

Comité technique

TC/59/13

Cinquante-neuvième session
Genève, 23 et 24 octobre 2023

Original: anglais
Date: 12 septembre 2023

REVISION PARTIELLE DES PRINCIPES DIRECTEURS D'EXAMEN DU CHOU-FLEUR

Document établi par un expert des Pays-Bas

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

Ce document a été généré à l'aide d'une traduction automatique dont l'exactitude ne peut être garantie. Par conséquent, le texte dans la langue originale est la seule version authentique.

1. L'objet du présent document est de présenter une proposition de révision partielle des principes directeurs d'examen du chou-fleur (document TG/45/7 Rev.).

2. À sa cinquante-septième session, le Groupe de travail technique sur les plantes potagères (TWV)¹, a examiné une proposition de révision partielle des principes directeurs d'examen du chou-fleur (*Brassica oleracea* L. convar *botrytis* (L.) Alef. var. *botrytis* L.) sur la base des documents TG/45/7 Rev. et TWV/57/20 "Partial revision of the Test Guidelines for Cauliflower" et a proposé les modifications suivantes (voir document TWV/57/26 "Report", paragraphe 63) :

- (a) Révision du caractère 25 "Fleur : couleur"
- (b) Ajout d'une nouvelle explication pour l'Ad. 25 "Fleur : couleur"
- (c) Révision de l'explication de l'Ad. 28 "Stérilité mâle"
- (d) Ajout de références au chapitre 9. "Bibliographie"

3. Le nouveau texte proposé est présenté ci-dessous. Les modifications proposées sont présentées en surbrillance et soulignées pour les insertions et ~~biffées~~ pour les suppressions dans l'annexe du présent document (en anglais uniquement).

Proposition de révision du caractère 25 "Fleur : couleur"

	English	français	deutsch	español	Example Varieties/ Exemples/ Beispielsorten/ Variedades ejemplo	Note/ Nota
25. VG/ (*) MS (+)	Flower: color	Fleur : couleur	Blüte: Farbe	Flor: color		
QL	white	blanche	weiß	blanco	Bruce, Ecrin	1
	yellow	jaune	gelb	amarillo	Flora Blanca, Lecerf	2

¹ Tenue à Antalya (Turquie) du 1 au 5 mai 2023.

Proposition d'ajout d'une nouvelle explication pour l'ad. 25 "Fleur : couleur"Ad. 25 : Fleur : couleur

Doit être soumis à un essai en plein champ et/ou à un test avec marqueurs d'ADN.

Dans le cas d'un essai en plein champ, l'observation est de type VG. Dans le cas d'un test avec marqueurs d'ADN, l'observation est de type MS.

Essai en plein champ :

Vérifier la couleur des fleurs.



Test avec marqueurs d'ADN

Le gène CCD4 est responsable de la couleur blanche des pétales de la variété *Brassica oleracea* L. convar *botrytis* (L.) Alef. var. *botrytis* L. La perte fonctionnelle de ce gène est responsable de la couleur jaune des pétales. Les marqueurs correspondant au gène fonctionnel et au gène non fonctionnel sont basés sur 3 SNP (polymorphismes nucléotidiques simples) sur la position ~1296bp dans les gènes (Han *et al.* 2019).

Les marqueurs peuvent être utilisés en multiplex avec le marqueur de stérilité masculine (ad. 28).

La présence du gène CCD4 fonctionnel ou non fonctionnel peut être détectée par les marqueurs codominants décrits.

Aspects spécifiques :

