



These Test Guidelines have been superseded by a later version. The latest adopted version of Test Guidelines can be found at http://www.upov.int/test_guidelines/en/list.jsp

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

Ces principes directeurs d'examen ont été remplacés par une version ultérieure. La version adoptée la plus récente des principes directeurs d'examen figure à l'adresse suivante : http://www.upov.int/test_guidelines/fr/list.jsp

Cette publication a été numérisée à partir d'une copie papier et peut contenir des différences avec le document original.

Diese Prüfungsrichtlinien wurden durch eine neuere Fassung ersetzt. Die neueste angenommene Fassung von Prüfungsrichtlinien ist unter http://www.upov.int/test_guidelines/de/list.jsp zu finden.

Diese Veröffentlichung wurde von einer Papierkopie gescannt und könnte Abweichungen von der originalen Veröffentlichung aufweisen.

Las presentes directrices de examen han sido reemplazadas por una versión posterior. La versión de las directrices de examen de más reciente aprobación está disponible en http://www.upov.int/test_guidelines/es/list.jsp.

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



**INTERNATIONALER VERBAND
ZUM SCHUTZ VON
PFLANZENZÜCHTUNGEN**

**UNION INTERNATIONALE
POUR LA PROTECTION
DES OBTENTIONS VEGETALES**

**INTERNATIONAL UNION
FOR THE PROTECTION OF
NEW VARIETIES OF PLANTS**

GUIDELINES

FOR THE CONDUCT OF TESTS

FOR DISTINCTNESS, HOMOGENEITY AND STABILITY

PRINCIPES DIRECTEURS

POUR LA CONDUITE DE L'EXAMEN

DES CARACTERES DISTINCTIFS, DE L'HOMOGENEITE ET DE LA STABILITE

RICHTLINIEN

FUER DIE DURCHFUEHRUNG DER PRUEFUNG

AUF UNTERSCHIEDBARKEIT, HOMOGENITAET UND BESTAENDIGKEIT

WHEAT

BLE

WEIZEN

(Triticum aestivum L.
emend. Fiori et Paol.)

These Guidelines should be read in conjunction with document UPOV/TG/1/2, which contains explanatory notes on the general principles on which the Guidelines have been established.

Ces principes directeurs doivent être interprétés en relation avec le document UPOV/TG/1/2, qui contient des explications sur les principes généraux qui sont à la base de leur rédaction.

Diese Richtlinien sind in Verbindung mit dem Dokument UPOV/TG/1/2 zu sehen, das Erklärungen über die allgemeinen Grundsätze enthält, nach denen die Richtlinien aufgestellt wurden.

[English]

<u>TABLE OF CONTENTS</u>	<u>PAGE</u>
I. Subject of these Guidelines	3
II. Material Required	3
III. Conduct of Tests	3
IV. Methods and Observations	3
V. Grouping of Varieties	3
VI. Characteristics and Symbols	4
VII. Table of Characteristics	9
VIII. Explanations on the Table of Characteristics	14
IX. Literature	30
X. Technical Questionnaire	31
Annex	

[français]

<u>SOMMAIRE</u>	<u>PAGE</u>
I. Objet de ces principes directeurs	5
II. Matériel requis	5
III. Conduite de l'examen	5
IV. Méthodes et observations	5
V. Groupement des variétés	5
VI. Caractères et symboles	6
VII. Tableau des caractères	9
VIII. Explications du tableau des caractères	14
IX. Littérature	30
X. Questionnaire technique	31
Annexe	

[deutsch]

<u>INHALT</u>	<u>SEITE</u>
I. Anwendung dieser Richtlinien	7
II. Anforderungen an das Vermehrungsmaterial	7
III. Durchführung der Prüfung	7
IV. Methoden und Erfassungen	7
V. Gruppierung der Sorten	7
VI. Merkmale und Symbole	8
VII. Merkmalstabelle	9
VIII. Erklärungen zu der Merkmalstabelle	15
IX. Literatur	30
X. Technischer Fragebogen	31
Anlage	

[English]

I. Subject of these Guidelines

These Test Guidelines apply to all varieties of Triticum aestivum L. emend. Fiori et Paol.

II. Material Required

1. The competent authorities decide when, where and in what quantity and quality the plant material required for testing the variety is to be delivered. Applicants submitting material from a State other than that in which the testing takes place must make sure that all customs formalities are complied with. The minimum quantity of seed to be supplied by the applicant in one or several samples should be:

3 kg.

The seed should at least meet the minimum requirements for germination capacity, moisture content and purity for marketing certified seed in the country in which the application is made. The germination capacity should be as high as possible.

2. If requested by the competent authority, at least 150 ears for winter wheat and 100 ears for spring wheat should also be submitted. The ears should be well developed and not obviously affected by any pest or disease. They should contain a sufficient number of viable seeds to establish a satisfactory row of plants for observation.

3. The plant material must not have undergone any treatment unless the competent authorities allow or request such treatment. If it has been treated, full details of the treatment must be given.

III. Conduct of Tests

1. The minimum duration of tests should normally be two similar growing periods.

2. The tests should normally be conducted at one place. If any important characteristics of the variety cannot be seen at that place, the variety may be tested at an additional place.

3. The field tests should be carried out under conditions ensuring normal growth. The size of the plots should be such that plants or parts of plants may be removed for measurement and counting without prejudice to the observations which must be made up to the end of the growing period. Each test should include about 2000 plants which should be divided between two or more replicates. If tests on ear-rows are conducted, at least 100 ear-rows should be observed. Separate plots for observation and for measuring can only be used if they have been subject to similar environmental conditions.

4. Additional tests for special purposes may be established.

IV. Methods and Observations

1. All observations for assessment of distinctness and stability should be made on 20 plants or parts of 20 plants.

2. For the assessment of uniformity of characteristics on the plot as a whole (visual assessment by a single observation of a group of plants or parts of plants), the number of aberrant plants or parts of plants should not exceed 5 in 2000.

3. For the assessment of uniformity of characteristics on single ear-rows, plants or parts of plants (visual assessment by observations of a number of individual ear-rows, plants or parts of plants) the number of aberrant ear-rows, plants or parts of plants should not exceed 3 in 100.

4. Additional tests for special purposes may be established.

V. Grouping of Varieties

1. The collection of varieties to be grown should be divided into groups to facilitate the assessment of distinctness. Characteristics which are suitable for grouping purposes are those which are known from experience not to vary, or to vary only slightly, within a variety. Their various states of expression should be fairly evenly distributed throughout the collection.

2. It is recommended that the competent authorities use the following characteristics for grouping varieties:

- (i) Straw: pith in cross section (half way between base of ear and stem node below) (characteristic 10)
- (ii) Ear: color (characteristic 16)
- (iii) Awns or scurs: presence (characteristic 14)
- (iv) Seasonal type (characteristic 26)

VI. Characteristics and Symbols

1. To assess distinctness, uniformity and stability, the characteristics and their states as given in the three UPOV working languages in the Table of Characteristics should be used.

2. Notes (1 to 9), for the purposes of electronic data processing, are given opposite the states of expression for each characteristic. For certain characteristics, different example varieties, separated by a semicolon, are indicated for winter wheat and spring wheat. Where spring varieties are indicated they follow the semicolon.

3. Legend:

(*) Characteristics that should be used on all varieties in every growing period over which examinations are made and always be included in the variety descriptions, except when the state of expression of a preceding characteristic or regional environmental conditions render this impossible.

(+) See Explanations on the Table of Characteristics in chapter VIII.

1) The optimum stage of development for the assessment of each characteristic is indicated by a number in the second column. The stages of development denoted by each number are described at the end of chapter VIII. The letters indicate the following:

M: actual measurement

VG: visual assessment by a single observation of a group of plants or parts of plants

VS: visual assessment by observations of a number of individual ear- rows, plants or plant parts

* * * * *

[français]

I. Objet de ces principes directeurs

Ces principes directeurs d'examen s'appliquent à toutes les variétés de Triticum aestivum L emend. Fiori et Paol.

II. Matériel requis

1. Les autorités compétentes décident de la quantité de matériel végétal nécessaire pour l'examen de la variété, de sa qualité ainsi que des dates et lieux d'envoi. Il appartient au demandeur qui soumet du matériel provenant d'un pays autre que celui où l'examen doit avoir lieu de s'assurer que toutes les formalités douanières ont été dûment accomplies. La quantité minimale de semences à fournir par le demandeur en un ou plusieurs échantillons sera de :

3 kg.

Les semences doivent au moins satisfaire les conditions minimales exigées pour la faculté germinative, la teneur en eau et la pureté pour la commercialisation des semences certifiées dans le pays dans lequel la demande est faite. La faculté germinative doit être aussi élevée que possible.

2. Si l'autorité compétente le demande, au moins 150 épis pour le blé d'hiver et 100 épis pour le blé de printemps doivent aussi être fournis. Les épis doivent être bien développés et indemnes de tous parasites ou maladies. Ils doivent contenir un nombre de semences viables suffisant pour l'établissement d'un épi-ligne permettant d'effectuer les observations.

3. Le matériel végétal ne doit pas avoir subi de traitement sauf autorisation ou demande expresse des autorités compétentes. S'il a été traité, le traitement appliqué doit être indiqué en détail.

III. Conduite de l'examen

1. La durée minimale d'examen est en règle générale de deux cycles similaires de végétation.

2. Les essais doivent être conduits en un seul lieu. Si ce lieu ne permet pas de faire apparaître certains caractères importants de la variété, celle-ci peut aussi être étudiée dans un autre lieu.

3. Les essais au champ doivent être conduits dans des conditions normales de culture. La taille des parcelles doit être telle que l'on puisse prélever des plantes ou parties de plantes pour effectuer des mesures ou des dénombrements sans nuire aux observations ultérieures qui doivent se poursuivre jusqu'à la fin de la période de végétation. Chaque essai doit porter sur environ 2000 plantes, qui doivent être réparties en deux ou plusieurs répétitions. Si des essais avec épis-lignes sont implantés, au moins 100 épis-lignes doivent être observés. On ne peut utiliser de parcelles séparées, destinées l'une aux observations et l'autre aux mesures, que si elles sont soumises à des conditions de milieu similaires.

4. Des essais additionnels peuvent être établis pour certaines déterminations.

IV. Méthodes et observations

1. Toutes les observations pour la détermination de la distinction et la stabilité doivent porter sur 20 plantes ou parties de 20 plantes.

2. Pour évaluer l'homogénéité des caractères sur la base de l'ensemble de la parcelle (une évaluation visuelle fondée sur une seule observation faite sur un ensemble de plantes ou parties de plantes), le nombre de plantes ou parties de plantes aberrantes ne doit pas dépasser 5 sur 2000.

3. Pour évaluer l'homogénéité des caractères sur la base des épis-lignes, de plantes ou parties de plantes individuelles (une évaluation visuelle fondée sur des observations faites individuellement sur un certain nombre d'épis-lignes, de plantes ou parties de plantes), le nombre d'épis-lignes, de plantes ou parties de plantes aberrantes ne doit pas dépasser 3 sur 100.

V. Groupement des variétés

1. La collection des variétés à cultiver doit être divisée en groupes pour faciliter la détermination de la distinction. Les caractères à utiliser pour définir les groupes sont ceux dont on sait par expérience qu'ils ne varient pas, ou qu'ils varient peu, à l'intérieur d'une variété. Les différents niveaux d'expression doivent être assez uniformément répartis dans la collection.

2. Il est recommandé aux autorités compétentes d'utiliser les caractères ci-après pour le groupement des variétés :

- i) Paille : moelle en section transversale (à mi-distance entre la base de l'épi et le noeud de la tige immédiatement en-dessous) (caractère 10)
- ii) Epi : couleur (caractère 16)
- iii) Barbes ou arêtes : présence (caractère 14)
- iv) Type de développement (caractère 26)

VI. Caractères et symboles

1. Pour évaluer les possibilités de distinction, l'homogénéité et la stabilité, on doit utiliser les caractères indiqués dans le tableau des caractères, avec leurs différents niveaux d'expression, dans les trois langues de travail de l'UPOV.

2. En regard des différents niveaux d'expression des caractères, sont indiquées des notes (1 à 9) destinées au traitement électronique des données. Pour certains caractères, des variétés différentes, séparées par un point-virgule, ont été indiquées à titre d'exemples pour le blé d'hiver et pour le blé de printemps. Lorsque des variétés de printemps sont indiquées, elles suivent le point-virgule.

3. Légende :

(*) Caractères qui doivent être utilisés pour toutes les variétés, à chaque cycle de végétation au cours duquel les essais sont réalisés, et qui doivent toujours figurer dans la description de la variété, sauf si le niveau d'expression d'un caractère précédent ou les conditions de milieu régionales le rendent impossible.

(+) Voir l'explication du tableau des caractères au chapitre VIII.

1) Le stade optimal de développement pour l'observation de chaque caractère est indiqué par un nombre dans la deuxième colonne. Les stades de développement correspondant à chaque nombre sont décrits à la fin du chapitre VIII. Les lettres ont les significations suivantes :

M : des mensurations effectives

VG : une évaluation visuelle fondée sur une seule observation faite sur un ensemble de plantes ou parties de plantes

VS : une évaluation visuelle fondée sur des observations faites individuellement sur un certain nombre d'épis-lignes, de plantes ou parties de plantes

* * * * *

[deutsch]

I. Anwendung dieser Richtlinien

Diese Richtlinien gelten für alle Sorten von Triticum aestivum L emend. Fiori et Paol.

II. Anforderungen an das Vermehrungsmaterial

1. Die zuständigen Behörden bestimmen, wann, wohin und in welcher Menge und Beschaffenheit das für die Prüfung der Sorte erforderliche Vermehrungsmaterial zu liefern ist. Anmelder, die Material von ausserhalb des Staates, in dem die Prüfung vorgenommen wird, einreichen, müssen sicherstellen, dass alle Zollvorschriften erfüllt sind. Die vom Anmelder in einer oder mehreren Proben einzusendende Mindestmenge an Vermehrungsmaterial sollte betragen:

3 kg.

Das Saatgut sollte wenigstens die Mindestanforderungen an die Keimfähigkeit, den Feuchtigkeitsgehalt und die Reinheit für die Vermarktung von zertifiziertem Saatgut des Landes erfüllen, in dem die Anmeldung eingereicht wurde. Die tatsächliche Keimfähigkeit sollte so hoch wie möglich sein.

2. Sofern von den zuständigen Behörden verlangt, sollten zusätzlich mindestens 150 Aehren für Winterweizen und 100 Aehren für Sommerweizen eingereicht werden. Die Aehren sollten gut entwickelt und, soweit sichtbar, von keinem Schädling und von keiner Krankheit befallen sein. Sie sollten eine ausreichende Anzahl keimfähiger Samen für die Aussaat einer für die Beobachtung ausreichenden Reihe enthalten.

