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

|  |  |
| --- | --- |
| Comité techniqueCinquante-septième sessionGenève, 25 et 26 octobre 2021 | TC/57/17Original : anglaisDate : 6 septembre 2021 |

Révision partielle des principes directeurs d’examen de la laitue

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 laitue (document TG/13/11 Rev.)

 À sa cinquante-cinquième session[[1]](#footnote-2), le groupe de travail technique sur les plantes potagères (TWV) a examiné une proposition de révision partielle des principes directeurs d’examen de la laitue (*Lactuca sativa*L.) sur la base des documents TG/13/11 Rev. et TWV/55/11 “*Partial revision of the Test Guidelines for Lettuce*” et a proposé les modifications suivantes (voir le paragraphe 121 du document TWV/55/16 “*Report*”) :

1. Modification du point 9.3 “Variétés témoins” concernant la méthode actuelle d’essai biologique de l’ad. 53 “Résistance au *Lettuce mosaic virus* (LMV), pathotype II”
2. Ajout d’une nouvelle méthode pour le test avec marqueurs d’ADN à l’ad. 53 “Résistance au *Lettuce mosaic virus* (LMV), pathotype II”

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

## Propositions de modification de l’Ad. 53 “Résistance au *Lettuce mosaic virus* (LMV), pathotype II”

*Libellé actuel*

Ad. 53 : Résistance au *Lettuce mosaic virus* (LMV), pathotype II

|  |  |
| --- | --- |
| 1. Agent pathogène | *Lettuce mosaic virus* |
| 2. État de quarantaine | non |
| 3. Espèce hôte | laitue – *Lactuca sativa* L. |
| 4. Source de l’inoculum | GEVES[[2]](#footnote-3) (FR) ou Naktuinbouw[[3]](#footnote-4) (NL) |
| 5. Isolat | pathotype II (les isolats LMV-0 et Ls1 appartiennent au même pathotype) |
| 6. Identification de l’isolat | variétés témoins résistantes et sensibles  |
| 7. Détermination du pouvoir pathogène | inoculation de la variété témoin sensible  |
| 8. Multiplication de l’inoculum |   |
|  8.2 Variété de multiplication  | variété témoin sensible  |
|  8.3 Stade de la plante lors de l’inoculation | 2-3 feuilles |
|  8.4 Milieu d’inoculation | 0,05 M de PBS, 0,25% (poids/volume) de Na2SO3, 0,5% de C5H10NNaS2.3H2O, 4% de carborundum et 5% de charbon actif |
|  8.5 Méthode d’inoculation | par frottement; renouveler éventuellement après 4 jours; 1-2 heures d’humidité élevée après l’inoculation |
|  8.6 Récolte de l’inoculum | feuille fraîche homogénéisée dans un tampon (50% poids/volume);les feuilles lyophilisées peuvent être conservées moins d’une année; conservation de longue durée à -80 °C |
|  8.7 Vérification de l’inoculum récolté | comparer avec une inoculation fictive avec un tampon de virus de la mosaïque de la laitue + carborundum + charbon |
|  8.8 Durée de conservation/viabilité de l’inoculum | 2 h à 4 °C ou sur glace |
| 9. Format de l’essai |   |
|  9.1 Nombre de plantes par génotype | au moins 20 |
|  9.2 Nombre de répétitions | 1 |
|  9.3 Variétés témoins | sensibles : Bijou (rouge), Hilde II (verte), Sprinter (verte), Sucrine (verte)résistantes : Capitan (verte), Corsica (verte), Diveria (rouge)  |
|  9.4 Protocole d’essai | inoculation fictive de plusieurs plantes sur le même plateau |
|  9.5 Installation d’essai | chambre climatisée |
|  9.6 Température | après inoculation à 15-22 °C |
|  9.7 Lumière | 12-16 heures de lumière à environ 5000 lux |
| 10. Inoculation |   |
|  10.1 Préparation de l’inoculum | feuille fraîche broyée dans un tampon frais de virus de la mosaïque de la laitue comprenant du carborundum et du charbon actif |
|  10.3 Stade de la plante lors de l’inoculation | première feuille bien développée à la première inoculation, éventuellement 4 jours plus tard deuxième inoculation |
|  10.4 Méthode d’inoculation  | friction, enlever le carborundum par lavage |
|  10.7 Observations finales | 21 jours après l’inoculation  |
| 11. Observations |  |
|  11.1 Méthode | estimation visuelle de la sévérité de l’attaque de la mosaïquecomparer avec des variétés types, de préférence avec des variétés types ayant le même type de croissance |
|  11.2 Échelle d’observation  | résistante = aucun symptôme |
|   | sensible = retard de croissance, jeunes feuilles atteintes du virus de la mosaïque, enroulement des feuilles  |
|  11.3 Validation de l’essai | les variétés types doivent être conformes à la description |
| 12. Interprétation des données en termes de niveaux d’expression des caractères de l’UPOV  | classer chaque plante dans la catégorie résistante ou sensible, voir 11.2 |
| 13. Points critiques de contrôle | la variété Sprinter est moins sensible que bon nombre d’autres variétés sensibles; elle peut être utilisée pour détecter une faible pression de l’inoculation dans une expérience donnéela pigmentation anthocyanique des feuilles peut masquer les symptômes de la mosaïque et une date antérieure d’observation peut être prévue pour les variétés vertes, en fonction de la réaction des variétés types lors de l’essai |

