

Erweiterter Redaktionsausschuss

TC-EDC/Mar18/8

Genf, 26. und 27. März 2018

Original: englisch

Datum: 8. März 2018

TEILÜBERARBEITUNG DER PRÜFUNGSRICHTLINIEN FÜR TOMATE*erstellt von einem Sachverständigen aus den Niederlanden**Haftungsausschluss: dieses Dokument gibt nicht die Grundsätze oder eine Anleitung der UPOV wieder*

1. Zweck dieses Dokuments ist es, einen Vorschlag zur Teilüberarbeitung der Prüfungsrichtlinien für Tomate (Dokument TG/44/11 Rev.) vorzulegen.
2. Auf ihrer einundfünfzigsten Tagung in Roelofarendsveen, Niederlande, vom 3. bis 7. Juli 2017 prüfte die Technische Arbeitsgruppe für Gemüsearten (TWV) auf der Grundlage der Dokumente TG/44/11 Rev. und TWV/51/11 „*Partial Revision of the Test Guidelines for Tomato*“ einen Vorschlag für eine Teilüberarbeitung der Prüfungsrichtlinien für Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) und schlug folgende Überarbeitungen an den Prüfungsrichtlinien für Tomate vor (vergleiche Dokument TWV/51/16 „*Report*“, Absatz 114):
3. Folgende Änderungen werden vorgeschlagen:
 - a) Änderung der Erfassungsmethode für Merkmale 48.1 und 48.2:
 - (i) Merkmal 48.1 „Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) - Pathotyp 0 (ex 1)“
 - (ii) Merkmal 48.2 „Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) - Pathotyp 1 (ex 2)“
 - b) Änderung der Erläuterung zu Merkmal 48 durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Erfassung der Resistenz und durch geringfügige Änderungen an der derzeitigen Methode
 - c) Änderung der Erfassungsmethode für Merkmale 51.1, 51.2 und 51.3:
 - (i) Merkmal 51.1 „Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) - Pathotyp 0“
 - (ii) Merkmal 51.2 „Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) - Pathotyp 1“
 - (iii) Merkmal 51.3 „Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) - Pathotyp 2“
 - d) Änderung der Erläuterung zu Merkmal 51 durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Erfassung der Resistenz und durch geringfügige typographische Änderungen an der derzeitigen Methode
 - e) Änderung der Erfassungsmethode für Merkmal 58 „Resistenz gegen das Tomatenbronzefleckenvirus (TSWV) - Pathotyp 0“
 - f) Änderung der Erläuterung zu Merkmal 58 durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Erfassung der Resistenz
 - g) Hinzufügung eines Literaturhinweises im Hinblick auf die Änderungen (a) – (f) zu Kapitel 9 „Literatur“.
4. Die vorgeschlagenen Änderungen sind nachfolgend durch Hervorheben und Unterstreichen (Einfügungen) und ~~Durchstreichen~~ (Streichungen) angegeben.

Vorschlag zur Änderung der Erfassungsmethode für Merkmale 48.1 und 48.2:*Derzeitiger Wortlaut*

48. (+)	VG	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)		
48.1 (*)	VG	– Race 0 (ex 1)	– Pathotype 0 (ex 1)	– Pathotyp 0 (ex 1)	– Raza 0 (ex 1)		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Marmande verte	1
		present	présente	vorhanden	presente	Anabel, Marporum, Marsol	9
48.2 (*)	VG	– Race 1 (ex 2)	– Pathotype 1 (ex 2)	– Pathotyp 1 (ex 2)	– Raza 1 (ex 2)		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Marmande verte	1
		present	présente	vorhanden	presente	Motelle, Walter	9
48.3	VG	– Race 2 (ex 3)	– Pathotype 2 (ex 3)	– Pathotyp 2 (ex 3)	– Raza 2 (ex 3)		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Marmande verte, Motelle	1
		present	présente	vorhanden	presente	Alliance, Florida, Ivanhoé, Tributes	9

