|  |  |
| --- | --- |
|  | G |
| Internationaler Verband zum Schutz von Pflanzenzüchtungen |  |

|  |  |
| --- | --- |
| Technischer Ausschuss  Siebenundfünfzigste Tagung Genf, 25. und 26. Oktober 2021 | TC/57/17  Original: englisch  Datum: 6. September 2021 |

Teilüberarbeitung der prüfungsrichtlinien für SALAT

Von einem Sachverständigen aus den Niederlanden erstelltes Dokument

Haftungsausschluss: dieses Dokument gibt nicht die Grundsätze oder eine Anleitung der UPOV wieder

Zweck dieses Dokuments ist es, einen Vorschlag für eine Teilüberarbeitung der Prüfungsrichtlinien für Salat (Dokument TG/13/11 Rev.) vorzulegen.

Auf ihrer fünfundfünfzigsten Tagung[[1]](#footnote-2) prüfte die Technische Arbeitsgruppe für Gemüsearten (TWV) einen Vorschlag für eine Teilüberarbeitung der Prüfungsrichtlinien für Salat (*Lactuca sativa* L.) auf Grundlage der Dokumente TG/13/11 Rev. und TWV/55/11 „*Partial revision of the Test Guidelines for Lettuce*“, und schlug die folgenden Änderungen vor (vergleiche Dokument TWV/55/16 „*Report*“, Absatz 121):

1. Änderung von Punkt 9.3 „Kontrollsorten“ im aktuellen Biotest-Verfahren unter Zu 53 „Resistenz gegen *Lettuce mosaic virus* (LMV) Pathotyp II“
2. Hinzufügung einer neuen Methode für den DNA-Marker-Test unter Zu 53: „Resistenz gegen *Lettuce mosaic virus* (LMV) Pathotyp II“

Die vorgeschlagenen Änderungen werden nachstehend durch Hervorheben und Unterstreichen (Einfügungen) und ~~Durchstreichen~~ (Streichungen) angegeben.