*Nouveau libellé proposé*

Ad. 53 : Résistance au *Lettuce mosaic virus* (LMV), pathotype II

La résistance au pathotype II doit être vérifiée dans le cadre d’un essai biologique (méthode i) ou d’un test avec marqueurs d’ADN (méthode ii).

1. Essai biologique

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agent pathogène | *Lettuce mosaic virus* |
| 2. | État de quarantaine | non |
| 3. | Espèce hôte | laitue – *Lactuca sativa* L. |
| 4. | Source de l’inoculum | GEVES[[4]](#footnote-5) (FR) ou Naktuinbouw[[5]](#footnote-6) (NL) |
| 5. | Isolat | pathotype II (les isolats LMV-0 et Ls1 appartiennent au même pathotype) |
| 6. | Identification de l’isolat | variétés témoins résistantes et sensibles  |
| 7. | Détermination du pouvoir pathogène | inoculation de la variété témoin sensible  |
| 8. | Multiplication de l’inoculum |   |
| 8.2 | Variété de multiplication  | variété témoin sensible  |
| 8.3 | Stade de la plante lors de l’inoculation | 2-3 feuilles |
| 8.4 | Milieu d’inoculation | 0,05 M de PBS, 0,25% (poids/volume) de Na2SO3, 0,5% de C5H10NNaS2.3H2O, 4% de carborundum et 5% de charbon actif |
| 8.5 | Méthode d’inoculation | par frottement; renouveler éventuellement après 4 jours; 1-2 heures d’humidité élevée après l’inoculation |
| 8.6 | Récolte de l’inoculum | feuille fraîche homogénéisée dans un tampon (50% poids/volume);les feuilles lyophilisées peuvent être conservées moins d’une année; conservation de longue durée à -80 °C |
| 8.7 | Vérification de l’inoculum récolté | comparer avec une inoculation fictive avec un tampon de virus de la mosaïque de la laitue + carborundum + charbon |
| 8.8 | Durée de conservation/viabilité de l’inoculum | 2 h à 4 °C ou sur glace |
| 9. | Format de l’essai |   |
| 9.1 | Nombre de plantes par génotype | au moins 20 |
| 9.2 | Nombre de répétitions | 1 |
| 9.3 | Variétés témoins | sensibles : Bijou (rouge), Hilde II (verte), Sprinter (verte), Sucrine (verte)résistantes : Capitan (verte), Corsica (verte), ~~Diveria (rouge)~~ Multired 80 (rouge) |
| 9.4 | Protocole d’essai | inoculation fictive de plusieurs plantes sur le même plateau |
| 9.5 | Installation d’essai | chambre climatisée |
| 9.6 | Température | après inoculation à 15-22 °C |
| 9.7 | Lumière | 12-16 heures de lumière à environ 5000 lux |
| 10. | Inoculation |   |
| 10.1 | Préparation de l’inoculum | feuille fraîche broyée dans un tampon frais de virus de la mosaïque de la laitue comprenant du carborundum et du charbon actif |
| 10.3 | Stade de la plante lors de l’inoculation | première feuille bien développée à la première inoculation, éventuellement 4 jours plus tard deuxième inoculation |
| 10.4 | Méthode d’inoculation  | friction, enlever le carborundum par lavage |
| 10.7 | Observations finales | 21 jours après l’inoculation  |
| 11. | Observations |  |
| 11.1 | Méthode | estimation visuelle de la sévérité de l’attaque de la mosaïquecomparer avec des variétés types, de préférence avec des variétés types ayant le même type de croissance |
| 11.2 | Échelle d’observation  | résistante = aucun symptômesensible = retard de croissance, jeunes feuilles atteintes du virus de la mosaïque, enroulement des feuilles |
| 11.3 |  Validation de l’essai | les variétés types doivent être conformes à la description |
| 12. | Interprétation des données en termes de niveaux d’expression des caractères de l’UPOV | classer chaque plante dans la catégorie résistante ou sensible, voir 11.2 |
| 13. | Points critiques de contrôle | la variété Sprinter est moins sensible que bon nombre d’autres variétés sensibles; elle peut être utilisée pour détecter une faible pression de l’inoculation dans une expérience donnéela pigmentation anthocyanique des feuilles peut masquer les symptômes de la mosaïque et une date antérieure d’observation peut être prévue pour les variétés vertes, en fonction de la réaction des variétés types lors de l’essai |