3. Das Vermehrungsmaterial darf keiner Behandlung unterzogen worden sein, es sei denn, dass die zuständigen Behörden eine solche Behandlung gestatten oder vorschreiben. Soweit es behandelt worden ist, müssen die Einzelheiten der Behandlung angegeben werden.

III. Durchführung der Prüfung

1. Die Mindestprüfungsdauer sollte in der Regel zwei gleichartige Wachstumsperioden betragen.

2. Die Prüfungen sollten in der Regel an einer Stelle durchgeführt werden. Wenn einige wichtige Merkmale an diesem Ort nicht festgestellt werden können, kann die Sorte an einem weiteren Ort geprüft werden.

3. Die Feldprüfungen sollten unter Bedingungen durchgeführt werden, die eine normale Pflanzenentwicklung sicherstellen. Die Parzellengrösse ist so zu bemessen, dass den Beständen die für Messungen und Zählungen benötigten Pflanzen oder Pflanzenteile entnommen werden können, ohne dass dadurch die Beobachtungen, die bis zum Abschluss der Vegetationsperiode durchzuführen sind, beeinträchtigt werden. Jede Prüfung sollte insgesamt etwa 2000 Pflanzen umfassen, die auf zwei oder mehrere Wiederholungen verteilt werden sollten. Sofern Prüfungen mit Aehrenreihen durchgeführt werden, sollten wenigstens 100 Aehrenreihen erfasst werden. Getrennte Parzellen für Beobachtungen einerseits und Messungen andererseits können nur bei Vorliegen ähnlicher Umweltbedingungen verwendet werden.

4. Zusätzliche Prüfungen für besondere Erfordernisse können durchgeführt werden.

IV. Methoden und Erfassungen

1. Alle Erfassungen für die Feststellung der Unterscheidbarkeit und Beständigkeit sollten an 20 Pflanzen oder Teilen von 20 Pflanzen erfolgen.

2. Für die Erfassung der Homogenität von Merkmalen auf der gesamten Parzelle (visuelle Feststellung durch eine einzige Beobachtung einer Gruppe von Pflanzen oder Pflanzenteilen), sollte die Anzahl Abweicher-Pflanzen oder -Pflanzenteile 5 aus 2000 nicht übersteigen.

3. Für die Erfassung der Homogenität von Merkmalen an einzelnen Aehrenreihen, Pflanzen oder Pflanzenteilen (visuelle Erfassungen durch Beobachtung einer Anzahl individueller Aehrenreihen, Pflanzen oder Pflanzenteile) sollte die Anzahl Abweicher-Aehrenreihen, -Pflanzen oder -Pflanzenteile 3 aus 100 nicht übersteigen.

V. Gruppierung der Sorten

1. Das Prüfsortiment sollte zur leichteren Herausarbeitung der Unterscheidbarkeit in Gruppen unterteilt werden. Für die Gruppierung sind solche Merkmale geeignet, die erfahrungsgemäss innerhalb einer Sorte nicht oder nur wenig variieren. Die verschiedenen Ausprägungsstufen sollten in der Vergleichssammlung ziemlich gleichmässig verteilt sein.

2. Den zuständigen Behörden wird empfohlen, die nachstehenden Merkmale für die Gruppierung der Sorten heranzuziehen:

- i) Halm: Füllung im Querschnitt (in der Mitte zwischen der Basis der Aehre und dem darunter liegenden Halmknoten) (Merkmal 10)
- ii) Aehre: Farbe (Merkmal 16)
- iii) Grannen oder Spelzenspitzen: Vorhandensein (Merkmal 14)
- iv) Wechselverhalten (Merkmal 26)

VI. Merkmale und Symbole

1. Zur Beurteilung der Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit sollten die Merkmale mit ihren Ausprägungsstufen, wie sie in der Merkmalstabelle in den drei UPOV-Arbeitssprachen aufgeführt sind, verwendet werden.

2. Hinter den Ausprägungsstufen für jedes Merkmal stehen Noten (von 1 bis 9) für eine elektronische Datenverarbeitung. Für einige Merkmale sind, durch ein Semikolon voneinander getrennt, unterschiedliche Beispielssorten für Winterweizen und Sommerweizen angegeben. Wenn Sommerweizensorten angegeben sind, stehen sie hinter dem Semikolon.

3. Legende:

(*) Merkmale, die für alle Sorten in jedem Prüfungsjahr, in dem Prüfungen vorgenommen werden, herangezogen werden und in jeder Sortenbeschreibung enthalten sein sollten, sofern die Ausprägungsstufe eines vorausgehenden Merkmals oder regionale Umweltbedingungen dies nicht ausschliessen.

(+) Siehe Erklärungen zu der Merkmalstabelle in Kapitel VIII.

1) Das optimale Entwicklungsstadium für die Erfassung eines jeden Merkmals ist durch eine Ziffer in der zweiten Spalte angegeben. Die durch die einzelnen Ziffern angegebenen Entwicklungsstadien sind am Ende des Kapitels VIII beschrieben. Die Buchstaben bedeuten folgendes:

M: tatsächliche Messungen

VG: visuelle Erfassung durch eine einzige Beobachtung einer Gruppe von Pflanzen oder Pflanzenteilen

VS: visuelle Erfassungen durch Beobachtung einer Anzahl einzelner Aehrenreihen, Pflanzen oder Pflanzenteile

* * * * *

TG/3/11
Wheat/Blé/Weizen, 94-11-04
-9-

VII. Table of Characteristics/Tableau des caractères/Merkmalstabelle

Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
1. Coleoptile: (+) anthocyanin coloration	09-11 VS	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	Herzog; Delos	1
Coléoptile: pigmen- tation anthocyanique		weak	faible	gering	Niklas; Baldus	3
		medium	moyenne	mittel	Andros; Planet	5
Keimscheide: Anthocyanfärbung		strong	forte	stark	Obelisk; Briscard	7
		very strong	très forte	sehr stark	Albatros; -	9
(*) 2. Plant: growth habit (+)	25-29	erect	dressé	aufrecht	Castan; -	1
Plante: port au tallage	VG	semi-erect	demi-dressé	halbaufrecht	Frandoc; Remus	3
Pflanze: Wuchsform		intermediate	demi-dressé à demi-étalé	mittel	Obelisk; Troll	5
		semi- prostrate	demi-étalé	halbliiegend	Boss; -	7
		prostrate	étalé	liegend	Beaver; -	9
3. Flag leaf: anthocyanin coloration of auricles	49-51 VG	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	Soissons; Prinqual	1
Dernière feuille: pigmentation antho- cyanique des oreillettes		weak	faible	gering	Niklas; Troll	3
		medium	moyenne	mittel	Cargidoc; -	5
Oberstes Blatt: Antho- cyanfärbung der Auricula		strong	forte	stark	Cargo; Sunnan	7
		very strong	très forte	sehr stark	Recital; Dollar	9
4. Plant: frequency of (+) plants with recurved flag leaves	47-51 VG	absent or very low	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	Apollo	1
		low	faible	gering	Recital; Axona	3
Plante: fréquence de plantes avec la dernière feuille retombante		medium	moyenne	mittel	Obelisk; Filou	5
		high	forte	stark	Frandoc; Prinqual	7
Pflanze: Häufigkeit von Pflanzen mit gebo- genen obersten Blättern		very high	très forte	sehr stark	Capitole; -	9
(*) 5. Time of ear emergence (first spikelet visible on 50% of ears)	50-52 VG	very early	très précoce	sehr früh	Britta; Florence Aurore	1
		early	précoce	früh	Recital; Remus	3
Epoque d'épiaison (premier épillet visible sur 50% des épis)		medium	moyenne	mittel	Astron; Paros	5
		late	tardive	spät	Moulin; Vitus	7
Zeitpunkt des Aehren- schiebens (erstes Aehrchen sichtbar an 50 % der Aehren)		very late	très tardive	sehr spät	Beaver; -	9

TG/3/11
Wheat/Blé/Weizen, 94-11-04
-10-

Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
(*) 6. Flag leaf: glaucosity (+) of sheath Dernière feuille: glaucescence de la gaine Oberstes Blatt: Bereifung der Blattscheide	60-65	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	Cargo; Adonis	1
	VG	weak	faible	gering	Heiduck; Ventura	3
		medium	moyenne	mittel	Agent; Hanno	5
		strong	forte	stark	Orestis; Prinqual	7
		very strong	très forte	sehr stark	Haven; Wim	9
(*) 7. Ear: glaucosity Epi: glaucescence Aehre: Bereifung	60-69	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	Soissons; Adonis	1
	VG	weak	faible	gering	Garant; Ventura	3
		medium	moyenne	mittel	Contra; Paros	5
		strong	forte	stark	Niklas; Combi	7
		very strong	très forte	sehr stark	Boxer; Wim	9
8. Culm: glaucosity of neck Tige: glaucescence du col de l'épi Halm: Bereifung des obersten Internodiums	60-69	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	Goelent; Adonis	1
	VG	weak	faible	gering	Soissons; Ventura	3
		medium	moyenne	mittel	Haven; Attis	5
		strong	forte	stark	Herzog; Nandu	7
		very strong	très forte	sehr stark	Quotador; Wim	9
(*) 9. Plant: length (stem, ear, awns and scurs) Plante: longueur (tige, épi, barbes et arêtes) Pflanze: Länge (Halm, Aehre, Grannen und Spelzenspitzen)	75-92	very short	très courte	sehr kurz	Courtot; Briscard	1
	M	short	courte	kurz	Konsul; Remus	3
		medium	moyenne	mittel	Sideral; Ventura	5
		long	longue	lang	Boxer; Adonis	7
		very long	très longue	sehr lang	Aladin; Vitus	9
(*)10. Straw: pith in cross (+) section (halfway between base of ear and stem node below) Paille: moelle en section transversale (à mi-distance entre la base de l'épi et le noeud de la tige immédiatement en-dessous) Halm: Füllung im Querschnitt (in der Mitte zwischen der Basis der Aehre und dem darunter liegenden Halmknoten)	80-92	thin	peu épaisse	dünn	Orestis; Remus	3
	VS	medium	moyenne	mittel	Herzog; Nandu	5
		thick	épaisse	dick	Forby; Furio	7

TG/3/11
Wheat/Blé/Weizen, 94-11-04
-11-

Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
(*)11. Ear: shape in profile (+)	92	tapering	pyramidal	pyramidenförmig	Slejpner; Filou	1
Epi: forme en vue de profil	VS	parallel sided	à bords parallèles	parallel	-; -	2
Aehre: Form in Seitenansicht		semi-clavate	en demi-massue	halb keulenförmig	Pane 247; -	3
		clavate	en massue	keulenförmig	Beauchamp; Prinqual	4
		fusiform	fusiforme	spindel-förmig	Declic; Nandu	5
(*)12. Ear: density	80-92	very lax	très lâche	sehr locker	Demar 4; -	1
Epi: compacité	VS or M	lax	lâche	locker	Castan; Ventura	3
Aehre: Dichte		medium	demi-lâche à demi-compact	mittel	Soissons; Hanno	5
		dense	compact	dicht	Forby; Combi	7
		very dense	très compact	sehr dicht	-; -	9
13. Ear: length (excluding awns and scurs)	80-92	very short	très court	sehr kurz	-; -	1
	M	short	court	kurz	Carat; -	3
Epi: longueur (à l'exclusion des barbes ou arêtes)		medium	moyen	mittel	Ritmo; Arkas	5
		long	long	lang	Forby; Prinqual	7
Aehre: Länge (ohne Grannen oder Spelzenspitzen)		very long	très long	sehr lang	Amifort; -	9
(*)14. Awns or scurs: (+) presence	80-92	both absent	toutes les deux absentes	beide fehlend	Futur; Axona	1
	VG	scurs present	arêtes présentes	Spelzenspitzen vorhanden	Festival; Furio	2
Barbes ou arêtes: présence		awns present	barbes présentes	Grannen vorhanden	Soissons; Ventura	3
Grannen oder Spelzenspitzen: Vorhandensein						
(*)15. Awns or scurs at tip of ear: length	80-92	very short	très courtes	sehr kurz	Herzog; -	1
	VG	short	courtes	kurz	Andros; Combi	3
Barbes ou arêtes à l'extrémité de l'épi: longueur		medium	moyennes	mittel	Pagode; Hanno	5
		long	longues	lang	Fidel; -	7
Grannen oder Spelzenspitzen an der Aehrenspitze: Länge		very long	très longues	sehr lang	Gaicho; -	9
(*)16. Ear: color	90-92	white	blanc	weiss	Herzog; Furio	1
Epi: couleur	VG	colored	coloré	gefärbt	Gallo; Prinqual	2
Aehre: Farbe						

TG/3/11
Wheat/Blé/Weizen, 94-11-04
-12-

Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
17. Apical rachis segment: (+) hairiness of convex surface Article terminal du rachis: pilosité de la face externe Oberstes Spindelglied: äussere Behaarung	80-92	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	Soissons; -	1
	VS	weak	faible	gering	Slejpner; Furio	3
		medium	moyenne	mittel	Beaver; Rock	5
		strong	forte	stark	Apollo; Axona	7
		very strong	très forte	sehr stark	Carat; -	9
18. Lower glume: shoulder (+) width (spikelet in mid- third of ear) Glume inférieure: largeur de la troncature (épillet du tiers moyen de l'épi) Hüllspelze: Schulter- breite (Aehrchen im middle- ren Drittel der Aehre)	80-92	absent or very narrow	nulle ou très étroite	fehlend oder sehr schmal	Courtot; -	1
	VS	narrow	étroite	schmal	Soissons; Wim	3
		medium	moyenne	mittel	Sideral; Furio	5
		broad	large	breit	Castan; Filou	7
		very broad	très large	sehr breit	Abo	9
19. Lower glume: shoulder (+) shape (as for 18) Glume inférieure: forme de la troncature (comme pour 18) Hüllspelze: Schulterform (wie unter 18)	80-92	sloping	inclinée	abfallend	Courtot; -	1
	VS	slightly sloping	légèrement inclinée	leicht abfallend	Forby; Ventura	3
		straight	droite	gerade	Herzog; Prinqual	5
		elevated	échanquée	gehoben	Beaver; Adonis	7
		strongly elevated with 2nd point present	fortement échanquée avec présence d'un 2ème bec	stark gehoben mit vorhandener zweiter Spitze	Farnese; -	9
20. Lower glume: beak length (as for 18) Glume inférieure: longueur du bec (comme pour 18) Hüllspelze: Zahnlänge (wie unter 18)	80-92	very short	très court	sehr kurz	Aladin; Sunnan	1
	VS	short	court	kurz	Sideral; Axona	3
		medium	moyen	mittel	Recital; Furio	5
		long	long	lang	Soissons; Tejo	7
		very long	très long	sehr lang	Courtot; Prinqual	9
21. Lower glume: beak (+) shape (as for 18) Glume inférieure: forme du bec (comme pour 18) Hüllspelze: Zahnform (wie unter 18)	80-92	straight	droit	gerade	Festival; Lobo	1
	VS	slightly curved	légèrement coudé	leicht gebogen	Slejpner; Furio	3
		moderately curved	demi- coudé	mittel gebogen	Courtot; Rock	5
		strongly curved	fortement coudé	stark gebogen	Arum; -	7
		geniculate	genouillé	geknickt	-; -	9

