<u>27.3 Cepa 2</u>	<u>[1] ausente</u>	<u>[1] ausente</u>	<u>[9] resistente</u>

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)

i) 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	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Fuente del inóculo	Dr. Eduardo R. Bejarano, Laboratorio de Fitogenética del IHSM-UMA-CSIC ¹⁰
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 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , transformada con plásmidos que contienen los clones infecciosos (Morilla et al. 2005. <i>Phytopathology</i> 95: 1089-1097) La bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 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 <i>A. tumefaciens</i> ha de mantenerse congelada a -80°C 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, (<i>Solanum lycopersicum</i>) Moneymaker, Marmande Resistentes: (<i>Solanum lycopersicum</i>) 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

¹⁰ Fuente del inóculo: IHSM-UMA-CSIC (edu_rodri@uma.es); INIA (Cardaba@inia.es).

9.8	<u>Estación</u>	
9.9	<u>Medidas especiales</u>	<u>autorización para la utilización confinada de organismos modificados genéticamente (N-1 como mínimo)</u>
10.	<u>Inoculación</u>	
10.1	<u>Preparación del inóculo</u>	<u>Raspar la superficie del tubo que contiene la solución madre de <i>A. tumefaciens</i> 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 28°C. Centrifugar el cultivo saturado a 3500 rpm durante 20 minutos y desechar el sobrenadante.</u>
10.2	<u>Cuantificación del inóculo</u>	<u>disolver en agua desionizada esterilizada hasta alcanzar una densidad óptica (DO₆₀₀) de 1</u>
10.3	<u>Estado de desarrollo en el momento de la inoculación</u>	<u>3-4 hojas</u>
10.4	<u>Método de inoculación</u>	<u>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.</u>
10.5	<u>Primera observación</u>	<u>20 días después de la inoculación</u>
10.6	<u>Segunda observación</u>	<u>30 días después de la inoculación</u>
*10.7	<u>Observaciones finales</u>	<u>45 días después de la inoculación</u>
11.	<u>Observaciones</u>	
11.1	<u>Método</u>	<u>visual</u>
11.2	<u>Escala de observación</u>	<u>Síntomas: amarilleo y rizado de las hojas</u>
11.3	<u>Validación del ensayo</u>	<u>la evaluación de la resistencia de la variedad deberá calibrarse con los resultados de los controles resistentes y susceptibles</u>
12.	<u>Interpretación de los datos en función de los niveles de los caracteres de la UPOV</u>	
	<u>ausentes [1]</u>	<u>síntomas intensos</u>
	<u>presentes [9]</u>	<u>ausencia de síntomas</u>
13.	<u>Puntos de control esenciales:</u>	
	<u>El TYLCV es endémico en muchas zonas tropicales y subtropicales y está sujeto a cuarentena en muchos países de clima templado.</u>	
	<u>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.</u>	
	<u>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).</u>	

ii) Método de inoculación por moscas blancas

1.	Agentes patógenos	<u>Cepa IL del virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV)</u>
2.	Estado de cuarentena	<u>sí (véase el punto 13)</u>
3.	Especies huéspedes	<u><i>Solanum lycopersicum</i></u>
4.	Fuente del inóculo	<u>-España¹¹</u>
5.	Aislado	<u>-TYLCV-IL La Mayora</u>
8.	Multiplicación del inóculo	<u>moscas blancas</u>
8.6	Cosecha del inóculo	
9.	Formato del examen	
9.1	Número de plantas por genotipo	20

¹¹ IHSM-CSIC (guillamon@eelm.csic.es) o INIA (cardaba@inia.es)

9.2	Número de réplicas	<u>dos</u> réplicas
9.3	Variedades de control	
	Resistentes	TY 20, Anastasia, Mohawk
	Susceptibles	Big Power, (<i>Solanum lycopersicum</i>) Montfave H 63-5 Moneymaker, Marmande
	Resistentes	(<i>Solanum lycopersicum</i>) <u>Delyca, Montenegro, Anastasia, TY20, Mohawk</u>
9.5	Instalación del ensayo	campo con presión natural de la enfermedad <u>invernadero o túnel de plástico</u>
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) <u>de 2 a 4 semanas</u>
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. <u>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.</u> 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 Naktuinbouw¹² (NL), GEVES¹³ (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, froto de 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.

¹² Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl¹³ GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

Nuevo texto propuesto

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

i) **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	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Fuente del inóculo	Naktuinbouw ¹⁴ (NL), GEVES 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	Big Power y (<i>Solanum lycopersicum</i>) Monalbo, Momor, Montfavet H 63.5
	Resistentes	Enpower y (<i>Solanum lycopersicum</i>) 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

¹⁴ Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl

¹⁵ GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr

13.	<p>Puntos de control esenciales</p> <p>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.</p>
-----	--

ii) 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.	<u>Agentes patógenos</u>	<u>Virus del bronceado del tomate</u>
2.	<u>Gen funcional</u>	<u>Sw-5b</u>
3.	<u>Iniciadores</u>	
3.1	<u>Alelos susceptibles</u>	<u>Sw5-Vat1-F: 5'-ACAACATCAAACAATGTTAGCC-3'</u> <u>Sw5-Vat2-F: 5'-CATCAAACAATGCAGTTAGCC-3'</u>
3.2	<u>Alelo resistente</u>	<u>Sw5-Res-F: 5'-ATCAACCAATACAGCCTAACC-3'</u>
3.3	<u>Inverso universal</u>	<u>Sw5-universal-R: 5'-TTTCTCCCTGCAAGTTCACC-3'</u>
3.4	<u>Sondas para alelos específicos</u>	<u>Sw5-Sus1:</u> <u>5'-VIC-TACATTATGAAGGGTTAACAAG-MGB-NFQ-3'</u> <u>Sw5-Sus2:</u> <u>5'-6FAM-ACAACAGAGGGTTAACAAGTTTAGG-BHQ1-3'</u> <u>Sw5-Res:</u> <u>5'-TEXAS RED-TGGGCGAAAATCCCAACAAG-BHQ2-3'</u>
4.	<u>Formato del examen</u>	
4.1	<u>Número de plantas por genotipo</u>	<u>20 plantas como mínimo</u>
4.2	<u>Variedades de control</u>	<u>presencia del alelo susceptible homocigótico 1:</u> <u>(<i>Solanum lycopersicum</i>) Moneymaker</u> <u>presencia del alelo susceptible homocigótico 2:</u> <u>(<i>Solanum lycopersicum</i>) Mountain Magic</u> <u>presencia del alelo resistente homocigótico:</u> <u>(<i>Solanum lycopersicum</i>) Montealto</u>
6.	<u>Condiciones de la PCR</u>	<u>1. ciclo inicial de desnaturalización durante 10 minutos a 95°C</u> <u>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.</u>
8.	<u>Interpretación de los resultados del ensayo</u>	
	<u>ausentes [1]</u>	<u>presencia del (de los) alelo(s) susceptible(s) y ausencia del alelo resistente</u>
	<u>presentes [9]</u>	<u>presencia del alelo resistente (homocigótico o heterocigótico)</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) o no.</u>

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]