1. Test avec marqueurs d’ADN

Le gène récessif *mo1* (avec ses allèles *mo11*ou *mo12*) donne la résistance au LMV, pathotype II. Les allèles de résistance *mo11* et *mo12* et la présence de l’allèle de sensibilité *mo10* peut être détectée par le marqueur co-dominant décrit par V. Nicaise *et al.* (2003). Aspects spécifiques :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | Agent pathogène | *Lettuce mosaic virus,* pathotype II |
| 2. | Gène opérationnel | *mo1* (avec deux allèles de résistance *mo11*et *mo12*et un allèle de sensibilité *mo10*) |
| 3. | Sondes et amorces pour la PCR Taqman  |  |
| 3.1. | Essai 1 | pour distinguer les génotypes *mo11* des génotypes *mo10* et *mo12* (suppression de 6 bases à la position nucléotidique 344-349) : |
|

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Sonde | séquence d’ADN ‘5-’3 | Couleur du fluorophore (facultatif) |
| Pr-del-mo1 | GGCTCAAGGAGCTGACTTCTATTG | Texas Red (sensible) |
| Pr-del-mo11 | GGCTCATGACTTCTATTG | 6FAM-MGB (*mo11* résistant) |

|  |  |
| --- | --- |
| Amorces | séquence d’ADN ‘5-’3 |
| Fw-del-mo1  | CAACAACATACATCGACCAA |
| Rev-del-mo1 | CTTCCCACTTAGGCTCGAT |

 Séquence d’amplicon : ‘5-’3 La séquence d’amplicon pour l’allèle *mo10*et*mo12* :TTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTATTGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACC La séquence d’amplicon pour l’allèle de résistance *mo11 :*TTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCATGACTTCTATTGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACC |
| 3.2. | Essai 2 | pour distinguer les génotypes *mo12* des génotypes *mo10* et *mo11* (SNP à la position nucléotidique 228) : |
|

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Sonde | séquence d’ADN ‘5-’3 | Couleur du fluorophore (facultatif) |
| Pr-SNP228-*mo1* | CTCCCTCT**G**CTAAGTC | 6FAM-MGB (sensible) |
| Pr-SNP228-*mo12* | ACTCCCTCT**C**CTAAGT  | VIC-MGB (*mo12* résistant) |

|  |  |
| --- | --- |
| Amorces | séquence d’ADN ‘5-’3 |
| Fw-SNP228-*mo1*  | GCATCCGCTCGAGCATTC |
| Rev-SNP228-*mo1* | CTACCCCAAGCGACTTGCTT |

 |
|  Séquence d’amplicon : ‘5-’3 La séquence d’amplicon pour l’allèle *mo10*et *mo11* :TCAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCT**G**CTAAGTCCAAGCAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCC La séquence d’amplicon pour l’allèle de résistance *mo12* :TCAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCT**C**CTAAGTCCAAGCAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCC |
| 4. | Format de l’essai |  |
| 4.1 | Nombre de plantes par génotype | au moins 20 plantes |
| 4.2 | Variétés témoins  | Allèle homozygote de sensibilité *mo10* présent : Sprinter, SucrineAllèle homozygote de résistance *mo11*présent : Capitan, KanaryoleAllèle homozygote de résistance *mo12*présent : CorianasMélanger l’ADN pour avoir un témoin hétérozygote |
| 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. |
| 5.2 | Préparation de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) | Déposer à la pipette chaque échantillon d’ADN et un mélange maître commercial de PCR en temps réel dans des puits individuels pour l’essai 1 et pour l’essai 2. Analyser les échantillons dans une machine PCR en temps réel capable de lire les fluorophores de toutes les sondes, avec des conditions de réaction adaptées au mélange maître utilisé. |
| 6. | Conditions de la réaction en chaîne par polymérase | (protocole d’essai détaillé disponible auprès de Naktuinbouw[[6]](#footnote-7) (NL)) |
|  | Essai 1 : |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Température | temps | vitesse de progression |
| Activation initiale de l’enzyme | 95°C | 2’ 00” |  |
| 40 cycles | 95°C | 0’ 15” | 5˚C/sec |
|  | 65°C | 0’ 48” | 5˚C/sec |