TG/3/11
Wheat/Blé/Weizen, 94-11-04
-13-

Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
22. Lower glume: extent (+) of internal hair (as for 18)	80-92	weak	faible	gering	Slejpner; Prinqual	3
	VS	medium	moyenne	mittel	Sideral; Furio	5
		strong	forte	stark	Declic; Tejo	7
Glume inférieure: étendue de la pilosité interne (comme pour 18)						
Hüllspelze: Verbreitung der inneren Behaarung (wie unter 18)						
23. Lowest lemma: beak (+) shape (as for 18)	80-92	straight	droit	gerade	Soissons; Prinqual	1
	VS	slightly curved	légèrement coudé	leicht gebogen	Slejpner; Briscard	3
		moderately curved	demi-coudé	mittel gebogen	Sideral; Wim	5
		strongly curved	fortement coudé	stark gebogen	Parade; Axona	7
Glumelle inférieure: forme du bec (comme pour 18)						
Untere Deckspelze: Zahnform (wie unter 18)						
		geniculate	genouillé	geknickt	Tara; -	9
(*)24. Grain: color (+) Graine: couleur Korn: Farbe	92	white	blanc	weiss	Recital; Florence Aurore	1
	VG	red	roux	rot	Soissons; Ventura	2
25. Grain: coloration (+) with phenol	92	none or very light	nulle ou très faible	fehlend oder sehr hell	-; -	1
	VS	light	faible	hell	Soissons; -	3
		medium	moyenne	mittel	Orestis; Prinqual	5
		dark	foncée	dunkel	Slejpner; Rock	7
		very dark	très foncée	sehr dunkel	Sideral; Ventura	9
Graine: coloration au phénol						
Korn: Phenolfärbung						
(*)26. Seasonal type (+) Type de développement Wechselverhalten	-	winter type	type hiver	Winterform	Slejpner; -	1
	VG	alternative type	type alternatif	Wechselform	Fidel; -	2
		spring type	type printemps	Sommerform	-; Nandu	3

VIII. Explanations on the Table of Characteristics/Explications du tableau
des caractères/Erklärungen zu der Merkmalstabelle

Ad/Add./Zu 1

Coleoptile: anthocyanin coloration

Coléoptile: pigmentation anthocyanique

Keimscheide: Anthocyanfärbung

[English]

Method for the Determination of Anthocyanin Coloration

Number of grains per test:	20 grains for distinctness, 100 grains for homogeneity
Preparation of grains:	Set up non-dormant grains on moistened filter paper covered with a Petri dish lid during germination
Place:	Laboratory or greenhouse
Light:	After the coleoptiles have reached a length of about 1 cm in darkness, they are placed in artificial light (daylight equivalent), at 15,000 lux continuously for 3 - 4 days
Temperature:	15 to 20°C
Time of recording:	Coleoptiles fully developed (about 1 week) at stage 09-11
Scale of recording:	See characteristic 1
Note:	At least two of the example varieties should be included as a control when testing for distinctness.

[français]

Methode de détermination de la pigmentation anthocyanique

Nombre de grains par essai :	20 pour la distinction, 100 pour l'homogénéité
Préparation des grains :	Placer des grains non dormants sur un papier filtre humide. Couvrir avec un couvercle de boîte de Pétri pendant la germination
Lieu :	Laboratoire ou serre
Lumière :	Lorsque les coléoptiles ont atteint une longueur d'environ 1 cm à l'obscurité, placer les plantules sous un éclairage artificiel continu (type lumière du jour) de 15.000 lux pendant 3 à 4 jours
Température :	15 à 20°C
Epoque d'observation :	Coléoptiles à complet développement (environ 1 semaine) au stade 09-11
Echelle de notation :	Voir caractère 1
Note :	Prendre au moins deux des variétés indiquées à titre d'exemples comme témoin lors de l'examen de la distinction

[deutsch]

Methode für die Bestimmung der Anthocyanfärbung

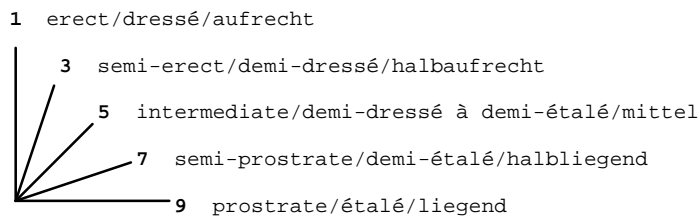
Anzahl Körner je Prüfung:	20 Körner für die Unterscheidbarkeit, 100 Körner für die Homogenität
Vorbereitung der Körner:	Körner, die sich nicht in Keimruhe befinden, auf feuchtem Filterpapier ansetzen. Während der Keimung mit Petrischalendeckel verschliessen
Ort:	Labor oder Gewächshaus
Licht:	Nachdem die Keimscheide in der Dunkelheit eine Länge von etwa 1 cm erreicht hat, wird künstliches Licht (Tageslichtäquivalent) von 15 000 Lux ununterbrochen für 3 bis 4 Tage gegeben
Temperatur:	15 bis 20°C
Zeitpunkt der Erfassung:	Keimscheide voll entwickelt (etwa 1 Woche) im Stadium 09-11
Erfassungsskala:	Siehe Merkmal 1
Anmerkung:	Mindestens zwei der Beispielssorten sollten bei der Prüfung auf Unterscheidbarkeit als Kontrolle einbezogen werden.

Ad/Add./Zu 2

Plant: growth habit

Plante: port au tallage

Pflanze: Wuchsform



The growth habit should be assessed visually from the attitude of the leaves and tillers. The angle formed by the outer leaves and the tillers with an imaginary vertical axis should be used.

Le port doit être déterminé visuellement d'après le port des feuilles et des talles. On utilisera l'angle formé par les feuilles externes et les talles avec un axe vertical imaginaire.

Die Wuchsform sollte auf Grund der Haltung der Blätter und Triebe visuell erfasst werden. Der von den äusseren Blättern und Trieben mit einer vertikalen Achse gebildete Winkel sollte verwendet werden.

Ad/Add./Zu 4

Plant: frequency of plants with recurved flag leaves

Plante: fréquence de plantes avec la dernière feuille retombante

Pflanze: Häufigkeit von Pflanzen mit gebogenen obersten Blättern

1. all flag leaves are rectilinear/toutes les plantes ont la dernière feuille dressée/alle obersten Blätter sind gerade
3. about 1/4 of the plants with recurved flag leaves/environ 1/4 des plantes ont la dernière feuille retombante/etwa 1/4 der Pflanzen mit gebogenen obersten Blättern
5. about 1/2 of the plants with recurved flag leaves/environ 1/2 des plantes ont la dernière feuille retombante/etwa die Hälfte der Pflanzen mit gebogenen obersten Blättern
7. about 3/4 of the plants with recurved flag leaves/environ 3/4 des plantes ont la dernière feuille retombante/etwa drei Viertel der Pflanzen mit gebogenen obersten Blättern
9. all flag leaves are recurved/toutes les plantes ont la dernière feuille retombante/alle obersten Blätter sind gebogen.

Ad/Add./Zu 6

Flag leaf: glaucosity of sheath

Dernière feuille: glaucescence de la gaine

Oberstes Blatt: Bereifung der Blattscheide

The strongest expression on the sheath should be observed.

L'expression la plus forte sur la gaine doit être observée.

Die stärkste Ausprägung auf der Blattscheide sollte erfasst werden.

Ad/Add./Zu 10

Straw: section (half way between base of ear and stem node below)

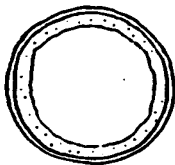
Paille: section (à mi-hauteur entre la base de l'epi et le noeud de la tige immédiatement en-dessous)

Halm: Füllung (in der Mitte zwischen der Basis der Aehre und dem darunter liegenden Halmknoten)

All stems of the plant should be checked and the strongest expression per plant recorded.

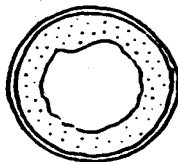
Toutes les tiges doivent être vérifiées et l'expression la plus forte de chaque plante notée.

Alle Halme sollten überprüft werden und die stärkste Ausprägung jeder Pflanze sollte erfasst werden.



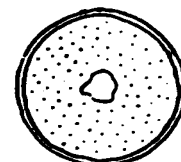
3

pith thin
moelle peu épaisse
Füllung dünn



5

pith medium
moelle moyenne
Füllung mittel



7

pith thick
moelle épaisse
Füllung dick

Ad/Add./Zu 11

Ear: shape in profile

Epi: forme en vue de profil

Aehre: Form in Seitenansicht



1

tapering
pyramidal
pyramidenförmig



2

parallel-sided
à bords parallèles
parallel



3

semi-clavate
en demi-massue
halb keulenförmig



4

clavate
en massue
keulenförmig



5

fusiform
fusiforme
spindelförmig

Ad/Add./Zu 12

Ear: density

Epi: compacité

Aehre: Dichte

The density can be assessed either visually or as measurement of the ratio of the number of spikelets/ear length.

La compacité peut être observée visuellement ou par calcul du rapport entre le nombre d'épillets et la longueur de l'épi.

Die Dichte kann entweder visuell oder als Messung des Verhältnisses aus Anzahl Aehrchen und Länge der Aehre erfasst werden.

Ad/Add./Zu 14

Awns or scurs: présence

Barbes ou arêtes: présence

Grannen oder Spelzenspitzen: Vorhandensein



1

both absent
toutes les deux absentes
beide fehlend



2

scurs present
arêtes présentes
Spelzenspitzen vorhanden

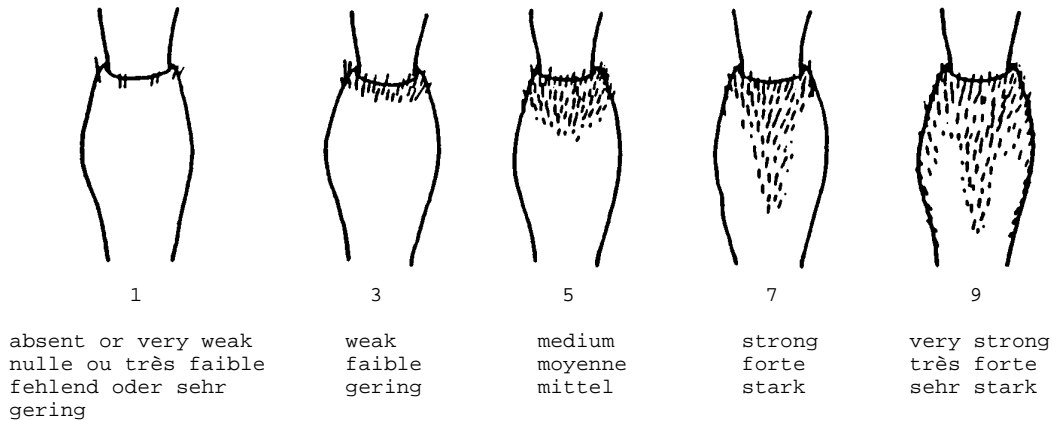


3

awns present
barbes présentes
Grannen vorhanden

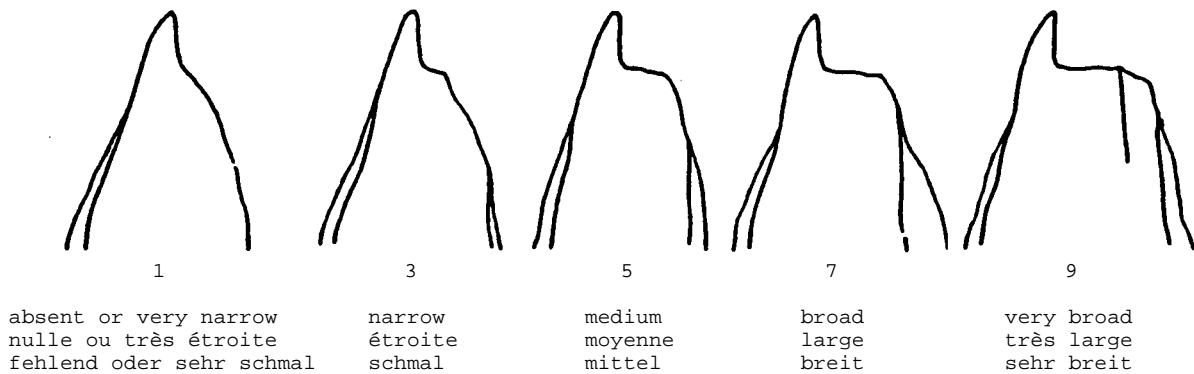
Ad/Add./Zu 17

Apical rachis segment: hairiness of convex surface
Article terminal du rachis: pilosité de la face externe
Oberstes Spindelglied: äussere Behaarung



