

Erweiterter Redaktionsausschuss

TC-EDC/Mar18/9

Genf, 26. und 27. März 2018

Original: englisch

Datum: 8. März, 2018

TEILÜBERARBEITUNG DER PRÜFUNGSRICHTLINIEN FÜR TOMATEN-UNTERLAGEN

von einem Sachverständigen aus den Niederlanden erstelltes Dokument

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

1. Zweck dieses Dokumentes ist es, einen Vorschlag für eine Teilüberarbeitung der Prüfungsrichtlinien für Tomatenunterlagen (Dokument TG/294/1 Corr. Rev. 2) vorzulegen.

2. Die Technische Arbeitsgruppe für Gemüsearten (TWV) prüfte auf ihrer einundfünfzigsten Tagung vom 3. Juli bis zum 7. Juli 2017 in Roelofarendsveen, Niederlande, einen Vorschlag für eine Teilüberarbeitung der Prüfungsrichtlinien für Tomaten-Unterlagen (Dokument TG/294/1 korr. Rev.) aufgrund der Dokumente TG/294/1 korr. Rev. und TWV/51/11 „Teilüberarbeitung der Prüfungsrichtlinien für Tomaten-Unterlagen“ und schlug die folgenden Änderungen der Prüfungsrichtlinien für Tomaten-Unterlagen vor (vergleiche Dokument TWV/51/16 „Report“, Absatz 115):

- a) Änderung der Erfassungsmethode für Merkmale 24.1 und 24.2:
 - i) Merkmal 24.1 „Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) - Pathotyp 0 (ex 1)“
 - ii) Merkmal 24.2 „Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) - Pathotyp 1 (ex 2)“
- b) Änderung der Erläuterung Zu 24 durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Erfassung der Resistenz und durch geringfügige Änderungen der derzeitigen Methode
- c) Änderung der Erfassungsmethode für Merkmale 27.1, 27.2 und 27.3:
 - i) Merkmal 27.1 „Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) - Pathotyp 0“
 - ii) Merkmal 27.2 „Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) - Pathotyp 1“
 - iii) Merkmal 27.3 „Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) - Pathotyp 2“
- d) Änderung der Erläuterung Zu 27 durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Resistenzfassung und durch geringfügige typographische Änderungen der derzeitigen Methode
- e) Änderung der Erläuterung Zu 30 „Resistenz gegen das gelbe Tomatenblattrollvirus (TYLCV)“ durch Überarbeitung der derzeitigen Methode und durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Erfassung der Resistenz
- f) Änderung der Erfassungsmethode für Merkmal 31 „Resistenz gegen das Tomatenbronzefleckenvirus (TSWV)“
- g) Änderung der Erläuterung Zu 31 durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Erfassung der Resistenz
- h) Hinzufügung eines Literaturhinweises in bezug auf Änderungen a) – h) in Kapitel 9 „Literatur“.

3. Die vorgeschlagenen Änderungen sind nachfolgend durch Unterstreichen (Einfügungen) und ~~Durchstreichen~~ (Streichungen) angegeben.

Vorschlag für eine Änderung der Erfassungsmethode für Merkmale 24.1 und 24.2

Derzeitiger Wortlaut

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

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

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

Vorschlag zur Änderung der Erläuterung Zu 24 durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Erfassung der Resistenz und durch geringfügige Änderungen der derzeitigen Methode

Derzeitiger Wortlaut

Zu 24: Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

1. Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*
3. Wirtsarten *Solanum lycopersicum*
4. Quelle des Inokulums Naktuinbouw¹ (NL) und GEVES² (FR)
5. Isolat Pathotyp 0 (ex 1) (z. B. Stämme Orange 71 oder PRI 20698 oder Fol 071 1 (ex 2) (z. B. Stämme 4152 oder PRI40698 oder RAF 70 und 2 (ex 3)
Einzelne Stämme können hinsichtlich der Pathogenität abweichen
6. Feststellung der Isolatidentität Verwendung von Vergleichssorten (vergleiche 9.3)
7. Feststellung der Pathogenität an anfälligen Tomatensorten
8. Vermehrung des Inokulums
- 8.1 Vermehrungsmedium Kartoffeldextrose-Agar, Medium „S“ nach Messiaen
- 8.4 Inokulationsmedium Wasser, um die Agarplatten abzuschaben oder Czapek-Dox-Kulturmedien (7 Tage alte belüftete Kultur)
- 8.6 Ernte des Inokulums durch doppeltes Musselintuch filtern
- 8.7 Prüfung des geernteten Inokulums Sporenzählung; anpassen an 10⁶ pro ml
- 8.8 Haltbarkeit/Lebensfähigkeit des Inokulums 4-8 Std., kühl stellen, um Keimen der Sporen zu verhindern
9. Prüfungsanlage
- 9.1 Anzahl der Pflanzen pro Genotyp .mind. 20 Pflanzen
- 9.2 Anzahl der Wiederholungen 1 Wiederholung
- 9.3 Kontrollsorten für die Prüfung mit Pathotyp 0 (ex 1)
- Anfällig (*Solanum lycopersicum*) Marmande, Marmande verte, Resal
- Nur für Pathotyp 0 resistent (*Solanum lycopersicum*) Marporum, Larissa, „Marporum x Marmande verte“, Marsol, Anabel
- Resistent für Pathotyp 0 und 1 (*Solanum lycopersicum*) Motelle, Gourmet, Mohawk
- Kontrollsorten für die Prüfung mit Pathotyp 1 (ex 2)
- Anfällig (*Solanum lycopersicum*) Marmande verte, Cherry Belle, Roma
- Nur für Pathotyp 0 resistent (*Solanum lycopersicum*) Marporum, Ranco
- Resistent für Pathotyp 0 und 1 (*Solanum lycopersicum*) Tradiro, Odisea
- Anmerkung: Ranco ist etwas weniger resistent als Tradiro
- Kontrollsorten für die Prüfung mit Pathotyp 2 (ex 3)
- Anfällig für Pathotyp 2 Emperador
- Resistent für Pathotyp 0, 1 und 2 Colosus
- 9.4 Gestaltung der Prüfung >20 Pflanzen; z. B. 35 Samen für 24 Pflanzen, einschl. 2 Nullproben
- 9.5 Prüfungseinrichtung Gewächshaus oder klimatisierter Raum
- 9.6 Temperatur 24-28°C (strenge Prüfung mit mildem Isolat)
20-24°C (weniger strenge Prüfung mit starkem Isolat)
- 9.7 Licht 12 Stunden pro Tag oder länger
- 9.8 Jahreszeit alle Jahreszeiten
- 9.9 Besondere Maßnahmen leicht saurer Torfboden ist optimal;
Boden feucht, aber nicht zu naß halten
10. Inokulation
- 10.1 Vorbereitung des Inokulums belüftete Messiaen oder PDA oder Agar Medium S nach Messiaen oder Czapek-Dox-Kultur oder Abschaben der Platten
- 10.2 Quantifizierung des Inokulums ... Sporenzählung, anpassen an 10⁶ Sporen pro ml,
Geringere Konzentration für ein sehr aggressives Isolat
- 10.3 Pflanzenstadium bei Inokulation . 10-18 Tage, Keimblatt bis 1. Blatt
- 10.4 Inokulationsmethode Wurzeln und Hypocotyle werden 5-15 Min. in Sporensuspension getaucht; Kürzen der Wurzeln optional
- 10.7 Abschließende Erfassungen 14-21 Tage nach Inokulation
11. Erfassungen
- 11.1 Methode visuelle