## Vorgeschlagene Änderungen von Zu 53: „Resistenz gegen *Lettuce mosaic virus* (LMV) Pathotyp II”

*Derzeitiger Wortlaut*

Zu 53: Resistenz gegen *Lettuce mosaic virus* (LMV) Pathotyp II

|  |  |
| --- | --- |
| 1. Pathogen | *Lettuce mosaic virus* |
| 2. Quarantänestatus | keiner |
| 3. Wirtsart | Salat - *Lactuca sativa* L. |
| 4. Quelle des Inokulums | GEVES[[2]](#footnote-3) (FR) oder Naktuinbouw[[3]](#footnote-4) (NL) |
| 5. Isolat | Pathotyp II (Isolate LMV-0 und Ls1 gehören zum selben Pathotyp) |
| 6. Feststellung der Isolatidentität | resistente und anfällige Kontrollsorten |
| 7. Feststellung der Pathogenität | Inokulation einer anfälligen Kontrollsorte |
| 8. Vermehrung des Inokulums |  |
| 8.2 Vermehrungssorte | anfällige Kontrollsorte |
| 8.3 Pflanzenstadium bei der Inokulation | 2-3 Blätter |
| 8.4 Inokulationsmedium | 0,05 M PBS, 0,25% (w/v) Na2SO3 0,5% C5H10NNaS2.3H2O, 4% Carborundum und 5% Aktivkohle |
| 8.5 Inokulationsmethode | Reiben; wahlweise nach 4 Tagen wiederholen; 1-2 Stunden hohe Feuchtigkeit nach Inokulation |
| 8.6 Ernte des Inokulums | homogenisiertes frisches Blatt in Puffer (50% w/v);  gefriergetrocknete Blätter können weniger als 1 Jahr verwahrt werden, Langzeitlagerung bei -80°C |
| 8.7 Prüfung des geernteten Inokulums | Vergleich mit vorgetäuschter Inokulation mit LMV-Puffer + Carborundum + Kohle |
| 8.8 Haltbarkeit/Lebensfähigkeit des Inokulums | 2 Stunden bei 4°C oder auf Eis |
| 9. Prüfungsanlage |  |
| 9.1 Anzahl der Pflanzen pro Genotyp | mindestens 20 |
| 9.2 Anzahl der Wiederholungen | 1 |
| 9.3 Kontrollsorten | anfällig: Bijou (rot), Hilde II (grün), Sprinter (grün), Sucrine (grün)  resistent: Capitan (grün), Corsica (grün), Diveria (rot) |
| 9.4 Gestaltung der Prüfung | mehrere Pflanzen mit vorgetäuschter Inokulation in derselben Saatkiste |
| 9.5 Prüfungseinrichtung | Klimakammer |
| 9.6 Temperatur | nach Inokulation 15-22°C |
| 9.7 Licht | 12-16 Stunden Licht ca. 5000 Lux |
| 10. Inokulation |  |
| 10.1 Vorbereitung des Inokulums | frisches zermahlenes Blatt in frischem LMV-Puffer inkl. Carborundum und Aktivkohle |
| 10.3 Pflanzenstadium bei der Inokulation | 1. Blatt gut entwickelt bei 1. Inokulation, optional 4 Tage später 2. Inokulation |
| 10.4 Inokulationsmethode | Reiben, Abwaschen des Carborundums |
| 10.7 Abschließende Erfassungen | 21 Tage nach der Inokulation |
| 11. Erfassungen |  |
| 11.1 Methode | visuelle Einschätzung der Grades an Mosaikbildung; Vergleich mit Standardsorten, vorzugsweise mit Standardsorten desselben Wachtumstyps. |
| 11.2 Erfassungsskala | resistent = keine Symptome |
|  | anfällig = Wachstumsverzögerung, junge Blätter mit Mosaik, Blätter rollen sich ein |
| 11.3 Validierung der Prüfung | Standardssorten sollten Beschreibung entsprechen |
| 12. Auswertung der Daten hinsichtlich der UPOV-Ausprägungsstufen | resistent oder anfällig nach Pflanze klassifizieren, siehe 11.2. |
| 13. Kritische Kontrollpunkte | Sprinter ist weniger anfällig als viele andere anfällige Sorten. Diese Sorte kann in einem spezifiischen Versuch zur Erkennung eines niedrigen Inokulationsdrucks verwendet werden.  Anthocyanfärbung in Blättern kann Mosaik-Symptome verschleiern und ein früheres Erfassungsdatum für grüne Sorten könnte, abhängig von der Reaktion der Standardsorten in der Prüfung, möglich sein. |

*Vorgeschlagener neuer Wortlaut*

Zu 53: Resistenz gegen *Lettuce mosaic virus* (LMV) Pathotyp II

Die Resistenz gegen Pathotyp II ist anhand eines Biotests (Methode i) und/oder eines DNA-Marker-Tests (Methode ii) zu prüfen.

