

Comité de rédaction élargi

TC-EDC/Mar18/9

Genève, 26 et 27 mars 2018

Original : anglais

Date : 8 mars 2018

**REVISION PARTIELLE DES PRINCIPES DIRECTEURS D'EXAMEN DU PORTE-GREFFE DE 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 du porte-greffe de tomate (document TG/294/1 Corr. Rev. 2).

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 du porte-greffe de tomate (document TG/294/1 Corr. Rev.) sur la base des documents TG/294/1 Corr. Rev. et TWV/51/11 "Partial Revision of the Test Guidelines for Tomato Rootstocks" et a proposé de réviser comme suit les principes directeurs d'examen du porte-greffe de tomate (voir le paragraphe 115 du document TWV/51/16 "Report") :

- a) Modifier la méthode d'observation des caractères 24.1 et 24.2 :
  - i) Caractère 24.1 "Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) – Pathotype 0 (ex 1)"
  - ii) Caractère 24.2 "Résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) – Pathotype 1 (ex 2)"
- b) Modifier l'explication Ad. 24 : 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 27.1, 27.2 et 27.3 :
  - i) Caractère 27.1 "Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) – Souche 0"
  - ii) Caractère 27.2 "Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) – Souche 1"
  - iii) Caractère 27.3 "Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV) – Souche 2"
- d) Modifier l'explication Ad. 27 : ajouter une autre méthode d'observation de la résistance et apporter des modifications typographiques mineures à la méthode actuelle
- e) Modifier l'explication Ad. 30 "Résistance au virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (TYLCV)" : réviser la méthode actuelle et ajouter une autre méthode d'observation de la résistance
- f) Modifier la méthode d'observation du caractère 31 "Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV)"
- g) Modifier l'explication Ad. 31 : ajouter une autre méthode d'observation de la résistance
- h) Ajouter une référence dans la bibliographie concernant les modifications (a) – (h) au chapitre 9 "Bibliographie".

3. 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 24.1 et 24.2

*Libellé actuel*

24. (+)	Resistance to <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Résistance à <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Resistenz gegen <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)		
24.1 (*)	VG – Race 0 (ex 1)	– Pathotype 0 (ex 1)	– Pathotyp 0 (ex 1)	– Raza 0 (ex 1)		
QL	absent	absente	fehlend	ausente		1
	present	présente	vorhanden	presente	Emperador	9
24.2 (*)	VG – Race 1 (ex 2)	– Pathotype 1 (ex 2)	– Pathotyp 1 (ex 2)	– Raza 1 (ex 2)		
QL	absent	absente	fehlend	ausente		1
	present	présente	vorhanden	presente	Emperador	9
24.3 (*)	VG – Race 2 (ex 3)	– Pathotype 2 (ex 3)	– Pathotyp 2 (ex 3)	– Raza 2 (ex 3)		
QL	absent	absente	fehlend	ausente	Emperador	1
	present	présente	vorhanden	presente	Colosus	9

*Nouveau libellé proposé*

24. (+)	Resistance to <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Résistance à <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Resistenz gegen <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)		
24.1 (*)	VG/ VS – Race 0 (ex 1)	– Pathotype 0 (ex 1)	– Pathotyp 0 (ex 1)	– Raza 0 (ex 1)		
QL	absent	absente	fehlend	ausente		1
	present	présente	vorhanden	presente	Emperador	9
24.2 (*)	VG/ VS – Race 1 (ex 2)	– Pathotype 1 (ex 2)	– Pathotyp 1 (ex 2)	– Raza 1 (ex 2)		
QL	absent	absente	fehlend	ausente		1
	present	présente	vorhanden	presente	Emperador	9
24.3 (*)	VG – Race 2 (ex 3)	– Pathotype 2 (ex 3)	– Pathotyp 2 (ex 3)	– Raza 2 (ex 3)		
QL	absent	absente	fehlend	ausente	Emperador	1
	present	présente	vorhanden	presente	Colosus	9

