

Comité de rédaction élargi

TC-EDC/Mar18/8

Genève, 26 et 27 mars 2018

Original: anglais

Date: 8 mars 2018

REVISION 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*

1. 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.).
2. 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") :
3. Les modifications suivantes sont proposées :
 - a) Modifier la méthode d'observation des caractères 48.1 et 48.2 :
 - i) Caractère 48.1 "Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) – Pathotype 0 (ex 1)"
 - ii) Caractère 48.2 "Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) – Pathotype 1 (ex 2)"
 - b) Modifier l'explication Ad. 48 : ajouter une autre méthode d'observation de la résistance et apporter des modifications mineures à la méthode actuelle
 - c) Modifier la méthode d'observation des caractères 51.1, 51.2 et 51.3 :
 - i) Caractère 51.1 "Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) – Souche 0"
 - ii) Caractère 51.2 "Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) – Souche 1"
 - iii) Caractère 51.3 "Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) – Souche 2"
 - d) Modifier l'explication Ad. 51 : ajouter une autre méthode d'observation de la résistance et apporter des modifications typographiques mineures à la méthode actuelle
 - e) Modifier la méthode d'observation du caractère 58 "Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV) – Pathotype 0"
 - f) Modifier l'explication Ad. 58 : ajouter une autre méthode d'observation de la résistance
 - g) Ajouter une référence dans la bibliographie concernant les modifications (a) – (f) au chapitre 9 "Bibliographie".
4. 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 <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

Nouveau libellé proposé

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

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	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
3. Espèces hôtes	<i>Solanum lycopersicum</i>
4. Source de l'inoculum	Naktuinbouw ¹ (NL) et GEVES ² (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 140698 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 10 ⁶ 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	Marmande, Marmande verte, Resal
Résistantes au pathotype 0 seulement	Marporum, Larissa, "Marporum x Marmande verte", Marsol, Anabel
Résistantes au pathotype 0 et 1	Motelle, Gourmet, Mohawk
Variétés témoins pour l'essai avec le pathotype (ex 2)	
Sensibles	Marmande verte, Cherry Belle, Roma
Résistantes au pathotype 0 uniquement	Marporum, Ranco
Résistantes aux pathotypes 0 et 1	Tradiro, Odisea
Remarque	Ranco est un peu moins résistante que Tradiro
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
10.2 Quantification de l'inoculum.....	compter les spores, ajuster à 10 ⁶ spores par ml, concentration plus basse pour un isolat très agressif

¹ Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl

² GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

- 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.

i) Essai biologique

1.	Agent pathogène	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
3.	Espèces hôtes	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Source de l'inoculum	Naktuinbouw ³ (NL), et GEVES ⁴ (FR) <u>ou</u> INIA ⁵ (ES)
5.	Isolat	pathotype 0 (ex 1) (p.ex. souches Orange 71 ou PRI 20698 ou Fol 071), <u>pathotype 1</u> (ex 2) (p.ex. souches 4152 ou PR 140698 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 10 ⁶ 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", Marsel, 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, <u>Marporum, Ranco</u>
	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

³ Naktuinbouw : resistentie@naktuinbouw.nl

⁴ GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr

⁵ INIA: cardaba@inia.sp

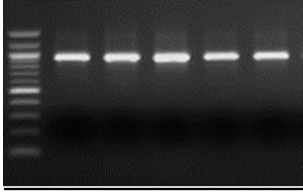
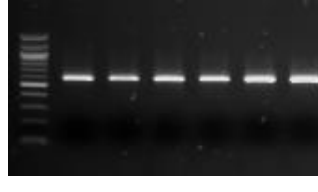