1. Biotest

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Pathogen | *Lettuce mosaic virus* |
| 2. | Quarantänestatus | keiner |
| 3. | Wirtsart | Salat - *Lactuca sativa* L. |
| 4. | Quelle des Inokulums | GEVES[[4]](#footnote-5) (FR) oder Naktuinbouw[[5]](#footnote-6) (NL) |
| 5. | Isolat | Pathotyp II (Isolate LMV-0 und Ls1 gehören zum selben Pathotyp) |
| 6. | Feststellung der Isolatidentität | resistente und anfällige Kontrollsorten |
| 7. | Feststellung der Pathogenität | Inokulation einer anfälligen Kontrollsorte |
| 8. | Vermehrung des Inokulums |  |
| 8.2 | Vermehrungssorte | anfällige Kontrollsorte |
| 8.3 | Pflanzenstadium bei der Inokulation | 2-3 Blätter |
| 8.4 | Inokulationsmedium | 0,05 M PBS, 0,25% (w/v) Na2SO3 0,5% C5H10NNaS2.3H2O, 4% Carborundum und 5% Aktivkohle |
| 8.5 | Inokulationsmethode | Reiben; wahlweise nach 4 Tagen wiederholen; 1-2 Stunden hohe Feuchtigkeit nach Inokulation |
| 8.6 | Ernte des Inokulums | homogenisiertes frisches Blatt in Puffer (50% w/v);  gefriergetrocknete Blätter können weniger als 1 Jahr verwahrt werden, Langzeitlagerung bei -80°C |
| 8.7 | Prüfung des geernteten Inokulums | Vergleich mit vorgetäuschter Inokulation mit LMV-Puffer + Carborundum + Kohle |
| 8.8 | Haltbarkeit/Lebensfähigkeit des Inokulums | 2 Stunden bei 4°C oder auf Eis |
| 9. | Prüfungsanlage |  |
| 9.1 | Anzahl der Pflanzen pro Genotyp | mindestens 20 |
| 9.2 | Anzahl der Wiederholungen | 1 |
| 9.3 | Kontrollsorten | anfällig: Bijou (rot), Hilde II (grün), Sprinter (grün), Sucrine (grün)  resistent: Capitan (grün), Corsica (grün), ~~Diveria (rot)~~ Multired 80 (rot) |
| 9.4 | Gestaltung der Prüfung | mehrere Pflanzen mit vorgetäuschter Inokulation in derselben Saatkiste |
| 9.5 | Prüfungseinrichtung | Klimakammer |
| 9.6 | Temperatur | nach Inokulation 15-22°C |
| 9.7 | Licht | 12-16 Stunden Licht ca. 5000 Lux |
| 10. | Inokulation |  |
| 10.1 | Vorbereitung des Inokulums | frisches zermahlenes Blatt in frischem LMV-Puffer inkl. Carborundum und Aktivkohle |
| 10.3 | Pflanzenstadium bei der Inokulation | 1. Blatt gut entwickelt bei 1. Inokulation, optional 4 Tage später 2. Inokulation |
| 10.4 | Inokulationsmethode | Reiben, Abwaschen des Carborundums |
| 10.7 | Abschließende Erfassungen | 21 Tage nach der Inokulation |
| 11. | Erfassungen |  |
| 11.1 | Methode | visuelle Einschätzung der Grades an Mosaikbildung; Vergleich mit Standardsorten, vorzugsweise mit Standardsorten desselben Wachtumstyps. |
| 11.2 | Erfassungsskala | resistent = keine Symptome  anfällig = Wachstumsverzögerung, junge Blätter mit Mosaik, Blätter rollen sich ein |
| 11.3 | Validierung der Prüfung | Standardssorten sollten Beschreibung entsprechen |
| 12. | Auswertung der Daten hinsichtlich der UPOV-Ausprägungsstufen | resistent oder anfällig nach Pflanze klassifizieren, siehe 11.2. |
| 13. | Kritische Kontrollpunkte | Sprinter ist weniger anfällig als viele andere anfällige Sorten. Diese Sorte kann in einem spezifiischen Versuch zur Erkennung eines niedrigen Inokulationsdrucks verwendet werden.  Anthocyanfärbung in Blättern kann Mosaik-Symptome verschleiern und ein früheres Erfassungsdatum für grüne Sorten könnte, abhängig von der Reaktion der Standardsorten in der Prüfung, möglich sein. |