1.	Caractère	Fleur : couleur
2.	Gène opérationnel	Gène CCD4 fonctionnel : blanc Gène CCD4 non fonctionnel : jaune
3.1	Amorces	La température des amorces est de ~57 °C Amorce Forward : "5-CTGGATTCAACATCATTACAG CT-3" Amorce Reverse : '5-CGGTGACGAGATCGATCTTCA-3'
3.2	Sondes	Sonde blanche : '5-Fluorophore-ATCGCTCCAAATATTATGT-Quencer-3' Sonde jaune : '5-Fluorophore-GCTCCGAACGTTATGT-Quencer-3'
		Les sondes sont des sondes MGB (Applied biosystems) ou des sondes XS (Biolegio). La température des sondes doit être réglée à 67 °C. Les fluorophores peuvent être modifiés en fonction de leur compatibilité avec les filtres de la machine PCR en temps réel.
4.	Format de l'essai	
4.1	Nombre de plantes par génotype	au moins 20 plantes
4.2	Variétés témoins	Allèle homozygote pour le gène fonctionnel CCD4 (couleur blanche des pétales) présent : Ecrin Gène CCD4 fonctionnel et non fonctionnel hétérozygote présent (la variété est blanche) : Bruce Allèle homozygote pour le gène non fonctionnel CCD4 (couleur jaune des pétales) présent : Magnifico
6.	Conditions de la réaction en chaîne par polymérase (en fonction du mélange maître)	1. Étape de dénaturation initiale à 95 °C pendant 10 minutes 2. 40 cycles à 95 °C pendant 15 secondes et à 60 °C pendant 1 minute. Chaque cycle se termine avec la lecture d'une plaque.
8.	Interprétation des résultats de l'essai	
	Blanc (1)	La sonde pour le gène fonctionnel CCD4 (couleur blanche des pétales) est présente à l'état homozygote, la variété a des fleurs blanches. Les deux sondes sont présentes (hétérozygotes), la variété a des fleurs blanches.
	Jaune (2)	La sonde pour le gène non fonctionnel CCD4 (couleur jaune des pétales) est présente à l'état homozygote, la variété a des fleurs jaunes. Dans le cas où le résultat du test avec marqueurs d'ADN ne confirme pas la déclaration figurant dans le questionnaire technique, un essai en plein champ doit être effectué pour vérifier si la variété a des pétales blancs ou jaunes en raison d'un autre mécanisme.

Dans le cas d'un essai en plein champ, l'observation est de type VS. Dans le cas d'un test avec marqueurs d'ADN, l'observation est de type MS.

Proposition de révision de l'explication de l'ad. 28 "Stérilité mâle"Ad. 28 : Stérilité mâle

Doit être soumis à un essai en plein champ et/ou un test avec marqueurs d'ADN².

Dans le cas d'un essai en plein champ, l'observation est de type VS. Dans le cas d'un test avec marqueurs d'ADN, l'observation est de type MS.

Essai en plein champ :

Absente : >70% des plantes sont fertiles (variétés à fécondation libre ou variétés hybrides produites avec un système d'auto-incompatibilité)

Partielle : 30% à 70% des plantes sont fertiles (variétés hybrides produites avec une stérilité mâle génique, à l'état hétérozygote)

Total : <30% des plantes sont fertiles (variétés hybrides produites avec une stérilité mâle cytoplasmique)



mâle fertile (présence de pollen)



mâle stérile (absence de pollen)

Test avec marqueurs d'ADN ou essai en plein champ :

Les variétés déclarées mâles fertiles (niveau 1) ou totalement mâles stériles (niveau 3) dans le questionnaire technique peuvent faire l'objet d'un examen lors d'un essai en plein champ ou d'un test avec marqueurs d'ADN. Les variétés présentant une stérilité mâle partielle (niveau 2) et les lignées à multiplication végétative présentant une stérilité mâle totale (niveau 3) ne peuvent pas être examinées dans le cadre d'un test avec marqueurs d'ADN mais doivent être observées dans le cadre d'un essai en plein champ.

Il convient de noter qu'il existe des lignées qui sont mâles stériles en raison du gène homozygote récessif de la stérilité mâle monogénique. Ces lignées sont utilisées pour la production d'hybrides qui seront alors mâles fertiles. Cependant, lorsqu'une lignée mère hétérozygote est utilisée, les hybrides produits seront mâles partiellement stériles (niveau 2). En raison de leur nature, ces lignées doivent être multipliées par voie végétative. Elles sont mâles stériles mais ne possèdent pas le marqueur d'ADN de la stérilité mâle CMS. Les lignées mâles stériles multipliées par voie végétative ne peuvent donc pas être examinées dans le cadre d'un test avec marqueurs d'ADN, mais doivent être observées dans le cadre d'un essai en plein champ.

