

Technischer Ausschuss

TC/57/17

Siebenundfünfzigste Tagung
Genf, 25. und 26. Oktober 2021Original: 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*

1. Zweck dieses Dokuments ist es, einen Vorschlag für eine Teilüberarbeitung der Prüfungsrichtlinien für Salat (Dokument TG/13/11 Rev.) vorzulegen.
2. Auf ihrer fünfundfünfzigsten Tagung¹ 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):
 - a) Änderung von Punkt 9.3 „Kontrollsorten“ im aktuellen Biotest-Verfahren unter Zu 53 „Resistenz gegen *Lettuce mosaic virus* (LMV) Pathotyp II“
 - b) Hinzufügung einer neuen Methode für den DNA-Marker-Test unter Zu 53: „Resistenz gegen *Lettuce mosaic virus* (LMV) Pathotyp II“
3. Die vorgeschlagenen Änderungen werden nachstehend durch Hervorheben und Unterstreichen (Einfügungen) und ~~Durchstreichen~~ (Streichungen) angegeben.

¹ vom 3. bis 7. Mai 2021, von der Türkei ausgerichtet und auf elektronischem Wege abgehalten.

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	<i>Lettuce mosaic virus</i>
2. Quarantänestatus	keiner
3. Wirtsart	Salat - <i>Lactuca sativa</i> L.
4. Quelle des Inokulums	GEVES ² (FR) oder Naktuinbouw ³ (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 Vermehrungsorte	anfällige Kontrollsorte
8.3 Pflanzenstadium bei der Inokulation	2-3 Blätter
8.4 Inokulationsmedium	0,05 M PBS, 0,25% (w/v) Na ₂ SO ₃ , 0,5% C ₅ H ₁₀ NNaS ₂ ·3H ₂ O, 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) mehrere Pflanzen mit vorgetäuschter Inokulation in derselben Saatkiste
9.4 Gestaltung der Prüfung	Klimakammer
9.5 Prüfungseinrichtung	nach Inokulation 15-22°C
9.6 Temperatur	12-16 Stunden Licht ca. 5000 Lux
9.7 Licht	
10. Inokulation	
10.1 Vorbereitung des Inokulums	frisches zermahlene 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 Wachstumstyps.
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 spezifischen 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.

² matref@geves.fr³ resistentie@naktuinbouw.nl

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.

(i) Biotest

1.	Pathogen	<i>Lettuce mosaic virus</i>
2.	Quarantänestatus	keiner
3.	Wirtsart	Salat - <i>Lactuca sativa</i> L.
4.	Quelle des Inokulums	GEVES ⁴ (FR) oder Naktuinbouw ⁵ (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	Vermehrungsorte	anfällige Kontrollsorte
8.3	Pflanzenstadium bei der Inokulation	2-3 Blätter
8.4	Inokulationsmedium	0,05 M PBS, 0,25% (w/v) Na ₂ SO ₃ 0,5% C ₅ H ₁₀ NNaS ₂ ·3H ₂ O, 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 zermahlene 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

⁴ matref@geves.fr

⁵ resistentie@naktuinbouw.nl

11.	Erfassungen	
11.1	Methode	visuelle Einschätzung der Grades an Mosaikbildung; Vergleich mit Standardsorten, vorzugsweise mit Standardsorten desselben Wachstumstyps.
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 spezifischen 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	<u><i>Lettuce mosaic virus</i> Pathotyp II</u>
2.	Funktionelles Gen	<u><i>mo1</i> (mit zwei Resistenzallelen <i>mo1¹</i> und <i>mo1²</i> und einem Anfälligkeitsallel <i>mo1⁰</i>)</u>
3.	Sonden und Primer für den TaqMan PCR	
3.1.	Test 1	<u>um <i>mo1¹</i> Genotypen von <i>mo1⁰</i> und <i>mo1²</i> Genotypen zu unterscheiden (Deletion von 6 Basen auf Nukleotidposition 344-349):</u>

Sonde	DNA Sequenz '5'-3'	Fluoreszenzfarbstoff (freigestellt)
Pr-del- <i>mo1</i>	GGCTCAAGGAGCTGACTTCTATTG	Texas Red (anfällig)
Pr-del- <i>mo1¹</i>	GGCTCATGACTTCTATTG	6FAM-MGB (resistentes <i>mo1¹</i>)

Primer	DNA Sequenz '5'-3'
Fw-del- <i>mo1</i>	CAACAACATACATCGACCAA
Rev-del- <i>mo1</i>	CTCCCACTTAGGCTCGAT

Sequenz-Amplikon: '5'-3'

Die Amplikonsequenz der Allele *mo1⁰* und *mo1²*:

TTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTATTGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACC

Die Amplikonsequenz für das Resistenzallel *mo1¹*:

TTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCATGACTTCTATTGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACC

3.2.	Test 2	um $mo1^2$ Genotypen von $mo1^0$ und $mo1^1$ Genotypen zu unterscheiden (SNP auf Nukleotidposition 228):																
	<table border="1"> <tr> <td>Sonde</td> <td>DNA Sequenz '5'-3'</td> <td>Fluoreszenzfarbstoff (freigestellt)</td> </tr> <tr> <td>Pr-SNP228-$mo1$</td> <td>CTCCCTCTGCTAAGTC</td> <td>6FAM-MGB (anfällig)</td> </tr> <tr> <td>Pr-SNP228-$mo1^2$</td> <td>ACTCCCTCTCCTAAGT</td> <td>VIC-MGB (resistentes $mo1^2$)</td> </tr> </table>	Sonde	DNA Sequenz '5'-3'	Fluoreszenzfarbstoff (freigestellt)	Pr-SNP228- $mo1$	CTCCCTCTGCTAAGTC	6FAM-MGB (anfällig)	Pr-SNP228- $mo1^2$	ACTCCCTCTCCTAAGT	VIC-MGB (resistentes $mo1^2$)								
Sonde	DNA Sequenz '5'-3'	Fluoreszenzfarbstoff (freigestellt)																
Pr-SNP228- $mo1$	CTCCCTCTGCTAAGTC	6FAM-MGB (anfällig)																
Pr-SNP228- $mo1^2$	ACTCCCTCTCCTAAGT	VIC-MGB (resistentes $mo1^2$)																
	<table border="1"> <tr> <td>Primer</td> <td>DNA Sequenz '5'-3'</td> </tr> <tr> <td>Fw-SNP228-$mo1$</td> <td>GCATCCGCTCGAGCATTC</td> </tr> <tr> <td>Rev-SNP228-$mo1$</td> <td>CTACCCCAAGCGACTTGCTT</td> </tr> </table>	Primer	DNA Sequenz '5'-3'	Fw-SNP228- $mo1$	GCATCCGCTCGAGCATTC	Rev-SNP228- $mo1$	CTACCCCAAGCGACTTGCTT											
Primer	DNA Sequenz '5'-3'																	
Fw-SNP228- $mo1$	GCATCCGCTCGAGCATTC																	
Rev-SNP228- $mo1$	CTACCCCAAGCGACTTGCTT																	
Sequenz-Amplikon: '5'-3'																		
Die Amplikonsequenz der Allele $mo1^0$ und $mo1^1$:																		
TCAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAGCAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCC																		
Die Amplikonsequenz für das Resistenzallel $mo1^2$:																		
TCAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTGATACTCCCTCTCCTAAGTCCAAGCAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCC																		
4.	Prüfungsanlage																	
4.1	Anzahl der Pflanzen pro Genotyp	Mind. 20 Pflanzen																
4.2	Kontrollsorten	Allel $mo1^0$ für Anfälligkeit homozygot vorhanden: Sprinter, Sucrine Allel $mo1^1$ für Resistenz homozygot vorhanden: Capitan, Kanaryole Allel $mo1^2$ 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 Testprotokoll über Naktuinbouw ⁶ (NL) erhältlich)																
	Test 1:	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Temperatur</th> <th>Zeit</th> <th>Anstiegs- geschwindigkeit</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Erste Aktivierung des Enzyms</td> <td>95°C</td> <td>2' 00"</td> <td></td> </tr> <tr> <td>40 Zyklen</td> <td>95°C</td> <td>0' 15"</td> <td>5°C/sec</td> </tr> <tr> <td></td> <td>65°C</td> <td>0' 48"</td> <td>5°C/sec</td> </tr> </tbody> </table>		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
	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:	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Temperatur</th> <th>Zeit</th> <th>Anstiegs- geschwindigkeit</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>95°C</td> <td>2' 00"</td> <td></td> </tr> <tr> <td>40 Zyklen</td> <td>95°C</td> <td>0' 15"</td> <td>5°C/sec</td> </tr> <tr> <td></td> <td>60°C</td> <td>0' 48"</td> <td>5°C/sec</td> </tr> </tbody> </table>		Temperatur	Zeit	Anstiegs- geschwindigkeit		95°C	2' 00"		40 Zyklen	95°C	0' 15"	5°C/sec		60°C	0' 48"	5°C/sec
	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.																		