(ii) DNA-Marker-Test

Das rezessive Resistenzgen *mo1* (mit seinen Allelen *mo11* oder *mo12*) verleiht Resistenz gegen LMV Pathotyp II. Die Resistenzallele *mo11* und *mo12* und das Vorhandensein des Anfälligkeitsallel *mo10* sind, wie in V. Nicaise *et al.* (2003) geschildert, anhand der kodominanten Marker zu erkennen. Spezifische Aspekte:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1. | | Pathogen | | | *Lettuce mosaic virus* Pathotyp II |
| 2. | | Funktionelles Gen | | | *mo1* (mit zwei Resistenzallelen *mo11*und *mo12*und einem Anfälligkeitsallel *mo10*) |
| 3. | | Sonden und Primer für den TaqMan PCR | | |  |
| 3.1. | | Test 1 | | | um *mo11* Genotypen von *mo10* und *mo12* Genotypen zu unterscheiden (Deletion von 6 Basen auf Nukleotidposition 344-349): |
| |  |  |  | | --- | --- | --- | | Sonde | DNA Sequenz ‘5-‘3 | Fluoreszenzfarbstoff (freigestellt) | | Pr-del-mo1 | GGCTCAAGGAGCTGACTTCTATTG | Texas Red (anfällig) | | Pr-del-mo11 | GGCTCATGACTTCTATTG | 6FAM-MGB (resistentes *mo11*) |  |  |  | | --- | --- | | Primer | DNA Sequenz ‘5-‘3 | | Fw-del-mo1 | CAACAACATACATCGACCAA | | Rev-del-mo1 | CTTCCCACTTAGGCTCGAT |   Sequenz-Amplikon: ‘5-‘3  Die Amplikonsequenz der Allele *mo10*und*mo12*:  TTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTATTGTTTCAAGAATAAAAT  CGAGCCTAAGTGGGAAGACC  Die Amplikonsequenz für das Resistenzallel *mo11*:  TTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCATGACTTCTATTGTTTCAAGAATAAAATCGAGCC  TAAGTGGGAAGACC | | | | | |
| 3.2. | Test 2 | | | um *mo12* Genotypen von *mo10* und *mo11* Genotypen zu unterscheiden (SNP auf Nukleotidposition 228): | |
| |  |  |  | | --- | --- | --- | | Sonde | DNA Sequenz ‘5-‘3 | Fluoreszenzfarbstoff (freigestellt) | | Pr-SNP228-*mo1* | CTCCCTCT**G**CTAAGTC | 6FAM-MGB (anfällig) | | Pr-SNP228-*mo12* | ACTCCCTCT**C**CTAAGT | VIC-MGB (resistentes *mo12*) |  |  |  | | --- | --- | | Primer | DNA Sequenz ‘5-‘3 | | Fw-SNP228-*mo1* | GCATCCGCTCGAGCATTC | | Rev-SNP228-*mo1* | CTACCCCAAGCGACTTGCTT | | | | | | |
| Sequenz-Amplikon: ‘5-‘3  Die Amplikonsequenz der Allele *mo10*und *mo11*:  TCAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCT**G**CTAAGTCCAAGCAAGTCG  CTTGGGGTAGTTCCATGCGCC  Die Amplikonsequenz für das Resistenzallel *mo12*:  TCAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCT**C**CTAAGTCCAAGCAAGTCG  CTTGGGGTAGTTCCATGCGCC | | | | | |
| 4. | Prüfungsanlage | | |  | |
| 4.1 | Anzahl der Pflanzen pro Genotyp | | | Mind. 20 Pflanzen | |
| 4.2 | Kontrollsorten | | | Allel *mo10* für Anfälligkeit homozygot vorhanden: Sprinter, Sucrine  Allel *mo11* für Resistenz homozygot vorhanden: Capitan, Kanaryole  Allel *mo12* für Resistenz homozygot vorhanden: Corianas  DNA mischen für heterozygote Kontrolle | |
| 5. | Vorbereitung | | |  | |
| 5.1 | Vorbereitung DNA | | | Pro Einzelpflanze ein junges Blatt ernten. Gesamt-DNA anhand eines Standardverfahrens zur DNA-Isolierung isolieren. | |
| 5.2 | Vorbereitung PCR | | | Für Test 1 und 2 jede DNA-Probe und einen im Handel erhältlichen Echtzeit-PCR-Mastermix in individuelle Kavitäten pipettieren. Proben in einem Echtzeit-PCR-Instrument analysieren welches in der Lage ist, die Fluorophordaten aller Sonden auszulesen, mit für den verwendeten Mastermix geeigneten Reaktionsbedingungen. | |
| 6. | PCR-Bedingungen | | | (ausführliches Testprotokol über Naktuinbouw[[6]](#footnote-7) (NL) erhältlich) | |
