|  |  |
| --- | --- |
|  | F |
| Union internationale pour la protection des obtentions végétales |  |

|  |  |
| --- | --- |
| Comité de rédaction élargi  Genève, 26 et 27 mars 2018 | TC-EDC/Mar18/8  Original: anglais  Date: 8 mars 2018 |

Révision partielle des principes directeurs d’examen de la tomate

Document établi par un expert des Pays-Bas

Avertissement : le présent document ne représente pas les principes ou les orientations de l’UPOV

Le présent document a pour objet de présenter une proposition de révision partielle des principes directeurs d’examen de la tomate (document TG/44/11 Rev.).

À sa cinquante et unième session tenue à Roelofarendsveen (Pays-Bas) du 3 au 7 juillet 2017, le groupe de travail technique sur les plantes potagères (TWV) a examiné une proposition de révision partielle des principes directeurs d’examen de la tomate (*Solanum lycopersicum* L*.*) sur la base des documents TG/44/11 Rev. et TWV/51/11 “Partial Revision of the Test Guidelines for Tomato” et a proposé de réviser comme suit les principes directeurs d’examen de la tomate (voir le paragraphe 114 du document TWV/51/16 “Report”) :

Les modifications suivantes sont proposées :

1. Modifier la méthode d’observation des caractères 48.1 et 48.2 :
   1. Caractère 48.1 “Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) – Pathotype 0 (ex 1)”
   2. Caractère 48.2 “Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) – Pathotype 1 (ex 2)”
2. Modifier l’explication Ad. 48 : ajouter une autre méthode d’observation de la résistance et apporter des modifications mineures à la méthode actuelle
3. Modifier la méthode d’observation des caractères 51.1, 51.2 et 51.3 :
   1. Caractère 51.1 “Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) – Souche 0”
   2. Caractère 51.2 “Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) – Souche 1”
   3. Caractère 51.3 “Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) – Souche 2”
4. Modifier l’explication Ad. 51 : ajouter une autre méthode d’observation de la résistance et apporter des modifications typographiques mineures à la méthode actuelle
5. Modifier la méthode d’observation du caractère 58 “Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV) – Pathotype 0”
6. Modifier l’explication Ad. 58 : ajouter une autre méthode d’observation de la résistance
7. Ajouter une référence dans la bibliographie concernant les modifications (a) – (f) au chapitre 9 “Bibliographie”.

Les modifications proposées sont indiquées ci-dessous en surbrillance et soulignées pour les insertions, en surbrillance et ~~biffées~~ pour les suppressions.

## Proposition de modification de la méthode d’observation des caractères 48.1 et 48.2

*Libellé actuel :*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 48.   (+) | VG | Resistance to  *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) | Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) | Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) | Resistencia a  *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (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 |

*Nouveau libellé proposé*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 48.   (+) | VG | Resistance to  *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) | Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) | Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) | Resistencia a  *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (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 |

## Proposition de modification de l’explication Ad. 48 : ajouter une autre méthode d’observation de la résistance et apporter des modifications mineures à la méthode actuelle