Proposition de modification de l'explication Ad. 24 : ajouter une autre méthode d'observation de la résistance et apporter des modifications mineures à la méthode actuelle

*Libellé actuel*

Ad. 24 : 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<sup>1</sup> (NL) et GEVES<sup>2</sup> (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 10<sup>6</sup> 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 plante 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 ..... (*Solanum lycopersicum*) Marmande, Marmande verte, Resal
- Résistantes au pathotype 0 seulement ..... (*Solanum lycopersicum*) Marporum, Larissa, "Marporum x Marmande verte", Marsol, Anabel
- Résistantes au pathotype 0 et 1 ..... (*Solanum lycopersicum*) Motelle, Gourmet, Mohawk
- Variétés témoins pour l'essai avec le pathotype 1 (ex 2)
- Sensibles ..... (*Solanum lycopersicum*) Marmande verte, Cherry Belle, Roma
- Résistantes au pathotype 0 uniquement ..... (*Solanum lycopersicum*) Marporum, Ranco
- Résistantes aux pathotypes 0 et 1 ..... (*Solanum lycopersicum*) Tradiro, Odisea
- Remarque ..... (*Solanum lycopersicum*) Ranco est un peu moins résistante que Tradiro
- Variétés témoins pour l'essai avec le pathotype 2 (ex 3)
- Sensible au pathotype 2 ..... Emperador
- Résistantes aux pathotypes 0, 1 et 2 .. Colosus
- 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 agressif, avec isolat peu 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

<sup>1</sup> Naktuinbouw : [resistentie@naktuinbouw.nl](mailto:resistentie@naktuinbouw.nl)

<sup>2</sup> GEVES; [Valerie.GRIMAULT@geves.fr](mailto:Valerie.GRIMAULT@geves.fr)

- 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 d'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.
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. Des variétés témoins proches du cas limite R/S sont essentielles pour faire une comparaison entre laboratoires.

## Nouveau libellé proposé

Ad. 24 : 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). En cas d'essai biologique, le type d'observation est VG. Dans le cas d'un test avec marqueurs d'ADN, le type d'observation est 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 <sup>3</sup> (NL), GEVES <sup>4</sup> (FR) ou INIA <sup>5</sup> (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 PRI40698 ou RAF 70) et pathotype 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 <sup>6</sup> 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 pathotype 0 (ex 1)	
	Sensibles	( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Marmande, Marmande verte, Resal
	Résistantes au pathotype 0 <del>seulement</del>	"Marporum x Marmande verte", Marsol, Anabel, Motelle, Gourmet, Mohawk, Ranco, Tradiro
	Résistantes au pathotype 0 et 1	( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Motelle, Gourmet, Mohawk
	Remarque :	Ranco est un peu moins résistante que Tradiro
9.3.2	Variétés témoins pour l'essai avec le pathotype 1 (ex 2)	
	Sensibles	( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Marmande verte, Cherry Belle, Roma, Marporum, Ranco
	Résistantes au pathotype 0 <del>uniquement</del>	( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Marporum, Ranco
	Résistantes aux pathotypes 0 et 1	Emperador, Colosus et ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) 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 au pathotype 2	Emperador et ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Marmande verte, Motelle, Marporum
	Résistantes aux pathotypes 0, 1 et 2	Colosus et ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) 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

<sup>3</sup> Naktuinbouw : resistantie@naktuinbouw.nl

<sup>4</sup> GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr

<sup>5</sup> INIA : cardaba@inia.sp

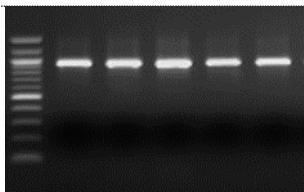
9.5	Installation d'essai	serre ou chambre climatisée
9.6	Température	24-28 °C (essai agressif, avec isolat peu agressif) 20-24 °C ( <del>essai agressif, avec isolat peu agressif</del> essai peu agressif, avec isolat agressif)
9.7	Lumière	12 heures par jour ou plus
9.8	Saison	toutes saisons
9.9	Mesures 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 <del>Czapek-Box</del> Czapeck-Dox ou racler les plaques
10.2	Quantification de l'inoculum	compter les spores, ajuster à 10 <sup>6</sup> 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 d'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 : 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
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. Des variétés témoins proches du cas limite R/S sont essentielles pour faire une comparaison entre laboratoires.	

