



Disclaimer: unless otherwise agreed by the Council of UPOV, only documents that have been adopted by the Council of UPOV and that have not been superseded can represent UPOV policies or guidance.

This document has been scanned from a paper copy and may have some discrepancies from the original document.

Avertissement: sauf si le Conseil de l'UPOV en décide autrement, seuls les documents adoptés par le Conseil de l'UPOV n'ayant pas été remplacés peuvent représenter les principes ou les orientations de l'UPOV.

Ce document a été numérisé à partir d'une copie papier et peut contenir des différences avec le document original.

Allgemeiner Haftungsausschluß: Sofern nicht anders vom Rat der UPOV vereinbart, geben nur Dokumente, die vom Rat der UPOV angenommen und nicht ersetzt wurden, Grundsätze oder eine Anleitung der UPOV wieder.

Dieses Dokument wurde von einer Papierkopie gescannt und könnte Abweichungen vom Originaldokument aufweisen.

Descargo de responsabilidad: salvo que el Consejo de la UPOV decida de otro modo, solo se considerarán documentos de políticas u orientaciones de la UPOV los que hayan sido aprobados por el Consejo de la UPOV y no hayan sido reemplazados.

Este documento ha sido escaneado a partir de una copia en papel y puede que existan divergencias en relación con el documento original.

UPOV

TC/XV/2

ORIGINAL: anglais

DATE: 15 février 1980

UNION INTERNATIONALE POUR LA PROTECTION DES OBTENTIONS VÉGÉTALES

GENÈVE

COMITE TECHNIQUE

Quinzième session
Genève, 18 et 19 mars 1980

INCIDENCES DES METHODES PLUS PERFECTIONNEES TELLES QUE
L'ELECTROPHORESE OU LES METHODES BIOCHIMIQUES SUR
L'EXAMEN DES CARACTERES DISTINCTIFS

Document préparé par le Bureau de l'Union

1. Au cours de sa quatorzième session (novembre 1979), le Comité technique a débattu de la question de savoir si l'électrophorèse pourrait être utilisée comme moyen d'évaluer les possibilités de distinction des variétés dans la procédure en vue de l'octroi de droits d'obtenteurs. Il a été convenu de poursuivre le débat sur ce problème au cours de la quinzième session du Comité technique. (Voir le paragraphe 26 du document TC/XIV/5).

2. Deux documents de travail ont été rédigés, pour faciliter les débats envisagés au Comité technique, l'un par des experts du Royaume-Uni et l'autre par des experts des Pays Bas. Ils figurent respectivement aux annexes I et II du présent document.

[Deux annexes suivent]

L'ELECTROPHORESE EN TANT QUE MOYEN D'EVALUER LES
POSSIBILITES DE DISTINCTION DES VARIETES

(Document de travail préparé par des experts
du Royaume-Uni)

1. RAPPEL

L'électrophorèse existe en tant que technique depuis un certain nombre d'années. Elle se fonde sur le fait que certaines macromolécules se déplacent sur un support à des vitesses différentes lorsqu'on les soumet à un champ électrique. La vitesse de déplacement dépend, entre autres, de la charge de la molécule et de la porosité du support. Des améliorations et des raffinements ont conduit à des variantes telles que l'électrophorèse de zone sur divers supports, sur gel à gradient de concentration et à concentration au point isoélectrique; les molécules ayant fait l'objet de cette méthode de séparation vont des acides aminés aux enzymes et protéines.

Le nombre des différentes techniques qui peuvent être appliquées en vue de la séparation de molécules différentes est grosso modo une fonction des variables suivantes :

"Poids moléculaire; charge moléculaire; porosité du support; système tampon; différence de potentiel électrique aux extrémités du support; technique de coloration; technique de lecture".

De ce qui précède on constatera que l'électrophorèse n'est pas une technique unique mais offre des possibilités nombreuses et variées.

En bref, les résultats d'une séparation par électrophorèse apparaissent sous forme d'une série de bandes de largeurs différentes sur le support après coloration appropriée. Ces bandes peuvent varier d'un cultivar à l'autre par leur position, leur nombre et leur intensité. La formule "nettement distinct" serait très probablement interprétée comme s'appliquant à des différences relatives à la présence ou à l'absence de bandes plutôt qu'à des différences d'intensité de bandes similaires.