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

48. (+)	VG	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)		
48.1 (*)	VG/ VS	– Race 0 (ex 1)	– Pathotype 0 (ex 1)	– Pathotyp 0 (ex 1)	– Raza 0 (ex 1)		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Marmande verte	1
		present	présente	vorhanden	presente	Anabel, Marporum, Marsol	9
48.2 (*)	VG/ VS	– Race 1 (ex 2)	– Pathotype 1 (ex 2)	– Pathotyp 1 (ex 2)	– Raza 1 (ex 2)		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Marmande verte	1
		present	présente	vorhanden	presente	Motelle, Walter	9
48.3	VG	– Race 2 (ex 3)	– Pathotype 2 (ex 3)	– Pathotyp 2 (ex 3)	– Raza 2 (ex 3)		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Marmande verte, Motelle	1
		present	présente	vorhanden	presente	Alliance, Florida, Ivanhoé, Tributes	9

Vorschlag zur Änderung der Erläuterung zu Merkmal 48 durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Erfassung der Resistenz und durch geringfügige Änderungen an der derzeitigen Methode

Derzeitiger Wortlaut

Zu 48: Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

1. Pathogen	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
3. Wirtsarten	<i>Solanum lycopersicum</i>
4. Quelle des Inokulums	Naktuinbouw ¹ (NL) und GEVES ² (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) an anfälligen Tomatensorten
7. Feststellung der Pathogenität	
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 Kontrollsorten für die Prüfung mit Pathotyp 0 (ex 1)	
Anfällig	Marmande, Marmande verte, Resal
Nur für Pathotyp 0 resistent	Marporum, Larissa, „Marporum x Marmande verte“, Marsol, Anabel
Resistent für Pathotyp 0 und 1	Motelle, Gourmet, Mohawk
Kontrollsorten für die Prüfung mit Pathotyp 1 (ex 2)	
Anfällig	Marmande verte, Cherry Belle, Roma
Nur für Pathotyp 0 resistent	Marporum, Ranco
Resistent für Pathotyp 0 und 1	Tradiro, Odisea
Anmerkung:	Ranco ist etwas weniger resistent als Tradiro
Kontrollsorten für die Prüfung mit Pathotyp 2 (ex 3)	
Anfällig für Pathotyp 0, 1 und 2	Marmande verte, Motelle, Marporum
Resistent für Pathotyp 0, 1 und 2	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

¹ Naktuinbouw; resistantie@naktuinbouw.nl

² GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

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. Standards in der Nähe des Grenzbereichs R/S helfen, zwischen verschiedenen Labors zu vergleichen.
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.	

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

Zu 48: Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

Die Resistenz gegen Pathotyp 0 (ex 1) und Pathotyp 1 (ex 2) ist anhand eines Biotests (Methode i) und/oder eines DNS-Marker-Tests (Methode ii) zu prüfen. Die Resistenz gegen Pathotyp 2 (ex 3) ist anhand eines Biotests (Methode i) zu prüfen. 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	Vergleichssorten verwenden (siehe 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; angleichen 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	mindestens 20 Pflanzen
9.2	Anzahl der Wiederholungen	1 Wiederholung
9.3.1	Kontrollsorten für die Prüfung mit Pathotyp 0 (ex 1)	
	Anfällig	Marmande, Marmande verte, Resal
	Nur für Pathotyp 0 resistent	Marporum, Larissa, „Marporum x Marmande verte“, Marsol, Anabel, Motelle, Gourmet, Mohawk, Tradiro
	Resistent für Pathotyp 0 und 1	Motelle, Gourmet, Mohawk
	Anmerkung:	Ranco ist etwas weniger resistent als Tradiro
9.3.2	Kontrollsorten für die Prüfung mit Pathotyp 1 (ex 2)	
	Anfällig	Marmande verte, Cherry Belle, Roma, <u>Marporum, Ranco</u>
	Nur für Pathotyp 0 resistent	Marporum, Ranco
	Resistent für Pathotyp 0 und 1	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 0, 1 und 2	Marmande verte, Motelle, Marporum