ii) Test avec marqueurs d'ADN

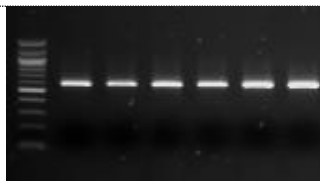
La résistance aux deux pathotypes 0 (ex 1) et 1 (ex 2) est souvent fondée sur le gène de résistance I2. La présence d'allèle résistant ou sensible du gène I2 peut être détectée par le marqueur co-dominant décrit dans cette méthode.

1.	Agent pathogène	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
2.	Gène opérationnel	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 : ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Moneymaker allèle homozygote résistant présent : ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Tradiro
5.	Préparation	

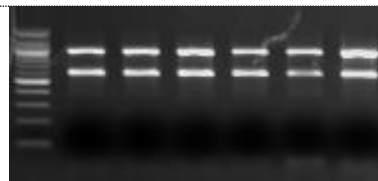
5.1	<u>Préparation de l'ADN</u>	Récolter sur chaque plante une partie d'une jeune feuille. Isoler tout l'ADN à l'aide d'un protocole standard d'isolement de l'ADN (fondé sur CTAB/SDS). Replacer en suspension dans 100 µl T <sub>10</sub> E <sub>0</sub> . 1. Diluer tout l'ADN à 1/10 (H <sub>2</sub> O) pour obtenir une concentration d'ADN entre 1 et 10 ng/µl.
5.2	<u>Préparation de la réaction en chaîne par polymérase</u>	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 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 µl d'ADN dilué 10x</li> <li>• 2,5 µl de solution tampon de réaction 10x</li> <li>• 2 mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 0.1 µM d'amorce de réaction en chaîne par polymérase (primers) résistante chacun</li> <li>• 0.2 µM d'amorce de réaction en chaîne par polymérase (primers) sensible chacun</li> <li>• 200 µM de chacun des quatre dNTP</li> <li>• 1 unité de Taq ADN polymérase</li> </ul>
6.	<u>Conditions de la réaction en chaîne par polymérase</u>	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.	<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>24.1 Pathotype 0 (ex 1)</u> 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).
	<u>24.2 Pathotype 1 (ex 2)</u> absente ..... [1] présente ..... [9]	Homozygote sensible lors du test avec marqueurs d'ADN 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 27.1, 27.2 et 27.3

*Libellé actuel*

27. (+)	Resistance to Tomato mosaic virus (ToMV)	Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV)	Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV)	Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV)	
27.1	<b>VG – Strain 0</b>	<b>– Souche 0</b>	<b>– Pathotyp 0</b>	<b>– Cepa 0</b>	
QL	absent	absente	fehlend	ausente	1
	present	présente	vorhanden	presente	Emperador 9
27.2	<b>– Strain 1</b>	<b>– Souche 1</b>	<b>– Pathotyp 1</b>	<b>– Cepa 1</b>	
QL	absent	absente	fehlend	ausente	1
	present	présente	vorhanden	presente	9
27.3	<b>– Strain 2</b>	<b>– Souche 2</b>	<b>– Pathotyp 2</b>	<b>– Cepa 2</b>	
QL	absent	absente	fehlend	ausente	1
	present	présente	vorhanden	presente	9