 |
|  | Essai 2 : |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Température | temps | vitesse de progression |
|  | 95°C | 2’ 00” |  |
| 40 cycles | 95°C | 0’ 15” | 5˚C/sec |
|  | 60°C | 0’ 48” | 5˚C/sec |

Analyse au point final en RFU. |
| 7. | Observations |  |
| 7.1 | Échelle d’observations  |  |
| Essai 1 :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Fluorophore donnant le signal |  |  |
| FAM (*mo11*) | Texas Red (*mo10* ou *mo12*) |   |
| - | x | Homozygote *mo10* ou *mo12,* ou hétérozygotes *mo10* et *mo12*  |
| x | - | Homozygote *mo11*  |
| x | x | Hétérozygotes *mo10* et *mo11*ou hétérozygotes *mo12* et *mo11* |
| - | - | Aucun résultat, renouveler l’essai |

 |
| Essai 2 :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Fluorophore donnant le signal |  |  |
| FAM (*mo10* ou *mo11*) | VIC (*mo12*) |   |
| (x) (FAM RFU << VIC RFU) | x | Homozygote *mo12*  |
| x | - | Homozygote *mo10* ou *mo11,* ou hétérozygotes *mo10* et *mo11*  |
| x  | (x) (FAM RFU >> VIC RFU) | Hétérozygotes *mo10* et *mo12*ou hétérozygotes *mo11* et *mo12*  |
| - | - | Aucun résultat, renouveler l’essai |

 |
| 7.2  | Validation de l’essai | Les variétés témoins devraient donner les résultats escomptés.Une variété homogène ne présentera pas de plantes hétérozygotes, à l’exception des variétés avec des combinaisons d’allèles (*mo0*+*mo11* *ou 2*). |
| 8. | Interprétation des données en termes de niveaux d’expression des caractères de l’UPOV | La combinaison des deux tests de PCR conduit au résultat prédit ci-après dans le cadre d’un essai biologique avec LMV, pathotype II : |
|

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|   |   | **Essai 2 (*mo1²*)** |
|   |   | **absent** | **homozygote présent**  | **hétérozygote** |
| **Essai 1 (*mo11*)** | **absent**  | sensible (*mo10*) | résistant (*mo12*) | sensible (*mo10*/*mo12*) |
| **homozygote présent** | résistant (*mo11*) | pas possible (invalide) | pas possible (invalide) |
| **hétérozygote** | sensible(*mo10*/ *mo11*) | pas possible (invalide) | devrait être résistant, mais pas encore validé |

 |
|  |  | Les plantes hétérozygotes (*mo10/mo11* ou *mo12*) sont sensibles dans le cadre de l’essai biologique car *mo1* est un gène récessif.Les plantes hétérozygotes ([*mo11*] + [*mo12*]) ont besoin de la conclusion d’un essai biologique.Les variétés présentant un mélange de génotypes (plantes hétérozygotes, plantes homozygotes *mo10*(phénotype prédit sensible) et plantes homozygotes *mo11* ou *mo12*(phénotype prédit résistant) ne seront pas homogènes dans le cadre de l’essai biologique.Dans le cas où le résultat du test avec marqueurs d’ADN ne confirme pas la déclaration figurant dans le questionnaire technique, un essai biologique doit être effectué pour vérifier si la variété est résistante en raison d’un autre mécanisme. |

[Fin du document]

1. Organisée en Turquie par voie électronique du 3 au 7 mai 2021. [↑](#footnote-ref-2)
2. matref@geves.fr [↑](#footnote-ref-3)
3. resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-4)
4. [matref@geves.fr](matref%40geves.fr) [↑](#footnote-ref-5)
5. [resistentie@naktuinbouw.nl](resistentie%40naktuinbouw.nl) [↑](#footnote-ref-6)
6. Naktuinbouw : resistentie@naktuinbouw.nl [↑](#footnote-ref-7)