

Technischer Ausschuss

TC/59/13

**Neunundfünfzigste Tagung
Genf, 23. und 24. Oktober 2023**

Original: englisch
Datum: 12. September 2023

TEILÜBERARBEITUNG DER PRÜFUNGSRICHTLINIEN FÜR BLUMENKOHL

von einem Sachverständigen aus den Niederlanden erstelltes Dokument

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

Dieses Dokument wurde mit Hilfe einer maschinellen Übersetzung erstellt, und die Genauigkeit kann nicht garantiert werden. Daher ist der Text in der Originalsprache die einzige authentische Version.

1. Zweck dieses Dokuments ist es, einen Vorschlag für eine Teilüberarbeitung der Prüfungsrichtlinien für Blumenkohl (Dokument TG/45/7 Rev.) vorzulegen.
2. Auf ihrer siebenundfünfzigsten Tagung¹ prüfte die Technische Arbeitsgruppe für Gemüsearten (TWV) einen Vorschlag für eine Teilüberarbeitung der Prüfungsrichtlinien für Blumenkohl (*Brassica oleracea* L. convar *botrytis* (L.) Alef. var. *botrytis* L.) auf Grundlage der Dokumente TG/45/7 Rev. und TWV/57/20 "Partial revision of the Test Guidelines for Cauliflower", und schlug folgende Änderungen vor (vergleiche Dokument TWV/57/26 „Report“, Absatz 63):
 - (a) Überarbeitung von Merkmal 25 "Blüte: Farbe"
 - (b) Hinzufügung einer neuen Erläuterung zu 25 „Blüte: Farbe“
 - (c) Überarbeitung der Erläuterung zu 28 „Männliche Sterilität“
 - (d) Hinzufügung von Verweisen zu Kapitel 9. "Literatur"
3. Die vorgeschlagenen Änderungen werden nachstehend angegeben. Die vorgeschlagenen Änderungen werden in der Anlage mit Hervorhebung durch Unterstreichen (Einfügungen) und ~~Durchstreichen~~ (Streichungen) angegeben.

Vorgeschlagene Überarbeitung von Merkmal 25 "Blüte: Farbe"

	English	français	deutsch	español	Example Varieties/ Exemples/ Beispielsorten/ Variedades ejemplo	Note/ Nota
25. VG/ (*) MS (+)	Flower: color	Fleur : couleur	Blüte: Farbe	Flor: color		
QL	white	blanche	weiß	blanco	Bruce, Ecrin	1
	yellow	jaune	gelb	amarillo	Flora Blanca, Lecerf	2

¹ vom 1. bis 5. Mai 2023 in Antalya, Türkei.

Vorgeschlagene Hinzufügung einer neuen Erläuterung zu 25 „Blüte: Farbe“

Zu 25: Blüte: Farbe

Mittels Feldanbau und/oder DNS-Marker-Test zu prüfen.

Im Falle eines Feldanbaus ist die Beobachtungsmethode VG. Im Falle eines DNS-Marker-Tests ist die Beobachtungsmethode MS.

Feldanbau:

Prüfen der Blütenfarbe.



DNS-Marker-Test:

Das Gen CCD4 ist verantwortlich für die weiße Blütenblattfarbe bei *Brassica oleracea* L. convar *botrytis* (L.) Alef. var. *botrytis* L. Ein Funktionsverlust dieses Gens ist für die gelbe Blütenblattfarbe verantwortlich. Die Marker, die dem funktionalen Gen und dem nicht-funktionalen Gen entsprechen, basieren auf 3 SNPs an Position ~1296bp in den Genen (Han et al. 2019).

Die Marker können im Multiplex mit dem Marker für männliche Sterilität (Zu 28) durchgeführt werden.

Das Vorhandensein des funktionalen oder nicht-funktionalen CCD4-Gens kann durch die beschriebenen kodominanten Marker nachgewiesen werden.