Dans les cas où seul un test avec marqueurs d'ADN est autorisé (variétés reproduites par voie sexuée des niveaux 1 et 3), si le marqueur CMS ne semble pas être présent, la variété est censée avoir des fleurs mâles fertiles. Dans les cas où le marqueur CMS est présent, la variété est censée avoir des fleurs mâles stériles. Toutes les variétés déclarées partiellement stériles (niveau 2) et les lignées multipliées par voie végétative déclarées mâles totalement stériles (niveau 3) doivent être soumises à un essai en plein champ.

Si le résultat du test avec marqueurs d'ADN ne confirme pas la déclaration figurant dans le questionnaire technique, il convient d'effectuer un essai en plein champ pour vérifier si la variété présente des fleurs mâles fertiles ou mâles stériles ou s'il s'agit d'une ségrégation due à un autre mécanisme.

Le marqueur peut être utilisé en multiplex avec les marqueurs de la couleur des fleurs (ad. 25).

² La description de la méthode d'examen pour tester la stérilité mâle de *Brassica* (le marqueur CMS) est couverte par le secret d'affaires. Le détenteur du secret d'affaires, Syngenta Seeds B.V., a donné son consentement pour l'utilisation aux seules fins de l'examen de la distinction, de l'homogénéité et de la stabilité (examen DHS) et de l'élaboration des descriptions variétales par l'UPOV et les services des membres de l'UPOV. Syngenta Seeds B.V. déclare que ni l'UPOV ni les services des membres de l'UPOV qui utilisent le marqueur CMS aux fins susmentionnées ne seront tenus responsables d'une éventuelle utilisation abusive du marqueur CMS par des tiers. Veuillez prendre contact avec Naktuinbouw (Pays-Bas) pour obtenir la méthode et des informations concernant le marqueur CMS aux fins susmentionnées.

Proposition d'ajout de références au chapitre 9. "Bibliographie"9. Bibliographie

Fengqing Han, Huilin Cui, Bin Zhang, Xiaoping Liu, Limei Yang, Mu Zhuang, Honghao Lv, Zhansheng Li, Yong Wang, Zhiyuan Fang, Jianghua Song and Yangyong Zhang, 2019: Map-based cloning and characterization of BoCCD4, a gene responsible for white/yellow petal color in *B. oleracea* BMC Genomics. 20:242

Fujime, Y., 1983: Studies on Thermal Conditions of Curd Formation and Development in Cauliflower and Broccoli, with Special Reference to Abnormal Curd Development. Memoires of Faculty of Agriculture, Kagawa University, No. 40, February 1983, pp. 1-123, JP.

Gray, A.R., 1989: Taxonomy and Evolution of Broccoli and Cauliflower. Baileya 23 (1), pp. 28-46.

Nieuwhof, M., 1969: Cole Crops. World Crops Books: Leonard Hill, London, GB.

Sadik, S., 1962: Morphology of the curd of cauliflower. Amer. Bot. 49, pp. 290-297.

Tsunoda, S., Hinata, K., and Gomez-Campo, C., 1980: Brassica Crops and Wild Allies. Biology and Breeding, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, JP.

Wiebe, H.J., 1972/73: Wirkung von Temperatur und Licht auf Wachstum und Entwicklung von Blumenkohl. Gartenbauwissenschaft 37, pp. 165-178, 37, pp. 293-303, 37, pp. 455-469, 38, pp. 263-279, 38, pp. 433-440.

Wiebe, H.J., 1975: The Morphological development of cauliflower and broccoli cultivars depending on temperature. Sci. Hort. 3, pp. 95-101.

Wiebe, H.J., 1981: Influence of transplant characteristics and growing conditions on curd size (buttoning) of cauliflower. Acta Hort. 122, pp. 99-105.