*Libellé actuel*

Ad. 48 : Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

|  |  |
| --- | --- |
| 1. Agent pathogène | *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* |
| 3. Espèces hôtes | *Solanum lycopersicum* |
| 4. Source de l’inoculum | Naktuinbouw[[1]](#footnote-2) (NL) et GEVES[[2]](#footnote-3) (FR) |
| 5. Isolat | pathotype 0 (ex 1)  (p.ex. souches Orange 71 ou PRI 20698 ou Fol 071 1 (ex 2) (p.ex. souches 4152 ou PR I40698 ou RAF 70 et 2 (ex 3)  le pouvoir pathogène des souches peut varier de l’une à l’autre |
| 6. Identification de l’isolat | utiliser des variétés témoins (voir 9.3) |
| 7. Détermination du pouvoir pathogène | sur des variétés de tomate sensibles |
| 8. Multiplication de l’inoculum |  |
| 8.1 Milieu de multiplication | gélose dextrosée à la pomme de terre,  milieu “S” de Messiaen |
| 8.4 Milieu d’inoculation | eau pour racler les plaques de gélose ou culture Czapek-Dox (culture aérée vieille de 7 jours) |
| 8.6 Récolte de l’inoculum | filtrer au travers d’une double mousseline |
| 8.7 Vérification de l’inoculum récolté | compter les spores, ajuster à 106 par ml |
| 8.8 Durée de conservation/viabilité de l’inoculum | 4 à 8 heures, conserver frais pour empêcher la germination des spores |
| 9. Format de l’essai |  |
| 9.1 Nombre de plantes par génotype | au moins 20 plantes |
| 9.2 Nombre de répétitions | 1 répétition |
| 9.3 Variétés témoins pour l’essai avec pathotype 0 (ex 1)  Sensibles  Résistantes au pathotype 0 seulement  Résistantes au pathotype 0 et 1  Variétés témoins pour l’essai avec le pathotype 1 (ex 2)  Sensibles  Résistantes au pathotype 0 uniquement  Résistantes aux pathotypes 0 et 1  Remarque  Variétés témoins pour l’essai avec le pathotype 2 (ex 3)  Sensibles aux pathotypes 0, 1 et 2  Résistantes aux pathotypes 0, 1 et 2 | Marmande, Marmande verte, Resal  Marporum, Larissa, “Marporum x Marmande verte”, Marsol, Anabel  Motelle, Gourmet, Mohawk  Marmande verte, Cherry Belle, Roma  Marporum, Ranco  Tradiro, Odisea  Ranco est un peu moins résistante que Tradiro  Marmande verte, Motelle, Marporum  Tributes, Murdoch, Marmande verte x Florida |
| 9.4 Protocole d’essai | plus de 20 plantes, p.ex. 35 graines pour 24 plantes, y compris 2 plantes témoins |
| 9.5 Installation d’essai | serre ou chambre climatisée |
| 9.6 Température | 24-28°C (essai agressif, avec isolat peu agressif)  20-24°C (essai peu agressif, avec isolat agressif) |
| 9.7 Lumière | 12 heures par jour ou plus |
| 9.8 Saison | toutes saisons |
| 9.9 Mesures spéciales | un sol tourbeux légèrement acide est optimal;  conserver le sol humide mais éviter le stress hydrique |
| 10. Inoculation |  |
| 10.1 Préparation de l’inoculum | culture aérée de Messiaen ou PDA ou milieu S de Messiaen ou culture Czapek Box |
| 10.2 Quantification de l’inoculum | compter les spores, ajuster à 106 spores par ml, concentration plus basse pour un isolat très agressif |
| 10.3 Stade de la plante lors de l’inoculation | 10 à 18 jours, cotylédon jusqu’à la première feuille |
| 10.4 Méthode de l’inoculation | les racines et les hypocotyles sont immergés dans une suspension de spores pendant 5 à 15 minutes; la réduction des racines est une option |
| 10.7 Observations finales | 14 à 21 jours après l’inoculation |
| 11. Observations |  |
| 11.1 Méthode | visuelle |
| 11.2 Échelle d’observation | symptômes :  retard de croissance, flétrissement, jaunissement, brunissement des vaisseaux s’étendant au-dessus du cotylédon |
| 11.3 Validation de l’essai | l’évaluation de la résistance des variétés doit être calibrée avec les résultats des contrôles de résistance et de sensibilité. Des variétés témoins proches du cas limite R/S sont essentielles pour faire une comparaison entre laboratoires. |
| 12. Interprétation des résultats du test en comparaison avec les variétés témoins : | |
| absente | [1] symptômes sévères |
| présente | [9] symptômes légers ou aucun symptôme |
| 13. Points critiques de contrôle :  Les résultats de l’essai peuvent légèrement varier dans la pression de l’inoculum en raison des différences qui caractérisent l’isolat, la concentration des spores, l’humidité du sol et la température. | |

*Nouveau libellé proposé*

Ad. 48 : Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

La résistance aux pathotypes 0 (ex 1) et 1 (ex 2) doit être vérifiée dans le cadre d’un essai biologique (méthode i) ou d’un test avec marqueurs d’ADN (méthode ii). La résistance au pathotype 2 (ex 3) doit être vérifiée dans le cadre d’un essai biologique (méthode i). Dans le cas d’un essai biologique, l’observation est de type VG. Dans le cas d’un test avec marqueurs d’ADN, l’observation est de type VS.