³ Naktuinbouw: resistantie@naktuinbouw.nl

⁴ GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr

⁵ INIA: cardaba@inia.sp

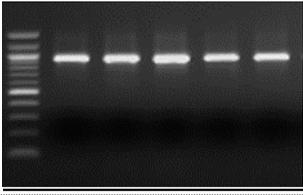
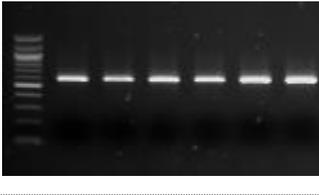
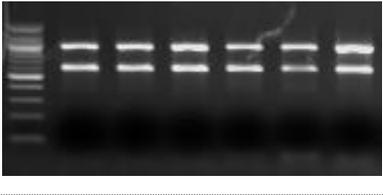
	Resistent für Pathotyp 0, 1 und 2	Tributes, Murdoch, „Marmande verte x Florida“
9.4	Gestaltung der Prüfung	>20 Pflanzen; z.B. 35 Samen für 24 Pflanzen, einschl. 2 Nullproben
9.5	Prüfungseinrichtung	Gewächshaus oder klimatisierter Raum
9.6	Temperatur	24-28°C (strenge Prüfung mit mildem Isolat) 20-24°C (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. Standards in der Nähe des Grenzbereichs R/S müssen unbedingt zwischen Laboren verglichen 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.

(ii) DNS-Marker-Test

Die Resistenz sowohl gegen Pathotyp 0 (ex 1) als auch gegen Pathotyp 1 (ex 2) basiert oft auf dem Resistenzgen I2. Das Vorhandensein des resistenten und/oder anfälligen Allels von Gen I2 ist, wie in dieser Methode beschrieben, anhand der kodominanten Marker zu erkennen.

1.	Pathogen	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
2.	Quarantänestatus	I2
3.	Primer	
3.1	Anfällige Allele	Z1063-i2-F 5'-GTT TGA CAG CTT GGT TTT GT-3' Z1063-i2-R 5'-CTC AAA CTC ACC ATC ATT GA-3'
3.2	Resistente Allele	TFusF1 5'-CTG AAA CTC TCC GTA TTT C-3' TFusRR1 5'-CGA AGA GTG ATT GGA GAT-3'
4.	Prüfungsanlage	
4.1	Anzahl der Pflanzen pro Genotyp	mindestens 20 Pflanzen
4.2	Kontrollsorten	homozygotes anfälliges Allel vorhanden: Moneymaker homozygotes resistentes Allel vorhanden: Tradiro

<u>5.</u>	<u>Vorbereitung</u>	
<u>5.1</u>	<u>Vorbereitung der DNS</u>	Von jeder Pflanze jeweils einen Teil eines jungen Blattes entnehmen. Gesamte DNS mit einem Standard-DNS-Isolationsprotokoll (CTAB/SDS-basiert) isolieren. In 100 µl T ₁₀ E _{0,1} resuspendieren. Gesamte DNS 1/10 (H ₂ O) verdünnen, um eine DNS-Konzentration zwischen 1-10 ng/µl zu erhalten.
<u>5.2</u>	<u>Vorbereitung der PCR</u>	3 µl jeder verdünnten DNS-Probe für einzelne PCR-Reaktionen verwenden. PCR-Mastermix zubereiten, 20µl Reaktionsvolumen: <ul style="list-style-type: none"> • 3 µl von 10fach verdünnter DNS • 2,5 µl von 10fachem Reaktionspuffer • 2 mM MgCl₂ • 0,1 µM jedes Resistenzprimers • 0,2 µM jedes anfälligen Primers • Je 200 µM jedes der vier dNTP • 1 Einheit von Taq DNS-Polymerase
<u>6.</u>	<u>PCR-Bedingungen</u>	1. Initialer Denaturierungsschritt bei 94°C für 3 Minuten 2. 35 Zyklen bei 94°C für 1 Minute, 56°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten 3. Finaler Extensionsschritt bei 72°C für 10 Minuten
<u>7.</u>	<u>Erfassungen</u>	
<u>7.1</u>	<u>Methode</u>	visuelle
<u>7.2</u>	<u>Erfassungsskala</u>	

		
nur Amplikon von 940bp <u>homozygotes anfälliges Allel vorhanden</u>	nur Amplikon von 600bp <u>homozygotes resistentes Allel vorhanden</u>	Amplikone von 940bp und 600bp <u>anfälliges und resistentes Allel vorhanden: heterozygot resistant</u>