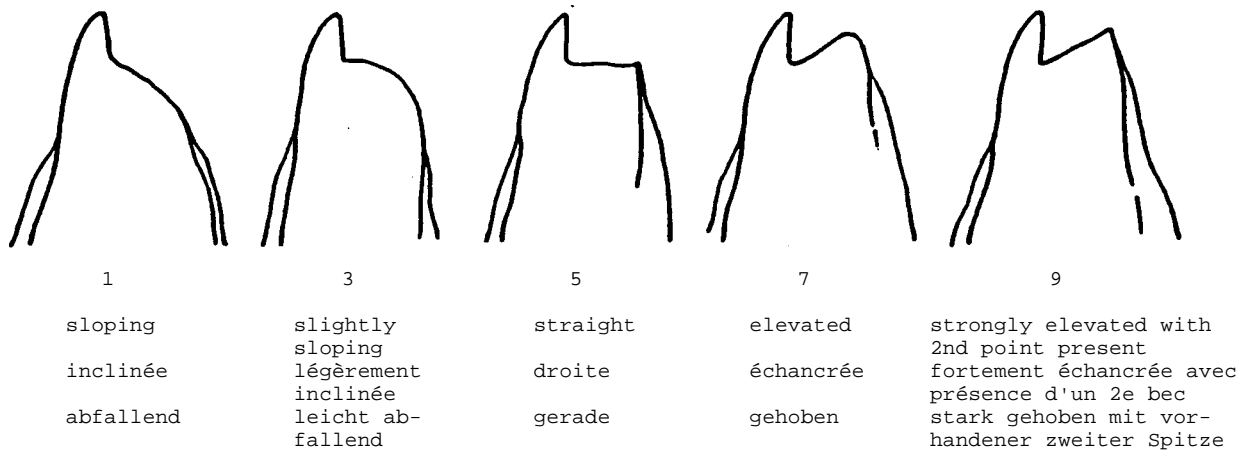
Ad/Add./Zu 18

Lower glume: shoulder width (spikelet in mid-third of ear)
Glume inférieure: largeur de la troncature (épillet du tiers moyen de l'épi)
Hüllspelze: Schulterbreite (Aehrchen im mittleren Drittel der Aehre)



Ad/Add./Zu 19

Lower glume: shoulder shape (spikelet in mid-third of ear)
Glume inférieure: forme de la troncature (épillet du tiers moyen de l'épi)
Hüllspelze: Schulterform (Aehrchen im mittleren Drittel der Aehre)

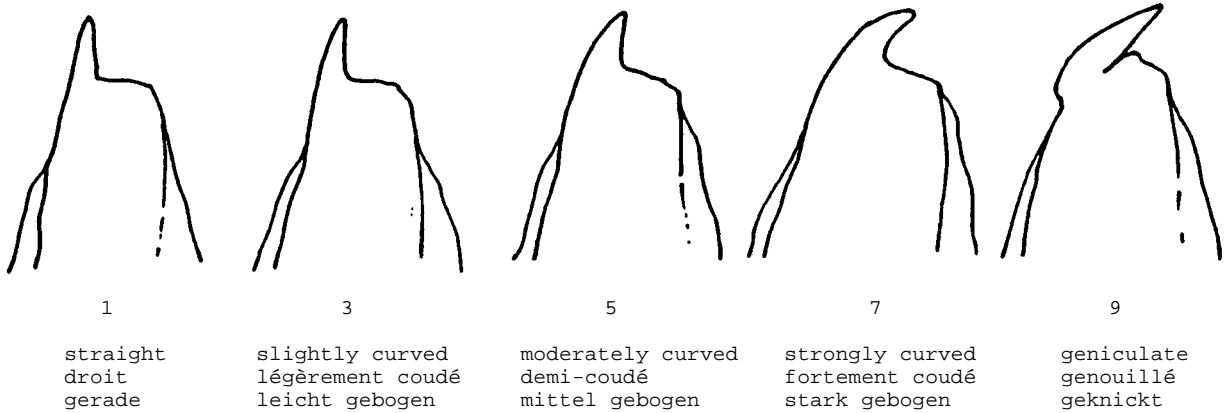


Ad/Add./Zu 21

Lower glume: beak shape (spikelet in mid-third of ear)

Glume inférieure: forme du bec (épillet du tiers moyen de l'épi)

Hüllspelze: Zahnform (Aehrchen im mittleren Drittel der Aehre)

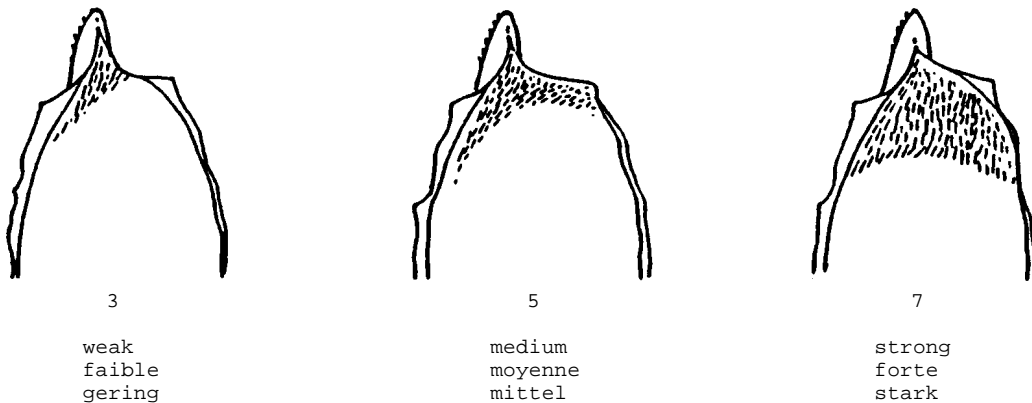


Ad/Add./Zu 22

Lower glume: extent of internal hairs (spikelet in mid-third of ear)

Glume inférieure: étendue de la pilosité interne (épillet du tiers moyen de l'épi)

Hüllspelze: Verbreitung der inneren Behaarung (Aehrchen im mittleren Drittel der Aehre)

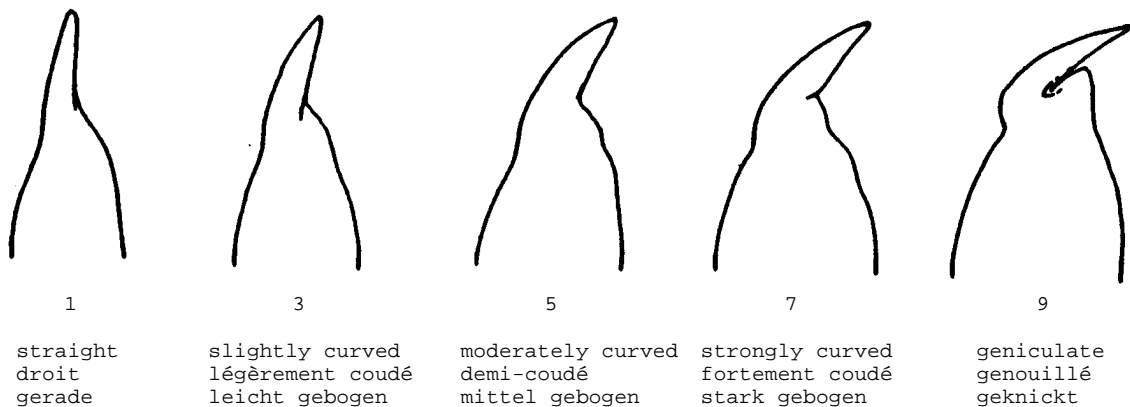


Ad/Add./Zu 23

Lower lemma: beak shape

Glumelle inférieure: forme du bec

Untere Deckspelze: Zahnform



Ad/Add./Zu 25

Grain: coloration with phenol

Grain: coloration au phénol

Korn: Phenolfärbung

[English]

Method for Determination of Phenol Reaction

Number of grains per test:	20 grains for distinctness, 100 grains for homogeneity. The grains should not have been treated chemically
Preparation of grains:	Soak in tap water for 16 to 20 hours, drain and remove surface water, place the grains with crease downwards, cover dish with lid
Concentration of solution:	1 per cent Phenol-solution (freshly made up)
Amount of solution:	The grains should be about 3/4 covered
Place:	Laboratory
Light:	Daylight - out of direct sunshine
Temperature:	18 to 20°C
Time of recording:	4 hours (after adding solution)
Scale of recording:	See characteristic 25 in the Table of Characteristics
Note:	At least two of the example varieties should be included as a control

[français]

Méthode de détermination de la réaction au phénol

Nombre de grains par essai :	20 pour la distinction, 100 pour l'homogénéité. Les grains ne doivent pas avoir subi de traitement chimique
Préparation des grains :	Faire tremper dans l'eau du robinet pendant 16 à 20 heures, égoutter et essuyer, placer les grains avec le sillon en bas, fermer la boîte avec un couvercle
Concentration de la solution :	Solution de phénol (fraîche) à 1 pour cent
Quantité de solution par : échantillon	Immerger les grains aux 3/4 environ
Lieu :	Laboratoire
Lumière :	Lumière du jour - à l'abri d'un ensoleillement direct
Température :	18 à 20°C
Epoque d'observation :	4 heures (après le début du trempage dans la solution)
Echelle de notation :	Voir le caractère 25 dans le tableau des caractères
Note :	Prendre au moins deux des variétés indiquées à titre d'exemple comme témoin

[deutsch]

Methode für die Bestimmung der Phenolreaktion

Anzahl Körner je Prüfung:	20 Körner für die Unterscheidbarkeit, 100 Körner für die Homogenität. Die Körner sollten nicht chemisch behandelt worden sein
Vorbereitung der Körner:	Aufweichen in Leitungswasser für 16 bis 20 Stunden, abtropfen lassen und Oberflächenwasser entfernen, Körner mit Furche nach unten legen, Schale verschliessen
Konzentration der Lösung:	1%ige Phenol-Lösung (frisch angesetzt)
Lösungsmenge je Prüfung:	Die Körner sollten zu etwa 3/4 eingetaucht sein
Ort:	Labor
Licht:	Tageslicht - ausserhalb der direkten Sonneneinstrahlung
Temperatur:	18 bis 20°C
Zeitdauer der Erfassung:	4 Stunden (nach Zugabe der Lösung)
Erfassungsskala:	Siehe Merkmal 25 in der Merkmalstabelle
Anmerkung:	Mindestens zwei der Beispielsorten sollten als Kontrolle einbezogen werden

Ad/Add./Zu 26

Seasonal type

Type de développement

Wechselverhalten

[English]

The seasonal type should be assessed on one or several plots sown in springtime. Example varieties should always be included in the plots. When the example varieties behave according to this description, the varieties under study can be described. At the time when the latest springtype variety is fully mature (stage 91/92 of the Eucarpia decimal code), the growth stage reached by the respective variety should be assessed. The states of expression are defined as follows:

Winter type:	The plants have reached stage 45 of the Eucarpia decimal code (boots swollen) at maximum
Alternative type:	The plants have exceeded stage 45 of the Eucarpia decimal code---as a rule they have exceeded stage 75---and have reached stage 90 at maximum
Spring type:	The plants have exceeded stage 90 of the Eucarpia decimal code.

[français]

Le type de développement doit être observé sur une ou plusieurs parcelles ensemencées au printemps. Les variétés exemples doivent toujours être incluses dans les parcelles. Si elles se comportent comme indiqué dans le tableau de caractères, les variétés en étude peuvent être décrites. Le stade de développement atteint par les variétés doit être observé au stade de pleine maturité (stade 91/92 du code décimal d'Eucarpia) de la variété de printemps la plus tardive. Les stades d'expression sont définis comme suit :

Type hiver :	Les plantes ont atteint au maximum le stade 45 du code décimal d'Eucarpia (gonflement)
Type alternatif :	Les plantes ont excédé le stade 45 du code décimal d'Eucarpia---en règle générale elles ont excédé le stade 75--et ont atteint au maximum le stade 90
Type printemps :	Les plantes ont excédé le stage 90 du code décimal d'Eucarpia.

[deutsch]

Das Wechselverhalten sollte in einer Frühjahrssaat an einer oder mehreren Parzellen erfasst werden. In die Parzellen, sollten immer Beispielssorten einbezogen werden. Wenn die Beispielssorten sich entsprechend ihrer Beschreibung verhalten, können die in der Prüfung stehenden Sorten beschrieben werden. Zu dem Zeitpunkt, an dem die späteste Sommersorte vollreif ist (Stadium 91/92 des Eucarpia Dezimal-Codes), sollte das jeweils erreichte Entwicklungsstadium festgehalten werden. Die Ausprägungssufen sind folgendermassen bestimmt:

Winterform:	Die Pflanzen haben maximal das Stadium 45 des Eucarpia Dezimal-Codes erreicht (Blattscheide der Fahne geschwollen)
Wechselform:	Die Pflanzen haben das Stadium 45 des Eucarpia Dezimal-Codes überschritten---in der Regel haben sie das Stadium 75 überschritten---und das Stadium 90 maximal erreicht.
Sommerform:	Die Pflanzen haben das Stadium 90 des Eucarpia Dezimal-Codes überschritten.

TG/3/11
Wheat/Blé/Weizen, 94-11-04
-23-

Code décimal pour les stades de croissance des céréales*
Decimal Code for the Growth Stages of Cereals*
Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides*

2-digit Code Code à 2 chiffres 2-stelliger Code	General Description	Description générale	Allgemeine Beschreibung	Feekes' Scale Echelle de Feekes Feekes-Skala	Additional Remarks on Wheat, Barley, Rye, Oats and Rice Remarques complémentaires pour le blé, l'orge, le seigle, l'avoine et le riz Ergänzende Bemerkungen für Weizen, Gerste, Roggen, Hafer und Reis
	<u>Germination</u>	<u>Germination</u>	<u>Keimung</u>		
00	Dry seed	Grain sec	Trockene Saat		
01	Start of imbibition	Début de l'imbibition	Beginn der Quellung (Samen normale Grösse, aber weich)		
02	-	-	-		
03	Imbibition complete	Imbibition complète	Ende Quellung (Samen gequollen, aber noch nicht gekeimt)		
04	-	-	-		
05	Radicle emerged from caryopsis	Sortie de la racine	Austritt der Keim- wurzel aus der Karyopse		
06	-	-	-		
07	Coleoptile emerged from caryopsis	Sortie du coléoptile	Austritt des Koleoptils aus der Karyopse		
08	-	-	-		
09	Leaf just at coleoptile tip	Feuille juste au sommets du coléoptile	Blatt gerade an der Spitze des Koleoptils erkennbar		
	<u>Seedling growth</u>	<u>Croissance de la plantule</u>	<u>Wachstum des Keimlings</u>		
10	First leaf through coleoptile	1ère feuille traver- sant le coléoptile	Austritt des ersten Blattes aus dem Koleop- til	1	Second leaf visible (less than 1 cm) 2e feuille visible (moins d'1 cm) Zweites Blatt sichtbar (weniger als 1 cm)
11	First leaf un- folded (1)	1ère feuille étalée (1)	erstes Blatt ent- faltet (1)		
12	2 leaves unfolded	2 feuilles étalées	2 Blätter entfaltet	}	50 per cent of laminae unfolded 50% des limbes étalés 50% der Blattspreiten entfaltet
13	3 leaves unfolded	3 feuilles étalées	3 Blätter entfaltet		
14	4 leaves unfolded	4 feuilles étalées	4 Blätter entfaltet		
15	5 leaves unfolded	5 feuilles étalées	5 Blätter entfaltet		
16	6 leaves unfolded	6 feuilles étalées	6 Blätter entfaltet		
17	7 leaves unfolded	7 feuilles étalées	7 Blätter entfaltet		
18	8 leaves unfolded	8 feuilles étalées	8 Blätter entfaltet		
19	9 or more leaves unfolded	9 feuilles étalées ou plus	9 oder mehr Blätter entfaltet		

* Reproduced from EUCARPIA Bulletin No. 7, 1974, pp.49 - 52, with the kind permission of the authors. For further information, see J.C. Zadoks, T.T. Chang and C.F. Konzak, EUCARPIA Bulletin No. 7, 1974, pp. 42 - 52. The French translation has been kindly furnished by Mrs. R. Cassini, Mr. R. Cassini and Mr. R. Marie. The German translation has been kindly furnished by Mr. A.O. Klomp and Mrs. I. Volk.