¹ Naktuinbouw; resistantie@naktuinbouw.nl

² GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

- 11.2 Erfassungsskala Symptome:
Wachstumsverzögerung, Welken, Vergilbung
Braunfärbung der Gefäße bis oberhalb Keimblatt
- 11.3 Validierung der Prüfung Die Bewertung der Sortenresistenz sollte mit den Ergebnissen
resistenter und anfälliger Kontrollen kalibriert werden
12. Auswertung der Testergebnisse im Vergleich mit Kontrollsorten
fehlend[1] ausgeprägte Symptome
vorhanden.....[9] schwache oder keine Symptome
13. Kritische Kontrollpunkte:
Die Prüfungsergebnisse können hinsichtlich des Inokulumdrucks aufgrund von Unterschieden bei Isolat,
Sporenkonzentration, Bodenfeuchtigkeit und Temperatur leicht abweichen. Standards in der Nähe des
Grenzbereichs R/S helfen, zwischen verschiedenen Labors zu vergleichen.

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

Zu 24: Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

Resistenz gegen Pathotyp 0 (ex 1) und Pathotyp 1 (ex 2) ist in einem Biotest (Methode i) und/oder in einem DNS-Marker-Test (Methode ii) zu testen. Resistenz gegen Pathotyp 2 (ex 3) ist in einem Biotest (Methode i) zu testen. Im Falle eines Biotests ist die Beobachtungsmethode VG. Im Falle eines DNS-Marker-Tests ist die Beobachtungsmethode VS.

i) Biotest

1.	Pathogen	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
3.	Wirtsarten	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Quelle des Inokulums	Naktuinbouw ³ (NL), GEVES ⁴ (FR) oder INIA ⁵ (ES)
5.	Isolat	Pathotyp 0 (ex 1) (z. B. Stämme Orange 71 oder PRI 20698 oder Fol 071), Pathotyp 1 (ex 2) (z. B. Stämme 4152 oder PRI40698 oder RAF 70) und Pathotyp 2 (ex 3) Einzelne Stämme können hinsichtlich der Pathogenität abweichen
6.	Feststellung der Isolatidentität	Verwendung von Vergleichssorten (vergleiche 9.3)
7.	Feststellung der Pathogenität	an anfälligen Tomatensorten
8.	Vermehrung des Inokulums	
8.1	Vermehrungsmedium	Kartoffeldextrose-Agar, Medium „S“ nach Messiaen
8.4	Inokulationsmedium	Wasser, um die Agarplatten abzuschaben oder Czapek-Dox-Kulturmedien (7 Tage alte belüftete Kultur)
8.6	Ernte des Inokulums	durch doppeltes Musselintuch filtern
8.7	Prüfung des geernteten Inokulums	Sporenzählung; anpassen an 10 ⁶ pro ml
8.8	Haltbarkeit/Lebensfähigkeit des Inokulums	4-8 Std., kühl stellen, um Keimen der Sporen zu verhindern
9.	Prüfungsanlage	
9.1	Anzahl der Pflanzen pro Genotyp	mind. 20 Pflanzen
9.2	Anzahl der Wiederholungen	1 Wiederholung
9.3.1	Kontrollsorten für die Prüfung mit Pathotyp 0 (ex 1)	
	Anfällig	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Marmande, Marmande verte, Resal
	Nur resistent für Pathotyp 0	„Marporum x Marmande verte“, Marsol, Anabel Motelle, Gourmet, Mohawk, Ranco, Tradiro
	Resistent für Pathotyp 0 und 1	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Motelle, Gourmet, Mohawk
	Anmerkung:	Ranco ist etwas weniger resistent als Tradiro
9.3.2	Kontrollsorten für die Prüfung mit Pathotyp 1 (ex 2)	
	Anfällig	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Marmande verte, Cherry Belle, Roma, Marporum, Ranco
	Nur resistent für Pathotyp 0	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Marporum, Ranco
	Resistent für Pathotyp 0 und 1	Emperador, Colosus und (<i>Solanum lycopersicum</i>) Tradiro, Odisea, „Motelle x Marmande verte“
	Anmerkung:	Ranco ist etwas weniger resistent als Tradiro
9.3.3	Kontrollsorten für die Prüfung mit Pathotyp 2 (ex 3)	
	Anfällig für Pathotyp 2	Emperador und (<i>Solanum lycopersicum</i>) Marmande verte, Motelle, Marporum

³ Naktuinbouw: resistantie@naktuinbouw.nl

⁴ GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr

⁵ INIA: cardaba@inia.sp

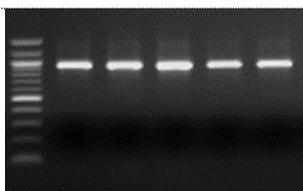
	Resistent für Pathotyp 0, 1 und 2	Colosus und (<i>Solanum lycopersicum</i>) Tributes, Murdoch, „Marmande verte x Florida“
9.4	Gestaltung der Prüfung	>20 Pflanzen; z. B. 35 Samen für 24 Pflanzen, einschl. 2 Nullproben
9.5	Prüfungseinrichtung	Gewächshaus oder klimatisierter Raum
9.6	Temperatur	24-28°C (strenge Prüfung mit mildem Isolat) 20-24°C (weniger strenge Prüfung mit starkem Isolat)
9.7	Licht	12 Stunden pro Tag oder länger
9.8	Jahreszeit	alle Jahreszeiten
9.9	Besondere Maßnahmen	leicht saurer Torfboden ist optimal; Boden feucht, aber nicht zu naß halten
10.	Inokulation	
10.1	Vorbereitung des Inokulums	belüftete Messiaen oder PDA oder Agar Medium S nach Messiaen oder Czapek-Dox-Kultur oder Abschaben der Platten
10.2	Quantifizierung des Inokulums	Sporenzählung, anpassen an 10 ⁶ Sporen pro ml, geringere Konzentration für ein sehr aggressives Isolat
10.3	Pflanzenstadium bei Inokulation	10-18 Tage, Keimblatt bis 1. Blatt
10.4	Inokulationsmethode	Wurzeln und Hypocotyle werden 5-15 Min. in Sporensuspension getaucht; Kürzen der Wurzeln optional
10.7	Abschließende Erfassungen	14-21 Tage nach Inokulation
11.	Erfassungen	
11.1	Methode	visuelle
11.2	Erfassungsskala	Symptome: Wachstumsverzögerung, Welken, Vergilbung Braunfärbung der Gefäße bis oberhalb Keimblatt
11.3	Validierung der Prüfung	Die Bewertung der Sortenresistenz sollte mit den Ergebnissen resistenter und anfälliger Kontrollen kalibriert werden.
12.	Auswertung der Testergebnisse im Vergleich mit Kontrollsorten	
	fehlend [1]	ausgeprägte Symptome
	vorhanden [9]	schwache oder keine Symptome
13.	Kritische Kontrollpunkte Die Prüfungsergebnisse können hinsichtlich des Inokulumdrucks aufgrund von Unterschieden bei Isolat, Sporenkonzentration, Bodenfeuchtigkeit und Temperatur leicht abweichen. Standards in der Nähe des Grenzbereichs R/S helfen, zwischen verschiedenen Labors zu vergleichen.	