|  | Test 1: | | | |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | |  | Temperatur | Zeit | Anstiegs-geschwindigkeit | | Erste Aktivierung des Enzyms | 95°C | 2' 00" |  | | 40 Zyklen | 95°C | 0' 15" | 5˚C/sec | |  | 65°C | 0' 48" | 5˚C/sec | | |
|  | Test 2: | | | |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | |  | Temperatur | Zeit | Anstiegs-geschwindigkeit | |  | 95°C | 2' 00" |  | | 40 Zyklen | 95°C | 0' 15" | 5˚C/sec | |  | 60°C | 0' 48" | 5˚C/sec |   Analyse des Endpunkt-RFU. | |
| 7. | Erfassungen | | |  | |
| 7.1 | Erfassungsskala | | |  | |
| Test 1:   |  |  |  | | --- | --- | --- | | Signalgebende Fluorophore |  |  | | FAM (*mo11*) | Texas Red (*mo10* oder *mo12*) |  | | - | x | Homozygotes *mo10* oder *mo12,* oder heterozygotes *mo10* und *mo12* | | x | - | Homozygotes *mo11* | | x | x | Heterozygotes *mo10* und *mo11*oder heterozygotes *mo12* und *mo11* | | - | - | Kein Ergebnis, Test wiederholen | | | | | | |
| Test 2:   |  |  |  | | --- | --- | --- | | Signalgebende Fluorophore |  |  | | FAM (*mo10* oder *mo11*) | VIC (*mo12*) |  | | (x) (FAM RFU << VIC RFU) | x | Homozygotes *mo12* | | x | - | Homozygotes *mo10* oder *mo11,* oder heterozygotes *mo10* und *mo11* | | x | (x) (FAM RFU >> VIC RFU) | Heterozygotres *mo10* und *mo12*or heterozygotes *mo11*und *mo12* | | - | - | Kein Ergebnis, Test wiederholen | | | | | | |
| 7.2 | Validierung der Prüfung | | Kontrollsorten sollten die erwarteten Ergebnisse liefern.  Eine homogene Sorte wird keine hereozyten Pflanzen aufweisen, außer bei einer Sorte mit Allelkombinationen (*mo0*+*mo11* oder *2*). | | |
| 8. | Auswertung der Daten hinsichtlich der UPOV-Ausprägungsstufen | | Die Kombination der beiden PCR-Tests führt zu folgendem voraussichtlichen Ergebnis in einem Biotest mit with LMV Pathotyp II: | | |
| |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | |  |  | **Test 2 (*mo1²*)** | | | |  |  | **fehlend** | **homozygot vorhanden** | **heterozygot** | | **Test 1 (*mo11*)** | **fehlend** | anfällig (*mo10*) | resistent  (*mo12*) | anfällig (*mo10*/*mo12*) | | **homozygot vorhanden** | resistent  (*mo11*) | nicht möglich (ungültig) | nicht möglich (ungültig) | | **heterozygot** | anfällig  (*mo10*/ *mo11*) | nicht möglich (ungültig) | voraussichtlich resistent, aber noch nicht validiert | | | | | | |
|  |  | | Heterozygote Pflanzen (*mo10/mo11* oder *mo12*) sind in Biotests anfällig, da es sich bei *mo1* um ein rezessives Gen handelt.  Heterozygote Pflanzen ([*mo11*] + [*mo12*]) bedürfen eines Ergebnisses aus einem Biotest.  Sorten mit einer Mischung aus Genotypen (heterozygote Pflanzen, homozygote *mo10*Pflanzen (voraussichtlich anfälliger Phänotyp) und homozygote*mo11* oder *mo12*Pflanzen (voraussichtlich resistenter Phänotyp))sind im Biotest voraussichtlich nicht homogen.  Wenn der DNA-Marker-Testergebnis die Angaben im TQ nicht bestätigt, sollte ein Biotest durchgeführt warden, um zu erfassen, ob die Sorte aufgrund eines anderen Mechanismus resistent ist. | | |

[Ende des Dokuments]

1. vom 3. bis 7. Mai 2021, von der Türkei ausgerichtet und auf elektronischem Wege abgehalten. [↑](#footnote-ref-2)
2. matref@geves.fr [↑](#footnote-ref-3)
3. resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-4)
4. matref@geves.fr [↑](#footnote-ref-5)
5. resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-6)
6. Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-7)