2. USAGE COURANT

Diverses techniques électrophorétiques ont été utilisées par les minotiers, les sélectionneurs et les chercheurs depuis un certain nombre d'années. La mise au point de tests spécifiques est actuellement effectuée au Royaume-Uni sous les auspices de l'Agricultural Research Council à Rothamsted (pour l'orge), du Plant Breeding Institute (pour le blé) et de la Welsh Plant Breeding Station (pour les graminées fourragères). On sait par ailleurs que la Brewing Industry Research Foundation et le Lord Rank Research Centre utilisent aussi une ou plusieurs de ces techniques. Pour le commerce, leur intérêt principal réside apparemment dans le fait qu'elles constituent un moyen rapide de confirmer l'identité, par exemple, de lots de grains ou de farine de blé par référence aux gliadines. D'autres techniques ont été utilisées pour la séparation d'isoenzymes et d'hor-déines. L'électrophorèse est utilisée aux fins de l'examen des caractères distinctifs, de l'homogénéité et de la stabilité en France, où l'on recourt à une seule technique, pour la séparation des gliadines du blé d'hiver, selon des procédures rigoureusement normalisées. Son utilisation est restreinte aux demandes d'inscription au catalogue national se rapportant à des variétés présentant une valeur agronomique et une valeur d'utilisation satisfaisantes. Il semblerait que la technique soit considérée comme insuffisamment fiable aux fins de la protection des obtentions végétales; dans ce domaine les considérations de valeur agronomique et de valeur d'utilisation ne sont pas pertinentes et les décisions reposent uniquement sur les critères de distinction, d'homogénéité et de stabilité.

En Suède, des droits d'obtenteur ont été accordés pour deux nouvelles variétés de Festuca rubra sur la base de caractères distinctifs établis par électrophorèse.

3. COHERENCE DES RESULTATS

Alors qu'il est admis que la technique est au point en ce qui concerne ses aspects chimiques, il semble que les difficultés rencontrées en France et mentionnées ci-dessus tiennent, au moins en partie, au fait que des lots différents d'amidon et de substances chimiques donnent des résultats quelque peu différents. Dans leurs efforts pour surmonter cette difficulté, les services d'examen, les agences de certification des semences, les sélectionneurs, les minotiers et toutes les autres personnes utilisant le test sont convenus en France d'un mode d'emploi extrêmement précis. Il semble qu'en dépit de cela, il subsiste des difficultés dans l'interprétation des résultats avec le degré de précision dont on aura probablement besoin.

4. OUTIL DE ROUTINE OU TEST SPECIAL ?

Si une technique particulière devait être érigée en test de routine, il faudrait que tous les sélectionneurs soient consultés.

L'introduction d'un test de routine signifierait que tous les sélectionneurs devraient procéder à leurs propres tests sur le matériel qu'ils fournissent et il est douteux que beaucoup d'entre eux soient en mesure de le faire, au moins pour le moment. Une autre solution consisterait à n'utiliser la technique que lorsqu'un demandeur revendique une différence dans son questionnaire technique déposé en même temps que la demande. Avec certaines limitations quant à la possibilité de recourir de façon pratique à un test et de le répéter, les procédures actuelles permettent cette démarche et les principes directeurs d'examen de l'UPOV mentionnent le fait que les listes de caractères ne sont pas exhaustives et que des caractères peuvent y être ajoutés lorsqu'ils se sont révélés utiles.

5. HOMOGENEITE ET STABILITE

Pour vérifier l'homogénéité dans le cas des espèces autogames telles que le blé, l'orge et l'avoine avec la précision habituelle, il faut, compte tenu des niveaux d'homogénéité courants, examiner un échantillon d'environ 400 grains. Cela peut soulever des difficultés d'ordre matériel et des problèmes de volume de travail. Toutefois, le problème probablement le plus important serait posé aux sélectionneurs, qui devraient veiller à ce que le matériel qu'ils soumettent soit suffisamment homogène dans sa réaction électrophorétique. Ellis (1977) rapporte qu'un certain nombre de variétés actuellement inscrites dans un catalogue ne sont pas génétiquement pures dans leur réaction électrophorétique. Un autre problème se pose lorsqu'il s'agit de distinguer une nouvelle variété d'une espèce autogame (qui devrait être homogène) d'une variété existante (qui peut ne pas être homogène), car une différence pourrait n'être mise en évidence que sur une partie des grains examinés.

Il faudra étudier tout particulièrement les niveaux d'homogénéité que l'on peut s'attendre à trouver dans les espèces allogames.