Besondere Aspekte:

1.	Merkmal	Blüte: Farbe
2.	Funktionales Gen	Funktionales CCD4-Gen: weiß Nicht-funktionales CCD4-Gen: gelb
3.1	Primer	Tm der Primer beträgt ~57 °C Vorwärts-Primer: „5-CTGGATTCAACATCATTACAG CT-3' Rückwärts-Primer: '5-CGGTGACGAGATCGATCTTCA-3'
3.2	Sonden	Weiße Sonde: ,5-Fluorophor-ATCGCTCCAAATATTATGT-Quencer-3' Gelbe Sonde: '5-Fluorophor-GCTCCGAACGTTATGT-Quencer-3'
		Die Sonden sind MGB-Sonden (Applied Biosystems) oder XS-Sonden (Biolegio). Die Tm der Sonden muss bei 67 °C bestellt werden. Die Fluorophore können gemäß der Kompatibilität mit den Filtern der Echtzeit-PCR-Maschine modifiziert werden.
4.	Prüfungsanlage	
4.1	Anzahl der Pflanzen pro Genotyp	mind. 20 Pflanzen
4.2	Kontrollsorten	Allel für funktionales CCD4-Gen (weiße Blütenblatfarbe) homozygot vorhanden: Ecrin Funktionale und nicht-funktionale CCD4-Gene heterozygot vorhanden (Sorte ist weiß): Bruce Allel für nicht-funktionales CCD4-Gen (gelbe Blütenblatfarbe) homozygot vorhanden: Magnifico
6.	PCR-Bedingungen (abhängig von Mastermischung)	1. Initialer Denaturierungsschritt 10 min 95 °C 2. 40 Zyklen, 15 Sekunden 95 °C und 1 Minute 60 °C. Jeder Zyklus endet mit einer Plattenauslesung.
8.	Auswertung der Prüfungsergebnisse	
	Weiß (1):	Die Sonde für das funktionale CCD4-Gen (weiße Blütenblatfarbe) ist homozygot vorhanden, die Sorte hat weiße Blüten. Beide Sonden sind vorhanden (heterozygot), die Sorte hat weiße Blüten.
	Gelb (2)	Die Sonde für das nicht-funktionale CCD4-Gen (gelbe Blütenblatfarbe) ist homozygot vorhanden, die Sorte hat gelbe Blüten. Wenn das Ergebnis des DNS-Marker-Tests die Angaben im TQ nicht bestätigt, sollte ein Feldanbau durchgeführt werden, um zu erfassen, ob die Sorte aufgrund eines anderen Mechanismus weiße oder gelbe Blüten hat.

Im Falle eines Feldanbaus ist die Beobachtungsmethode VS. Im Falle eines DNS-Marker-Tests ist die Beobachtungsmethode MS

Vorgeschlagene Überarbeitung der Erläuterung zu 28 „Männliche Sterilität“

Zu 28: Männliche Sterilität

Mittels Feldanbau und/oder DNS-Marker-Test zu prüfen.²

Im Falle eines Feldanbaus ist die Beobachtungsmethode VS. Im Falle eines DNS-Marker-Tests ist die Beobachtungsmethode MS.

Feldanbau:

- Fehlend: > 70 % der Pflanzen fertil (mit einem Selbstinkompatibilitätssystem produzierte freiabblühende Sorten oder Hybridsorten)
Partiell: 30 % bis 70 % der Pflanzen fertil (mit genetischer männlicher Sterilität produzierte Hybridsorten in heterozygotem Zustand)
Vollständig: < 30 % der Pflanzen fertil (mit zytoplasmatischer männlicher Sterilität produzierte Hybridsorten)



männlich fertil (Pollen vorhanden)



männlich steril (Pollen fehlend)

DNS-Marker-Test und/oder Feldanbau:

Sorten, bei denen im TQ männliche Fertilität (Stufe 1) oder vollständige männliche Sterilität (Stufe 3) angegeben wurden, können mittels Feldanbau oder DNS-Marker-Test geprüft werden.

Sorten mit partieller männlicher Sterilität (Stufe 2) und vegetativ vermehrte vollständig männlich sterile Linien (Stufe 3) können nicht mittels eines DNS-Marker-Tests geprüft werden, sondern müssen in einem Feldanbau erfasst werden.

Es sei angemerkt, dass es Linien gibt, die aufgrund des homozygot rezessiven Gens für monogene männliche Sterilität (GMS) männlich steril sind. Diese Linien werden für die Erzeugung von Hybridsorten verwendet, die dann männlich fertil sein werden. Wenn jedoch eine heterozygote Mutterlinie verwendet wird, sind die erzeugten Hybriden partiell männlich steril (Stufe 2). Aufgrund ihrer Beschaffenheit müssen diese Linien vegetativ vermehrt werden. Sie sind zwar männlich steril, verfügen aber nicht über den DNS-Marker für das Vorhandensein der CMS männlichen Sterilität. Daher können vegetativ vermehrte männlich sterile Linien nicht mittels eines DNS-Marker-Tests geprüft werden, sondern müssen in einem Feldanbau erfasst werden.