1. Essai biologique

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agent pathogène | *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* |
| 3. | Espèces hôtes | *Solanum lycopersicum* |
| 4. | Source de l’inoculum | Naktuinbouw[[3]](#footnote-4) (NL), ~~et~~ GEVES[[4]](#footnote-5) (FR) ou INIA[[5]](#footnote-6) (ES) |
| 5. | Isolat | pathotype 0 (ex 1) (p.ex. souches Orange 71 ou PRI 20698 ou Fol 071), pathotype 1 (ex 2) (p.ex. souches 4152 ou PR I40698 ou RAF 70) et pathotype ~~et~~ 2 (ex 3)  le pouvoir pathogène des souches peut varier de l’une à l’autre |
| 6. | Identification de l’isolat | utiliser des variétés témoins (voir 9.3) |
| 7. | Détermination du pouvoir pathogène | sur des variétés de tomate sensibles |
| 8. | Multiplication de l’inoculum |  |
| 8.1 | Milieu de multiplication | gélose dextrosée à la pomme de terre,  milieu “S” de Messiaen |
| 8.4 | Milieu d’inoculation | eau pour racler les plaques de gélose ou culture Czapek-Dox (culture aérée vieille de 7 jours) |
| 8.6 | Récolte de l’inoculum | filtrer au travers d’une double mousseline |
| 8.7 | Vérification de l’inoculum récolté | compter les spores, ajuster à 106 par ml |
| 8.8 | Durée de conservation/viabilité de l’inoculum | 4 à 8 heures, conserver frais pour empêcher la germination des spores |
| 9. | Format de l’essai |  |
| 9.1 | Nombre de plantes par génotype | au moins 20 plantes |
| 9.2 | Nombre de répétitions | 1 répétition |
| 9.3.1 | Variétés témoins pour l’essai avec le pathotype 0 (ex 1) |  |
|  | Sensibles | Marmande, Marmande verte, Resal |
|  | Résistantes ~~au pathotype 0 seulement~~ | Marporum, Larissa, “Marporum x Marmande verte”, ~~Marsol, Anabel,~~ Motelle, Gourmet, Mohawk, Tradiro |
|  | ~~Résistantes au pathotype 0 et 1~~ | ~~Motelle, Gourmet, Mohawk~~ |
|  | ~~Remarque :~~ | ~~Ranco est un peu moins résistante que Tradiro~~ |
| 9.3.2 | Variétés témoins pour l’essai avec le pathotype 2 (ex 3) |  |
|  | Sensibles ~~aux pathotypes 0, 1 et 2~~ | Marmande verte, Cherry Belle, Roma, Marporum, Ranco |
|  | ~~Résistantes au pathotype 0 seulement~~ | ~~Marporum, Ranco~~ |
|  | Résistantes ~~aux pathotypes 0 et 1~~ | Tradiro, Odisea, “Motelle x Marmande verte” |
|  | ~~Remarque~~ | ~~Ranco est un peu moins résistante que Tradiro~~ |
| 9.3.3 | Variétés témoins pour l’essai avec le pathotype 2 (ex 3) |  |
|  | Sensibles ~~aux pathotypes 0, 1 et 2~~ | Marmande verte, Motelle, Marporum |
|  | Résistantes ~~aux pathotypes 0, 1 et 2~~ | Tributes, Murdoch, “Marmande verte x Florida” |
| 9.4 | Protocole d’essai | plus de 20 plantes, p.ex. 35 graines pour 24 plantes, y compris 2 plantes témoins |
| 9.5 | Installation d’essai | serre ou chambre climatisée |
| 9.6 | Température | 24-28°C (essai agressif, avec isolat peu agressif)  20-24°C (essai peu agressif, avec isolat agressif) |
| 9.7 | Lumière | 12 heures par jour ou plus |
| 9.8 | Saison | toutes saisons |
| 9.9 | Mesures spéciales | un sol tourbeux légèrement acide est optimal;  conserver le sol humide mais éviter le stress hydrique |
| 10. | Inoculation |  |
| 10.1 | Préparation de l’inoculum | culture aérée de Messiaen ou PDA ou milieu S de Messiaen ou culture ~~Czapek Box~~ Czapeck-Dox ou racler les plaques |
| 10.2 | Quantification de l’inoculum | compter les spores, ajuster à 106 spores par ml, concentration plus basse pour un isolat très agressif |
| 10.3 | Stade de la plante lors de l’inoculation | 10 à 18 jours, cotylédon jusqu’à la première feuille |
| 10.4 | Méthode de l’inoculation | les racines et les hypocotyles sont immergés dans une suspension de spores pendant 5 à 15 minutes; la réduction des racines est une option |
| 10.7 | Observations finales | 14 à 21 jours après l’inoculation |
| 11. | Observations |  |
| 11.1 | Méthode | visuelle |
| 11.2 | Échelle d’observation | symptômes :  retard de croissance, flétrissement, jaunissement, brunissement des vaisseaux s’étendant au-dessus du cotylédon |
| 11.3 | Validation de l’essai | l’évaluation de la résistance des variétés doit être calibrée avec les résultats des contrôles de résistance et de sensibilité. Des variétés témoins proches du cas limite R/S sont essentielles pour faire une comparaison entre laboratoires. |
| 12. | Interprétation des résultats du test en comparaison avec les variétés témoins : |  |
|  | absente | [1] symptômes sévères |
|  | présente | [9] symptômes légers ou aucun symptôme |
| 13. | Points critiques de contrôle | Les résultats de l’essai peuvent légèrement varier dans la pression de l’inoculum en raison des différences qui caractérisent l’isolat, la concentration des spores, l’humidité du sol et la température. |