ii) DNS-Marker-Test

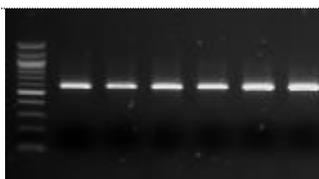
Resistenz gegen sowohl Pathotyp 0 (ex 1) als auch Pathotyp 1 (ex 2) gründet oft auf Resistenzgen I2. Das Vorhandensein des resistenten und/oder anfälligen Allels von Gen I2 kann durch den in dieser Methode beschriebenen kodominanten Marker erfaßt werden.

1.	<u>Pathogen</u>	<u><i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i></u>
2.	<u>Funktionelles Gen</u>	<u>I2</u>
3.	<u>Primer</u>	
3.1	<u>Anfälliges Allel</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>
3.2	<u>Resistentes Allel</u>	<u>TFusF1 5'-CTG AAA CTC TCC GTA TTT C-3'</u> <u>TFusRR1 5'-CGA AGA GTG ATT GGA GAT-3'</u>
4.	<u>Prüfungsanlage</u>	
4.1	<u>Anzahl der Pflanzen pro Genotyp</u>	<u>mind. 20 Pflanzen</u>
4.2	<u>Kontrollsorten</u>	<u>Homozygotes anfällige Allel vorhanden:</u> <u>(<i>Solanum lycopersicum</i>) Moneymaker</u> <u>Homozygotes resistentes Allel vorhanden: (<i>Solanum lycopersicum</i>) Tradiro</u>
5.	<u>Vorbereitung</u>	

5.1	<u>Vorbereitung DNS</u>	<u>Ernten, pro einzelne Pflanze, eines Teils eines jungen Blattes. Isolat Gesamt-DNS mit einem Standard DNS-Isolationsprotokoll (CTAB/SDS-basiert). In 100 µl T₁₀E_{0,1} resuspendieren. Gesamt-DNS auf 1/10 (H₂O) verdünnen, um eine DNS-Konzentration zwischen 1-10 ng/µl zu erhalten.</u>
5.2	<u>Vorbereitung PCR</u>	<u>Verwendung von 3 µl jeder verdünnten DNS-Probe in einzelnen PCR-Reaktionen.</u> <u>Vorbereitung des PCR Master Mix, 20µl Reaktionsvolumen:</u> <ul style="list-style-type: none"> • 3 µl 10x verdünnte DNS • 2,5 µl 10x Reaktionspuffer • 2 mM MgCl₂ • jeweils 0.1 µM resistente Primer • jeweils 0.1 µM anfällige Primer • 200 µM von jeweils den vier dNTPs • 1 Einheit Taq DNS-Polymerase
6.	<u>PCR-Bedingungen</u>	<u>1. anfänglicher Denaturierungsschritt bei 94°C 3 Minuten lang</u> <u>2. 35 Zyklen bei 94°C 1 Minute lang, 56°C 1 Minute lang und 72°C 2 Minuten lang</u> <u>3. abschließender Erweiterungsschritt bei 72°C 10 Minuten lang</u>
7.	<u>Erfassungen</u>	
7.1	<u>Methode</u>	<u>visuell</u>
7.2	<u>Erfassungsskala</u>	



Amplikon von 940bp nur homozygotes anfälliges Allel vorhanden



Amplikon von 600bp nur homozygotes resistentes Allel vorhanden



Amplikons von 940bp und 600bp anfälliges und resistentes Allel vorhanden: heterozygot resistent

7.3	<u>Validierung der Prüfung</u>	<u>Kontrollsorten sollten die erwarteten Bänder ergeben.</u>
8.	<u>Auswertung der Prüfergebnisse</u>	
	<u>24.1 Pathotyp 0 (ex 1)</u>	
	<u>vorhanden..... [9]</u>	<u>Homozygot oder heterozygot resistent in dem DNS-Marker-Test.</u> <u>Wenn ein homozygotes anfälliges Allel vorhanden sind, sollte ein Biotest für Pathotyp 0 (ex 1) durchgeführt werden.</u> <u>Wenn das DNS-Marker-Testergebnis die Erklärung im TQ nicht bestätigt, sollte ein Biotest durchgeführt werden, um zu erfassen, ob die Resistenz für die Sorte fehlend oder vorhanden ist (an anderem Mechanismus, z.B. Gen I2 ohne I).</u>
	<u>24.2 Pathotyp 1 (ex 2)</u>	
	<u>fehlend..... [1]</u>	<u>Homozygot anfällig im DNS-Marker-Test</u>
	<u>vorhanden..... [9]</u>	<u>Homozygot oder heterozygot resistent im DNS-Marker-Test.</u> <u>Wenn das DNS-Marker-Testergebnis die Erklärung im TQ nicht bestätigt, sollte ein Biotest durchgeführt werden, um zu erfassen, ob die Resistenz für die Sorte fehlend oder vorhanden ist (an anderem Mechanismus, z.B. Gen I3).</u>

Vorschlag für Änderung der Erfassungsmethode für Merkmale 27.1, 27.2 und 27.3

Derzeitiger Wortlaut

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

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

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

Vorschlag zur Änderung der Erläuterung Zu 27 durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Erfassung der Resistenz und durch geringfügige typographische Änderungen der derzeitigen Methode

Derzeitiger Wortlaut

Zu 27: Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV)