<u>7.3</u>	<u>Validierung der Prüfung</u>	Kontrollsorten sollten das erwartete Band/die erwarteten Bänder ergeben.
<u>8.</u>	<u>Auswertung der Testergebnisse</u>	
	<u>48.1 Resistenz gegen Pathotyp 0 (ex 1)</u> <u>vorhanden</u>	[9] homozygot oder heterozygot resistant im DNS-Marker-Test. Falls homozygotes anfälliges Allel vorhanden, sollte ein Biotest an Pathotyp 0 (ex 1) durchgeführt werden. Bestätigt der DNS-Marker-Test die Erklärung im TQ nicht, sollte ein Biotest durchgeführt werden, um zu erfassen, ob die Resistenz für die Sorte (an einem anderen Mechanismus, z.B. Gen I2 ohne I) fehlt oder vorhanden ist.
	<u>48.2 Resistenz gegen Pathotyp 1 (ex 2)</u> <u>fehlend</u>	[1] homozygot anfällig im DNS-Marker-Test
	<u>vorhanden</u>	[9] homozygot oder heterozygot resistant im DNS-Marker-Test. Bestätigt der DNS-Marker-Test die Erklärung im TQ nicht, sollte ein Biotest durchgeführt werden, um zu erfassen, ob die Resistenz für die Sorte (an einem anderen Mechanismus, z.B. Gen I3) fehlt oder vorhanden ist.

Vorschlag zur Änderung der Erfassungsmethode für Merkmale 51.1, 51.2 und 51.3

Derzeitiger Wortlaut

51. (+)	VG	Resistance to Tomato mosaic virus (ToMV)	Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV)	Resistenz gegen das Tomatenmosaik-virus (ToMV)	Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV)		
51.1	VG	– Strain 0	– Souche 0	– Pathotyp 0	– Cepa 0		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Monalbo	1
		present	présente	vorhanden	presente	Mobaci, Mocimor, Moperou	9
51.2	VG	– Strain 1	– Souche 1	– Pathotyp 1	– Cepa 1		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Monalbo	1
		present	présente	vorhanden	presente	Mocimor, Moperou	9
51.3	VG	– Strain 2	– Souche 2	– Pathotyp 2	– Cepa 2		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Monalbo	1
		present	présente	vorhanden	presente	Mobaci, Mocimor	9

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

51. (+)	VG VS	Resistance to Tomato mosaic virus (ToMV)	Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV)	Resistenz gegen das Tomatenmosaik-virus (ToMV)	Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV)		
51.1	VG/ VS	– Strain 0	– Souche 0	– Pathotyp 0	– Cepa 0		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Monalbo	1
		present	présente	vorhanden	presente	Mobaci, Mocimor, Moperou	9
51.2	VG/ VS	– Strain 1	– Souche 1	– Pathotyp 1	– Cepa 1		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Monalbo	1
		present	présente	vorhanden	presente	Mocimor, Moperou	9
51.3	VG/ VS	– Strain 2	– Souche 2	– Pathotyp 2	– Cepa 2		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Monalbo	1
		present	présente	vorhanden	presente	Mobaci, Mocimor	9

Vorschlag zur Änderung der Erläuterung zu Merkmal 51 durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Erfassung der Resistenz und durch geringfügige typographische Änderungen an der derzeitigen Methode

Derzeitiger Wortlaut

Zu 51: Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV)