[L'annexe suit]

PROPOSITIONS DE MODIFICATIONS PRÉSENTÉES EN SURBRILLANCE
(en anglais uniquement)

Proposed revision of Characteristic 25 “Flower: color”

	English	français	deutsch	español	Example Varieties/ Exemples/ Beispielssorten/ Variedades ejemplo	Note/ Nota
25. VG/ (*) MS (+)	Flower: color	Fleur : couleur	Blüte: Farbe	Flor: color		
QL	white	blanche	weiß	blanco	Bruce, Ecrin	1
	yellow	jaune	gelb	amarillo	Flora Blanca, Lecerf	2

Proposed addition of new explanation Ad. 25 Characteristic 25 “Flower: color”

Ad 25: Flower: color

To be tested in a field and/or in a DNA marker test.

In the case of a field trial, the type of observation is VG. In the case of a DNA marker test, the type of observation is MS.

Field trial:

Check de color of flowers.



1
white

2
yellow

DNA marker test:

The gene CCD4 is responsible for the white petal color in *Brassica oleracea* L. convar *botrytis* (L.) Alef. var. *botrytis* L. Functional loss of this gene is responsible for the yellow petal color. The markers corresponding with the functional gene and nonfunctional gene are based on 3 SNP's on position ~1296bp in the genes (Han et al. 2019).

The markers can be performed in multiplex with the marker for male sterility (Ad. 28).

The presence of the functional or nonfunctional CCD4 gene can be detected by the described co-dominant markers.

Specific aspects:

1.	<u>Characteristic</u>	<u>Flower: color</u>
2.	<u>Functional gene</u>	<u>Functional CCD4 gene : white</u> <u>Nonfunctional CCD4 gene: yellow</u>
3.1	<u>Primers</u>	<u>Tm of the primers is ~57°C</u> <u>Forward Primer: "5-CTGGATTCAACATCATTACAG CT-3"</u> <u>Reverse Primer: '5-CGGTGACGAGATCGATCTTCA-3'</u>
3.2	<u>Probes</u>	<u>White Probe: '5-Fluorophore-ATCGCTCCAAATATTATGT-Quencer-3'</u> <u>Yellow Probe: '5-Fluorophore-GCTCCGAACGTTATGT-Quencer-3'</u>
		<u>The probes are MGB probes (Applied biosystems) or XS probes (Biolegio). The Tm of the probes must be ordered at 67°C.</u> <u>Fluorophores can be modified according to compatibility with the filters on the real-time PCR machine.</u>
4.	<u>Format of the test</u>	
4.1	<u>Number of plants per genotype</u>	<u>at least 20 plants</u>
4.2	<u>Control varieties</u>	<u>Homozygous allele for functional CCD4 gene (white petal color) present: Ecrin</u> <u>Heterozygous functional and nonfunctional CCD4 gene present (variety is white): Bruce</u> <u>Homozygous allele for nonfunctional CCD4 gene (yellow petal color) present: Magnifico</u>
6.	<u>PCR conditions</u> <u>(mastermix dependent)</u>	<u>1. Initial denaturation step 10 min 95 °C</u> <u>2. 40 cycles 15 sec 95 °C and 1 min 60°C. Every cycle ends with a plate reading.</u>
8.	<u>Interpretation of test results</u>	
	<u>White (1):</u>	<u>Probe for functional CCD4 gene (white petal color) is homozygous present, variety has white flowers.</u> <u>Both probes are present (heterozygous), the variety has white flower.</u>
	<u>Yellow (2)</u>	<u>Probe for nonfunctional CCD4 gene (yellow petal color) is homozygous present, the variety has yellow flowers.</u> <u>In case the DNA marker test result does not confirm the declaration in the TQ, a field trial should be performed to observe whether the variety has white or yellow flowers due to another mechanism.</u>

In case of a field trial, type of observation is VS. In case of a DNA marker test, type of observation is MS.

Proposed revision of explanation Ad. 28 “Male sterility”

Ad. 28: Male sterility

To be tested in a field trial and/or in a DNA marker test³.

In the case of a field trial, the type of observation is VG VS. In the case of a DNA marker test, the type of observation is MS.

Field trial:

Absent: >70% of the plants fertile (open-pollinated varieties or hybrid varieties produced with self-incompatibility system)
Partial: 30% to 70% of the plants fertile (hybrid varieties produced with genic male sterility, in heterozygous state)
Total: < 30% of the plants fertile (hybrid varieties produced with cytoplasmic male sterility)



male fertile (pollen present)



male sterile (pollen absent)

DNA marker test and/or field trial:

All Varieties declared male fertile (state 1) or total male sterile (state 3) in the TQ, can be examined in a field trial or in a DNA marker test.