9.8	Saison	toutes saisons
9.9	Mesures spéciales	un sol tourbeux légèrement acide est optimal; conserver le sol humide mais éviter le stress hydrique
10.	Inoculation	
10.1	Préparation de l'inoculum	culture aérée de Messiaen ou PDA ou milieu S de Messiaen ou culture Czapek-Dox <u>Czapeck-Dox</u> ou <u>racler les plaques</u>
10.2	Quantification de l'inoculum	compter les spores, ajuster à 10 ⁶ 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.	<u>Agent pathogène</u>	<u><i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i></u>
2.	<u>État de quarantaine</u>	<u>I2</u>
3.	<u>Amorces de réaction en chaîne par polymérase (primers)</u>	
3.1	<u>Allèle sensible</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>Allèle résistant</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>Format de l'essai</u>	
4.1	<u>Nombre de plantes par génotype</u>	<u>au moins 20 plantes</u>
4.2	<u>Variétés témoins</u>	<u>allèle homozygote sensible présent : Moneymaker</u> <u>allèle homozygote résistant présent : Tradiro</u>
5.	<u>Préparation</u>	
5.1	<u>Préparation de l'ADN</u>	<u>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 T₁₀E_{0.1}. Diluer tout l'ADN à 1/10 (H₂O) pour obtenir une concentration d'ADN entre 1 et 10 ng/µl.</u>

5.2	<u>Préparation de la réaction en chaîne par polymérase</u>	<p>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 :</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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.	<u>Conditions de la réaction en chaîne par polymérase</u>	<p>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</p>
7.	<u>Observations</u>	
7.1	<u>Méthode</u>	visuelle
7.2	<u>Échelle d'observation</u>	

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

7.3	<u>Validation de l'essai</u>	Les variétés témoins doivent donner les bandes attendues.
8.	<u>Interprétation des résultats de l'essai</u>	
	<u>48.1 Résistance au pathotype 0 (ex 1)</u>	
	<u>présente</u>	<p>[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).</p>
	<u>48.2 Résistance au pathotype 1 (ex 2)</u>	
	<u>absente</u>	[1] homozygote sensible lors du test avec marqueurs d'ADN
	<u>présente</u>	<p>[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).</p>

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/ 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

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.....	<i>Solanum lycopersicum</i>
4. Source de l'inoculum	Naktuinbouw ⁶ (NL) ou GEVES ⁷ (FR)
5. Isolât.....	souches 0 (p.ex. isolat INRA Avignon 6-5-1-1), 1 et 2
6. Identification de l'isolât	variétés de tomate génétiquement définies ainsi : Mobaci (Tm1), Moperou (Tm2), Momor (Tm2 ²) sur une plante sensible
7. Détermination du pouvoir pathogène	
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 <i>Nicotiana tabacum</i> "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) "cotylédons étalés" ou "deux feuilles développées"
10.3 Stade de la plante lors de l'inoculation	
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 l'évaluation de la variété résistante doit être calibrée avec les résultats des témoins sensibles et résistants
11.3 Validation de l'essai.....	

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 entraîne 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.

⁶ Naktuinbouw : resistentie@naktuinbouw.nl

⁷ GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr

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.

i) Essai biologique

1.	Agent pathogène	virus de la mosaïque de la tomate
3.	Espèces hôtes	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Source de l'inoculum	Naktuinbouw ⁸ (NL), et GEVES ⁹ (FR) ou INIA ¹⁰ (ES, souche 0)
5.	Isolat	souches 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 (Tm2 ²)
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 <i>Nicotiana tabacum</i> "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

⁸ Naktuinbouw : resistentie@naktuinbouw.nl

⁹ GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr

¹⁰ INIA : cardaba@inia.sp

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 entraîne 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.	<u>Agent pathogène</u>	<u>virus de la mosaïque de la tomate</u>
2.	<u>Gène opérationnel</u>	<u>Tm2/2²</u>
3.	<u>Amorces de réaction en chaîne par polymérase (primers)</u>	
3.1	<u>Essai 1 pour vérifier la résistance de l'allèle Tm2 ou Tm2²</u>	<u>Amorce externe de réaction en chaîne par polymérase TMV-2286F:</u> <u>5'GGGTATACTGGGAGTGTCCAATTC3'</u> <u>Amorce externe de réaction en chaîne par polymérase TMV-2658R:</u> <u>5'CCGTGCACGTTACTTCAGACAA3'</u> <u>Tm22 SNP2494F:</u> <u>5'CTCATCAAGCTTACTCTAGCCTACTTTAGT3'</u> <u>Tm2 SNP2493R:</u> <u>5'CTGCCAGTATATAACGGTCTACCG3'</u>