* Reproduit du Bulletin EUCARPIA No. 7, 1974, pp. 49 - 52, avec l'aimable autorisation des auteurs. Pour plus de détails, voir J.C. Zadoks, T.T. Chang et C.F. Konzak, Bulletin EUCARPIA No. 7, 1974, pp. 42 - 52. La traduction française a été aimablement fournie par Mme R. Cassini, M. R. Cassini et M. R. Marie. La traduction allemande a été aimablement fournie par M. A.O. Klomp et Mme I. Volk.

* Mit freundlicher Erlaubnis der Autoren entnommen aus EUCARPIA Bulletin Nr. 7, 1974, 49 - 52. Zwecks weiterer Information siehe J.C. Zadoks, T.T. Chang und C.F. Konzak, EUCARPIA Bulletin Nr. 7, 1974, 42 - 52. Die französische Uebersetzung wurde freundlicherweise überlassen von Frau R. Cassini, Herrn R. Cassini und Herrn R. Marie. Die deutsche Uebersetzung wurde freundlicherweise überlassen von Herrn A.O. Klomp und Frau I. Volk.

TG/3/11
Wheat/Blé/Weizen, 94-11-04
-24-

Code décimal pour les stades de croissance des céréales*
Decimal Code for the Growth Stages of Cereals*
Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides*

2-digit Code Code à 2 chiffres 2-stelliger Code	General Description	Description générale	Allgemeine Beschreibung	Feekes' Scale Echelle de Feekes Feekes-Skala	Additional Remarks on Wheat, Barley, Rye, Oats and Rice Remarques complémentaires pour leblé, l'orge, le seigle, l'avoine et le riz Ergänzende Bemerkungen für Weizen, Gerste, Roggen, Hafer und Reis
	<u>Tillering</u>	<u>Tallage</u>	<u>Bestockung</u>		
20	Main shoot only	Maître-brin seulement	Nur der Hauptspross entwickelt		
21	Main shoot and 1 tiller	Maître-brin et 1 talle	Spross und 1 Seitentrieb	2	<p>This section to be used to supplement records from other sections of the table: "concurrent codes".</p> <p>Cette section est destinée aux notes supplémentaires venant des autres sections du tableau "codes parallèles"</p> <p>Dieser Abschnitt kann zur Ergänzung der Beobachtungen aus den folgenden Abschnitten verwendet werden: "Mehrfache Codierung".</p>
22	Main shoot and 2 tillers	Maître-brin et 2 talles	Spross und 2 Seitentriebe	3	
23	Main shoot and 3 tillers	Maître-brin et 3 talles	Spross und 3 Seitentriebe		
24	Main shoot and 4 tillers	Maître-brin et 4 talles	Spross und 4 Seitentriebe		
25	Main shoot and 5 tillers	Maître-brin et 5 talles	Spross und 5 Seitentriebe		
26	Main shoot and 6 tillers	Maître-brin et 6 talles	Spross und 6 Seitentriebe		
27	Main shoot and 7 tillers	Maître-brin et 7 talles	Spross und 7 Seitentriebe		
28	Main shoot and 8 tillers	Maître-brin et 8 talles	Spross und 8 Seitentriebe		
29	Main shoot and 9 or more tillers	Maître-brin et 9 talles et plus	Spross und 9 oder mehr Seitentriebe		
	<u>Stem elongation</u>	<u>Elongation de la tige (Montaison)</u>	<u>Schossen</u>		
30	Pseudo stem erection (2)	Redressement (de la partie aérienne) (2)	Aufrichten des Scheinstamms (beginnendes Streckungswachstum) (2)	4-5	In rice: vegetative lag phase Chez le riz: phase végétative décalée Bei Reis: Phase der Verzögerung des vegetativen Wachstums
31	1st node detectable	1er noeud décelable	1. Knoten wahrnehmbar	6	<p>Jointing stage Stade unique Aufrichtungsstadium</p> <p>Above crown nodes Noeuds apparents Knoten oberhalb der Halmbasis</p>
32	2nd node detectable	2e noeud décelable	2. Knoten wahrnehmbar	7	
33	3rd node detectable	3e noeud décelable	3. Knoten wahrnehmbar	8	
34	4th node detectable	4e noeud décelable	4. Knoten wahrnehmbar		
35	5th node detectable	5e noeud décelable	5. Knoten wahrnehmbar		
36	6th node detectable	6e noeud décelable	6. Knoten wahrnehmbar		
37	Flag leaf just visible	dernière feuille visible	Fahnenblatt gerade sichtbar	8	
38	-	-	-		Pre-boot stage In rice: Opposite auricle stage Pré-gonflement
39	Flag leaf ligule/collar just visible	Ligule ou collerette de la dernière feuille juste visible	Ligula/Kragen des Fahnenblatts gerade sichtbar	9	Chez le riz: stade oreillettes opposées Vorstadium des Aehrenschwellsens Bei Reis: Blatthäutchen des letzten und vorletzten Blattes gegenüberstehend

TG/3/11
Wheat/Blé/Weizen, 94-11-04
-25-

Code décimal pour les stades de croissance des céréales*
Decimal Code for the Growth Stages of Cereals*
Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides*

2-digit Code Code à 2 chiffres 2-stelliger Code	General Description	Description générale	Allgemeine Beschreibung	Peekes' Scale Echelle de Peekes Peekes-Skala	Additional Remarks on Wheat, Barley, Rye, Oats and Rice Remarques complémentaires pour le blé, l'orge, le seigle, l'avoine et le riz Ergänzende Bemerkungen für Weizen, Gerste, Roggen, Hafer und Reis	
	<u>Booting</u>	<u>Gonflement</u>	<u>Schwellen der Aehren</u>			
40	-	-	-		Little enlargement of the inflorescence, early-boot stage	
41	Flag leaf sheath extending	Extension de la gaine de la dernière feuille	Blattscheide der Fahne länger werdend		Faible accroissement de l'inflorescence, début du gonflement	
42	-	-	-		Geringe Vergrößerung des Blütenstandes, frühes Stadium des Aehrenschwel lens	
43	Boots just visibly swollen	Gonflement à peine visible	Blattscheide der Fahne sichtbar geschwollen	10	Mid-boot stage Mi-gonflement Mittleres Stadium des Aehrenschwel lens	
44	-	-	-			
45	Boots swollen	Gonflement	Blattscheide der Fahne geschwollen			Late-boot stage Fin du gonflement Spätes Stadium des Aehrenschwel lens
46	-	-	-			
47	Flag leaf sheath opening	Ouverture de la gaine de la dernière feuille	Oeffnen der letzten Blattscheide	10.1		
48	-	-	-			In awned forms only Chez les formes barbues seulement Nur bei grannigen Formen
49	First awns visible	Premières barbes visibles	Erste Grannen sichtbar			
	<u>Inflorescence emergence</u>	<u>Epiaison</u>	<u>Aehrenschieben</u>			
50]	First spikelet of inflorescence just visible	1er épillet de l'inflorescence à peine visible	Erstes Aehrchen des Blütenstandes gerade sichtbar	[N	N = non-synchronous crops cultures non synchrones Getreidebestände, die sich ungleichmässig entwickeln S = synchronous crops cultures synchrones Getreidebestände, die sich gleichmässig entwickeln	
51]				[S		
52]	1/4 of inflorescence emerged	1/4 de l'inflorescence dégagé	1/4 des Blütenstandes herausgeschoben	[N		
53]				[S		10.2
54]	1/2 of inflorescence emerged	1/2 de l'inflorescence dégagée	1/2 des Blütenstandes herausgeschoben	[N		10.3
55]				[S		
56]	3/4 of inflorescence emerged	3/4 de l'inflorescence dégagés	3/4 des Blütenstandes herausgeschoben	[N		10.4
57]				[S		
58]	Emergence of inflorescence completed	Inflorescence complètement dégagée	Herausschieben des Blütenstandes abgeschlossen	[N		10.5
59]				[S		

TG/3/11
Wheat/Blé/Weizen, 94-11-04
-26-

Code décimal pour les stades de croissance des céréales*
Decimal Code for the Growth Stages of Cereals*
Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides*

2-digit Code Code à 2 chiffres 2-stelliger Code	General Description	Description générale	Allgemeine Beschreibung	Feekes' Scale Echelle de Feekes Feekes-Skala	Additional Remarks on Wheat, Barley, Rye, Oats and Rice Remarques complémentaires pour le blé, l'orge, le seigle, l'avoine et le riz Ergänzende Bemerkungen für Weizen, Gerste, Roggen, Hafer und Reis
	<u>Anthesis</u>	<u>Anthèse</u>	<u>Blüte</u>		
60] 61]	Beginning of anthesis	Début de l'anthèse	Beginn der Blüte	[N S 10.51	Not easily detectable in barley. In rice: Usually immediately following heading.
62	-	-	-		
63	-	-	-		Pas facilement décelable chez l'orge.
64] 65]	Anthesis half-way	Mi-anthèse	Mitte der Blüte	[N S 10.52	Pour le riz: en général suit immédiatement l'épiaison. Bei Gerste nicht leicht festzustellen Bei Reis: Im allgemeinen sofort nach dem Herausschieben der einzelnen Aehrchen.
66	-	-	-		
67	-	-	-		
68] 69]	Anthesis complete	Anthèse complète	Ende der Blüte	[N S 10.53	
	<u>Milk development</u>	<u>Stade laiteux</u>	<u>Entwicklung der Milchreife</u>		
70	-	-	-		
71	Caryopsis watery ripe	Stade aqueux de la maturation du caryopse	Karyopse wasserreif	10.54	
72	-	-	-		Increase in solids of liquid endosperm notable when crushing the caryopsis between fingers
73	Early milk	Début laiteux	Frühe Milchreife] 11.1	L'endosperme liquide commence à devenir solide quand on écrase le caryopse entre les doigts.
74	-	-	-		
75	Medium milk	Mi-laiteux	Mitte der Milchreife		
76	-	-	-		
77	Late milk	Fin laiteux	Späte Milchreife		
78	-	-	-		
79	-	-	-		

TG/3/11
Wheat/Blé/Weizen, 94-11-04
-27-

Code décimal pour les stades de croissance des céréales*
Decimal Code for the Growth Stages of Cereals*
Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides*

2-digit Code Code à 2 chiffres 2-stelliger Code	General Description	Description générale	Allgemeine Beschreibung	Feekes' Scale Echelle de Feekes Feekes-Skala	Additional Remarks on Wheat, Barley, Rye, Oats and Rice Remarques complémentaires pour le blé, l'orge, le seigle, l'avoine et le riz Ergänzende Bemerkungen für Weizen, Gerste, Roggen, Hafer und Reis
	<u>Dough development</u>	<u>Stade pâteux</u>	<u>Entwicklung der Teigreife</u>		
80	-	-	-		
81	-	-	-		
82	-	-	-		
83	Early dough	Début pâteux	Frühe Teigreife		
84	-	-	-	} 11.2	Fingernail impression not held. La marque de l'ongle ne tient pas. Zerdrücken der Frucht mit dem Fingernagel möglich.
85	Soft dough	Pâteux tendre	Weich teigreif		
86	-	-	-		
87	Hard dough	Pâteux dur	Hart teigreif		
88	-	-	-		
89	-	-	-		
	<u>Ripening</u>	<u>Maturation</u>	<u>Das Reifen</u>		
90	-	-	-		In rice: Terminal spikelets ripened. Chez le riz: maturité des épillets terminaux.
91	Caryopsis hard (difficult to divide by thumb-nail) (3)	Le caryopse est dur (difficile à couper à l'ongle) (3)	Karyopse hart (nur schwer mit dem Daumen nagel zu teilen) (3)	11.3	Bei Reis: Die Körner an der Spitze der Rispe sind reif.
92	Caryopsis hard (can no longer be dented by thumb-nail) (4)	Le caryopse est dur (ne peut plus du tout être entamé par l'ongle) (4)	Karyopse hart (nicht mehr mit dem Daumen nagel einzudellen) (4)	11.4	In rice: 50% of spikelets ripened. Chez le riz: 50% des épillets mûrs. Bei Reis: 50% der Körner sind reif.
93	Caryopsis loosening in daytime	Caryopse se détachant dans la journée	Karyopse tagsüber lockernd		In rice: Over 90% of spikelets ripened. (5) Chez le riz: plus de 90% des épillets mûrs. (5) Bei Reis: mehr als 90% der Körner sind reif. (5)
94	Over-ripe, straw dead and collapsing	Surmaturité, la paille est morte et s'affaisse	Ueberreif, Stroh tot und zusammenbrechend		
95	Seed dormant	Semence dormante	Samen in Keimruhe		Risk of grain loss by shedding. Risque de perte par égrenage. Kornverlust durch Ausfall möglich.
96	Viable seed giving 50% germination	Semence viable donnant 50% de germination	Keimfähige Samen (50 % Keimung)		
97	Seed not dormant	Semence non dormante	Samen nicht in Keimruhe		
98	Secondary dormancy induced	Dormance secondaire induite	Sekundäre Keimruhe induziert		
99	Secondary dormancy lost	Dormance secondaire levée	Sekundäre Keimruhe verloren		

TG/3/11
Wheat/Blé/Weizen, 94-11-04
-28-

Code décimal pour les stades de croissance des céréales*
Decimal Code for the Growth Stages of Cereals*
Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides*

2-digit Code Code à 2 chiffres 2-stelliger Code	General Description	Description générale	Allgemeine Beschreibung	Feekes' Scale Echelle de Feekes Feekes-Skala	Additional Remarks on Wheat, Barley, Rye, Oats and Rice Remarques complémentaires pour leblé, l'orge, le seigle, l'avoine et le riz Ergänzende Bemerkungen für Weizen, Gerste, Roggen, Hafer und Reis
	<u>Transplanting and recovery (rice only)</u>	<u>Repiquage et reprise (riz seulement)</u>	<u>Auspflanzen und An- wachsen (nur für Reis)</u>		
T1	Uprooting of seed- lings	Arrachage des plantules	Ausziehen der Jung- pflanzen		
T2	-	-	-		
T3	Rooting	Enracinement	Bewurzelung		
T4	-	-	-		
T5	-	-	-		
T6	-	-	-		
T7	Recovery of shoots	Reprise des	Wiederergrünen plantules		
T8	-	-	-		
T9	Resumption of vege- tative growth	Reprise de la crois- sance végétative	Neubeginn des vegeta- tiven Wachstums		

[English]

Notes on the Table of the Decimal Code for the Growth Stages of Cereals

- (1) Stage of seedling inoculation with rust in the greenhouse.
- (2) Only applicable to cereals with a prostrate or semi-prostrate early growth habit.
- (3) Ripeness for binder (ca. 16% water content). Chlorophyll of inflorescence largely lost.
- (4) Ripeness for combine harvester (less than 16% water content).
- (5) Optimum harvest time.