Alors qu'il n'y a pas de raison de croire que dans le cas des céréales une variété morphologiquement homogène serait instable dans sa réaction électrophorétique, on considère comme douteux que les sélectionneurs d'espèces allogames, telles que les graminées fourragères, soient en mesure de maintenir l'électrophorogramme tel qu'il a été défini lorsque la variété a été inscrite pour la première fois au catalogue.

6. AVANTAGES ET INCONVENIENTS

6.1 Avantages

- 6.1.1 Frais de main d'oeuvre relativement bas, puisque les tests peuvent être effectués par du personnel entraîné après la mise au point du procédé de routine.

- 6.1.2 Résultats relativement rapides. Par exemple, une manipulation électrophorétique peut être terminée en 48 heures.
- 6.1.3 Test applicable aux graines isolées ou aux parties de graines (mais celles-ci sont normalement détruites).
- 6.1.4 Test n'exigeant que peu d'espace de laboratoire.
- 6.1.5 Equipement relativement bon marché.
- 6.1.6 Résultats normalement pas soumis à l'influence du milieu dans lequel la plante est cultivée.

6.2 Inconvénients

- 6.2.1 Une petite prise d'essai peut conduire à des anomalies dans les résultats; en conséquence il serait préférable de s'en tenir à la présence de bandes plutôt qu'à l'intensité des bandes.
- 6.2.2 L'utilisation de la technique exigerait une période de rodage assez longue, et une consultation des organisations de sélectionneurs afin de respecter les engagements déjà pris au sujet de l'introduction de nouvelles techniques.
- 6.2.3 Une application à grande échelle exigerait trop de tests si l'on s'en tenait aux niveaux d'homogénéité actuellement en vigueur pour l'examen des caractères distinctifs, de l'homogénéité et de la stabilité (1%) et pour la certification (0,05%). Toute autre solution équivaldrait à une réduction du niveau d'homogénéité escompté.
- 6.2.4 L'utilisation de semences entières ou de parties de semences peut se traduire par l'impossibilité de procéder à des tests de descendance à des fins de confirmation.
- 6.2.5 Bien que ce ne soit pas un inconvénient à proprement parler, il convient de noter que jusqu'à présent presque toutes les techniques d'électrophorèse ont été appliquées à des variétés qui ont déjà subi avec succès la procédure actuelle d'examen des caractères distinctifs, de l'homogénéité et de la stabilité. Les résultats obtenus en France et au Royaume-Uni montrent que des variétés qui sont morphologiquement distinctes peuvent présenter des diagrammes de répartition des bandes identiques.
- 6.2.6 Il est difficile de choisir dans le vaste éventail de tests électrophorétiques disponibles celui qui est le plus approprié pour la résolution du problème dont il s'agit ici.
- 6.2.7 Certains produits chimiques nécessaires sont soumis à des restrictions d'utilisation édictées dans le cadre de la législation sur la sécurité et l'hygiène du travail.

7. COUTS

Alors que le coût initial de l'équipement de laboratoire peut être élevé, celui qu'entraîne l'usage des techniques électrophorétiques pour des tests spéciaux ne serait pas important. Si ces techniques devaient être introduites comme tests de routine pour toutes les variétés, le coût serait considérable. Il se pourrait que ces techniques trouvent une application suffisamment large pour remplacer les essais en culture. Pour le moment il s'agit là de conjecture et cela est considéré comme très improbable. Aussi faut-il s'attendre à ce que le coût des tests électrophorétiques quels qu'ils soient viennent s'ajouter au coût des essais en culture.

Il semble qu'au moins aux stades initiaux un biochimiste expérimenté et entraîné serait nécessaire.

8. CONCLUSIONS

En raison des difficultés connues, un complément de recherche sur l'application éventuelle de ces techniques, plus particulièrement à l'examen des caractères distinctifs, de l'homogénéité et de la stabilité, doit être entrepris avant qu'on ne puisse envisager l'acceptation soit comme tests de routine, soit comme tests spéciaux. Les possibilités qu'offrent ces techniques se révèlent considérables, mais le danger existe de se laisser entraîner dans une voie dont on ne sait pas jusqu'où elle mène et dans toute une gamme de tests sans qu'une étude préparatoire n'ait été faite.