In den Fällen, in denen nur ein DNS-Marker-Test zulässig ist (samenvermehrte Sorten der Stufen 1 und 3), wird erwartet, dass die Sorte männlich fertile Blüten hat, wenn der CMS-Marker nicht vorhanden zu sein scheint. Wenn der CMS-Marker vorhanden ist, wird erwartet, dass die Sorte männlich sterile Blüten hat. Alle Sorten, die als partiell steril (Stufe 2) angegeben wurden, und vegetativ vermehrte Linien, die als vollständig männlich steril (Stufe 3) angegeben wurden, sollten in einem Feldanbau geprüft werden.

Wenn das Ergebnis des DNS-Marker-Tests die Erklärung im TQ nicht bestätigt, sollte ein Feldanbau durchgeführt werden, um zu erfassen, ob die Sorte männlich fertile oder männlich sterile Blüten hat oder sich aufgrund eines anderen Mechanismus aufspaltet.

² Die Beschreibung des Verfahrens zur Prüfung männlicher Sterilität für *Brassica* (CMS-Marker) fällt unter ein Geschäftsgeheimnis. Der Inhaber des Geschäftsgeheimnisses, Syngenta Seeds B.V., hat der Verwendung des CMS-Markers ausschließlich zum Zwecke der Prüfung der Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit (DUS) und zur Erstellung von Sortenbeschreibungen durch UPOV und Behörden von Verbandsmitgliedern zugestimmt. Syngenta Seeds B.V. erklärt, dass weder UPOV noch Behörden von Verbandsmitgliedern, die den CMS-Marker für oben genannte Zwecke nutzen, für den etwaigen Missbrauch/die Nutzung des CMS-Markers durch Dritte zur Verantwortung gezogen werden. Nehmen Sie bitte Kontakt zu Naktuinbouw, Niederlande, auf, um für oben genannte Zwecke Informationen zu dem CMS-Marker zu erhalten.

Der Marker kann im Multiplex mit den Markern für die Blütenfarbe durchgeführt werden (Zu 25).

Vorgeschlagene Hinzufügung von Verweisen zu Kapitel 9. "Literatur"

9. Literatur

Fengqing Han, Huilin Cui, Bin Zhang, Xiaoping Liu, Limei Yang, Mu Zhuang, Honghao Lv, Zhansheng Li, Yong Wang, Zhiyuan Fang, Jianghua Song and Yangyong Zhang, 2019: Map-based cloning and characterization of BoCCD4, a gene responsible for white/yellow petal color in *B. oleracea* BMC Genomics. 20:242

Fujime, Y., 1983: Studies on Thermal Conditions of Curd Formation and Development in Cauliflower and Broccoli, with Special Reference to Abnormal Curd Development. Memoires of Faculty of Agriculture, Kagawa University, No. 40, February 1983, pp. 1-123, JP.

Gray, A.R., 1989: Taxonomy and Evolution of Broccoli and Cauliflower. Bailey 23 (1), pp. 28-46.

Nieuwhof, M., 1969: Cole Crops. World Crops Books: Leonard Hill, London, GB.

Sadik, S., 1962: Morphology of the curd of cauliflower. Amer. Bot. 49, pp. 290-297.

Tsunoda, S., Hinata, K., and Gomez-Campo, C., 1980: Brassica Crops and Wild Allies. Biology and Breeding, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, JP.

Wiebe, H.J., 1972/73: Wirkung von Temperatur und Licht auf Wachstum und Entwicklung von Blumenkohl. Gartenbauwissenschaft 37, pp. 165-178, 37, pp. 293-303, 37, pp. 455-469, 38, pp. 263-279, 38, pp. 433-440.

Wiebe, H.J., 1975: The Morphological development of cauliflower and broccoli cultivars depending on temperature. Sci. Hort. 3, pp. 95-101.

Wiebe, H.J., 1981: Influence of transplant characteristics and growing conditions on curd size (buttoning) of cauliflower. Acta Hort. 122, pp. 99-105.