[français]

Notes pour le tableau du Code décimal pour les stades de croissance des céréales

- (1) Stade d'inoculation des plantules avec la rouille en serre.
- (2) Application seulement aux céréales dont le port est étalé ou demi-étalé aux stades précoces.
- (3) Maturité pour la moissonneuse-lieuse (environ 16% d'eau). Chlorophylle de l'inflorescence presque totalement disparue.
- (4) Maturité pour la moissonneuse-batteuse (moins de 16% d'eau).
- (5) Moment optimum pour la moisson.

[deutsch]

Bemerkungen zu der Tabelle des Dezimal-Codes für die Entwicklungsstadien des Getreides

- (1) Stadium für die künstliche Infektion von Keimpflanzen mit Getreiderost im Gewächshaus.
- (2) Nur anwendbar für Getreide mit liegendem oder halbliegendem Habitus zu Beginn der Vegetationsperiode.
- (3) Reif für die Ernte mit Binder (ca. 16 % Wassergehalt). Chlorophyll des Blütenstandes grösstenteils verloren.
- (4) Reif für die Ernte mit Mährescher (weniger als 16 % Wassergehalt).
- (5) Optimale Erntezeit.

IX. Literature/Littérature/Literatur

- BEZAR, H.J., HADFIELD, P.D., 1982: "Identification of New Zealand Wheat Cultivars." Crop Research Division, D.S.I.R., Christchurch, NZ, 39 pp.
- BRIGGLE, L.W., REITZ, L.P., 1963: "Classification of Triticum Species and of Wheat Varieties Grown in the United States." United States Department of Agriculture, Technical Bulletin No. 1278, US, 125 pp.
- BUSTARRET, J., 1944: "Variétés et variations." Annales agronomiques, 14ème année, 336, 365, FR
- DE BACKER, A., 1983: "L'homogénéité des variétés de Blé." Mémoire de fin d'études, 122e promotion Beauvais, 108 pp, FR
- DHORNE, D., 1985: "Les cultivars de blé (triticum Spp) et leur identification." Mémoire pour l'obtention du titre d'Ingénieur D.P.E., Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, 124 pp, FR
- FEINS, G.K. et al, 1975: "Australian Wheat Varieties." CSIR Wheat Research Unit, North Rye, New South Wales, AU
- HERVEY-MURRAY, C.G., 1980: "The Identification of Cereal Varieties." Cambridge University Press, 187 pp, GB
- JONARD, P., 1951: "Les blés tendres (triticum vulgare vill) cultivés en France." Paris, Institut National de la Recherche Agronomique, 491 pp, FR
- MILATZ, R., 1970: "Kriterien der Getreidearten einschliesslich Mais und ihre Bewertung zur Sortenidentifizierung." Bonn, Verband Deutscher Pflanzenzüchter, 236 pp, DE
- PAYNE, P.I., LAWRENCE, G.J., 1983: "Catalogue of Alleles For the Complex Gene Loci, Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1, Which Code For High Molecular Weight Subunits of Glutenin in Hexaploid Wheat. Cereal Research Communications 11, p. 29-35.
- PAYNE, P.I., 1987: "Genetics of Wheat Storage Proteins and the Effect of Allelic Variation on Bread-Making Quality. Annual Review of Plant Physiology 38, p. 141-153.
- PERCIVAL, J., 1921: "The Wheat Plant," monograph, London, Duckworth and Co., 463 pp, GB

X. Technical Questionnaire/Questionnaire technique/Technischer Fragebogen

Reference Number
(not to be filled in by the applicant)
Référence
(réservé aux Administrations)
Referenznummer
(nicht vom Anmelder auszufüllen)

TECHNICAL QUESTIONNAIRE
to be completed in connection with an application for plant breeders' rights

QUESTIONNAIRE TECHNIQUE
à remplir en relation avec une demande de certificat d'obtention végétale

TECHNISCHER FRAGEBOGEN
in Verbindung mit der Anmeldung zum Sortenschutz auszufüllen

1. Species/Espèce/Art Triticum aestivum L. emend Fiori et Paol.

WHEAT
BLE
WEIZEN

2. Applicant (Name and address)/Demandeur (nom et adresse)/Anmelder (Name und Adresse)

3. Proposed denomination or breeder's reference
Dénomination proposée ou référence de l'obtenteur
Vorgeschlagene Sortenbezeichnung oder Anmeldebezeichnung

4. Information on origin, maintenance and reproduction of the variety
Renseignements sur l'origine, le maintien et la reproduction de la variété
Information über Ursprung, Erhaltung und Vermehrung der Sorte

5. Characteristics of the variety to be indicated (the number in brackets refers to the corresponding characteristic in the Test Guidelines; please mark the state of expression which best corresponds)

Caractères de la variété à indiquer (le nombre entre parenthèses renvoie au caractère correspondant dans les principes directeurs d'examen; prière de marquer d'une croix le niveau d'expression approprié)

Anzugebende Merkmale der Sorte (die in Klammern angegebene Zahl verweist auf das entsprechende Merkmal in den Prüfungsrichtlinien; die Ausprägungsstufe, die der der Sorte am nächsten kommt, bitte ankreuzen)

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
5.1 Seasonal type (26)	winter type	type hiver	Winterform	Slejpner; -	1[]
Type de développement	alternative type	type alternatif	Wechselform	Fidel; -	2[]
Wechselverhalten	spring type	type printemps	Sommerform	-; Nandu	3[]
5.2. Time of ear emergence (5) (first spikelet visible on 50% of ears; quote mean date of heading of variety as well as of two well-known comparable varieties)
Epoque d'épiaison (premier épillet visible sur 50% des épis; indiquer la date moyenne d'épiaison de la variété et de deux variétés comparables bien connues)
Zeitpunkt des Aehrenschiebens (erstes Aehrchen sichtbar an 50% der Aehren; mittleres Datum des Aehrenschiebens der Sorte sowie von zwei bekannten vergleichbaren Sorten angeben)
5.3 Plant: length (stem, ear, awns and scurs; (9) quote height of variety as well as of two well-known comparable varieties)
Plante: longueur (tige, épi, barbes et arêtes; indiquer la hauteur de la variété et de deux variétés comparables bien connues)
Pflanze: Länge (Halm, Aehre, Grannen und Spelzenspitzen; Länge der Sorte sowie von zwei bekannten vergleichbaren Sorten angeben)

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note	
5.4 Straw: pith in cross (10) section (halfway between base of ear and stem node below)	thin	peu épaisse	dünn	Orestis; Remus	3[]	
	medium	moyenne	mittel	Herzog; Nandu	5[]	
	thick	épaisse	dick	Forby; Furio	7[]	
Paille: moelle en section transversale (à mi-distance entre la base de l'épi et le noeud de la tige immédiatement en-dessous)						
Halm: Füllung im Querschnitt (in der Mitte zwischen der Basis der Aehre und dem darunter liegenden Halmknoten)						
5.5 Ear: color (16)	white	blanc	weiss	Herzog; Furio	1[]	
	Epi: couleur	colored	coloré	gefärbt	Gallo; Prinqual	2[]
Aehre: Farbe						
5.6 Awns or scurs: (14) presence	both absent	toutes les deux absentes	beide fehlend	Futur; Axona	1[]	
	Barbes ou arêtes: présence	scurs present	arêtes présentes	Spelzenspitzen vorhanden	Festival; Furio	2[]
	Grannen oder Spelzenspitzen: Vorhandensein	awns present	barbes présentes	Grannen vorhanden	Soissons; Ventura	3[]

6. Similar varieties and differences from these varieties
Variétés voisines et différences par rapport à ces variétés
Ähnliche Sorten und Unterschiede zu diesen Sorten

Denomination of similar variety	Characteristic in which the similar variety is different ^o)	State of expression of similar variety	State of expression of candidate variety
Dénomination de la variété voisine	Caractère par lequel la variété voisine diffère ^o)	Niveau d'expression pour la variété voisine	Niveau d'expression pour la variété candidate
Bezeichnung der ähnlichen Sorte	Merkmal, in dem die ähnliche Sorte unterschiedlich ist ^o)	Ausprägungsstufe der ähnlichen Sorte	Ausprägungsstufe der Kandidatensorte

^o) In the case of identical states of expression of both varieties, please indicate the size of the difference/Au cas où les niveaux d'expression des deux variétés seraient identiques, prière d'indiquer l'amplitude de la différence/Sofern die Ausprägungsstufen der beiden Sorten identisch sind, bitte die Grösse des Unterschieds angeben.

7. Additional information which may help to distinguish the variety
Renseignements complémentaires pouvant faciliter la détermination des caractères distinctifs de
la variété
Zusätzliche Information zur Erleichterung der Unterscheidung der Sorte

7.1 Resistance to pests and diseases
Résistance aux parasites et aux maladies
Resistenzen gegenüber Schadorganismen

7.2 Special conditions for the examination of the variety
Conditions particulières pour l'examen de la variété
Besondere Bedingungen für die Prüfung der Sorte

7.3 Other information
Autres renseignements
Andere Informationen

[Annex follows/
L'annexe suit/
Anlage folgt]

ANNEX/ANNEXE/ANLAGE

Additional Useful Explanations
Explications additionnelles utiles
Zusätzliche nützliche Erklärungen

[English]

	<u>TABLE OF CONTENTS</u>	<u>PAGE</u>
Part I:	Introduction	2
Part II:	Characteristics derived by using electrophoresis	3
Part III:	Description of the method to be used	4

[français]

	<u>SOMMAIRE</u>	<u>PAGE</u>
Partie I :	Introduction	8
Partie II :	Caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse	9
Partie III :	Description de la méthode à utiliser	10

[deutsch]

	<u>INHALT</u>	<u>SEITE</u>
Teil I:	Einführung	15
Teil II:	Merkmale, die sich bei Verwendung der Elektrophorese ergeben	16
Teil III:	Beschreibung der zu verwendenden Methode	17

[English]

Part I

Introduction

The following Annex contains a list of characteristics derived by using electrophoresis and a description of the method to be used. UPOV decided to place these characteristics in an Annex to the Test Guidelines, thereby creating a special category of characteristic, because the majority of the UPOV member States is of the view that it is not possible to establish distinctness solely on the basis of a difference found in a characteristic derived by using electrophoresis. Such characteristics should therefore only be used as a complement to other differences in morphological or physiological characteristics. UPOV reconfirms that these characteristics are considered useful but that they might not be sufficient on their own to establish distinctness. They should not be used as a routine characteristic but at the request or with the agreement of the applicant of the candidate variety.

For the analysis of high molecular weight (HMW) glutenins, polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS PAGE) should be used. Glutenins are encoded by three compound loci, known as Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 on the long arms of the group 1 chromosomes (Payne, 1987). There are a number of alleles at each locus and the analysis of HMW glutenins is based on the recognition of these alleles from proteins, which appear on gels as a series of well defined bands or patterns of bands. The alleles are described by band numbers according to the definition given to them by Payne and Lawrence, 1983 (see Chapter IX, Literature). The corresponding letters and apparent molecular weights are reproduced in the description of the method used.

Part II

Characteristics Derived by Using Electrophoresis

Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
27. (+) Glutenin composition: allele expression at locus Glu-A1		band 1	bande 1	Bande 1	Kadett	1
		band 2*	bande 2*	Bande 2*	Courtot	2
	Gluténine: expression de l'allèle occupant le locus Glu-A1	no band	pas de bande	keine Bande	Talent	3
Glutenin-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung im Locus Glu-A1						
28. (+) Glutenin composition: allele expression at locus Glu-B1		bands 6 + 8	bandes 6 + 8	Banden 6 + 8	Norman	1
		bands 7 + 8	bandes 7 + 8	Banden 7 + 8	Courtot	2
	Composition de la gluténine: expression de l'allèle occupant le locus Glu-B1	bands 7 + 9	bandes 7 + 9	Banden 7 + 9	Kadett	3
		band 7 (or 7 + 9 in the presence of bands 5 + 10 of char. 29)	bande 7 (ou 7 + 9 en présence des bandes 5 + 10 du car. 29)	Bande 7 (oder 7 + 9 in Gegenwart der Banden 5 + 10 des Merkm. 29)	Okapi	4
	Glutenin-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung im Locus Glu-B1	bands 13 + 16	bandes 13 + 16	Banden 13+ 16	Carala	5
		bands 14 + 15	bandes 14 + 15	Banden 14 + 15	Troll	6
		bands 17 + 18	bandes 17 + 18	Banden 17 + 18	Moulin	7
		band 20	bande 20	Bande 20	Figaro	8
		bands 6.1 + 22	bandes 6.1 + 22	Banden 6.1 + 22	Schwabenkorn	9
29. (+) Glutenin composition: allele expression at locus Glu-D1		bands 2 + 12	bandes 2 + 12	Banden 2 + 12	Courtot	1
		bands 3 + 12	bandes 3 + 12	Banden 3 + 12	Norman	2
	Composition de la gluténine: expression de l'allèle occupant le locus Glu-D1	bands 4 + 12	bandes 4 + 12	Banden 4 + 12	Talent	3
		bands 5 + 10	bandes 5 + 10	Banden 5 + 10	Kadett	4
Glutenin-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung im Locus Glu-D1						

Part III

Description of the Method to be Used

Glutenin composition: allele expression at loci Glu-A1 (27), Glu-B1 (28) and Glu-D1 (29)

SDS PAGE Method for Analysis of HMW Glutenins from T. aestivum

1. Apparatus and equipment

Any suitable vertical electrophoresis system can be used, provided that the gels can be kept at a constant temperature. A gel thickness of no more than 1.5 mm is recommended. The power supply used should be capable of delivering both constant current and constant voltage output.