9. REFERENCES

Choix de références (relatives à de larges éventails de variétés)

SCANDALIOS, J.G. (1969). *Biochemical Genetics* 3, 37-39

ELLIS, J.R.S., DOLING, D.A. (1976). *Agricultural Merchant* (octobre) p.3

LEBACK, D.H. (1978). *Laboratory Equipment Digest* (janvier) 1978

ALMGARD, G. & NORMAN, T. (1970). *Agri Hortique Genetica* 28, 117 - 123

WRIGLEY, C.W., SHEPHERD, K.W. (1974). *Aust. J. Esp. Agric. & Animal Husbandry*,
14, 796 - 804

AUTRAN, J.C., BOURDET, A. (1975). 25 3 *Ann. Amélior. Plantes*, 277 - 301

ELLIS, J.R.S., BEMINSTER, G.H. (1977). *Journal NIAB*. 14, 221 - 231.

[L'annexe II suit]

REMARQUES SUR LES POSSIBILITES D'UTILISATION DE NOUVELLES TECHNIQUES
ET EN PARTICULIER DE L'ELECTROPHORESE DANS L'ETUDE DES VARIETES

(Document de travail préparé par des experts des Pays-Bas)

Introduction

Lors de sa dernière session, le Comité technique a décidé d'examiner à sa session suivante de mars 1980 les incidences que l'adoption de techniques perfectionnées pourrait avoir sur les droits d'obtenteur de plantes.

L'électrophorèse des protéines illustre ce problème.

D'autres exemples possibles sont l'utilisation ou l'extension de l'utilisation des techniques suivantes :

- Chromatographie en phase gazeuse et chromatographie en phase liquide à haute pression
- Réactions aux produits chimiques, notamment les pesticides et les indicateurs d'activité enzymatique
- Réactions immunitaires
- Colorimétrie dans le spectre visible de la lumière, le spectre ultraviolet, le spectre infrarouge et autres
- Microscopie à haut pouvoir de résolution.

L'utilisation assez étendue de l'électrophorèse des protéines permet de faire le point de la situation. Etant donné que les points de vue des autorités compétentes des Etats de l'Union risquent d'être ou sont parfois divergents, il paraît souhaitable d'examiner le problème.

Il n'est pas demandé au Comité technique de rouvrir le débat sur les caractères déjà retenus dans les principes directeurs adoptés pour la conduite de l'examen des caractères distinctifs, de l'homogénéité et de la stabilité.

Il n'est pas non plus question d'évoquer l'utilisation du matériel moderne qui apparaît actuellement afin d'analyser de façon plus efficace et plus objective les caractères établis.

Au contraire, le débat devrait porter sur l'adoption éventuelle, comme "caractère de nouveauté", d'un caractère

- a. qui n'a pas encore été retenu pour l'espèce considérée,
- b. qui n'est pas immédiatement visible et nécessite l'utilisation d'un appareillage et d'un savoir-faire spécialisés,
- c. qui, pour autant qu'on le sache, n'est pas en rapport avec les propriétés fonctionnelles de la variété.

Il conviendrait que le Comité évalue très soigneusement dans quelles conditions l'adoption de nouveaux caractères serait conforme au préambule de la Convention, c'est-à-dire servirait le développement de l'agriculture et la sauvegarde des intérêts des obtenteurs, au cas où ces caractères seraient utilisés pour l'octroi de droits d'obtenteur.

L'électrophorèse

Le terme "électrophorèse" désigne un procédé physico-chimique qui consiste à séparer des particules chargées électriquement en utilisant leurs différences de mouvements dans un champ électrique. Si l'on place une électrode positive et une électrode négative dans un fluide contenant des particules chargées, les particules portant une charge négative se dirigent vers l'électrode positive (l'anode) et les particules portant une charge positive se déplacent vers l'électrode négative (la cathode).

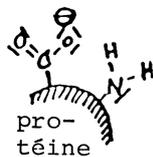
La vitesse de déplacement de ces particules dépend notamment des facteurs suivants :

1. intensité du champ électrique (tension)
2. température et viscosité du liquide
3. charge des particules
4. dimensions et forme des particules.

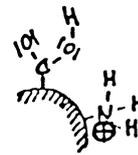
Les facteurs 3 et 4 sont des propriétés des particules qui peuvent varier beaucoup d'une substance à l'autre et par conséquent, ces particules peuvent être séparées en raison de leur vitesse de déplacement différente dans un champ électrique.

Les protéines telles que les protéines de réserve et les enzymes, que l'on trouve dans le suc des plantes, sont de très grosses molécules portant une charge électrique.