*Nouveau libellé proposé*

27. (+)	Resistance to Tomato mosaic virus (ToMV)	Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV)	Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV)	Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV)	
27.1	<b>VG/VS – Strain 0</b>	<b>– Souche 0</b>	<b>– Pathotyp 0</b>	<b>– Cepa 0</b>	
QL	absent	absente	fehlend	ausente	1
	present	présente	vorhanden	presente	Emperador 9
27.2	<b>VG/VS – Strain 1</b>	<b>– Souche 1</b>	<b>– Pathotyp 1</b>	<b>– Cepa 1</b>	
QL	absent	absente	fehlend	ausente	1
	present	présente	vorhanden	presente	9
27.3	<b>VG/VS – Strain 2</b>	<b>– Souche 2</b>	<b>– Pathotyp 2</b>	<b>– Cepa 2</b>	
QL	absent	absente	fehlend	ausente	1
	present	présente	vorhanden	presente	9



Proposition de modification de l'explication Ad. 27 : ajouter une autre méthode d'observation de la résistance et apporter des modifications typographiques mineures à la méthode actuelle

*Libellé actuel*

Ad. 27 : Résistance au virus de la mosaïque de la tomate (ToMV)

- |   |  |
|---|--|
| 1. Agent pathogène .....                                | Virus de la mosaïque de la tomate  |
| 3. Espèces hôtes .....                                  | <i>Lycopersicum esculentum</i>   |
| 4. Source de l'inoculum .....                           | Naktuinbouw <sup>6</sup> (NL) ou GEVES <sup>7</sup> (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 :<br>Mobaci (Tm1), Moperou (Tm2), Momor (Tm2 <sup>2</sup> )  |
| 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<br>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 .....   | ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Marmande, Monalbo  |
| Résistantes au virus : 0 et 2 .....                     | ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Mobaci   |
| Résistantes au virus : 0 et 1 .....                     | ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Moperou  |
| Résistantes avec nécrose.....                           | ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) "Monalbo x Momor"  |
| Résistantes .....                                       | ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Gourmet  |
| 9.4 Protocole d'essai .....                             | traitement blanc avec PBS et carborundum ou<br>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<br>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 d'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 :<br>mosaïque au sommet, malformation des feuilles<br>symptômes de résistance (fondés sur<br>l'hypersensibilité) :<br>nécrose locale, nécrose apicale, nécrose systémique |
| 11.3 Validation de l'essai.....                         | l'évaluation de la variété résistante doit être calibrée<br>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 :

<sup>6</sup> Naktuinbouw : resistantie@naktuinbouw.nl

<sup>7</sup> GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr

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.

*Nouveau libellé proposé*

Ad. 27 : 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). En cas d'essai biologique, le type d'observation est VG. Dans le cas d'un test avec marqueurs d'ADN, le type d'observation est 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 <sup>8</sup> (NL) ou GEVES <sup>9</sup> (FR)
5.	Isolat	souches 0 (p. ex. isolate 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 <sup>2</sup> )
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	Durée de conservation/viabilité de l'inoculum	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	( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Marmande, Monalbo
	Résistantes au virus : 0 et 2	( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Mobaci
	Résistantes au virus : 0 et 1	( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Moperou
	Résistantes avec nécrose	( <i>Solanum lycopersicum</i> ) "Monalbo x Momor"
	Résistantes	( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Gourmet
9.4	Protocole d'essai	traitement blanc avec PBS et carborundum ou tampon 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 ou tampon similaire homogénéiser, ajouter du carborundum au tampon (1 g/30ml)
10.3	Stade de la plante lors de l'inoculation	cotylédons ou deux feuilles
10.4	Méthode d'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

<sup>8</sup> Naktuinbouw : resistentie@naktuinbouw.nl

<sup>9</sup> GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr

	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 Tm2<sup>2</sup>). La présence d'allèles Tm2 et Tm2<sup>2</sup> 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	Tm2/2 <sup>2</sup>
3.	Amorces de réaction en chaîne par polymérase (primers)	
3.1	Essai 1 pour vérifier la résistance de l'allèle Tm2 ou Tm2 <sup>2</sup>	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'CGGTCTGGGGAAAACAACCTCT3' Amorce externe de réaction en chaîne par polymérase TM2-1256R: 5'CTAGCGGTATACCTCCACATCTCC3' TM2-SNP901misR: 5'GCAGTTGTCTCCAAATTTCCATC3' 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 : ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Moneymaker allèle Tm2 résistant présent : ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Moperou allèle Tm2 <sup>2</sup> résistant présent : ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) 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.	<u>Interprétation des résultats de l'essai</u>	<u>la présence des allèles tm2, Tm2, Tm2<sup>2</sup> conduit à une interprétation différente des caractères 27.1, 27.2 et 27.3, 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>
----	--	---