2. Chemicals

All chemicals should be of 'Analytical Reagent' grade or better.

Acrylamide (specially purified for electrophoresis)
Bisacrylamide (specially purified for electrophoresis)
Tris (hydroxymethyl) methylamine (TRIS)
Sodium dodecyl sulphate (SDS)
Ammonium persulphate (APS)
2-mercaptoethanol
TEMED (NNN'N'-tetramethylethylenediamine)
Trichloroacetic acid (TCA)
Hydrochloric acid
Glacial acetic acid
Glycine
n-Butanol
Pyronin Y (or G)
Glycerol (d = 1.256)
Methanol or ethanol
Coomassie Brilliant Blue R-250 (or equivalent)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (or equivalent)

3. Solutions

3.1 Extraction solution

3.1.1 Extraction of glutenins only

Stock solution:

6.25 ml 1M TRIS HCl buffer, PH 6.8 (see 3.3.2)
12.05 ml distilled water
2g SDS
10 mg Pyronin Y (or G)
10 ml glycerol
This solution can be stored for two months at 4°C.

Immediately before use, extraction solution is prepared as follows:

4.25 ml stock solution (above) plus 0.75 ml 2-mercaptoethanol made up to 10.0 ml with distilled water. This solution must be prepared immediately prior to use and cannot be stored.

3.1.2 Extraction of glutenins following gliadins

Solution A - 25 ml 2 - chloroethanol + 50 mg Pyronin Y/G, made up to 100 ml with distilled water.
Solution B - 27.0 g urea, 3.0 ml 2 - mercaptoethanol + 10.0 g SDS, made up to 100 ml with distilled water.

3.2 Electrophoresis (running) buffer

Stock solution:

141.1 g glycine
30.0 g TRIS
10.0 g SDS
made up to 1 l with distilled water.
Immediately before use, the stock solution is diluted 1:10 with distilled water.

The stock buffer solution can be stored for 2 months at room temperature. Do not store the diluted buffer more than one week. The pH of the buffer must be close to 8.3.

3.3 Gel preparation solutions

3.3.1 Stock resolving gel buffer (1M TRIS HCl, pH 8.8)

121.14 g TRIS plus approximately 20 ml HCl (d = 1.19) made up to 1 l with distilled water. This buffer can be stored at 4°C for 2 months.

3.3.2 Stock stacking gel buffer (1M TRIS HCl, pH 6.8)

121.14 g TRIS plus approximately 78 ml HCl (d = 1.19) made up to 1 l with distilled water. This buffer can be stored at 4°C for 2 months.

3.3.3 10% (w/v) SDS solution

10g of SDS dissolved in distilled water and made up to 100 ml. This solution can be stored at 4°C for 2 months. Prior to use, stir and heat gently to re-dissolve the SDS, if it comes out of solution.

3.3.4 1% (w/v) ammonium persulphate solution

1g of APS dissolved in distilled water and made up to 100 ml. This solution must be prepared immediately prior to use.

3.3.5 Stock acrylamide solution

40.02g acrylamide made up to 100 ml with distilled water.

3.3.6 Stock bisacrylamide solution

0.5198g bisacrylamide made up to 130 ml with distilled water.

3.4 Staining solutions

3.4.1 0.25g Coomassie Brilliant Blue G-250 plus 0.75g Coomassie Brilliant Blue R-250, made up to 100 ml with water.

3.4.2 55g TCA, 65 ml glacial acetic acid, 180 ml methanol or ethanol plus 25 ml solution 3.4.1, made up to 1 l with distilled water.

4. Procedure

4.1 Protein extraction

4.1.1 Glutenins only

Individual seeds are ground using a hammer (or other device). Ground seed meal is mixed with diluted sample extraction buffer (3.1.1) in a 3 ml polypropylene hemolyse or similar tube with a screw-on or fitted cap. The ratio of meal/extraction buffer is 50 mg/0.75 ml. The samples are extracted for 2 hours at room temperature, mixed several times using a vortex mixer, heated in a boiling water bath for 10 minutes and then allowed to cool. The tubes are centrifuged at 18000g for 5 minutes.

4.1.2 Glutenins following gliadins

If desired, glutenins and gliadins can be analyzed from the same grain. Gliadins are extracted first by adding 0.25 ml of Solution A (3.1.2) to a crushed grain (or half-grain) in a microtiter plate or micro-centrifuge tube and incubating overnight at room temperature. Following this, glutenins are extracted by adding 0.5 ml of Solution B (3.1.2) to the crushed grain and incubating overnight at room temperature.

According to the gel thickness and the size of the wells, the volume of extract loaded can vary. Between 10 and 25 µl is usually sufficient.

4.2 Preparation of the gel

Clean and dry gel cassettes are assembled, according to the design of the equipment used. If tape is used to seal the cassettes, it is advisable to assemble them at least one day in advance of use, to enable the tape to 'age' and adhere better.

4.2.1 Resolving (main) gel (10% acrylamide, pH 8.8)

To make two slab gels of 180 x 160 x 1.5 mm, the following is required:

20 ml stock acrylamide solution (3.3.5)
26 ml stock bisacrylamide solution (3.3.6),
30 ml stock gel buffer (3.3.1).

These should be at room temperature. The mixture is degassed in a 100 ml Büchner flask for 2 - 3 minutes. To this is added:

2 ml APS (3.3.4),
0.8 ml SDS (3.3.3),
40 µl TEMED (use straight from bottle).

The gels are then carefully poured, avoiding the formation of air bubbles, and polymerization allowed to take place at room temperature.

The gel cassettes should not be filled entirely, in order to leave room for a 3-4 cm layer of stacking gel. The gel surface is carefully overlaid with n-butanol (or distilled water) using a syringe. When polymerization is finished (about 30 min.), the gel surface is carefully rinsed with distilled water and dried with filter paper.

4.2.2 Resolving (main) gel (7% acrylamide, pH 8.8)

To resolve the sub-units 2 and 2*, it is necessary to use main gels of 7% acrylamide concentration.

To make two slab gels of 180 x 160 x 1.5 mm, the following is required:

14 ml stock acrylamide solution (3.3.5)
6 ml distilled water
26 ml stock bisacrylamide solution (3.3.6),
30 ml stock gel buffer (3.3.1).

These should be at room temperature. The mixture is de-gassed in a 100 ml Büchner flask for 2 - 3 minutes. To this is added:

2 ml APS (3.3.4),
0.8 ml SDS (3.3.3),
40 µ TEMED (use straight from bottle).

The gels are then carefully poured, avoiding the formation of air bubbles, and polymerization allowed to take place at room temperature.

The gel cassettes should not be filled entirely, in order to leave room for a 3-4 cm layer of stacking gel. The gel surface is carefully overlaid with n-butanol (or distilled water) using a syringe. When polymerization is finished (about 30 min.), the gel surface is carefully rinsed with distilled water and dried with filter paper.

4.2.3 Stacking gel (3% acrylamide, pH 6.8)

In a 50 ml Büchner flask, mix:

1.50 ml stock acrylamide solution (3.3.5),
2.15 ml stock bisacrylamide solution (3.3.6)
2.50 ml stock gel buffer (3.3.2) and
13.15 ml distilled water.

Following de-gassing add:

0.75 ml APS (3.3.4),
0.2 ml SDS (3.3.3),
15 µl TEMED (straight from bottle)

Mix carefully and immediately pour the stacking gels to the top of the gel cassettes. Insert the well-forming "comb", avoiding air bubbles. Allow to polymerize for about 2 hours at room temperature. The "combs" are then removed carefully from the gel cassettes and the wells rinsed using diluted electrophoresis running buffer (3.2).

4.3 Electrophoresis

The tank is filled with the appropriate volume of running buffer (3.2), cooled to 15°C. Following sample loading, electrophoresis is carried out at a constant current of 8 mA/cm² (cross-sectional area) of gel until the pyronin Y/G has moved through the stacking gel, and then at 16 mA/cm² of gel (maximum voltage 300V) until the marker is at the bottom of the gel. The temperature should be maintained at 15°C.

4.4 Fixing and staining

The gel cassettes are removed from the tank, opened and the gels fixed in 250 ml of 15% (w/v) TCA for at least 30 minutes. The gels are rinsed in distilled water and stained overnight in 250 ml of staining solution (3.4.2) at room temperature. Destaining is not usually necessary but gels should be washed in distilled water before being stored in sealed polythene bags.

Other staining procedures can be successfully used (e.g. Coomassie Brilliant Blue G or equivalent in TCA alone). The final quality control criterion, both for gel preparation and gel staining, is to analyze the suggested example varieties on each batch of gels. The separation of the suggested bands, and their relative electrophoretic mobilities (molecular weights) must be clear in order for the procedures to be judged satisfactory.

Recognition of Glutenin Alleles

This Table is designed to illustrate the alleles described above and to assist in the recognition of the different bands. It depicts the position and molecular weight of all of the glutenin bands from each locus, compared to those found in the Example Variety Courtot, along with the band numbers using the nomenclature of Payne; the letter given to each allele following Payne and Lawrence (1983) is also given.

Sub-Units of HMW Glutenins: nomenclature of the individual bands and recognition of the corresponding alleles

Characteristic 27: Glu-A1 locus

		Example variety (Courtot)	Note		
	1 (a)		2 (b)	3 (c)	
1	(113)---		1---		
2/2*	(108)---	2/2*---		2*---	n (no band)
3	(107)---				
4	(106)---				
5	(105)---				
6	(100)---				
6.1	(99)---				
7	(98)---	7 ---			
13/14/ 20	(94)---				
15	(91)---				
16/	(90)---				
17/18	89.5)				
22	(87)---				
8	(86)---	8 ---			
9/10	(83)---				
12	(80)---	12 ---			

Characteristic 28: Glu-B1 locus

		Example variety (Courtot)	Note								
			1 (d)	2 (b)	3 (c)	4 (a)	5 (f)	6 (h)	7 (i)	8 (e)	9
1	(113)---										
2/2*	(108)---	2/2*---									
3	(107)---										
4	(106)---										
5	(105)---										
6	(100)---		6---								
6.1	(99)---									6.1---	
7	(98)---	7 ---		7---	7---	7---					
13/14/ 20	(94)---						13---14---		20---		
15	(91)---							15---			
16/	(90)---						16---		17/18---		
17/18	89.5)										
22	(87)---									22---	
8	(86)---	8 ---	8---	8---							
9/10	(83)---				9---						
12	(80)---	12 ---									

Characteristic 29: Glu-D1 locus

		Example variety (Courtot)	Note			
			1 (a)	2 (b)	3 (c)	4 (d)
1	(113)---					
2/2*	(108)---	2/2*---	2---			
3	(107)---			3---		
4	(106)---				4---	
5	(105)---					5---
6	(100)---					
6.1	(99)---					
7	(98)---	7 ---				
13/14/ 20	(94)---					
15	(91)---					
16/	(90)---					
17/18	89.5)					
22	(87)---					
8	(86)---	8 ---				
9/10	(83)---					10---
12	(80)---	12 ---	12---	12---	12---	

Note: Certain bands (e.g. bands 9 and 10) have similar molecular weights. This leads to the fact that in the presence of bands 5 + 10 of characteristic 29 two states of expression of characteristic 28, band 7 and bands 7 + 9, cannot be differentiated from one another. Therefore, in the presence of bands 5 + 10 of characteristic 29, Note 4 of characteristic 28 could be either band 7 or bands 7 + 9. Other bands having similar molecular weights can be differentiated from one another by their known association with other bands. For characteristic 28, band 13 is always associated with band 16 and band 14 with band 15 while band 40 remains alone.

[français]

Partie I

Introduction

L'annexe suivante comprend une liste des caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse et une description de la méthode à appliquer. L'UPOV a décidé de faire figurer ces caractères dans une annexe aux Principes directeurs, en créant ainsi une catégorie spéciale de caractères, étant donné que la majorité des États membres de l'UPOV sont d'avis qu'il n'est pas possible d'établir la distinction uniquement sur la base d'une différence pour un caractère obtenu par l'utilisation de l'électrophorèse. Ces caractères doivent par conséquent être utilisés uniquement comme complément aux différences constatées pour des caractères morphologiques ou physiologiques. L'UPOV confirme que ces caractères sont considérés comme utiles, mais que, pris isolément, ils ne peuvent pas être suffisants pour établir la distinction. Ils ne doivent pas être utilisés comme caractères de routine, mais seulement sur demande ou avec accord du demandeur.

Pour analyser les gluténines de haut poids moléculaire, il est recommandé de pratiquer l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS PAGE). Les gluténines sont codées par trois loci complexes, appelés Glu-A1, Glu-B1 et Glu-D1 et localisés sur le bras long des chromosomes du groupe 1 (Payne, 1987). A chaque locus, plusieurs allèles peuvent être identifiés, et l'analyse des gluténines de haut poids moléculaire est fondée sur la reconnaissance de ces allèles à partir des protéines qui apparaissent sur des gels sous la forme de bandes ou de groupes de bandes bien définies. Les allèles sont désignés par des numéros de bandes, selon la définition qu'en ont donnée Payne et Lawrence en 1983 (voir le chapitre IX, Bibliographie). Les lettres correspondantes et les poids moléculaires apparents figurent dans la description de la méthode utilisée.