ii) Test avec marqueurs d’ADN

La résistance aux deux pathotypes 0 (ex 1) et 1 (ex 2) est souvent fondée sur le gène de résistance I2. La présence d’allèle résistant ou sensible du gène I2 peut être détectée par le marqueur co-dominant décrit dans cette méthode.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agent pathogène | *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* |
| 2. | État de quarantaine | I2 |
| 3. | Amorces de réaction en chaîne par polymérase (primers) |  |
| 3.1 | Allèle sensible | 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 | Allèle résistant | TFusF1 5’-CTG AAA CTC TCC GTA TTT C-3’  TFusRR1 5’-CGA AGA GTG ATT GGA GAT-3’ |
| 4. | Format de l’essai |  |
| 4.1 | Nombre de plantes par génotype | au moins 20 plantes |
| 4.2 | Variétés témoins | allèle homozygote sensible présent : Moneymaker  allèle homozygote résistant présent : Tradiro |
| 5. | Préparation |  |
| 5.1 | Préparation de l’ADN | récolter sur chaque plante une partie d’une jeune feuille. Isoler tout l’ADN à l’aide d’un protocole standard d’isolement de l’ADN (fondé sur CTAB/SDS). Replacer en suspension dans 100 µl T10E0, 1. Diluer tout l’ADN à 1/10 (H2O) pour obtenir une concentration d’ADN entre 1 et 10 ng/µl. |
| 5.2 | Préparation de la réaction en chaîne par polymérase | utiliser 3 µl de chaque échantillon d’ADN dilué en réactions individuelles en chaîne par polymérase.  Préparer le mélange principal de réaction en chaîne par polymérase, volume de réaction 20 µl :   * 3 µl d’ADN dilué 10x * 2,5 µl de solution tampon de réaction 10x * 2 mM MgCl2 * 0,1 µM d’amorce de réaction en chaîne par polymérase (primers) résistante chacun * 0,2 µM d’amorce de réaction en chaîne par polymérase (primers) sensible chacun * 200 µM de chacun des quatre dNTP * 1 unité de Taq ADN polymérase |
| 6. | Conditions de la réaction en chaîne par polymérase | 1. étape de dénaturation initiale à 94 °C pendant 3 minutes  2. 35 cycles à 94 °C pendant 1 minute, 56 °C pendant 1 minute et 72 °C pendant 2 minutes  3. étape d’extension finale à 72 °C pendant 10 minutes |
| 7. | Observations |  |
| 7.1 | Méthode | visuelle |
| 7.2 | Échelle d’observation |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| amplicon de 940bp uniquement | amplicon de 600bp uniquement | amplicons de 940bp et 600bp |
| allèle homozygote sensible présent | allèle homozygote résistant présent | allèles sensibles et résistants présents : hétérozygotes résistants |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 7.3 | Validation de l’essai | Les variétés témoins doivent donner les bandes attendues. |
| 8. | Interprétation des résultats de l’essai |  |
|  | 48.1 Résistance au pathotype 0 (ex 1) |  |
|  | présente | [9] homozygote ou hétérozygote résistant lors du test avec marqueurs d’ADN.  En cas d’allèle homozygote sensible présent, un essai biologique sur le pathotype 0 (ex 1) doit être effectué.  Si les résultats du test avec marqueurs d’ADN ne confirment pas la déclaration dans le questionnaire technique, un essai biologique doit être effectué pour observer si la résistance est absente ou présente pour la variété (sur un autre mécanisme, par exemple le gène I2 sans I). |
|  | 48.2 Résistance au pathotype 1 (ex 2) |  |
|  | absente | [1] homozygote sensible lors du test avec marqueurs d’ADN |
|  | présente | [9] homozygote ou hétérozygote résistant lors du test avec marqueurs d’ADN.  Si les résultats du test avec marqueurs d’ADN ne confirment pas la déclaration dans le questionnaire technique, un essai biologique doit être effectué pour observer si la résistance est absente ou présente pour la variété (sur un autre mécanisme, par exemple le gène I3). |

## Proposition de modification de la méthode d’observation des caractères 51.1, 51.2 et 51.3

*Libellé actuel*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 |

*Nouveau libellé proposé*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 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/ 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 |

## Proposition de modification de l’explication Ad. 51 : ajouter une autre méthode d’observation de la résistance et apporter des modifications typographiques mineures à la méthode actuelle