<u>Résultats du test avec marqueurs d'ADN</u>	<u>tm2/tm2</u>	<u>Tm2/tm2 ou Tm2/Tm2</u>	<u>Tm2<sup>2</sup>/tm2 ou Tm2<sup>2</sup>/Tm2<sup>2</sup> ou Tm2<sup>2</sup>/Tm2</u>
		<u>(survient par hasard)</u>	
<u>27.1 Souche 0</u>	<u>[1] absente</u>	<u>[9] résistante</u>	<u>[9] résistante</u>
<u>27.2 Souche 1</u>	<u>[1] absente</u>	<u>[9] résistante</u>	<u>[9] résistante</u>
<u>27.3 Souche 2</u>	<u>[1] absente</u>	<u>[1] absente</u>	<u>[9] résistante</u>

Proposition de modification de l'explication Ad. 30 "Résistance au virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (TYLCV)" : réviser la méthode actuelle et ajouter une autre méthode d'observation de la résistance.

*Libellé actuel*

Ad. 30 : Résistance au virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (TYLCV)

1. Agent pathogène ..... virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (voir la note ci-dessous)
2. État de quarantaine ..... oui
3. Espèces hôtes ..... *Solanum lycopersicum*
4. Source de l'inoculum ..... –
5. Isolat ..... –
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 géotype ..... 20 plantes
- 9.2 Nombre de répétitions ..... 1 répétition
- 9.3 Variétés témoins
- Sensibles : ..... (*Solanum lycopersicum*) Montfavet H 63.5
- Résistantes : ..... (*Solanum lycopersicum*) TY 20, Anastasia, Mohawk
- 9.5 Installation d'essai ..... parcelle de plein champ soumise à des pressions de maladies naturelles
- 9.9 Mesures spéciales ..... empêcher la propagation de mouches blanches
10. Inoculation
- 10.3 Stade la plante lors de l'inoculation..... 6 à 12 semaines (plantes adultes)
- 10.4 Méthode d'inoculation..... vecteur (mouches blanches Bemisia porteuses du virus)
- 10.7 Fin de l'essai..... 1 à 2 mois après l'inoculation
11. Observations
- 11.1 Méthode ..... visuelle
- 11.2 Échelle d'observation ..... symptômes : jaunissement et frisure des feuilles
- 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 sévères
présente .....	[9]	aucun symptôme ou symptômes légers
13. Points critiques de contrôle :  
Ce virus est endémique dans de nombreuses zones tropicales et sub-tropicales et est classé comme bioagresseur de quarantaine dans de nombreux pays à climat tempéré. Il figure sur la liste d'alerte EPPO. Quelques variétés résistantes au virus peuvent être sensibles au virus Sardinia des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (TYLCSV), étroitement apparenté au TYLCSV.

*Nouveau libellé proposé*

Ad. 30 : Résistance au virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (TYLCV)