1. PathogenTomatenmosaikvirus
3. Wirtsarten *Solanum lycopersicum*
4. Quelle des InokulumsNaktuinbouw (NL)⁶ oder GEVES⁷ (FR)
5. Isolat Stamm 0 (z. B. Isolat INRA Avignon 6-5-1-1) 1 und 2
6. Feststellung der Isolatidentitätgenetisch definierte Tomatenstandardsorten
Mobaci (Tm1), Moperou (Tm2), Momor (Tm2²)
7. Feststellung der Pathogenitätbei anfälligen Pflanzen
8. Vermehrung des Inokulums
- 8.1 Vermehrungsmediumlebende Pflanze
- 8.2 Vermehrungsortez. B. Moneymaker, Marmande
- 8.7 Prüfung des geernteten InokulumsOption: an *Nicotiana tabacum* „Xanthi“, Läsionen nach 2 Tagen prüfen
- 8.8 Haltbarkeit/Lebensfähigkeit
des Inokulums.....frisch>1 Tag, getrocknet>1 Jahr
9. Prüfungsanlage
- 9.1 Anzahl der Pflanzen pro Genotyp .mind. 20 Pflanzen
- 9.2 Anzahl der Wiederholungen 1 Wiederholung
- 9.3 Kontrollsorten
- Anfällig(*Solanum lycopersicum*) Marmande, Monalbo
- Resistent gegen ToMV: 0 und 2(*Solanum lycopersicum*) Mobaci
- Resistent gegen ToMV: 0 und 1(*Solanum lycopersicum*) Moperou
- Resistent mit Nekrose(*Solanum lycopersicum*) „Monalbo x Momor“
- Resistent(*Solanum lycopersicum*) Gourmet
- 9.4 Gestaltung der PrüfungBehandlung der Nullproben mit PBS und Carborundum oder vergleichbarer Pufferlösung
- 9.5 PrüfungseinrichtungGewächshaus oder klimatisierter Raum
- 9.6 Temperatur24 bis 26°C
- 9.7 Licht12 Stunden oder länger
- 9.8 JahreszeitSymptome sind im Sommer ausgeprägter
10. Inokulation
- 10.1 Vorbereitung des Inokulums1 g Blatt mit Symptomen mit 10 ml PBS oder vergleichbarer Pufferlösung
homogenisieren, Carborundum zu Pufferlösung hinzufügen (1g/30ml)
- 10.3 Pflanzenstadium bei Inokulation..Keimblätter oder 2 Blätter
- 10.4 Inokulationsmethodevorsichtiges Einreiben
- 10.7 Abschließende Erfassungen 11-21 Tage nach Inokulation
11. Erfassungen
- 11.1 Methode.....visuelle
- 11.2 ErfassungsskalaSymptome für die Anfälligkeit:
Mosaik oben, Missbildung der Blätter
Resistenzsymptome (basierend auf Überempfindlichkeit):
Lokale Nekrose, Topnekrose, systemische Nekrose
- 11.3 Validierung der Prüfung Die Bewertung der Sortenresistenz sollte mit den Ergebnissen resistenter und anfälliger Kontrollen kalibriert werden
- Anmerkung: bei einigen heterozygoten Sorten kann ein variabler Anteil an Pflanzen ausgeprägte systemische Nekrose oder einige nekrotische Punkte aufweisen, wohingegen andere Pflanzen keine Symptome aufweisen. Dieser Anteil kann von Versuch zu Versuch unterschiedlich hoch sein.
12. Auswertung der Testergebnisse im Vergleich mit Kontrollsorten
- fehlend [1] Symptome für Anfälligkeit
- vorhanden..... [9] keine Symptome oder Symptome von
- Überempfindlichkeitsresistenz
13. Kritische Kontrollpunkte:

⁶ Naktuinbouw; resistantie@naktuinbouw.nl

⁷ GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

Temperatur und Licht können die Entwicklung von Nekrose beeinflussen. Mehr Licht bedeutet mehr Nekrose. Bei Temperaturen über 26°C kann die Resistenz zusammenbrechen.

Resistente heterozygote Sorten können symptomfreie Pflanzen und Pflanzen mit schwerer Nekrose aufweisen. Trotz der offensichtlichen Aufspaltung kann die Probe als beständig für Resistenz betrachtet werden.

Anmerkung: Der Stamm INRA Avignon 6-5-1-1 wird für ToMV empfohlen: 0.
Dieser Stamm verursacht ein auffallend gelbes Aucuba-Mosaik

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

Zu 27: Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV)

Resistenz gegen Stamm 0, 1 und 2 ist in einem Biotest (Methode i) und/oder in einem DNS-Marker-Test (Methode ii) zu testen. Bei einem Biotest ist die Beobachtungsmethode VG. Bei einem DNS-Marker-Test ist die Beobachtungsmethode VS.

i) Biotest

1.	Pathogen	Tomatenmosaikvirus
3.	Wirtsarten	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Quelle des Inokulums	Naktuinbouw ⁸ (NL) oder GEVES ⁹ (FR)
5.	Isolat	Stamm 0 (z.B. Isolat INRA Avignon 6-5-1-1), <u>Stamm 1</u> und <u>Stamm 2</u>
6.	Feststellung der Isolatidentität	genetisch definierte Tomatenstandardsorten Mobaci (Tm1), Moperou (Tm2), Momor (Tm2 ²)
7.	Feststellung der Pathogenität	bei anfälligen Pflanzen
8.	Vermehrung des Inokulums	
8.1	Vermehrungsmedium	lebende Pflanze
8.2	Vermehrungsort	z.B.. Moneymaker, Marmande
8.7	Prüfung des geernteten Inokulums	Option: an <i>Nicotiana tabacum</i> „Xanthi“, Läsionen nach 2 Tagen prüfen
8.8	Haltbarkeit/Lebensfähigkeit des Inokulums	frisch>1 Tag, getrocknet>1 Jahr
9.	Prüfungsanlage	
9.1	Anzahl der Pflanzen pro Genotyp	mind. 20 Pflanzen
9.2	Anzahl der Wiederholungen	1 Wiederholung
9.3	Kontrollsorten	
	Anfällig	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Marmande, Monalbo
	Resistent für ToMV: 0 und 2	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Mobaci
	Resistent für ToMV: 0 und 1	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Moperou
	Resistent mit Nekrose	(<i>Solanum lycopersicum</i>) „Monalbo x Momor“
	Resistent	(<i>Solanum lycopersicum</i>) Gourmet
9.4	Gestaltung der Prüfung	Behandlung der Nullproben mit PBS und Carborundum oder vergleichbarer Pufferlösung
9.5	Prüfungseinrichtung	Gewächshaus oder klimatisierter Raum
9.6	Temperatur	24 bis 26°C
9.7	Licht	12 Stunden oder länger
9.8	Jahreszeit	Symptome sind im Sommer ausgeprägter
10.	Inokulation	
10.1	Vorbereitung des Inokulums	1 g Blatt mit Symptomen mit 10 ml PBS oder vergleichbarer Pufferlösung homogenisieren, Carborundum zu Pufferlösung hinzufügen (1g/30ml)
10.3	Pflanzenstadium bei Inokulation	Keimblätter oder 2 Blätter
10.4	Inokulationsmethode	vorsichtiges Einreiben
10.7	Abschließende Erfassungen	11-21 Tage nach Inokulation
11.	Erfassungen	
11.1	Methode	visuelle