Varieties with partial male sterility (state 2) and vegetatively propagated, total male sterile lines (state 3) cannot be examined in a DNA marker test but must be observed in a field trial.

It should be noted that lines exist which are male sterile due to the homozygous recessive monogenic male sterility (GMS) gene. These lines are used for the production of hybrids which then normally will be male fertile. However when a heterozygous mother line is used, the produced hybrids will be partially male sterile (state 2). Due to their nature these lines have to be propagated vegetatively. They are male sterile but do not have the DNA marker for the presence of CMS male sterility. So vegetatively propagated male sterile lines cannot be examined in a DNA marker test but must be observed in a field trial.

For the cases where only a DNA marker test is allowed (state 1 and state 3 seed propagated varieties), if the CMS marker appears to be not present, a field trial should be performed to observe whether the variety is male sterile (on another mechanism) or fertile. the variety is expected to have male fertile flowers. In cases where the CMS marker is present, the variety is expected to have male sterile flowers. All varieties declared fertile are to be tested in a field trial. All varieties declared partially sterile (state 2) and vegetatively propagated lines declared total male sterile (state 3) should be tested in a field trial.

In case the DNA marker test result does not confirm the declaration in the TQ, a field trial should be performed to observe whether the variety has male fertile or male sterile flowers or is segregating due to another mechanism.

The marker can be performed in multiplex with the markers for flower color (Ad. 25).

³ The description of the method to test male sterility for *Brassica* (CMS marker) is covered by a trade secret. The owner of the trade secret, Syngenta Seeds B.V., has given its consent for the use of the CMS marker solely for the purposes of examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS) and for the development of variety descriptions by UPOV and authorities of UPOV members. Syngenta Seeds B.V. declares that neither UPOV, nor authorities of UPOV members that use the CMS marker for the above purposes will be held accountable for possible (mis)use of the CMS marker by third parties. Please contact Naktuinbouw, Netherlands, to obtain the method and information on the CMS marker for the purposes mentioned above.

Proposed addition of references to Chapter 9. "Literature"

9. Literature

Fengqing Han, Huilin Cui, Bin Zhang, Xiaoping Liu, Limei Yang, Mu Zhuang, Honghao Lv, Zhansheng Li, Yong Wang, Zhiyuan Fang, Jianghua Song and Yangyong Zhang, 2019: Map-based cloning and characterization of BoCCD4, a gene responsible for white/yellow petal color in *B. oleracea* BMC Genomics. 20:242

Fujime, Y., 1983: Studies on Thermal Conditions of Curd Formation and Development in Cauliflower and Broccoli, with Special Reference to Abnormal Curd Development. Memoires of Faculty of Agriculture, Kagawa University, No. 40, February 1983, pp. 1-123, JP.

Gray, A.R., 1989: Taxonomy and Evolution of Broccoli and Cauliflower. Bailey 23 (1), pp. 28-46.

Nieuwhof, M., 1969: Cole Crops. World Crops Books: Leonard Hill, London, GB.

Sadik, S., 1962: Morphology of the curd of cauliflower. Amer. Bot. 49, pp. 290-297.

Tsunoda, S., Hinata, K., and Gomez-Campo, C., 1980: Brassica Crops and Wild Allies. Biology and Breeding, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, JP.

Wiebe, H.J., 1972/73: Wirkung von Temperatur und Licht auf Wachstum und Entwicklung von Blumenkohl. Gartenbauwissenschaft 37, pp. 165-178, 37, pp. 293-303, 37, pp. 455-469, 38, pp. 263-279, 38, pp. 433-440.

Wiebe, H.J., 1975: The Morphological development of cauliflower and broccoli cultivars depending on temperature. Sci. Hort. 3, pp. 95-101.

Wiebe, H.J., 1981: Influence of transplant characteristics and growing conditions on curd size (buttoning) of cauliflower. Acta Hort. 122, pp. 99-105.

[Fin de l'annexe et du document]