i) Méthode d'agro-inoculation

1.	<u>Agent pathogène</u>	<u>souche IL du virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (TYLCV) (voir la note ci-dessous)</u>
2.	<u>État de quarantaine</u>	<u>oui (voir 13.)</u>
3.	<u>Espèce hôte</u>	<u><i>Solanum lycopersicum</i></u>
4.	<u>Source de l'inoculum</u>	<u>M. Eduardo R. Bejarano, Plant Genetics Laboratory, IHSM UMA-CSIC<sup>10</sup></u>
5.	<u>Isolat</u>	<u>Alm : Pep : 99, souche IL</u>
6.	<u>Identification de l'isolat</u>	
7.	<u>Détermination du pouvoir pathogène</u>	
8.	<u>Multiplication de l'inoculum</u>	
8.1	<u>Milieu de multiplication</u>	<u>YEP/Kanamycin.</u>
8.2	<u>Variété multipliée</u>	
8.3	<u>Stade de la plante lors de l'inoculation</u>	<u>3 ou 4 feuilles</u>
8.4	<u>Milieu d'inoculation</u>	<u>YEP</u>
8.5	<u>Méthode d'inoculation</u>	<u>Infiltration par piqûre de la tige. L'inoculation de la plante est réalisée en utilisant la bactérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformée avec des plasmides contenant les clones infectieux (Morilla, et al. 2005. <i>Phytopathology</i> 95 : 1089–1097) L'<i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformé est un organisme génétiquement modifié qui doit respecter la législation en matière de protection de l'environnement et de la santé de l'homme et de l'animal.</u>
8.6	<u>Récolte de l'inoculum</u>	
8.7	<u>Vérification de l'inoculum récolté</u>	
8.8	<u>Durée de conservation/viabilité de l'inoculum</u>	<u>Les stocks de bactéries <i>A. tumefaciens</i> sont conservés congelés à 80 °C dans une solution à 15-20 % de glycérol pour une conservation de longue durée. Les cultures à conserver sont généralement obtenues à partir d'une seule colonie et cultivées dans 5 ml de YEP et 2,5 µl de kanamycine (100mg/ml) pendant 48 heures à 28 °C.</u>
9.	<u>Format de l'essai</u>	
9.1	<u>Nombre de plantes par génotype</u>	<u>20</u>
9.2	<u>Nombre de répétitions</u>	<u>2</u>
9.3	<u>Variétés témoins</u>	<u>Sensibles : Big Power, (<i>Solanum lycopersicum</i>) Moneymaker, Marmande Résistantes : (<i>Solanum lycopersicum</i>) Delyca, Montenegro, Anastasia, TY20, Mohawk</u>
9.4	<u>Protocole d'essai</u>	
9.5	<u>Installation d'essai</u>	<u>Serre ou chambre de culture avec autorisation d'utilisation confinée d'organisme génétiquement modifié, niveau de confinement 1 (N-1).</u>
9.6	<u>Température</u>	<u>23 à 25 °C</u>
9.7	<u>Lumière</u>	<u>16 h</u>
9.8	<u>Saison</u>	

<sup>10</sup> Source of inoculum; IHMS UMA (CSIC) edu. rodri@uma.es; INIA Cardaba@inia.es

9.9	Mesures spéciales	Autorisation d'utilisation confinée d'organisme génétiquement modifié, au moins au niveau de confinement 1 (N-1)
10.	Inoculation	
10.1	Préparation de l'inoculum	Strier la surface du milieu contenant la bactérie <i>A. tumefaciens</i> congelée placé dans un tube et immerger le tube dans 5 ml de YEP et 2,5 µl de kanamycine (100mg/ml) pendant 48 heures à 28 °C. Il est nécessaire d'agiter le tube. Prélever 100 µl et les placer dans 100 ml de YEP et 50 µl de kanamycine (100 mg/ml). Agiter pendant 48 heures à 28 ° C. Centrifuger la culture saturée pendant 20 min à 3500 tr/min et retirer la solution surnageante.
10.2	Quantification de l'inoculum	Dissoudre dans de l'eau déionisée stérile pour une DO600 de 1.
10.3	Stade de la plante lors de l'inoculation	3 <sup>e</sup> ou 4 <sup>e</sup> feuille
10.4	Méthode d'inoculation	Utiliser une seringue de 1 ml dotée d'une aiguille de calibre 27 et déposer quelques gouttes (environ 20 µl de la culture) sur les 10 à 15 trous de piqûre effectués avec l'aiguille dans la tige des plants de tomates destinés à l'essai. Conserver sur la glace pendant l'inoculation des plants.
10.5	Première observation	20 jours après l'inoculation
10.6	Deuxième observation	30 jours après l'inoculation
*10.7	Observations finales	45 jours après l'inoculation
11.	Observations	
11.1	Méthode	visuelle
11.2	Échelle d'observation	symptômes : jaunissement et frisure des feuilles
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 sévères
	présente ..... [9]	aucun symptôme
13.	Points critiques de contrôle :	
	Ce virus est endémique dans de nombreuses zones tropicales et sous-tropicales et est classé comme bioagresseur de quarantaine dans de nombreux pays à climat tempéré.	
	TYLCV-IL est la souche la plus répandue dans le monde. Avec cette souche, les symptômes n'apparaissent pas dans les variétés avec Ty-1 et Ty-2.	
	TYLCV figure sur la liste d'alerte EPPO. Quelques variétés résistantes au virus peuvent être sensibles au virus étroitement apparenté Sardinia des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (TYLCSV).	