[Anlage folgt]

VORGESCHLAGENEN ÄNDERUNGEN MIT HERVORHEBUNG
(nur auf Englisch)

Proposed revision of Characteristic 25 “Flower: color”

	English	français	deutsch	español	Example Varieties/ Exemples/ Beispielsorten/ Variedades ejemplo	Note/ Nota
25. VG/ (*) MS (+)	Flower: color	Fleur : couleur	Blüte: Farbe	Flor: color		
QL	white	blanche	weiß	blanco	Bruce, Ecrin	1
	yellow	jaune	gelb	amarillo	Flora Blanca, Lecerf	2

Proposed addition of new explanation Ad. 25 Characteristic 25 “Flower: color”

Ad 25: Flower: color

To be tested in a field and/or in a DNA marker test.

In the case of a field trial, the type of observation is VG. In the case of a DNA marker test, the type of observation is MS.

Field trial:

Check de color of flowers.



1
white

2
yellow

DNA marker test:

The gene CCD4 is responsible for the white petal color in *Brassica oleracea* L. convar *botrytis* (L.) Alef. var. *botrytis* L. Functional loss of this gene is responsible for the yellow petal color. The markers corresponding with the functional gene and nonfunctional gene are based on 3 SNP's on position ~1296bp in the genes (Han et al. 2019).

The markers can be performed in multiplex with the marker for male sterility (Ad. 28).

The presence of the functional or nonfunctional CCD4 gene can be detected by the described co-dominant markers.

Specific aspects:

1.	<u>Characteristic</u>	<u>Flower: color</u>
2.	<u>Functional gene</u>	<u>Functional CCD4 gene : white</u> <u>Nonfunctional CCD4 gene: yellow</u>
3.1	<u>Primers</u>	<u>Tm of the primers is ~57°C</u> <u>Forward Primer: "5-CTGGATTCAACATCATTACAG CT-3"</u> <u>Reverse Primer: '5-CGGTGACGAGATCGATCTTCA-3'</u>
3.2	<u>Probes</u>	<u>White Probe: '5-Fluorophore-ATCGCTCCAAATATTATGT-Quencer-3'</u> <u>Yellow Probe: '5-Fluorophore-GTCCGAACGTTATGT-Quencer-3'</u>
		<u>The probes are MGB probes (Applied biosystems) or XS probes (Biolegio). The Tm of the probes must be ordered at 67°C.</u> <u>Fluorophores can be modified according to compatibility with the filters on the real-time PCR machine.</u>
4.	<u>Format of the test</u>	
4.1	<u>Number of plants per genotype</u>	<u>at least 20 plants</u>
4.2	<u>Control varieties</u>	<u>Homozygous allele for functional CCD4 gene (white petal color) present: Ecrin</u> <u>Heterozygous functional and nonfunctional CCD4 gene present (variety is white): Bruce</u> <u>Homozygous allele for nonfunctional CCD4 gene (yellow petal color) present: Magnifico</u>
6.	<u>PCR conditions</u> <u>(mastermix dependent)</u>	<u>1. Initial denaturation step 10 min 95 °C</u> <u>2. 40 cycles 15 sec 95 °C and 1 min 60°C. Every cycle ends with a plate reading.</u>
8.	<u>Interpretation of test results</u>	
	<u>White (1):</u>	<u>Probe for functional CCD4 gene (white petal color) is homozygous present, variety has white flowers.</u> <u>Both probes are present (heterozygous), the variety has white flower.</u>
	<u>Yellow (2)</u>	<u>Probe for nonfunctional CCD4 gene (yellow petal color) is homozygous present, the variety has yellow flowers.</u> <u>In case the DNA marker test result does not confirm the declaration in the TQ, a field trial should be performed to observe whether the variety has white or yellow flowers due to another mechanism.</u>

In case of a field trial, type of observation is VS. In case of a DNA marker test, type of observation is MS.

Proposed revision of explanation Ad. 28 “Male sterility”

Ad. 28: Male sterility

To be tested in a field trial and/or in a DNA marker test³.

In the case of a field trial, the type of observation is VG VS. In the case of a DNA marker test, the type of observation is MS.