⁶ Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl

7.	<u>Erfassungen</u>																								
7.1	<u>Erfassungsskala</u>																								
Test 1:																									
	<u>Signalgebende Fluorophore</u>																								
	<u>FAM (mo^{1^1})</u>	<u>Texas Red (mo^{1^0} oder mo^{1^2})</u>																							
	⋮	x																							
	x	⋮																							
	x	x																							
	⋮	⋮																							
		<u>Homozygotes mo^{1^0} oder mo^{1^2}, oder heterozygotes mo^{1^0} und mo^{1^2}</u>																							
		<u>Homozygotes mo^{1^1}</u>																							
		<u>Heterozygotes mo^{1^0} und mo^{1^1} oder heterozygotes mo^{1^2} und mo^{1^1}</u>																							
		<u>Kein Ergebnis, Test wiederholen</u>																							
Test 2:																									
	<u>Signalgebende Fluorophore</u>																								
	<u>FAM (mo^{1^0} oder mo^{1^1})</u>	<u>VIC (mo^{1^2})</u>																							
	<u>(x) (FAM RFU << VIC RFU)</u>	x																							
	x	⋮																							
	x	<u>(x) (FAM RFU >> VIC RFU)</u>																							
	⋮	⋮																							
		<u>Homozygotes mo^{1^2}</u>																							
		<u>Homozygotes mo^{1^0} oder mo^{1^1}, oder heterozygotes mo^{1^0} und mo^{1^1}</u>																							
		<u>Heterozygotes mo^{1^0} und mo^{1^2} or heterozygotes mo^{1^1} und mo^{1^2}</u>																							
		<u>Kein Ergebnis, Test wiederholen</u>																							
7.2	<u>Validierung der Prüfung</u>	<u>Kontrollsorten sollten die erwarteten Ergebnisse liefern. Eine homogene Sorte wird keine hereozyten Pflanzen aufweisen, außer bei einer Sorte mit Allelkombinationen ($mo^{0^+}mo^{1^1}$ oder 2^2).</u>																							
8.	<u>Auswertung der Daten hinsichtlich der UPOV-Ausprägungsstufen</u>	<u>Die Kombination der beiden PCR-Tests führt zu folgendem voraussichtlichen Ergebnis in einem Biotest mit with LMV Pathotyp II:</u>																							
		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th colspan="3"><u>Test 2 (mo^{1^2})</u></th> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th><u>fehlend</u></th> <th><u>homozygot vorhanden</u></th> <th><u>heterozygot</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th rowspan="3"><u>Test 1 (mo^{1^1})</u></th> <th><u>fehlend</u></th> <td><u>anfällig (mo^{1^0})</u></td> <td><u>resistent (mo^{1^2})</u></td> <td><u>anfällig (mo^{1^0}/mo^{1^2})</u></td> </tr> <tr> <th><u>homozygot vorhanden</u></th> <td><u>resistent (mo^{1^1})</u></td> <td><u>nicht möglich (ungültig)</u></td> <td><u>nicht möglich (ungültig)</u></td> </tr> <tr> <th><u>heterozygot</u></th> <td><u>anfällig (mo^{1^0}/ mo^{1^1})</u></td> <td><u>nicht möglich (ungültig)</u></td> <td><u>voraussichtlich resistent, aber noch nicht validiert</u></td> </tr> </tbody> </table>			<u>Test 2 (mo^{1^2})</u>					<u>fehlend</u>	<u>homozygot vorhanden</u>	<u>heterozygot</u>	<u>Test 1 (mo^{1^1})</u>	<u>fehlend</u>	<u>anfällig (mo^{1^0})</u>	<u>resistent (mo^{1^2})</u>	<u>anfällig (mo^{1^0}/mo^{1^2})</u>	<u>homozygot vorhanden</u>	<u>resistent (mo^{1^1})</u>	<u>nicht möglich (ungültig)</u>	<u>nicht möglich (ungültig)</u>	<u>heterozygot</u>	<u>anfällig (mo^{1^0}/ mo^{1^1})</u>	<u>nicht möglich (ungültig)</u>	<u>voraussichtlich resistent, aber noch nicht validiert</u>
		<u>Test 2 (mo^{1^2})</u>																							
		<u>fehlend</u>	<u>homozygot vorhanden</u>	<u>heterozygot</u>																					
<u>Test 1 (mo^{1^1})</u>	<u>fehlend</u>	<u>anfällig (mo^{1^0})</u>	<u>resistent (mo^{1^2})</u>	<u>anfällig (mo^{1^0}/mo^{1^2})</u>																					
	<u>homozygot vorhanden</u>	<u>resistent (mo^{1^1})</u>	<u>nicht möglich (ungültig)</u>	<u>nicht möglich (ungültig)</u>																					
	<u>heterozygot</u>	<u>anfällig (mo^{1^0}/ mo^{1^1})</u>	<u>nicht möglich (ungültig)</u>	<u>voraussichtlich resistent, aber noch nicht validiert</u>																					
		<p><u>Heterozygote Pflanzen (mo^{1^0}/mo^{1^1} oder mo^{1^2}) sind in Biotests anfällig, da es sich bei $mo1$ um ein rezessives Gen handelt.</u></p> <p><u>Heterozygote Pflanzen ($[mo^{1^1}] + [mo^{1^2}]$) bedürfen eines Ergebnisses aus einem Biotest.</u></p> <p><u>Sorten mit einer Mischung aus Genotypen (heterozygote Pflanzen, homozygote mo^{1^0} Pflanzen (voraussichtlich anfälliger Phänotyp) und homozygote mo^{1^1} oder mo^{1^2} Pflanzen (voraussichtlich resistenter Phänotyp)) sind im Biotest voraussichtlich nicht homogen.</u></p> <p><u>Wenn der DNA-Marker-Testergebnis die Angaben im TQ nicht bestätigt, sollte ein Biotest durchgeführt werden, um zu erfassen, ob die Sorte aufgrund eines anderen Mechanismus resistent ist.</u></p>																							