ii) Méthode d'inoculation de la mouche blanche

1.	Agent pathogène	virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (TYLCV) souche IL
2.	État de quarantaine	oui (voir 13.)
3.	Espèce hôte	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Source de l'inoculum	- Espagne <sup>11</sup>
5.	Isolat	- TYLCV-IL La Mayora
8.	Multiplication de l'inoculum	mouches blanches
8.6	Récolte de l'inoculum	
9.	Format de l'essai	
9.1	Nombre de plantes par génotype	20
9.2	Nombre de répétitions	deux répétitions

<sup>11</sup> IHSM, CSIC guillamon@eelm.csic.es ou INIA cardaba@inia.es



9.3	Variétés témoins	
	Résistantes	TY 20, Anastasia, Mohawk
	Sensibles	Big Power, ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) <del>Montfavet H 63-5</del> <u>MoneyMaker, Marmande</u>
	Résistantes	( <i>Solanum lycopersicum</i> ) <u>Delyca, Montenegro</u> , Anastasia, TY20, Mohawk
9.5	Installation d'essai	<del>parcelle de plein champ soumise à des pressions de maladies naturelles</del> serre/serre tunnel
9.9	Mesures spéciales	empêcher la propagation de mouches blanches
10.	Inoculation	
10.3	Stade de la plante lors de l'inoculation	<del>6 à 12 semaines (plantes adultes)</del> <u>2 à 4 semaines</u>
10.4	Méthode d'inoculation	vecteur (mouches blanches Bemisia porteuses du virus TYLCV- <u>IL</u> )
10.7	Observations finales	1 à 2 mois après l'inoculation
11.	Observations	
11.1	Méthode	visuelle
11.2	Échelle d'observation	symptômes : jaunissement et frisure des feuilles
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 données en termes de niveaux d'expression des caractères de l'UPOV	
	absente [1]	symptômes sévères
	présente .....[9]	aucun symptôme ou symptômes légers
13.	Points critiques de contrôle :	
	Ce virus est endémique dans de nombreuses zones tropicales et subtropicales et est classé comme bioagresseur de quarantaine dans de nombreux pays à climat tempéré. <del>Il figure sur la liste d'alerte EPPO.</del>	
	<u>TYLCV-IL est la souche la plus répandue dans le monde. Avec cette souche, les symptômes n'apparaissent pas dans les variétés avec Ty-1 et Ty-2.</u>	
	Quelques variétés résistantes au virus peuvent être sensibles au virus étroitement apparenté Sardinia des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (TYLCSV).	

Proposition de modification de la méthode d'observation du caractère 31 "Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV)"

*Libellé actuel*

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

*Nouveau libellé proposé*

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

Proposition de modification de l'explication Ad. 31 : ajouter une autre méthode d'observation de la résistance

*Libellé actuel*

Ad. 31 : Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV)

1. Agent pathogène ..... virus de la tache bronzée de la tomate (voir la note ci-dessous)
2. État de quarantaine ..... oui (voir la note ci-dessous)
3. Espèces hôtes ..... *Solanum lycopersicum*
4. Source de l'inoculum ..... Naktuinbouw<sup>12</sup> (NL), GEVES<sup>13</sup> (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 géotype ..... 20 plantes
- 9.2 Nombre de répétitions..... 1 répétition
- 9.3 Variétés témoins
- Sensibles : ..... Big Power et (*Solanum lycopersicum*) Monalbo, Momor, Montfavet H 63.5
- Résistantes : ..... Enpower et (*Solanum lycopersicum*) 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 d'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.