⁸ Naktuinbouw: resistantie@naktuinbouw.nl

⁹ GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr

11.2	Erfassungsskala	Symptome für die Anfälligkeit: Mosaik oben, Missbildung der Blätter Resistenzsymptome (basierend auf Überempfindlichkeit): Lokale Nekrose, Topnekrose, systemische Nekrose
11.3	Validierung der Prüfung	Die Bewertung der Sortenresistenz sollte mit den Ergebnissen resistenter und anfälliger Kontrollen kalibriert werden
	Anmerkung: bei einigen heterozygoten Sorten kann ein variabler Anteil an Pflanzen ausgeprägte systemische Nekrose oder einige nekrotische Punkte aufweisen, wohingegen andere Pflanzen keine Symptome aufweisen. Dieser Anteil kann von Versuch zu Versuch unterschiedlich hoch sein.	
12.	Auswertung der Testergebnisse im Vergleich mit Kontrollsorten	
	fehlend[1]	Symptome für Anfälligkeit
	vorhanden[9]	keine Symptome oder Symptome von Überempfindlichkeitsresistenz
13.	<p>Kritische Kontrollpunkte</p> <p>Temperatur und Licht können die Entwicklung von Nekrose beeinflussen. Mehr Licht bedeutet mehr Nekrose. Bei Temperaturen über 26°C kann die Resistenz zusammenbrechen.</p> <p>Resistente heterozygote Sorten können symptomfreie Pflanzen und Pflanzen mit schwerer Nekrose aufweisen. Trotz der offensichtlichen Aufspaltung kann die Probe als beständig für Resistenz betrachtet werden.</p> <p>Anmerkung: Der Stamm INRA Avignon 6-5-1-1 für ToMV wird empfohlen: 0. Dieser Stamm verursacht ein auffallend gelbes Aucuba-Mosaik.</p>	

ii) DNS-Marker-Test

Resistenz gegen ToMV gründet oft auf Resistenzgen Tm2 (allele Tm2 oder Tm2²). Das Vorhandensein der resistenten Allele Tm2 und Tm2² und/oder des anfälligen Allels tm2 kann durch den in Arens, P. *et al* (2010) beschriebenen kodominanten Marker erfaßt werden. Spezifische Aspekte:

1.	<u>Pathogen</u>	<u>Tomatenmosaikvirus</u>
2.	<u>Funktionelles Gen</u>	<u>Tm2/2²</u>
3.	<u>Primer</u>	
3.1	<u>Test 1 zur Prüfung der Resistenz Allele Tm2 oder Tm2²</u>	<u>Äußerer Primer TMV-2286F:</u> <u>5'GGGTATACTGGGAGTGTCCAATTC3'</u> <u>Äußerer Primer TMV-2658R:</u> <u>5'CCGTGCACGTTACTTCAGACAA3'</u> <u>Tm2² SNP2494F:</u> <u>5'CTCATCAAGCTTACTCTAGCCTACTTTAGT3'</u> <u>Tm2 SNP2493R:</u> <u>5'CTGCCAGTATATAACGGTCTACCG3'</u>
3.2	<u>Test 2 zur Prüfung anfälliger oder resistenter Allele</u>	<u>Äußerer Primer TM2-748F:</u> <u>5'CGGTCTGGGGAAAACAACCTCT3'</u> <u>Äußerer Primer TM2-1256R:</u> <u>5'CTAGCGGTATACCTCCACATCTCC3'</u> <u>TM2-SNP901misR:</u> <u>5'GCAGGTTGTCCTCCAAATTTCCATC3'</u> <u>TM2-SNP901misF:</u> <u>5'CAAATTGGACTGACGGAACAGAAAGTT3'</u>
4.	<u>Prüfungsanlage</u>	
4.1	<u>Anzahl der Pflanzen pro Genotyp</u>	<u>mind. 20 Pflanzen</u>
4.2	<u>Kontrollsorten</u>	Homozygotes anfälliges Allel tm2 vorhanden: (Solanum lycopersicum) Moneymaker resistentes Allel Tm2 vorhanden: (Solanum lycopersicum) Moperou resistentes Allel Tm2 ² vorhanden: (Solanum lycopersicum) Momor, Persica, Campeon

6.	<u>PCR-Bedingungen</u>	<u>1. anfänglicher Denaturierungsschritt bei 94°C 3 Minuten lang</u> <u>2. 35 Zyklen bei 94°C 1 Minute lang, 55°C 1 Minute lang und 72°C 2 Minuten lang</u> <u>3. abschließender Erweiterungsschritt bei 72°C 10 Minuten lang</u>
8.	<u>Auswertung der Prüfungsergebnisse</u>	<u>Das Vorhandensein der Allele tm2, Tm2, Tm2² führt zu unterschiedlichen Auswertungen für Merkmale 27.1, 27.2 und 27.3, vergleiche Tabelle. Wenn das Ergebnis des DNS-Marker-Tests die Erklärung in dem TQ nicht bestätigt, sollte ein Biotest durchgeführt werden, um zu erfassen, ob die Resistenz für die Sorte fehlend oder vorhanden ist (an anderem Mechanismus, z.B. Gen Tm1).</u>

<u>Testergebnis DNS-Marker-Test</u>	<u>tm2/tm2</u>	<u>Tm2/tm2 oder Tm2/Tm2</u>	<u>Tm2²/tm2 oder Tm2²/Tm2² oder Tm2²/Tm2</u>
		(tritt gelegentlich auf)	
<u>27.1 Stamm 0</u>	<u>[1] fehlend</u>	<u>[9] resistent</u>	<u>[9] resistent</u>
<u>27.2 Stamm 1</u>	<u>[1] fehlend</u>	<u>[9] resistent</u>	<u>[9] resistent</u>
<u>27.3 Stamm 2</u>	<u>[1] fehlend</u>	<u>[1] fehlend</u>	<u>[9] resistent</u>

Vorschlag zur Änderung der Erläuterung Zu 30 „Resistenz gegen gelbes Tomatenblattrollvirus (TYLCV)“ durch Überarbeitung der derzeitigen Methode und durch Hinzufügen einer alternativen Methode zum Erfassen der Resistenz.

Derzeitiger Wortlaut

Zu 30: Resistenz gegen gelbes Tomatenblattrollvirus (TYLCV)

