

Comité technique

TC/57/17

**Cinquante-septième session
Genève, 25 et 26 octobre 2021****Original** : anglais
Date : 6 septembre 2021**REVISION 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*

1. 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.)
2. À sa cinquante-cinquième session¹, 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*") :
 - a) 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"
 - b) Ajout d'une nouvelle méthode pour le test avec marqueurs d'ADN à l'ad. 53 "Résistance au *Lettuce mosaic virus* (LMV), pathotype II"
3. Les modifications proposées sont indiquées ci-dessous en surbrillance et soulignées pour les insertions, en surbrillance et ~~biffées~~ pour les suppressions.

¹ Organisée en Turquie par voie électronique du 3 au 7 mai 2021.

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	<i>Lettuce mosaic virus</i>
2. État de quarantaine	non
3. Espèce hôte	laitue – <i>Lactuca sativa</i> L.
4. Source de l'inoculum	GEVES ² (FR) ou Naktuinbouw ³ (NL)
5. Isolât	pathotype II (les isolats LMV-0 et Ls1 appartiennent au même pathotype)
6. Identification de l'isolât	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 Na ₂ SO ₃ , 0,5% de C ₅ H ₁₀ NNaS ₂ .3H ₂ O, 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 l'inoculum	de 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 mosaïque comparer 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	de 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 donnée la 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

² matref@geves.fr

³ resistentie@naktuinbouw.nl

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).

i) Essai biologique

1.	Agent pathogène	<i>Lettuce mosaic virus</i>
2.	État de quarantaine	non
3.	Espèce hôte	laitue – <i>Lactuca sativa</i> L.
4.	Source de l'inoculum	GEVES ⁴ (FR) ou Naktuinbouw ⁵ (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 Na ₂ SO ₃ , 0,5% de C ₅ H ₁₀ NNaS ₂ .3H ₂ O, 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) <u>Multired 80 (rouge)</u>
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

⁴ matref@geves.fr

⁵ resistentie@naktuinbouw.nl

11.	Observations	
11.1	Méthode	estimation visuelle de la sévérité de l'attaque de la mosaïque comparer 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 donnée la 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

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

Sonde	séquence d'ADN '5'-3'	Couleur du fluorophore (facultatif)
Pr-del- <i>mo1</i>	GGCTCAAGGAGCTGACTTCTATTG	Texas Red (sensible)
Pr-del- <i>mo1¹</i>	GGCTCATGACTTCTATTG	6FAM-MGB (<i>mo1¹</i> résistant)

Amorces	séquence d'ADN '5'-3'
Fw-del- <i>mo1</i>	CAACAACATACATCGACCAA
Rev-del- <i>mo1</i>	CTCCCACTTAGGCTCGAT

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 <i>mo1²</i> des génotypes <i>mo1⁰</i> et <i>mo1¹</i> (SNP à la position nucléotidique 228) :			
		<u>Sonde</u>	<u>séquence d'ADN '5-'3</u>	<u>Couleur du fluorophore (facultatif)</u>	
		Pr-SNP228- <i>mo1</i>	CTCCCTCTGCTAAGTC	6FAM-MGB (sensible)	
		Pr-SNP228- <i>mo1²</i>	ACTCCCTCTCCTAAGT	VIC-MGB (<i>mo1²</i> résistant)	
		<u>Amorces</u>	<u>séquence d'ADN '5-'3</u>		
		Fw-SNP228- <i>mo1</i>	GCATCCGCTCGAGCATTC		
		Rev-SNP228- <i>mo1</i>	CTACCCCAAGCGACTTGCTT		
		Séquence d'amplicon : '5-'3			
		La séquence d'amplicon pour l'allèle <i>mo1⁰</i> et <i>mo1¹</i> :			
		TCAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAGCAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCC			
		La séquence d'amplicon pour l'allèle de résistance <i>mo1²</i> :			
		TCAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTCCTAAGTCCAAGCAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCC			
4.	Format de l'essai				
4.1	Nombre de plantes par génotype	au moins 20 plantes			
4.2	Variétés témoins	Allèle homozygote de sensibilité <i>mo1⁰</i> présent : Sprinter, Sucrine Allèle homozygote de résistance <i>mo1¹</i> présent : Capitan, Kanaryole Allèle homozygote de résistance <i>mo1²</i> présent : Corianas Mélanger 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 (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.			

⁶ Naktuinbouw : resistentie@naktuinbouw.nl

7.	Observations			
7.1	Échelle d'observations			
Essai 1 :				
	Fluorophore donnant le signal			
	FAM ($mo1^1$)	Texas Red ($mo1^0$ ou $mo1^2$)		
	-	x	Homozygote $mo1^0$ ou $mo1^2$, ou hétérozygotes $mo1^0$ et $mo1^2$	
	x	-	Homozygote $mo1^1$	
	x	x	Hétérozygotes $mo1^0$ et $mo1^1$ ou hétérozygotes $mo1^2$ et $mo1^1$	
	-	-	Aucun résultat, renouveler l'essai	
Essai 2 :				
	Fluorophore donnant le signal			
	FAM ($mo1^0$ ou $mo1^1$)	VIC ($mo1^2$)		
	(x) (FAM RFU << VIC RFU)	x	Homozygote $mo1^2$	
	x	-	Homozygote $mo1^0$ ou $mo1^1$, ou hétérozygotes $mo1^0$ et $mo1^1$	
	x	(x) (FAM RFU >> VIC RFU)	Hétérozygotes $mo1^0$ et $mo1^2$ ou hétérozygotes $mo1^1$ et $mo1^2$	
	-	-	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 (mo^0+mo1^1 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 ($mo1^2$)		
		absent	homozygote présent	hétérozygote
Essai 1 ($mo1^1$)	absent	sensible ($mo1^0$)	résistant ($mo1^2$)	sensible ($mo1^0/mo1^2$)
	homozygote présent	résistant ($mo1^1$)	pas possible (invalide)	pas possible (invalide)
	hétérozygote	sensible ($mo1^0/mo1^1$)	pas possible (invalide)	devrait être résistant, mais pas encore validé

Les plantes hétérozygotes ($mo1^0/mo1^1$ ou $mo1^2$) sont sensibles dans le cadre de l'essai biologique car $mo1$ est un gène récessif. Les plantes hétérozygotes ($[mo1^1] + [mo1^2]$) ont besoin de la conclusion d'un essai biologique.

Les variétés présentant un mélange de génotypes (plantes hétérozygotes, plantes homozygotes $mo1^0$ (phénotype prédit sensible) et plantes homozygotes $mo1^1$ ou $mo1^2$ (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]