*Libellé actuel*

Ad. 51: Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. Agent pathogène | virus de la mosaïque de la tomate | |
| 3. Espèces hôtes | *Solanum lycopersicum* | |
| 4. Source de l’inoculum | Naktuinbouw[[6]](#footnote-7) (NL) ou GEVES[[7]](#footnote-8) (FR) | |
| 5. Isolat | souches 0 (p.ex. isolat INRA Avignon 6-5-1-1), 1 et 2 | |
| 6. Identification de l’isolat | variétés de tomate génétiquement définies ainsi :  Mobaci (Tm1), Moperou (Tm2), Momor (Tm22) | |
| 7. Détermination du pouvoir pathogène | sur une plante sensible | |
| 8. Multiplication de l’inoculu |  | |
| 8.1 Milieu de multiplication | plante vivante | |
| 8.2 Variété multipliée | p.ex. Moneymaker, Marmande | |
| 8.7 Vérification de l’inoculum récolté | option : sur *Nicotiana tabacum* “Xanthi”, vérifier les lésions après 2 jours | |
| 8.8 Durée de conservation/viabilité de l’inoculum | frais > 1 jour, séché > 1 an | |
| 9. Format de l’essai |  | |
| 9.1 Nombre de plantes par génotype | au moins 20 plantes | |
| 9.2 Nombre de répétitions | 1 répétition | |
| 9.3 Variétés témoins  Sensibles  Résistantes au ToMV: 0 et 2  Résistantes au ToMV: 0 et 1  Résistantes avec nécrose  Résistantes | Marmande, Monalbo  Mobaci  Moperou  “Monalbo x Momor”  Gourmet | |
| 9.4 Protocole d’essai | traitement blanc avec PBS et carborundum ou PBS similaire | |
| 9.5 Installation d’essai | serre ou chambre climatisée | |
| 9.6 Température | 24 à 26°C | |
| 9.7 Lumière | 12 heures ou plus | |
| 9.8 Saison | les symptômes sont plus prononcés en été. | |
| 10. Inoculation |  | |
| 10.1 Préparation de l’inoculum | 1 g de feuille avec symptômes avec 10 ml PBS  Homogénéiser, ajouter du carborundum au PBS (1 g/30ml) | |
| 10.3 Stade de la plante lors de l’inoculation | “cotylédons étalés” ou “deux feuilles développées” | |
| 10.4 Méthode de l’inoculation | frotter légèrement | |
| 10.7 Observations finales | 11 à 21 jours après l’inoculation | |
| 11. Observations |  | |
| 11.1 Méthode | visuelle | |
| 11.2 Échelle d’observation | symptômes de sensibilité :  mosaïque au sommet, malformation des feuilles  symptômes de résistance (fondés sur l’hypersensibilité) :  nécrose locale, nécrose apicale, nécrose systémique | |
| 11.3 Validation de l’essai | l’évaluation de la variété résistante doit être calibrée avec les résultats des témoins sensibles et résistants | |
| Remarque : pour certaines variétés hétérozygotes, un nombre variable de plantes peut souffrir d’une sévère nécrose systémique ou de quelques taches de nécrose alors que les autres plantes ne connaissent aucun symptôme. Ce nombre peut varier d’un essai à l’autre. | | |
| 12. Interprétation des résultats du test en comparaison avec les variétés témoins : | | |
| absente | | [1] symptômes de sensibilité |
| présente | | [9] aucun symptôme ou symptômes de résistance par hypersensibilité |
| 13. Points critiques de contrôle :  La température et la lumière peuvent influencer le développement de la nécrose : plus de lumière entraine une plus grande nécrose. À des températures supérieures à 26°C, la résistance peut rompre.  Les variétés hétérozygotes résistantes peuvent avoir des plantes sans symptôme et des plantes avec nécrose prononcée; malgré cette fluctuation d’expression, l’échantillon peut être évalué comme étant homogène en matière de résistance.  Remarque : la souche INRA Avignon 6-5-1-1 est recommandée pour ToMV : 0. Elle provoque une mosaïque aucuba jaune significative. | | |

*Nouveau libellé proposé*

Ad. 51: Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV)

La résistance aux souches 0, 1 et 2 doit être vérifiée dans le cadre d’un essai biologique (méthode i) ou d’un test avec marqueurs d’ADN (méthode ii). Dans le cas d’un essai biologique, l’observation est de type VG. Dans le cas d’un test avec marqueurs d’ADN, l’observation est de type VS.

1. Essai biologique

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agent pathogène | virus de la mosaïque de la tomate |
| 3. | Espèces hôtes | *Solanum lycopersicum* |
| 4. | Source de l’inoculum | Naktuinbouw[[8]](#footnote-9) (NL), ~~et~~ GEVES[[9]](#footnote-10) (FR) ou INIA[[10]](#footnote-11) (ES, souche 0) |
| 5. | Isolat | souche~~s~~ 0 (p.ex. isolat INRA Avignon 6-5-1-1), souche 1 et souche 2 |
| 6. | Identification de l’isolat | variétés de tomate génétiquement définies ainsi :  Mobaci (Tm1), Moperou (Tm2), Momor (Tm22) |
| 7. | Détermination du pouvoir pathogène | sur une plante sensible |
| 8. | Multiplication de l’inoculum |  |
| 8.1 | Milieu de multiplication | plante vivante |
| 8.2 | Variété multipliée | p.ex. Moneymaker, Marmande |
| 8.7 | Vérification de l’inoculum récolté | option : sur *Nicotiana tabacum* “Xanthi”, vérifier les lésions après 2 jours |
| 8.8 | Durée de conservation/viabilité de l’inoculum | frais > 1 jour, séché > 1 an |
| 9. | Format de l’essai |  |
| 9.1 | Nombre de plantes par génotype | au moins 20 plantes |
| 9.2 | Nombre de répétitions | 1 répétition |
| 9.3 | Variétés témoins |  |
|  | Sensibles | Marmande, Monalbo |
|  | Résistantes au ToMV: 0 et 2 | Mobaci |
|  | Résistantes au ToMV: 0 et 1 | Moperou |
|  | Résistantes avec nécrose | “Monalbo x Momor” |
|  | Résistantes | Gourmet |
| 9.4 | Protocole d’essai | traitement blanc avec PBS et carborundum ou PBS similaire |
| 9.5 | Installation d’essai | serre ou chambre climatisée |
| 9.6 | Température | 24 à 26°C |
| 9.7 | Lumière | 12 heures ou plus |
| 9.8 | Saison | les symptômes sont plus prononcés en été~~.~~ |
| 10. | Inoculation |  |
| 10.1 | Préparation de l’inoculum | 1 g de feuille avec symptômes avec 10 ml PBS  homogénéiser, ajouter du carborundum au PBS (1 g/30ml) |
| 10.3 | Stade de la plante lors de l’inoculation | “cotylédons étalés” ou “deux feuilles développées” |
| 10.4 | Méthode de l’inoculation | frotter légèrement |
| 10.7 | Observations finales | 11 à 21 jours après l’inoculation |
| 11. | Observations |  |
| 11.1 | Méthode | visuelle |
| 11.2 | Échelle d’observation | symptômes de sensibilité :  mosaïque au sommet, malformation des feuilles  symptômes de résistance (fondés sur l’hypersensibilité) :  nécrose locale, nécrose apicale, nécrose systémique |
| 11.3 | Validation de l’essai | l’évaluation de la variété résistante doit être calibrée avec les résultats des témoins sensibles et résistants |
|  | Remarque : | pour certaines variétés hétérozygotes, un nombre variable de plantes peut souffrir d’une sévère nécrose systémique ou de quelques taches de nécrose alors que les autres plantes ne connaissent aucun symptôme. Ce nombre peut varier d’un essai à l’autre. |
| 12. | Interprétation des résultats du test en comparaison avec les variétés témoins : |  |
|  | absente | [1] symptômes de sensibilité |
|  | présente | [9] aucun symptôme ou symptômes de résistance par hypersensibilité |
| 13. | Points critiques de contrôle | La température et la lumière peuvent influencer le développement de la nécrose : plus de lumière entraine une plus grande nécrose. À des températures supérieures à 26°C, la résistance peut rompre.  Les variétés hétérozygotes résistantes peuvent avoir des plantes sans symptôme et des plantes avec nécrose prononcée; malgré cette fluctuation d’expression, l’échantillon peut être évalué comme étant homogène en matière de résistance.  Remarque : la souche INRA Avignon 6-5-1-1 est recommandée pour ToMV : 0. Elle provoque une mosaïque aucuba jaune significative. |