1. Pathogengelbes Tomatenblattrollvirus (vergleiche Anmerkung unten)
 2. QuarantänestatusJa
 3. Wirtsarten *Solanum lycopersicum*
 4. Quelle des Inokulums-
 5. Isolat-
 8. Vermehrung des Inokulums
 - 8.6 Ernte des Inokulumssymptomatische Blätter können bei -70°C aufbewahrt werden
 9. Prüfungsanlage
 - 9.1 Anzahl der Pflanzen pro Genotyp ..20 Pflanzen
 - 9.2 Anzahl der Wiederholungen1 Wiederholung
 - 9.3 Kontrollsorten
 - Anfällig:(*Solanum lycopersicum*) Montfavet H 63.5
 - Resistent:(*Solanum lycopersicum*) TY 20, Anastasia, Mohawk
 - 9.5 PrüfungseinrichtungFeld mit natürlichem Krankheitsdruck
 - 9.9 Besondere MaßnahmenVerbreitung von weißen Fliegen verhindern
 10. Inokulation
 - 10.3 Pflanzenstadium bei Inokulation ..6-12 Wochen (ausgewachsene Pflanzen)
 - 10.4 Inokulationsmethode Vektor (weiße Fliege Bemisia, die das TYLCV trägt)
 - 10.7 Abschließende Erfassungen1-2 Monate nach Inokulation
 11. Erfassungen
 - 11.1 Methodevisuelle
 - 11.2 ErfassungsskalaSymptome: Blätter vergilben und rollen sich ein
 - 11.3 Validierung der Prüfung Die Bewertung der Sortenresistenz sollte mit den Ergebnissen resistenter und anfälliger Kontrollen kalibriert werden
 12. Auswertung der Testergebnisse im Vergleich mit Kontrollsorten
 - fehlend[1] ausgeprägte Symptome
 - vorhanden..... [9] keine oder schwach ausgeprägte Symptome
 13. Kritische Kontrollpunkte:
- TYLCV ist in vielen tropischen und subtropischen Gebieten endemisch und hat in vielen Ländern mit gemäßigttem Klima Quarantänestatus. TYLCV steht auf der EPPO-Warnliste. Einige gegen TYLCV resistente Sorten können anfällig für das eng verwandte gelbe Tomatenblattroll-Sardinienvirus (TYLCSV) sein.

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

Zu 30: Resistenz gegen gelbes Tomatenblattrollvirus (TYLCV)

i) Agroinokulationsmethode

1.	<u>Pathogen</u>	<u>Gelbes Tomatenblattrollvirus (TYLCV) IL Stamm. (vergleiche Anmerkung unten)</u>
2.	<u>Quarantänestatus</u>	<u>ja (vergleiche 13.)</u>
3.	<u>Wirtsarten</u>	<u><i>Solanum lycopersicum</i></u>
4.	<u>Quelle des Inokulums</u>	<u>Dr. Eduardo R. Bejarano, Plant Genetics Laboratory, IHSM UMA- CSIC)¹⁰</u>
5.	<u>Isolat</u>	<u>Alm:Pep:99, Stamm IL</u>
6.	<u>Feststellung der Isolatidentität</u>	
7.	<u>Feststellung der Pathogenität</u>	
8.	<u>Vermehrung des Inokulums</u>	
8.1	<u>Vermehrungsmedium</u>	<u>YEP/Kanamycin.</u>
8.2	<u>Vermehrungsorte</u>	
8.3	<u>Pflanzenphase bei Inokulation</u>	<u>3-4 Blatt</u>
8.4	<u>Inokulationsmedium</u>	<u>YEP</u>
8.5	<u>Inokulationsmethode</u>	<u>Stengelpunkturagroinfiltration. Pflanzenagroinokulation wird unter Verwendung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>, mit Plasmiden transformiert, die die infektiösen Klone enthalten, ausgeführt (Morilla, et al. 2005. <i>Phytopathology</i> 95: 1089-1097) Das transformierte <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ist ein genetisch veränderter Organismus und muß den Bestimmungen gemäß der Gesetzgebung für Umwelt, Gesundheits- und Tierschutz entsprechen.</u>
8.6	<u>Ernte des Inokulums</u>	
8.7	<u>Prüfung des geernteten Inokulums</u>	
8.8	<u>Haltbarkeit/Lebensfähigkeit des Inokulums</u>	<u><i>A. tumefaciens</i> Unterlagen werden für langfristige Lagerung in gefrorenem Zustand bei -80°C in 15-20% Glycerin aufbewahrt. Die aufzubewahrenden Kulturen werden in der Regel aus einer einzelnen Kolonie in 5 ml YEP +2,5 µl Kanamycin (100mg/ml) 48 Std. lang bei 28°C gezüchtet.</u>
9.	<u>Prüfungsanlage</u>	
9.1	<u>Anzahl der Pflanzen pro Genotyp</u>	<u>20</u>
9.2	<u>Anzahl der Wiederholungen</u>	<u>2</u>
9.3	<u>Kontrollsorten</u>	<u>Anfällig: Big Power, (<i>Solanum lycopersicum</i>) Moneymaker, Marmande Resistent: (<i>Solanum lycopersicum</i>) Delyca, Montenegro, Anastasia, TY20, Mohawk</u>
9.4	<u>Gestaltung der Prüfung</u>	
9.5	<u>Prüfungseinrichtung</u>	<u>Gewächshaus oder Klimakammer mit Zulassung von beschränkter Verwendung von genetisch veränderten Organismen, Einschränkungsgang 1 (N-1).</u>
9.6	<u>Temperatur</u>	<u>23-25°C</u>
9.7	<u>Licht</u>	<u>16 Std.</u>
9.8	<u>Jahreszeit</u>	
9.9	<u>Besondere Maßnahmen</u>	<u>Zulassung von beschränkter Verwendung von genetisch veränderten Organismen, mindestens Grad 1 (N-1)</u>

¹⁰ Quelle des Inokulums; HMS UMA (CSIC) edu_rodri@uma.es; INIA Cardaba@inia.es

10.	<u>Inokulation</u>	
10.1	<u>Vorbereitung des Inokulums</u>	<u>Ausstreichen der Oberfläche der Röhre mit dem gefrorenen A. tumefaciens Bestand und Eintauchen in 5 ml YEP+2,5 µl Kanamycin (100mg/ml) 48 Std. lang bei 28°C. Muß geschüttelt werden. Entnahme von 100 µl und Platzieren in 100 ml YEP und 50 µl Kanamycin (100mg/ml). Schütteln 48 Std. lang bei 28°C. Zentrifugieren der gesättigten Kultur 20 min lang bei 3500 U/min und Verwerfen des Überstandes.</u>
10.2	<u>Quantifikation des Inokulums</u>	<u>Auflösung in sterilem deionisiertem Wasser auf endgültigen OD₆₀₀ Wert von 1.</u>
10.3	<u>Pflanzenstadium bei Inokulation</u>	<u>3-4tes Blatt</u>
10.4	<u>Inokulationsmethode</u>	<u>Aufziehen in eine 1 ml Spritze mit einer Nadel der Stärke 27, woraufhin einige Tropfen (etwa 20 µl der Kultur) auf 10-15 Einstichverletzungen mittels der Nadel in dem Stengel der getesteten Tomatenpflanzen gegeben wurden. Während der Inokulation der Pflanzen sind diese auf Eis zu halten.</u>
10.5	<u>Erste Erfassung</u>	<u>20 Tage nach Inokulation</u>
10.6	<u>Zweite Erfassung</u>	<u>30 dpi</u>
*10.7	<u>Abschließende Erfassungen</u>	<u>45 dpi</u>
11.	<u>Erfassungen</u>	
11.1	<u>Methode</u>	<u>Visuelle</u>
11.2	<u>Erfassungsskala</u>	<u>Symptome: Blätter vergilben und rollen sich ein</u>
11.3	<u>Validierung der Prüfung</u>	<u>Die Bewertung der Sortenresistenz sollte mit den Ergebnissen resistenter und anfälliger Kontrollen kalibriert werden</u>
12.	<u>Auswertung der Testergebnisse im Vergleich mit UPOV-Ausprägungsstufen</u>	
	<u>fehlend [1]</u>	<u>ausgeprägte Symptome</u>
	<u>vorhanden [9]</u>	<u>keine Symptome</u>
13.	<u>Kritische Kontrollpunkte:</u> <u>TYLCV ist in vielen tropischen und subtropischen Gebieten endemisch und hat in vielen Ländern mit gemäßigttem Klima Quarantänestatus.</u> <u>TYLCV-IL ist der weltweit verbreitetste Pathotyp. Bei diesem Pathotyp treten Symptome nicht in Sorten mit Ty-1 und Ty-2 auf.</u> <u>TYLCV steht auf der EPPO-Warnliste. Einige gegen TYLCV resistente Sorten können anfällig für das eng verwandte gelbe Tomatenblattroll-Sardinienvirus (TYLCSV) sein.</u>	