La charge électrique et sa polarité dépendent de l'acidité (le pH) du solvant : en milieu acide, les groupes alcalins d'une molécule (par exemple $-NH_2$) sont dissociés et portent une charge électrique tandis que les groupes acides n'en portent pas. En milieu alcalin, c'est l'inverse (voir figure).



milieu alcalin

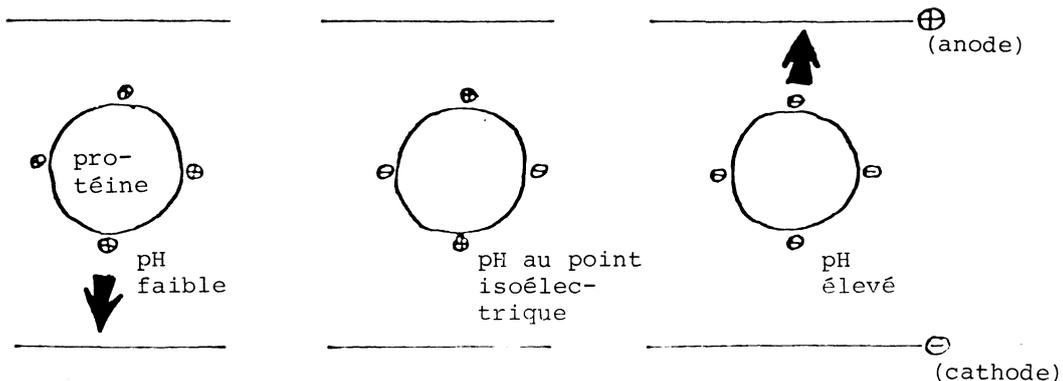


milieu acide

La direction du déplacement des molécules de protéine ne dépend donc pas seulement de la polarité du courant électrique mais aussi de l'acidité (pH) du solvant.

Par conséquent, aussi, pour chaque type de molécule de protéine, il existe un pH particulier du solvant pour lequel on obtiendra la dissociation d'une même quantité de groupes acides et alcalins sur la molécule, ce qui rendra cette molécule électriquement neutre dans son ensemble et l'empêchera de se déplacer si l'on applique un courant électrique.

Cette acidité (ou ce pH) prend des valeurs différentes pour les différents types de protéines; on la dénomme "point isoélectrique".



Plus de charges positives que de charges négatives. La protéine se déplace vers la cathode.

Même quantité de charges positives et de charges négatives. La protéine ne se déplace pas.

Plus de charges négatives que de charges positives. La protéine se déplace vers l'anode.

Le point isoélectrique est utilisé dans un type particulier d'électrophorèse qu'on appelle la "concentration au point isoélectrique".

En principe, on peut procéder à l'électrophorèse dans différents milieux comme le papier ou les films plastiques poreux, mais on utilise la plupart du temps des gels d'agar, d'amidon ou de polyacrylamide. Le gel de polyacrylamide est un système moléculaire réticulé à trois dimensions, que l'on obtient par polymérisation de l'acrylamide et d'un agent de réticulation éthylènebisacrylamide. Ainsi s'explique l'appellation "électrophorèse sur gel de polyacrylamide". Le gel de polyacrylamide a, par rapport aux autres supports, l'avantage que l'on peut agir sur la dimension des pores en modifiant la concentration du monomère et de l'agent de réticulation.

Comme la charge des molécules de protéines dépend du pH du solvant, l'électrophorèse doit s'opérer dans une solution tamponnée. On polymérise donc le gel dans le tampon afin de maintenir le pH constant à la valeur requise pendant toute l'opération.

Les molécules du mélange de protéines que l'on doit analyser se déplacent dans le gel sous l'action du courant électrique et lorsqu'elles ont parcouru une distance suffisante, on retire le gel de l'appareil et l'on rend les bandes de protéines visibles par coloration. Cette coloration peut être obtenue indifféremment au moyen de composés qui colorent toutes les protéines présentes dans le gel mais aussi de façon spécifique sur certains systèmes enzymatiques. Avec les procédés non spécifiques (par exemple, la coloration au bleu brillant Coomassie), seules les protéines présentes en assez grande quantité deviennent visibles. Les procédés spécifiques permettent de rendre visibles de très petites quantités d'enzymes. On procède alors en utilisant un composé spécifiquement transformé en un composé coloré insoluble par les enzymes présents dans le gel. A tous les endroits du gel où se trouvent des enzymes, on voit apparaître une coloration en bandes. Il existe maintenant des réactifs de coloration de ce type pour de nombreux systèmes enzymatiques.