ii) Test avec marqueurs d’ADN

La résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) est souvent fondée sur le gène de résistance Tm2 (allèle Tm2 ou Tm22). La présence d’allèles Tm2 et Tm22 résistants ou d’allèles tm2 sensibles peut être détectée par les marqueurs co-dominants décrits dans Arens, P. et al. (2010). Aspects particuliers :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agent pathogène | virus de la mosaïque de la tomate |
| 2. | Gène opérationnel | Tm2/22 |
| 3. | Amorces de réaction en chaîne par polymérase (primers) |  |
| 3.1 | Essai 1 pour vérifier la résistance de l’allèle Tm2 ou Tm22 | Amorce externe de réaction en chaîne par polymérase TMV-2286F: 5’GGGTATACTGGGAGTGTCCAATTC3’ Amorce externe de réaction en chaîne par polymérase TMV-2658R: 5’CCGTGCACGTTACTTCAGACAA3’ Tm22 SNP2494F: 5’CTCATCAAGCTTACTCTAGCCTACTTTAGT3’ Tm2 SNP2493R:  5’CTGCCAGTATATAACGGTCTACCG3’ |
| 3.2 | Essai 2 pour vérifier la sensibilité ou la résistance de l’allèle | Amorce externe de réaction en chaîne par polymérase TM2-748F:  5’CGGTCTGGGGAAAACAACTCT3’ Amorce externe de réaction en chaîne par polymérase TM2-1256R:  5’CTAGCGGTATACCTCCACATCTCC3’ TM2-SNP901misR:  5’GCAGGTTGTCCTCCAAATTTTCCATC3’ TM2-SNP901misF: 5’CAAATTGGACTGACGGAACAGAAAGTT3’ |
| 4. | Format de l’essai |  |
| 4.1 | Nombre de plantes par génotype | au moins 20 plantes |
| 4.2 | Variétés témoins | allèle tm2 homozygote sensible présent : Moneymaker  allèle Tm2 résistant présent : Moperou  allèle Tm22 résistant présent : Momor, Persica, Campeon |
| 6. | Conditions de la réaction en chaîne par polymérase | 1. étape de dénaturation initiale à 94 °C pendant 3 minutes 2. 35 cycles à 94 °C pendant 1 minute, 55 °C pendant 1 minute et 72 °C pendant 2 minutes 3. étape d’extension finale à 72 °C pendant 10 minutes |
| 8. | Interprétation des résultats de l’essai | la présence des allèles tm2, Tm2, Tm22 conduit à une interprétation différente des caractères 51.1, 51.2 et 51.3, voir le tableau. Si les résultats du test avec marqueurs d’ADN ne confirment pas la déclaration dans le questionnaire technique, un essai biologique doit être effectué pour observer si la résistance est absente ou présente pour la variété (sur un autre mécanisme, par exemple le gène Tm1). |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Résultats du test avec marqueurs d’ADN | tm2/tm2 | Tm2/tm2 ou Tm2/Tm2 | Tm22/tm2 ou Tm22/Tm22 ouTm22/Tm2 |
|  |  | (survient par hasard) |  |
| 51.1 Souche 0 | [1] absent | [9] résistant | [9] résistant |
| 51.2 Souche 1 | [1] absent | [9] résistant | [9] résistant |
| 51.3 Souche 2 | [1] absent | [1] absent | [9] résistant |