ii) Inokulationsmethode mit weißen Fliegen

1.	<u>Pathogen</u>	<u>Gelbes Tomatenblattrollvirus (TYLCV) IL Stamm</u>
2.	<u>Quarantänestatus</u>	<u>ja (vergleiche 13.)</u>
3.	<u>Wirtsarten</u>	<u>Solanum lycopersicum</u>
4.	<u>Quelle des Inokulums</u>	<u>-Spanien¹¹</u>
5.	<u>Isolat</u>	<u>-TYLCV-IL La Mayora</u>
8.	<u>Vermehrung des Inokulums</u>	<u>Weißer Fliegen</u>
8.6	<u>Ernte des Inokulums</u>	
9.	<u>Prüfungsanlage</u>	
9.1	<u>Anzahl der Pflanzen pro Genotyp</u>	<u>20</u>
9.2	<u>Anzahl der Wiederholungen</u>	<u>Zwei Wiederholungen</u>
9.3	<u>Kontrollsorten</u>	
	<u>Resistent</u>	<u>TY 20, Anastasia, Mohawk</u>
	<u>Anfällig</u>	<u>Big Power, (Solanum lycopersicum) Montfavet H-63.5 Moneymaker, Marmande</u>

¹¹ IHSM, CSIC guillamon@eelm.csic.es oder INIA cardaba@inia.es

	Resistent	(<i>Solanum lycopersicum</i>) <u>Delyca, Montenegro, Anastasia, TY20, Mohawk</u>
9.5	Prüfungseinrichtung	Feld mit natürlichem Krankheitsdruck <u>Gewächshaus oder Kunststoffunnel</u>
9.9	Besondere Maßnahmen	Verbreitung von weißen Fliegen verhindern
10.	Inokulation	
10.3	Pflanzenphase bei Inokulation	6-12 Wochen (ausgewachsene Pflanzen) <u>2-4 Wochen</u>
10.4	Inokulationsmethode	Vektor (weiße Fliege Bemisia, die das TYLCV-IL trägt)
10.7	Abschließende Erfassungen	1-2 Monate nach Inokulation
11.	Erfassungen	
11.1	Methode	visuelle
11.2	Erfassungsskala	Symptome: Blätter vergilben und rollen sich ein
11.3	Validierung der Prüfung	Die Bewertung der Sortenresistenz sollte mit den Ergebnissen resistenter und anfälliger Kontrollen kalibriert werden
12.	Auswertung der Testergebnisse im Vergleich mit UPOV-Ausprägungsstufen	
	fehlend[1]	ausgeprägte Symptome
	vorhanden[9]	keine oder schwach ausgeprägte Symptome
13.	Kritische Kontrollpunkte: TYLCV ist in vielen tropischen und subtropischen Gebieten endemisch und hat in vielen Ländern mit gemäßigttem Klima Quarantänestatus. TYLCV steht auf der EPPO Warnliste. <u>TYLCV-IL ist der weltweit verbreitetste Pathotyp. Bei diesem Pathotyp treten Symptome nicht in Sorten mit Ty-1 und Ty-2 auf.</u> Einige gegen TYLCV resistente Sorten können anfällig für das eng verwandte gelbe Tomatenblattroll-Sardinienvirus (TYLCSV) sein.	

Vorschlag für Änderung der Erfassungsmethode für Merkmal 31 „Resistenz gegen das gefleckte Tomatenbronzefleckenvirus (TSWV)“

Derzeitiger Wortlaut

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

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

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 Tomatenbronzefleckenvirus (TSWV)	Resistencia al virus del bronceado de tomate (TSWV)		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Big Power	1
		present	présente	vorhanden	presente	Enpower	9

Vorschlag für Änderung der Erläuterung Zu 31 durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Erfassung der Resistenz*Derzeitiger Wortlaut*Zu 31: Resistenz gegen das Tomatenbronzefleckenvirus (TSWV)

1. PathogenTomatenbronzefleckenvirus (vergleiche Anmerkung unten)
2. Quarantänestatusja (vergleiche Anmerkung unten)
3. Wirtsarten*Solanum lycopersicum*
4. Quelle des InokulumsNaktuinbouw¹² (NL), GEVES¹³ (FR)
5. IsolatPathotyp 0, vorzugsweise eine für Thrips transmissiondefiziente Variante
7. Feststellung der PathogenitätBiotest
8. Vermehrung des Inokulums
- 8.6 Ernte des Inokulumssymptomatische Blätter können bei -70°C aufbewahrt werden
9. Prüfungsanlage
- 9.1 Anzahl der Pflanzen pro Genotyp .. 20 Pflanzen
- 9.2 Anzahl der Wiederholungen1 Wiederholung
- 9.3 Kontrollsorten
- Anfällig:Big Power und (*Solanum lycopersicum*) Monalbo, Momor, Montfavet H 63.5
- Resistent:Enpower und (*Solanum lycopersicum*) Tsunami, Bodar, Mospomor, Lisboa
- 9.5 PrüfungseinrichtungGewächshaus oder Klimakammer
- 9.6 Temperatur 20°C
- 9.7 Licht12 Stunden oder länger
- 9.9 Besondere MaßnahmenThrips verhindern oder bekämpfen
10. Inokulation
- 10.1 Vorbereitung des Inokulumssymptomatische Blätter in eiskalte Pufferlösung
0,01 M PBS, pH 7,4, mit 0,01 M Natriumsulfit oder vergleichbare Pufferlösung pressen
Option: Blättersaft durch doppelt gelegtes Musselintuch filtern
- 10.3 Pflanzenstadium bei Inokulation 1 oder 2 entfaltete Blätter
- 10.4 Inokulationsmethodemechanisch, Reiben mit Carborundum an den Keimblättern, Inokulumssuspension < 10°C
- 10.7 Abschließende Erfassungen7-21 Tage nach Inokulation
11. Erfassungen
- 11.1 Methodevisuelle
- 11.2 ErfassungsskalaSymptome: Top-Mosaik, Braunfärbung, diverse Missbildungen, Nekrose
- 11.3 Validierung der Prüfung Die Bewertung der Sortenresistenz sollte mit den Ergebnissen resistenter und anfälliger Kontrollen kalibriert werden
12. Auswertung der Testergebnisse im Vergleich mit Kontrollsorten
- fehlend [1] Symptome
- vorhanden [9] keine Symptome
13. Kritische Kontrollpunkte:
TSWV hat in einigen Ländern Quarantänestatus TSWV wird durch *Tabak-Thrips* und Kalifornische Blüenthrrips (*Frankliniella occidentalis*) übertragen. Pathotyp 0 ist durch seine Unfähigkeit definiert, die Resistenz bei Tomatensorten, die das Resistenzgen Sw-5 tragen, zu brechen.