<sup>12</sup> Naktuinbouw : [resistentie@naktuinbouw.nl](mailto:resistentie@naktuinbouw.nl)

<sup>13</sup> GEVES : Valerie.GRIMAULT@geves.fr

Nouveau libellé proposé

Ad 31 : Résistance au virus de la tache bronzée de la tomate (TSWV)

i) Essai biologique

1.	Agent pathogène	virus de la tache bronzée de la tomate (voir la note ci-dessous)
2.	État de quarantaine	oui (voir la note ci-dessous)
3.	Espèce hôte	<i>Solanum lycopersicum</i>
4.	Source de l'inoculum	Naktuinbouw <sup>14</sup> (NL), GEVES <sup>15</sup> (FR)
5.	Isolat	pathotype 0, de préférence une souche non transmise par les thysanoptères
7.	Détermination du pouvoir pathogène	essai biologique
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	Big Power et ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Monalbo, Momor, Montfavet H 63.5
	Résistantes	Enpower et ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) 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 d'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 <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.

<sup>14</sup> Naktuinbouw : [resistentie@naktuinbouw.nl](mailto:resistentie@naktuinbouw.nl)

<sup>15</sup> GEVES; Valerie.GRIMAULT@geves.fr

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). Éléments particuliers :

1.	<u>Agent pathogène</u>	<u>virus de la tache bronzée de la tomate</u>
2.	<u>Gène opérationnel</u>	<u>Sw-5b</u>
3.	<u>Amorce de réaction en chaîne par polymérase (primer)</u>	
3.1	<u>Allèles sensibles</u>	<u>Sw5-Vat1-F: 5'-ACAACATCAAACAATGTTAGCC-3'</u> <u>Sw5-Vat2-F: 5'-CATCAAACAATGCAGTTAGCC-3'</u>
3.2	<u>Allèle résistant</u>	<u>Sw5-Res-F: 5'-ATCAACCAATACAGCCTAACC-3</u>
3.3	<u>Amorce antisens universelle</u>	<u>Sw5-universal-R: 5'-TTTCTCCCTGCAAGTTCACC-3'</u>
3.4	<u>Sondes spécifiques d'allèles</u>	<u>Sw5-Sus1:</u> <u>5'-VIC-TACATTATGAAGGGTTAACAAG-MGB-NFQ-3'</u> <u>Sw5-Sus2:</u> <u>5'-6FAM-ACAACAGAGGGTTAACAAGTTTAGG-BHQ1-3'</u> <u>Sw5-Res:</u> <u>5'-TEXAS RED-TGGGCGAAAATCCCAACAAG-BHQ2-3'</u>
4.	<u>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 1 homozygote sensible présent :</u> <u>(<i>Solanum lycopersicum</i>) Moneymaker</u> <u>allèle 2 homozygote sensible présent :</u> <u>(<i>Solanum lycopersicum</i>) Mountain Magic</u> <u>allèle homozygote résistant présent :</u> <u>(<i>Solanum lycopersicum</i>) Montealto</u>
6.	<u>Conditions de la réaction en chaîne par polymérase</u>	<u>1. étape de dénaturation initiale à 95 °C pendant 10 minutes</u> <u>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.</u>
8.	<u>Interprétation des résultats de l'essai</u>	
	<u>absente .....[1]</u>	<u>allèles sensibles présents et allèle résistant absent</u>
	<u>présente .....[9]</u>	<u>allèle résistant présent (homozygote ou hétérozygote)</u> <u>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).</u>

Proposition d'ajout d'une référence dans la bibliographie concernant les modifications (a) – (h) 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]