1. Pathogen.....Tomatenmosaikvirus
 3. Wirtsarten.....*Solanum lycopersicum*
 4. Quelle des Inokulums.....Naktuinbouw⁶ (NL) oder GEVES⁷ (FR)
 5. Isolat.....Stamm 0 (z. B. Isolat INRA Avignon 6-5-1-1) 1 und 2
 6. Feststellung der Isolatidentität.....genetisch definierte Tomatenstandardsorten
Mobaci (Tm1) , Moperou (Tm2), Momor (Tm2²)
 7. Feststellung der Pathogenität.....bei anfälligen Pflanzen
 8. Vermehrung des Inokulums
 - 8.1 Vermehrungsmedium.....lebende Pflanze
 - 8.2 Vermehrungssorte.....z. B. Moneymaker, Marmande
 - 8.7 Prüfung des geernteten Inokulums.....Option: 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 Genotypmind. 20 Pflanzen
 - 9.2 Anzahl der Wiederholungen1 Wiederholung
 - 9.3 Kontrollsorten
 - AnfälligMarmande, Monalbo
 - Resistent gegen ToMV: 0 und 2.....Mobaci
 - Resistent gegen ToMV: 0 und 1Moperou
 - Resistent mit Nekrose„Monalbo x Momor“
 - ResistentGourmet
 - 9.4 Gestaltung der PrüfungBehandlung der Nullproben mit PBS und Carborundum oder
vergleichbarer Pufferlösung
 - 9.5 PrüfungseinrichtungGewächshaus 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
 - 10.3 Pflanzenstadium bei Inokulation.....Keimblätter oder 2 Blätter
 - 10.4 Inokulationsmethodevorsichtiges Einreiben
 - 10.7 Abschließende Erfassungen11-21 Tage nach Inokulation
 11. Erfassungen
 - 11.1 Methodevisuelle
 - 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.
 12. Auswertung der Testergebnisse im Vergleich mit Kontrollsorten:
 - fehlend[1] Symptome für Anfälligkeit
 - vorhanden.....[9] keine Symptome oder Symptome von
Überempfindlichkeitsresistenz
 13. Kritische Kontrollpunkte:
- 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: Empfohlen wird der Stamm INRA Avignon 6-5-1-1 für ToMV: 0. Dieser Stamm verursacht ein auffallend gelbes Aucuba-Mosaik.

⁶ Naktuinbouw; resistantie@naktuinbouw.nl

⁷ GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

Zu 51: Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV)

Die Resistenz gegen Stamm 0, 1 und 2 ist anhand eines Biotests (Methode i) und/oder eines DNS-Marker-Tests (Methode ii) zu prüfen. Im Falle eines Biotests ist die Beobachtungsmethode VG. Im Falle eines DNS-Marker-Tests ist die Beobachtungsmethode VS.

(i) Biotest

1.	Pathogen	Tomatenmosaikvirus
3.	Wirtsarten	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Quelle des Inokulums	Naktuinbouw ⁸ (NL), GEVES ⁹ (FR) oder INIA ¹⁰ (ES, Stamm 0)
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	Vermehrungsorte	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	mindestens 20 Pflanzen
9.2	Anzahl der Wiederholungen	1 Wiederholung
9.3	Kontrollsorten	
	Anfällig	Marmande, Monalbo
	Resistent gegen ToMV: 0 und 2	Mobaci
	Resistent gegen ToMV: 0 und 1	Moperou
	Resistent mit Nekrose	„Monalbo x Momor“
	Resistent	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 zur 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 der Inokulation
11.	Erfassungen	

⁸ Naktuinbouw: resistantie@naktuinbouw.nl

⁹ GEVES: Valerie.GRIMAULT@geves.fr

¹⁰ INIA: cardaba@inia.sp

11.1	Methode	visuelle
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.	Kritische Kontrollpunkte	Temperatur und Licht können 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: Empfohlen wird der Stamm INRA Avignon 6-5-1-1 für ToMV: 0. Dieser Stamm verursacht ein auffallend gelbes Aucuba-Mosaik.

(ii) DNS-Marker-Test

Die Resistenz gegen ToMV basiert oftmals auf dem Resistenzgen Tm2 (Allel Tm2 oder Tm2²). Das Vorhandensein der resistenten Allele Tm2 und Tm2² und/oder des anfälligen Allels tm2 ist, wie in Arens, P. *et al* (2010) beschrieben, anhand der kodominanten Marker zu erkennen. Spezifische Aspekte:

1.	Pathogen	Tomatenmosaikvirus
2.	Funktionales Gen	Tm2/2 ²
3.	Primer	
3.1	Test 1 zur Prüfung der Resistenz Allele Tm2 oder Tm2 ²	Äußerer Primer TMV-2286F: 5'GGGTATACTGGGAGTGTCCAATTC3' Äußerer Primer TMV-2658R: 5'CCGTGCACGTTACTTCAGACAA3' Tm2 ² SNP2494F: 5'CTCATCAAGCTTACTCTAGCCTACTTTAGT3' Tm2 SNP2493R: 5'CTGCCAGTATATAACGGTCTACCG3'
3.2	Test 2 zur Prüfung anfälliger oder resistenter Allele	Äußerer Primer TM2-748F: 5'CGGTCTGGGGAAAACAACCTCT3' Äußerer Primer TM2-1256R: 5'CTAGCGGTATACCTCCACATCTCC3' TM2-SNP901misR: 5'GCAGGTTGTCCTCAAATTTCCATC3' TM2-SNP901misF: 5'CAAATTGGACTGACGGAACAGAAAGTT3'
4.	Prüfungsanlage	
4.1	Anzahl der Pflanzen pro Genotyp	mindestens 20 Pflanzen

<u>4.2</u>	<u>Kontrollsorten</u>	<u>homozygotes anfälliges Allel tm2 vorhanden: Moneymaker</u> <u>resistentes Allel Tm2 vorhanden: Moperou</u> <u>resistantes Allel Tm2² vorhanden: Momor, Persica, Campeon</u>
<u>6.</u>	<u>PCR-Bedingungen</u>	<u>1. Initialer Denaturierungsschritt bei 94°C für 3 Minuten</u> <u>2. 35 Zyklen bei 94°C für 1 Minute, 55°C für 1 Minute, 72°C für 2 Minuten</u> <u>3. Finaler Extensionsschritt bei 72°C für 10 Minuten</u>
<u>8.</u>	<u>Auswertung der Testergebnisse</u>	<u>Das Vorhandensein der Allele tm2, Tm2, Tm2² führt zu einer unterschiedlichen Auslegung für die Merkmale 51.1, 51.2 und 51.3, siehe Tabelle. Bestätigt der DNS-Marker-Test die Erklärung im TQ nicht, sollte ein Biotest durchgeführt werden, um zu erfassen, ob die Resistenz für die Sorte (an einem anderen Mechanismus, z.B. Gen Tm1) fehlt oder vorhanden ist.</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>
		<u>(kommt gelegentlich vor)</u>	
<u>51.1 Stamm 0</u>	<u>[1] fehlend</u>	<u>[9] resistent</u>	<u>[9] resistent</u>
<u>51.2 Stamm 1</u>	<u>[1] fehlend</u>	<u>[9] resistent</u>	<u>[9] resistent</u>
<u>51.3 Stamm 2</u>	<u>[1] fehlend</u>	<u>[1] fehlend</u>	<u>[9] resistent</u>

Vorschlag zur Änderung der Erfassungsmethode für Merkmal 58 „Resistenz gegen das Tomatenbronzefleckenvirus (TSWV) - Pathotyp 0“

Derzeitiger Wortlaut

58. (+)	VG	Resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV)	Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV)	Resistenz gegen das Tomatenbronzefleckenvirus (TSWV)	Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)		
		- Race 0	- Pathotype 0	- Pathotyp 0	- Raza 1		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Montfavit H 63.5	1
		present	présente	vorhanden	presente	Lisboa	9

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

58. (+)	VG/ VS	Resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV)	Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV)	Resistenz gegen das Tomatenbronzefleckenvirus (TSWV)	Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)		
		- Race 0	- Pathotype 0	- Pathotyp 0	- Raza 1 0		
QL		absent	absente	fehlend	ausente	Montfavit H 63.5	1
		present	présente	vorhanden	presente	Lisboa	9

Vorschlag zur Änderung der Erläuterung zu 58 durch Hinzufügen einer alternativen Methode zur Erfassung der Resistenz*Derzeitiger Wortlaut*Zu 58: Resistenz gegen das gefleckte Tomatenbronzenfleckenvirus (TSWV)

1. Pathogen	geflecktes Tomatenbronzenfleckenvirus
2. Quarantänestatus	ja (vergleiche Anmerkung unten)
3. Wirtsarten	<i>Solanum lycopersicum</i>
4. Quelle des Inokulums	Naktuinbouw ¹¹ (NL), GEVES ¹² (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	Monalbo, Momor, Montfavet H 63.5
Resistent	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 Blüenthrrips (<i>Frankliniella occidentalis</i>) übertragen. Pathotyp 0 ist durch seine Unfähigkeit definiert, die Resistenz bei Tomatensorten, die das Resistenzgen Sw-5 tragen, zu brechen.	