## Proposition de modification de la méthode d’observation du caractère 58 “Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV) – Pathotype 0”

*Libellé actuel*

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

*Nouveau libellé proposé*

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

Proposition de modification de l’explication Ad. 58 : ajouter une autre méthode d’observation de la résistance

*Libellé actuel*

Ad. 58: Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV)

|  |  |
| --- | --- |
| 1. Agent pathogène | virus de la tache bronzée de la tomate |
| 2. État de quarantaine | oui (voir la note ci-dessous) |
| 3. Espèces hôtes | *Solanum lycopersicum* |
| 4. Source de l’inoculum | Naktuinbouw [[11]](#footnote-12) (NL), GEVES[[12]](#footnote-13) (FR) |
| 5. Isolat | pathotype 0, de préférence une souche non transmise par les thysanoptères |
| 7. Détermination du pouvoir pathogène | bioessai |
| 8. Multiplication de l’inoculum |  |
| 8.6 Récolte de l’inoculum | les feuilles symptomatiques peuvent être stockées à -70°C |
| 9. Format de l’essai |  |
| 9.1 Nombre de plantes par génotype | 20 plantes |
| 9.2 Nombre de répétitions | 1 répétition |
| 9.3 Variétés témoins  Sensibles  Résistantes | Monalbo, Momor, Montfavet H 63.5  Tsunami, Bodar, Mospomor, Lisboa |
| 9.5 Installation d’essai | serre ou chambre climatisée |
| 9.6 Température | 20°C |
| 9.7 Lumière | 12 heures ou plus |
| 9.9 Mesures spéciales | empêcher ou combattre les thysanoptères |
| 10. Inoculation |  |
| 10.1 Préparation de l’inoculum | presser les feuilles symptomatiques dans un endroit glacé 0,01 M PBS, pH 7,4, avec 0,01 M de sulfite de sodium  option : tamiser le suc de la feuille au travers d’une double mousseline |
| 10.3 Stade de la plante lors de l’inoculation | une ou deux feuilles développées |
| 10.4 Méthode de l’inoculation | mécanique, frotter avec du carborundum  sur des cotylédons, suspension d’inoculum < 10C |
| 10.7 Observations finales | 7 à 21 jours après l’inoculation |
| 11. Observations |  |
| 11.1 Méthode | visuelle |
| 11.2 Échelle d’observation | symptômes : mosaïque au sommet, bronzage, diverses malformations, nécrose |
| 11.3 Validation de l’essai | l’évaluation de la résistance des variétés doit être calibrée avec les résultats des contrôles de résistance et de sensibilité |
| 12. Interprétation des résultats du test en comparaison avec les variétés témoins : | |
| absente | [1] symptômes |
| présente | [9] aucun symptôme |
| 13. Points critiques de contrôle :  Le virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV) a un statut de bioagresseur de quarantaine dans quelques pays. Il est transmis par *Thrips tabaci* et le thysanoptère occidental des fleurs (*Frankliniella occidentalis*). Le pathotype 0 est défini par son incapacité à surpasser la résistance dans les variétés de tomate porteuses du gène de résistance Sw-5. | |

*Nouveau libellé proposé*

Ad. 58 : Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV)

La résistance à la souche 0 doit être vérifiée dans le cadre d’un essai biologique (méthode i) ou d’un test avec marqueurs d’ADN (méthode ii). Dans le cas d’un essai biologique, l’observation est de type VG. Dans le cas d’un test avec marqueurs d’ADN, l’observation est de type VS.

i) Essai biologique

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agent pathogène | virus de la tache bronzée de la tomate |
| 2. | État de quarantaine | oui (voir la note ci-dessous) |
| 3. | Espèces hôtes | *Solanum lycopersicum* |
| 4. | Source de l’inoculum | Naktuinbouw [[13]](#footnote-14) (NL), GEVES [[14]](#footnote-15) (FR) |
| 5. | Isolat | pathotype 0, de préférence une souche non transmise par les thysanoptères |
| 7. | Détermination du pouvoir pathogène | bioessai |
| 8. | Multiplication de l’inoculum |  |
| 8.6 | Récolte de l’inoculum | les feuilles symptomatiques peuvent être stockées à -70°C |
| 9. | Format de l’essai |  |
| 9.1 | Nombre de plantes par génotype | 20 plantes |
| 9.2 | Nombre de répétitions | 1 répétition |
| 9.3 | Variétés témoins |  |
|  | Sensibles | Monalbo, Momor, Montfavet H 63.5 |
|  | Résistantes | Tsunami, Bodar, Mospomor, Lisboa |
| 9.5 | Installation d’essai | serre ou chambre climatisée |
| 9.6 | Température | 20°C |
| 9.7 | Lumière | 12 heures ou plus |
| 9.9 | Mesures spéciales | empêcher ou combattre les thysanoptères |
| 10. | Inoculation |  |
| 10.1 | Préparation de l’inoculum | presser les feuilles symptomatiques dans un endroit glacé 0,01 M PBS, pH 7,4, avec 0,01 M de sulfite de sodium ou une solution tampon similaire  option : tamiser le suc de la feuille au travers d’une double mousseline |
| 10.3 | Stade de la plante lors de l’inoculation | une ou deux feuilles développées |
| 10.4 | Méthode de l’inoculation | mécanique, frotter avec du carborundum  sur des cotylédons, suspension d’inoculum < 10C |
| 10.7 | Observations finales | 7 à 21 jours après l’inoculation |
| 11. | Observations |  |
| 11.1 | Méthode | visuelle |
| 11.2 | Échelle d’observation | symptômes : mosaïque au sommet, bronzage, diverses malformations, nécrose |
| 11.3 | Validation de l’essai | l’évaluation de la résistance des variétés doit être calibrée avec les résultats des contrôles de résistance et de sensibilité |
| 12. | Interprétation des résultats du test en comparaison avec les variétés témoins : |  |
|  | absente | [1] symptômes |
|  | présente | [9] aucun symptôme |
| 13. | Points critiques de contrôle | Le virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV) a un statut de bioagresseur de quarantaine dans quelques pays. Il est transmis par *Thrips tabaci* et le thysanoptère occidental des fleurs (*Frankliniella occidentalis*). Le pathotype 0 est défini par son incapacité à surpasser la résistance dans les variétés de tomate porteuses du gène de résistance Sw-5. |