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

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

Zu 31: Resistenz gegen Tomatenbronzefleckenvirus (TSWV)

i) **Biotest**

1.	Pathogen	Tomatenbronzefleckenvirus (vergleiche Anmerkung unten)
2.	Quarantänestatus	ja (vergleiche Anmerkung unten)
3.	Wirtsarten	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Quelle des Inokulums	Naktuinbouw ¹⁴ (NL), GEVES ¹⁵ (FR)
5.	Isolat	Pathotyp 0, vorzugsweise eine für Thrips transmissiondefiziente Variante
7.	Feststellung der Pathogenität	Biotest
8.	Vermehrung des Inokulums	
8.6	Ernte des Inokulums	symptomatische Blätter können bei -70°C aufbewahrt werden
9.	Prüfungsanlage	
9.1	Anzahl der Pflanzen pro Genotyp	20 Pflanzen
9.2	Anzahl der Wiederholungen	1 Wiederholung
9.3	Kontrollsorten	
	Anfällig	Big Power und (<i>Solanum lycopersicum</i>) Monalbo, Momor, Montfavet H 63.5
	Resistent	Enpower und (<i>Solanum lycopersicum</i>) Tsunami, Bodar, Mospomor, Lisboa
9.5	Prüfungseinrichtung	Gewächshaus oder Klimakammer
9.6	Temperatur	20°C
9.7	Licht	12 Stunden oder länger
9.9	Besondere Maßnahmen	Thrips verhindern oder bekämpfen
10.	Inokulation	
10.1	Vorbereitung des Inokulums	symptomatische Blätter in eiskalte Pufferlösung 0,01 M PBS, pH 7,4, mit 0,01 M Natriumsulfit oder vergleichbare Pufferlösung pressen Option: Blättersaft durch doppelt gelegtes Musselintuch filtern
10.3	Pflanzenstadium bei Inokulation	1 oder 2 entfaltete Blätter
10.4	Inokulationsmethode	mechanisch, Reiben mit Carborundum an den Keimblättern, Inokulumssuspension < 10° C
10.7	Abschließende Erfassungen	7-21 Tage nach Inokulation
11.	Erfassungen	
11.1	Methode	visuelle
11.2	Erfassungsskala	Symptome: Top-Mosaik, Braunfärbung, diverse Missbildungen, Nekrose
11.3	Validierung der Prüfung	Die Bewertung der Sortenresistenz sollte mit den Ergebnissen resistenter und anfälliger Kontrollen kalibriert werden
12.	Auswertung der Testergebnisse im Vergleich mit Kontrollsorten	
	fehlend[1]	Symptome
	vorhanden[9]	keine Symptome
13.	Kritische Kontrollpunkte	TSWV hat in einigen Ländern Quarantänestatus TSWV wird durch <i>Tabak-Thrips</i> und Kalifornische Blüenthrips (<i>Frankliniella occidentalis</i>) übertragen. Pathotyp 0 ist durch seine Unfähigkeit definiert, die Resistenz bei Tomatensorten, die das Resistenzgen Sw-5 tragen, zu brechen.

¹⁴ Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl

¹⁵ GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

ii) DNS-Marker-Test

Resistenz gegen TSWV Stamm 0 gründet oft auf dem Resistenzgen Sw-5. Das Vorhandensein von resistentem Allel und/oder anfälligem(n) Allel(en) kann durch den bei Dianese, E.C. *et al* (2010) beschriebenen in kodominanten Marker erfaßt werden. Spezifische Aspekte:

1.	<u>Pathogen</u>	<u>Tomatenbronzefleckenvirus</u>
2.	<u>Funktionelles Gen</u>	<u>Sw-5b</u>
3.	<u>Primer</u>	
3.1	<u>Anfällige Allele</u>	<u>Sw5-Vat1-F: 5'-ACAACATCAAACAATGTTAGCC-3'</u> <u>Sw5-Vat2-F: 5'-CATCAAACAATGCAGTTAGCC-3'</u>
3.2	<u>Resistente Allele</u>	<u>Sw5-Res-F: 5'-ATCAACCAATACAGCCTAACC-3'</u>
3.3	<u>Universal Reverse</u>	<u>Sw5-universal-R: 5'-TTTCTCCCTGCAAGTTCACC-3'</u>
3.4	<u>Allelspezifische Sonden</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>Prüfungsanlage</u>	
4.1	<u>Anzahl der Pflanzen pro Genotyp</u>	<u>mind. 20 Pflanzen</u>
4.2	<u>Kontrollsorten</u>	<u>Homozygotes anfälliges Allel 1 vorhanden:</u> <u><i>Solanum lycopersicum</i>) Moneymaker</u> <u>Homozygotes anfälliges Allel 2 vorhanden:</u> <u><i>Solanum lycopersicum</i>) Mountain Magic</u> <u>Homozygotes resistentes Allel vorhanden:</u> <u><i>(Solanum lycopersicum) Montealto</i></u>
6.	<u>PCR-Bedingungen</u>	<u>1. Initialer Denaturierungsschritt 10 min bei 95 °C</u> <u>2. 40 Zyklen 15 sec bei 95 °C und 1 min bei 60°C. Jeder Zyklus endet mit einem Plate Reading.</u>
8.	<u>Auswertung der Testergebnisse</u>	
	<u>fehlend[1]</u>	<u>Anfällige(s) Allel(e) vorhanden und resistentes Allel fehlend</u>
	<u>vorhanden[9]</u>	<u>resistentes Allel vorhanden (homozygot oder heterozygot)</u> <u>Wenn das DNS-Marker-Testergebnis die Erklärung im TQ nicht bestätigt, sollte ein Biotest durchgeführt werden, um zu erfassen, ob die Resistenz für die Sorte fehlend oder vorhanden ist (oder anderer Mechanismus).</u>

Vorschlag für Hinzufügen eines Literaturhinweises bezüglich der Änderungen a) – h) zu Kapitel 9 „Literatur“

Vorschlag für Hinzufügung zu 9. Literatur

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.

[Ende des Dokuments]