¹¹ Naktuinbouw; resistentie@naktuinbouw.nl¹² GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

Vorgeschlagener neuer Wortlaut

Zu 58: Resistenz gegen das Tomatenbronzefleckenvirus (TSWV)

Die Resistenz gegen Stamm 0 ist anhand eines Biotests (Methode i) und/oder eines DNS-Marker-Tests (Methode ii) zu prüfen. Im Falle eines Biotests ist die Beobachtungsmethode VG. Im Falle eines DNS-Marker-Tests ist die Beobachtungsmethode VS.

(I) Biotest

1.	Pathogen	Tomatenbronzefleckenvirus
2.	Quarantänestatus	ja (siehe Anmerkung unten)
3.	Wirtsarten	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Quelle des Inokulums	Naktuinbouw ¹³ (NL), GEVES ¹⁴ (FR)
5.	Isolat	Pathotyp 0, vorzugsweise eine für Thrips transmissionsdefiziente 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	Monalbo, Momor, Montfavet H 63.5
	resistent	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 Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl

¹⁴ GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

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.
-----	--------------------------	--

(ii) DNS-Marker-Test

Die Resistenz gegen TSWV Stamm 0 basiert oftmals auf dem Resistenzgen Sw-5. Das Vorhandensein des resistenten Allels und/oder eines anfälligen Allels/anfälliger Allele ist, wie in Dianese, E.C. *et al* (2010) beschrieben, anhand der kodominanten Marker zu erkennen. Spezifische Aspekte:

1.	Pathogen	Tomatenbronzefleckenvirus
2.	Funktionales Gen	Sw-5b
3.	Primer	
3.1	Anfällige Allele	Sw5-Vat1-F: 5'-ACAACATCAAACAATGTTAGCC-3' Sw5-Vat2-F: 5'-CATCAAACAATGCAGTTAGCC-3'
3.2	Resistente Allele	Sw5-Res-F: 5'-ATCAACCAATACAGCCTAACC-3'
3.3	Universal Reverse	Sw5-universal-R: 5'-TTTCTCCCTGCAAGTTCACC-3'
3.4	Allelspezifische Sonden	Sw5-Sus1: 5'-VIC-TACATTATGAAGGGTTAACAAG-MGB-NFQ-3' Sw5-Sus2: 5'-6FAM-ACAACAGAGGGTTAACAAGTTTAGG-BHQ1-3' Sw5-Res: 5'-TEXAS RED-TGGGCGAAAATCCCAACAAG-BHQ2-3'
4.	Prüfungsanlage	
4.1	Anzahl der Pflanzen pro Genotyp	mindestens 20 Pflanzen
4.2	Kontrollsorten	homozygotes anfälliges Allel 1 vorhanden: Moneymaker homozygotes anfälliges Allel 2 vorhanden: Mountain Magic homozygotes resistentes Allel vorhanden: Montealto
6.	PCR-Bedingungen	1. Initialer Denaturierungsschritt 10 min bei 95 °C 2. 40 Zyklen 15 sec bei 95 °C und 1 min bei 60°C. Jeder Zyklus endet mit einem Plate Reading.
8.	Auswertung der Testergebnisse	
	fehlend	[1] anfällige(s) Allel(e) vorhanden und resistentes Allel fehlt
	vorhanden	[9] resistentes Allel vorhanden (homozygot oder heterozygot) Bestätigt der DNS-Marker-Test die Erklärung im TQ nicht, sollte ein Biotest durchgeführt werden, um zu erfassen, ob die Resistenz für die Sorte (an einem anderen Mechanismus) fehlt oder vorhanden ist.

Vorschlag, einen Literaturhinweis im Hinblick auf die Änderungen (a) – (f) zu Kapitel 9 „Literatur“ hinzuzufügen

Vorgeschlagene 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), SS. 133-142.

[Ende des Dokuments]