ii) Test avec marqueurs d’ADN

La résistance au virus TSWV souche 0 est souvent fondée sur le gène de résistance Sw-5. La présence de l’allèle résistant ou d’allèles sensibles peut être détectée par les marqueurs co-dominants décrits dans Dianese, E.C. et al. (2010). Aspects particuliers :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agent pathogène | virus de la tache bronzée de la tomate |
| 2. | Gène opérationnel | Sw-5b |
| 3. | Amorces de réaction en chaîne par polymérase (primers) |  |
| 3,1 | Allèles sensibles | Sw5-Vat1-F: 5’-ACAACATCAAACAATGTTAGCC-3’  Sw5-Vat2-F: 5’-CATCAAACAATGCAGTTAGCC-3’ |
| 3,2 | Allèle résistant | Sw5-Res-F: 5’-ATCAACCAATACAGCCTAACC-3 |
| 3,3 | Amorce antisens universelle | Sw5-universal-R: 5’-TTTCTCCCTGCAAGTTCACC-3’ |
| 3.4 | Sondes spécifiques d’allèles | Sw5-Sus1:  5’-VIC-TACATTATGAAGGGTTAACAAG-MGB-NFQ-3’ Sw5-Sus2:  5’-6FAM-ACAACAGAGGGTTAACAAGTTTAGG-BHQ1-3’ Sw5-Res:  5’-TEXAS RED-TGGGCGAAAATCCCAACAAG-BHQ2-3’ |
| 4. | Format de l’essai |  |
| 4.1 | Nombre de plantes par génotype | au moins 20 plantes |
| 4.2 | Variétés témoins | allèle 1 sensible homozygote présent : Moneymaker  allèle 2 sensible homozygote présent : Mountain Magic  allèle résistant homozygote présent : Montealto |
| 6. | Conditions de la réaction en chaîne par polymérase | 1. étape de dénaturation initiale à 95 °C pendant 10 minutes  2. 40 cycles à 95 °C pendant 15 secondes et 60°C pendant une minute. Chaque cycle se termine avec la lecture d’une plaque. |
| 8. | Interprétation des résultats du test |  |
|  | absente | [1] allèles sensibles présents et allèle résistant absent |
|  | présente | [9] allèle résistant présent (homozygote ou hétérozygote)  Si les résultats du test avec marqueurs d’ADN ne confirment pas la déclaration dans le questionnaire technique, un essai biologique doit être effectué pour observer si la résistance est absente ou présente pour la variété (sur un autre mécanisme). |

## Proposition d’ajout d’une référence dans la bibliographie concernant les modifications (a) – (f) au chapitre 9 “Bibliographie”

*Ajout proposé pour le chapitre 9. Bibliographie*

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.

[Fin du document]

1. Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-2)
2. GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr [↑](#footnote-ref-3)
3. Naktuinbouw : resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-4)
4. GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr [↑](#footnote-ref-5)
5. INIA: cardaba@inia.sp [↑](#footnote-ref-6)
6. Naktuinbouw : resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-7)
7. GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr [↑](#footnote-ref-8)
8. Naktuinbouw : resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-9)
9. GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr [↑](#footnote-ref-10)
10. INIA : cardaba@inia.sp [↑](#footnote-ref-11)
11. Naktuinbouw: [resistentie@naktuinbouw.nl](mailto:resistentie@naktuinbouw.nl) [↑](#footnote-ref-12)
12. GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr [↑](#footnote-ref-13)
13. Naktuinbouw : [resistentie@naktuinbouw.nl](mailto:resistentie@naktuinbouw.nl) [↑](#footnote-ref-14)
14. GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr [↑](#footnote-ref-15)