Les types les plus utilisés d'électrophorèse sont les suivants :

1. l'électrophorèse "ordinaire" : la migration des protéines se fait dans un gel de porosité homogène et à pH constant;
2. l'électrophorèse à gradient de densité : la migration des protéines se fait dans un gel de pH constant mais selon un itinéraire de porosité décroissante;
3. l'électrophorèse à gradient de pH (concentration au point isoélectrique) : la migration des protéines se fait dans un gel de porosité constante mais à pH variable. Par conséquent, une molécule parvenue à un certain endroit dans le gel se trouve à un pH auquel elle est électriquement neutre et n'ira pas plus loin (c'est le point isoélectrique). Chaque composant du mélange de protéines se concentre donc dans le gel à l'endroit où le pH est égal à son point isoélectrique. On peut ainsi séparer des substances de façon extrêmement fine et obtenir des diagrammes de bandes composés d'un grand nombre de bandes très minces;
4. l'électrophorèse SDS : on peut utiliser les procédés No 1 et 2 ci-dessus mais le mélange de protéines est traité avec un puissant agent tensioactif (sulfate de lauryl-sodium) qui permet d'obtenir la désintégration des molécules de protéines.

Les diagrammes de bandes obtenus par ce procédé se sont révélés très typiques des variétés utilisées et indépendants des conditions du milieu dans lequel a été cultivée la variété. On sait par exemple qu'un apport supplémentaire d'engrais azotés élève la teneur en protéines de la plante mais les quantités relatives des différents composants du mélange ne seront pas modifiées. Le diagramme n'est pas modifié non plus par des facteurs tels que le climat, le temps ou le type de sol.

Différentes parties de la plante donnent des électrophorégrammes particuliers. L'électrophorèse et ses variantes peuvent faire apparaître de faibles différences, par exemple entre des isoenzymes, c'est-à-dire des protéines catalysant la même réaction chimique mais différant par des éléments mineurs de leur structure.

On utilise à l'heure actuelle l'électrophorèse dans la pratique pour identifier les lots de semences de blé et d'orge et pour l'identification des pommes de terre.

On l'utilise aussi pour le contrôle de l'endogamie dans la production des variétés hybrides de Brassica. Il ne fait aucun doute que l'électrophorèse constitue un précieux outil d'identification des variétés.

La question de savoir si cette technique est valable pour l'admission de variétés nouvelles est d'un autre ordre.

La réponse dépend d'un certain nombre de considérations et notamment des suivantes :

1. le nombre des techniques différentes semble virtuellement illimité;
2. l'utilisation d'une technique déterminée pour l'admission d'une variété exige que la même méthode soit utilisée aussi pour le maintien et le contrôle de cette variété;
3. dès lors que l'on adopte une méthode pour établir la distinction d'une variété déterminée, il faut aussi appliquer cette méthode et utiliser le même niveau d'homogénéité pour toutes les variétés examinées ensuite;
4. il est probable que dans une variété existante, on peut distinguer, maintenir et reproduire des sous-variétés qui diffèrent par leurs caractères électrophorétiques sans se distinguer de la variété au sens actuel du terme.

Bibliographie

1. Almgard, G. & U. Landegren - 1974 - Isoenzymatic variation used for the identification of barley varieties.
Z. Pflanzenzüchtung 72: 63-73.
2. Autran, J.C. & A. Bourdet - 1975 - L'identification des variétés de blé : Etablissement d'un tableau général de détermination fondé sur le diagramme électrophorétique des gliadines du grain.
Ann. Amélior. Plantes 25 (3): 277-301.
3. Clapham, D. & G. Almgard - 1978 - Biochemical identification of cultivars leads to award of plant breeders' rights.
Agri Hortique Genetica XXXVI: 88-94.
4. Doekes, G.J. - 1968 - Comparison of wheat varieties by starch gel electrophoresis of their grain proteins.
J. Sci. Food Agrc. 19: 169-176.
5. Hayward, M.D. & N.J. McAdam - 1977 - Isozyme polymorphism as a measure of distinctiveness and stability in cultivars of *Lolium perenne*.
Z. Pflanzenzüchtung 79: 59-68.
6. Loeschke, V. & H. Stegemann - 1965 - Proteinmuster der Kartoffelknollen - ein Sortencharakteristikum.
J.ber. Biol. Bundestanst. A 52 - A 53.
7. Stegemann, H. & V. Loeschke - 1976 - Index Europäischer Kartoffelsorten.
Mitt. Biol. Bundesanst. Landw. Forstw. Heft 168, 215 pp.
8. Zwartz, J.A. - 1965 - Characteristics of potato proteins in relation to potato varieties.
Bibl. 'Nutr. Dieta' 7: 221-232.