Field trial:

Absent: >70% of the plants fertile (open-pollinated varieties or hybrid varieties produced with self-incompatibility system)
Partial: 30% to 70% of the plants fertile (hybrid varieties produced with genic male sterility, in heterozygous state)
Total: < 30% of the plants fertile (hybrid varieties produced with cytoplasmic male sterility)



male fertile (pollen present)



male sterile (pollen absent)

DNA marker test and/or field trial:

All Varieties declared male fertile (state 1) or total male sterile (state 3) in the TQ, can be examined in a field trial or in a DNA marker test.

Varieties with partial male sterility (state 2) and vegetatively propagated, total male sterile lines (state 3) cannot be examined in a DNA marker test but must be observed in a field trial.

It should be noted that lines exist which are male sterile due to the homozygous recessive monogenic male sterility (GMS) gene. These lines are used for the production of hybrids which then normally will be male fertile. However when a heterozygous mother line is used, the produced hybrids will be partially male sterile (state 2). Due to their nature these lines have to be propagated vegetatively. They are male sterile but do not have the DNA marker for the presence of CMS male sterility. So vegetatively propagated male sterile lines cannot be examined in a DNA marker test but must be observed in a field trial.

For the cases where only a DNA marker test is allowed (state 1 and state 3 seed propagated varieties), if the CMS marker appears to be not present, a field trial should be performed to observe whether the variety is male sterile (on another mechanism) or fertile. the variety is expected to have male fertile flowers. In cases where the CMS marker is present, the variety is expected to have male sterile flowers. All varieties declared fertile are to be tested in a field trial. All varieties declared partially sterile (state 2) and vegetatively propagated lines declared total male sterile (state 3) should be tested in a field trial.

In case the DNA marker test result does not confirm the declaration in the TQ, a field trial should be performed to observe whether the variety has male fertile or male sterile flowers or is segregating due to another mechanism.

The marker can be performed in multiplex with the markers for flower color (Ad. 25).

³ The description of the method to test male sterility for *Brassica* (CMS marker) is covered by a trade secret. The owner of the trade secret, Syngenta Seeds B.V., has given its consent for the use of the CMS marker solely for the purposes of examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS) and for the development of variety descriptions by UPOV and authorities of UPOV members. Syngenta Seeds B.V. declares that neither UPOV, nor authorities of UPOV members that use the CMS marker for the above purposes will be held accountable for possible (mis)use of the CMS marker by third parties. Please contact Naktuinbouw, Netherlands, to obtain the method and information on the CMS marker for the purposes mentioned above.

Proposed addition of references to Chapter 9. "Literature"

9. Literature

Fengqing Han, Huilin Cui, Bin Zhang, Xiaoping Liu, Limei Yang, Mu Zhuang, Honghao Lv, Zhansheng Li, Yong Wang, Zhiyuan Fang, Jianghua Song and Yangyong Zhang, 2019: Map-based cloning and characterization of BoCCD4, a gene responsible for white/yellow petal color in *B. oleracea* BMC Genomics. 20:242

Fujime, Y., 1983: Studies on Thermal Conditions of Curd Formation and Development in Cauliflower and Broccoli, with Special Reference to Abnormal Curd Development. Memoires of Faculty of Agriculture, Kagawa University, No. 40, February 1983, pp. 1-123, JP.

Gray, A.R., 1989: Taxonomy and Evolution of Broccoli and Cauliflower. Bailey 23 (1), pp. 28-46.

Nieuwhof, M., 1969: Cole Crops. World Crops Books: Leonard Hill, London, GB.

Sadik, S., 1962: Morphology of the curd of cauliflower. Amer. Bot. 49, pp. 290-297.

Tsunoda, S., Hinata, K., and Gomez-Campo, C., 1980: Brassica Crops and Wild Allies. Biology and Breeding, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, JP.

Wiebe, H.J., 1972/73: Wirkung von Temperatur und Licht auf Wachstum und Entwicklung von Blumenkohl. Gartenbauwissenschaft 37, pp. 165-178, 37, pp. 293-303, 37, pp. 455-469, 38, pp. 263-279, 38, pp. 433-440.

Wiebe, H.J., 1975: The Morphological development of cauliflower and broccoli cultivars depending on temperature. Sci. Hort. 3, pp. 95-101.

Wiebe, H.J., 1981: Influence of transplant characteristics and growing conditions on curd size (buttoning) of cauliflower. Acta Hort. 122, pp. 99-105.

[Ende der Anlage und des Dokuments]