<u>3.2</u>	<u>Essai 2 pour vérifier la sensibilité ou la résistance de l'allèle</u>	<p>Amorce externe de réaction en chaîne par polymérase TM2-748F: 5'CGGTCTGGGGAAAACAACACTCT3'</p> <p>Amorce externe de réaction en chaîne par polymérase TM2-1256R: 5'CTAGCGGTATACCTCCACATCTCC3'</p> <p>TM2-SNP901misR: 5'GCAGGTTGCTCCTCCAAATTTCCATC3'</p> <p>TM2-SNP901misF: 5'CAAATTGGACTGACGGAACAGAAAGTT3'</p>
<u>4.</u>	<u>Format de l'essai</u>	
<u>4.1</u>	<u>Nombre de plantes par génotype</u>	au moins 20 plantes
<u>4.2</u>	<u>Variétés témoins</u>	<p>allèle tm2 homozygote sensible présent : Moneymaker</p> <p>allèle Tm2 résistant présent : Moperou</p> <p>allèle Tm2² résistant présent : Momor, Persica, Campeon</p>
<u>6.</u>	<u>Conditions de la réaction en chaîne par polymérase</u>	<p>1. étape de dénaturation initiale à 94 °C pendant 3 minutes</p> <p>2. 35 cycles à 94 °C pendant 1 minute, 55 °C pendant 1 minute et 72 °C pendant 2 minutes</p> <p>3. étape d'extension finale à 72 °C pendant 10 minutes</p>
<u>8.</u>	<u>Interprétation des résultats de l'essai</u>	la présence des allèles tm2, Tm2, Tm2 ² 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).

<u>Résultats du test avec marqueurs d'ADN</u>	<u>tm2/tm2</u>	<u>Tm2/tm2 ou Tm2/Tm2</u>	<u>Tm2²/tm2 ou Tm2²/Tm2² ou Tm2²/Tm2</u>
		(survient par hasard)	
<u>51.1 Souche 0</u>	<u>[1] absent</u>	<u>[9] résistant</u>	<u>[9] résistant</u>
<u>51.2 Souche 1</u>	<u>[1] absent</u>	<u>[9] résistant</u>	<u>[9] résistant</u>
<u>51.3 Souche 2</u>	<u>[1] absent</u>	<u>[1] absent</u>	<u>[9] résistant</u>

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)	Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV)	Resistenz gegen das Tomatenbronzenfleckenvirus (TSWV)	Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)		
		- Race 0	- Pathotype 0	- Pathotyp 0	- 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)	Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV)	Resistenz gegen das Tomatenbronzenfleckenvirus (TSWV)	Resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV)		
		- Race 0	- Pathotype 0	- Pathotyp 0	- 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	<i>Solanum lycopersicum</i>
4. Source de l'inoculum	Naktuinbouw ¹¹ (NL), GEVES ¹² (FR)
5. Isolât	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 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 < 10°C
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.

¹¹ Naktuinbouw: resistentie@naktuinbouw.nl

¹² GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr

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	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Source de l'inoculum	Naktuinbouw ¹³ (NL), GEVES ¹⁴ (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 <u>ou une solution tampon similaire</u> 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 < 10°C
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 Naktuinbouw : resistentie@naktuinbouw.nl

¹⁴ GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr

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 <i>Thrips tabaci</i> et le thysanoptère occidental des fleurs (<i>Frankliniella occidentalis</i>). 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]