Partie II

Caractères Obtenus par l'Utilisation de l'Electrophorèse

Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielsorten	Note
27. (+) Glutenin composition: allele expression at locus Glu-A1		band 1	bande 1	Bande 1	Kadett	1
		band 2*	bande 2*	Bande 2*	Courtot	2
	Gluténine: expression de l'allèle occupant le locus Glu-A1	no band	pas de bande	keine Bande	Talent	3
Glutenin-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung im Locus Glu-A1						
28. (+) Glutenin composition: allele expression at locus Glu-B1		bands 6 + 8	bandes 6 + 8	Banden 6 + 8	Norman	1
		bands 7 + 8	bandes 7 + 8	Banden 7 + 8	Courtot	2
	Composition de la gluténine: expression de l'allèle occupant le locus Glu-B1	bands 7 + 9	bandes 7 + 9	Banden 7 + 9	Kadett	3
		band 7 (or 7 + 9 in the presence of bands 5 + 10 of char. 29)	bande 7 (ou 7 + 9 en présence des bandes 5 + 10 du car. 29)	Bande 7 (oder 7 + 9 in Gegenwart der Banden 5 + 10 des Merkm. 29)	Okapi	4
	Glutenin-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung im Locus Glu-B1	bands 13 + 16	bandes 13 + 16	Banden 13+ 16	Carala	5
		bands 14 + 15	bandes 14 + 15	Banden 14 + 15	Troll	6
		bands 17 + 18	bandes 17 + 18	Banden 17 + 18	Moulin	7
		band 20	bande 20	Bande 20	Figaro	8
		bands 6.1 + 22	bandes 6.1 + 22	Banden 6.1 + 22	Schwabenkorn	9
29. (+) Glutenin composition: allele expression at locus Glu-D1		bands 2 + 12	bandes 2 + 12	Banden 2 + 12	Courtot	1
		bands 3 + 12	bandes 3 + 12	Banden 3 + 12	Norman	2
	Composition de la gluténine: expression de l'allèle occupant le locus Glu-D1	bands 4 + 12	bandes 4 + 12	Banden 4 + 12	Talent	3
		bands 5 + 10	bandes 5 + 10	Banden 5 + 10	Kadett	4
Glutenin-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung im Locus Glu-D1						

Partie III

Description de la Méthode à Utiliser

Composition de la gluténine : expression de l'allèle occupant les loci Glu-A1 (27),
Glu-B1 (28) et Glu-D1 (29)

Méthode SDS PAGE pour l'analyse des gluténines, de haut poids moléculaire, de T. aestivum

1. Matériel et équipement

Tout système d'électrophorèse vertical peut être utilisé à condition que les gels puissent être maintenus à température constante. Il est recommandé d'employer un gel d'au plus 1,5 mm d'épaisseur. Le générateur utilisé doit pouvoir fournir un courant et une tension d'alimentation constants.

2. Produits chimiques

Tous les produits chimiques doivent être de qualité "réactif analytique", voire mieux :

Acrylamide ("spécialement purifié pour l'électrophorèse")
Bisacrylamide ("spécialement purifié pour l'électrophorèse")
Tris (hydroxyméthyle) méthylamine (TRIS)
Dodécylsulfate de sodium (sodium dodecyl sulphate - SDS)
Persulfate d'ammonium (ammonium persulphate - APS)
2-mercaptoéthanol
NNN'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED)
Acide trichloroacétique (trichloroacetic acid - TCA)
Acide chlorhydrique
Acide acétique glacial
Glycine
n-Butanol
Pyronine Y (ou G)
Glycérol (d = 1,256)
Méthanol ou éthanol
Bleu de Coomassie R-250 (ou équivalent)
Bleu de Coomassie G-250 (ou équivalent)

3. Solutions

3.1 Solution d'extraction

3.1.1 Extraction des gluténines seulement

Solution-mère :

tampon : TRIS HCl 1M, pH 6,8 (voir 3.3.2) : 6,25 ml
eau distillée : 12,05 ml
SDS : 2 g
pyronine Y (ou G) : 10 mg
glycérol : 10 ml
Cette solution peut être conservée pendant deux mois à 4°C.

Juste avant utilisation, la solution d'extraction est préparée comme suit :

4,25 ml de solution-mère (voir ci-dessus) plus 0,75 ml de 2-mercaptoéthanol. Ajuster à 10 ml avec de l'eau distillée. Celle-ci doit être préparée juste avant d'être utilisée et ne peut pas être stockée.

3.1.2 Extraction des gluténines après celle des gliadines

Solution A : 25 ml de 2-chloroéthanol + 50 mg de pyronine Y ou G. Ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée.
Solution B : 27,0 g d'urée, 3,0 ml de 2-mercaptoéthanol + 10,0 g de SDS. Ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée.

3.2 Tampon de migration

Solution-mère :

glycine : 141,1 g
TRIS : 30,0 g
SDS : 10,0 g
Ajuster à un litre avec de l'eau distillée.

Juste avant utilisation, la solution de base est diluée au 1/10 avec de l'eau distillée.

La solution-mère de tampon peut être conservée pendant deux mois à température ambiante. Ne pas stocker la solution tampon diluée plus d'une semaine. Le pH du tampon doit être voisin de 8,3.

3.3 Solutions pour la préparation des gels

3.3.1 Tampon du gel de séparation (TRIS HCl 1M, pH 8,8)

121,14 g de TRIS plus environ 20 ml de HCl (d = 1,19). Ajuster à un litre avec de l'eau distillée. Celui-ci peut être conservé pendant deux mois à 4°C.

3.3.2 Tampon du gel de concentration (TRIS HCl 1M, pH 6,8)

121,14 g de TRIS plus environ 78 ml de HCl (d = 1,19). Ajuster à un litre avec de l'eau distillée. Celui-ci peut être conservé pendant deux mois à 4°C.

3.3.3 Solution de SDS à 10% (p/v)

10 g de SDS dissous dans de l'eau distillée jusqu'à l'obtention de 100 ml de solution. Celle-ci peut être conservée pendant deux mois à 4°C. Avant de l'utiliser, agiter et chauffer légèrement le mélange pour dissoudre à nouveau le SDS si besoin.

3.3.4 Solution de persulfate d'ammonium à 1% (p/v)

1 g de APS dissous dans de l'eau distillée jusqu'à l'obtention de 100 ml de solution. Celle-ci doit être préparée juste avant utilisation.

3.3.5 Solution-mère d'acrylamide

40,02 g d'acrylamide et ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée.

3.3.6 Solution-mère de bisacrylamide

0,5198 g de bisacrylamide et ajuster à 130 ml avec de l'eau distillée.

3.4 Solutions de coloration

3.4.1 0,25 g de bleu de Coomassie G-250 plus 0,75 g de bleu de Coomassie R-250 et ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée.

3.4.2 55 g de TCA, 65 ml d'acide acétique glacial, 180 ml de méthanol ou éthanol, plus 25 ml de la solution ci-dessous (3.4.1) et ajuster à un litre avec de l'eau distillée.

4. Manipulation

4.1 Extraction des protéines

4.1.1 Gluténines seulement

Les grains sont broyés au moyen d'un marteau (ou de tout autre instrument). La farine ainsi obtenue est mélangée au tampon d'extraction dilué (3.1.1) dans un tube à hémolyse de 3 ml en polypropylène ou dans un tube analogue muni d'un couvercle vissé ou emboîté. La proportion est de 50 mg de farine pour 0,75 ml de tampon d'extraction. Les échantillons sont extraits pendant deux heures à température ambiante, agités plusieurs fois au moyen d'un mélangeur à turbulence (vortex), chauffés pendant dix minutes dans un bain d'eau bouillante, puis mis à refroidir. Les tubes sont centrifugés à 18 000 g pendant cinq minutes.

4.1.2 Extraction des gluténines après extraction des gliadines

Si on le souhaite, les gluténines et les gliadines peuvent être analysées à partir du même grain. Tout d'abord les gliadines sont extraites en ajoutant 0,25 ml de solution A (3.1.2) au grain (ou demi-grain) écrasé placé sur une plaque de microtitration ou dans un tube de microcentrifugation (Eppendorf) et en laissant incuber toute la nuit à température ambiante. Ensuite, les gluténines sont extraites en ajoutant 0,5 ml de solution B (3.1.2) au grain écrasé et en laissant incuber toute la nuit à température ambiante.

Selon l'épaisseur du gel et la dimension des puits, le volume d'extrait chargé peut varier. Généralement, 10 à 25 µl suffisent.

4.2 Préparation du gel

Les cassettes doivent être propres et séchées. Les cassettes sont assemblées en fonction de la configuration du matériel utilisé. Si l'on se sert de ruban adhésif pour les fermer, il est judicieux de les assembler au moins le jour précédant leur utilisation, afin que le ruban adhésif puisse "vieillir" et mieux adhérer.

4.2.1 Gel de séparation (principal) (10% d'acrylamide - pH 8,8)

Pour deux gels de 180 x 160 x 1,5 mm, il faut :

- 20 ml de solution mère d'acrylamide (3.3.5),
- 26 ml de solution mère de bisacrylamide (3.3.6),
- 30 ml de tampon gel (3.3.1).

Le mélange, qui doit être à température ambiante, est dégazé pendant 2 - 3 minutes dans une fiole à vide (flacon de Büchner) de 100 ml. Ajouter à ce mélange :

- 2 ml de APS (3.3.4),
- 0,8 ml de SDS (3.3.3),
- 40 µl de TEMED (prélevé directement de la bouteille).

Ensuite, le gel est coulé entre les deux plaques avec précaution, en évitant la formation de bulles d'air. Laisser polymériser, à température ambiante.

Les cassettes ne doivent pas être remplies complètement, pour pouvoir couler un gel de concentration, d'une hauteur de 3 à 4 cm. La surface du gel est minutieusement recouverte de n-butanol (ou d'eau distillée) au moyen d'une seringue. Lorsque la polymérisation est terminée (au bout d'une trentaine de minutes), la surface du gel est soigneusement rincée avec de l'eau distillée et séchée avec du papier-filtre.

4.2.2 Gel de séparation (principal) (7% d'acrylamide - pH 8,8)

Pour séparer les sous-fractions 2 et 2*, il est nécessaire d'utiliser un gel de séparation d'une concentration de 7% d'acrylamide.

Pour deux gels de 180 x 160 x 1,5 mm, il faut :

14 ml de solution-mère d'acrylamide (3.3.5),
6 ml d'eau distillée,
26 ml de solution-mère de bisacrylamide (3.3.6),
30 ml du tampon gel (3.3.1).

Le mélange, qui doit être à température ambiante, est dégazé pendant 2 - 3 minutes dans une fiole à vide (flacon de Büchner) de 100 ml. Ajouter à ce mélange :

2 ml d'APS (3.3.4),
0,8 ml de SDS (3.3.3),
40 µl de TEMED (prélevé directement de la bouteille).

Ensuite, le gel est coulé avec précaution, en évitant la formation de bulles d'air. Laisser polymériser, à température ambiante.

Les cassettes ne doivent pas être remplies complètement, afin de pouvoir couler un gel de concentration, d'une hauteur de 3 à 4 cm. La surface du gel est minutieusement recouverte de n-butanol (ou d'eau distillée) au moyen d'une seringue. Lorsque la polymérisation est terminée (au bout d'une trentaine de minutes), la surface du gel est soigneusement rincée avec de l'eau distillée et séchée avec du papier-filtre.

4.2.3 Gel de concentration (3% d'acrylamide - pH 6,8)

Dans une fiole à vide (flacon de Büchner) de 50 ml, on mélange :

1,50 ml de solution-mère d'acrylamide (3.3.5),
2,15 ml de solution-mère de bisacrylamide (3.3.6),
2,50 ml de tampon gel (3.3.2), et
13,15 ml d'eau distillée.

Après dégazage, on ajoute :

0,75 ml d'APS (3.3.4),
0,2 ml de SDS (3.3.3),
15 µl de TEMED (prélevé directement de la bouteille).

Mélanger soigneusement et verser immédiatement la solution de gel de concentration de manière à remplir les cassettes. Le "peigne" servant à former des puits est inséré entre les deux plaques en évitant la constitution de bulles d'air. Laisser polymériser pendant deux heures environ à température ambiante. Ensuite, retirer avec précaution les "peignes" des cassettes et rincer les puits au moyen du tampon de migration dilué (3.2).

4.3 Électrophorèse

La cuve est remplie de tampon de migration (3.2), refroidie à 15°C. Après avoir introduit l'échantillon, un courant constant de 8 mA/cm² (surface de la section transversale) est appliqué jusqu'à ce que la pyronine Y/G ait traversé le gel de concentration, puis de 16 mA/cm² (maximum 300V) jusqu'à ce que le marqueur se trouve à l'extrémité du gel. La température doit être maintenue à 15°C.

4.4 Fixation et coloration

Les cassettes sont retirées de la cuve ouverte. Les gels sont fixés pendant 30 minutes au moins dans 250 ml de TCA à 15% (p/v) puis rincés dans de l'eau distillée et placés jusqu'au lendemain dans 250 ml de solution de coloration (3.4.2) à température ambiante. Il n'est généralement pas nécessaire de les décolorer, mais il faut les laver dans de l'eau distillée avant de les stocker dans des sachets de polyéthylène hermétiquement fermés.

D'autres méthodes de coloration peuvent être appliquées avec succès (bleu de Coomassie G, ou substance équivalente, dans du TCA uniquement). Pour contrôler la qualité finale du gel, du point de vue à la fois de sa préparation et de sa coloration, les variétés témoins proposées sont analysées pour chaque série de gels. La séparation des bandes et leur mobilité électrophorétique relative (poids moléculaires) des variétés témoins doivent être nettes pour que la manipulation soit jugée satisfaisante.

Reconnaissance des allèles des gluténines

Le tableau ci-dessous illustre les allèles décrits plus haut et vise à aider à reconnaître les différentes bandes. Il indique la position et le poids moléculaire de toutes les bandes de gluténines de chaque locus, en comparaison avec la variété Courtot, ainsi que les numéros de ces bandes d'après la nomenclature de Payne; la lettre attribuée à chaque allèle par Payne et Lawrence (1983) est également donnée.

Caractère 29 : **Glu-D1** locus

		Exemple (Courtot)	Note			
			1 (a)	2 (b)	3 (c)	4 (d)
1	(113)---					
2/2*	(108)---	2/2*---	2---			
3	(107)---			3---		
4	(106)---				4---	
5	(105)---					5---
6	(100)---					
6.1	(99)---					
7	(98)---	7 ---				
13/14/ 20	(94)---					
15	(91)---					
16/	(90)---					
17/18	89.5)					
22	(87)---					
8	(86)---	8 ---				
9/10	(83)---					10---
12	(80)---	12 ---	12---	12---	12---	

Note : Certaines bandes (les bandes 9 et 10, par exemple) ont des poids moléculaires similaires. Cela a pour résultat que lorsque, pour le caractère 29, il y a présence des bandes 5 + 10, les deux niveaux d'expression du caractère 28, bande 7 (Note 4) et bandes 7 + 9 (Note 3) ne peuvent pas être différenciés l'un de l'autre. Par conséquent, lorsque, pour le caractère 29, les bandes 5 + 10 sont présentes, la Note 4 du caractère 28 peut correspondre soit à la bande 7, soit aux bandes 7 + 9 (identiques à la Note 3). D'autres bandes qui ont des poids moléculaires similaires peuvent être différenciées les unes des autres grâce à leur association connue avec d'autres bandes. Pour le caractère 28, la bande 13 est toujours associée avec la bande 16 et la bande 14 toujours avec la bande 15, la bande 40 restant isolée.

[deutsch]

Teil I

Einführung

Die folgende Anlage enthält eine Liste der Merkmale, die sich bei Verwendung der Elektrophorese ergeben, sowie eine Beschreibung der zu verwendenden Methode. Die UPOV hat entschieden, diese Merkmale in einer Anlage zu den Prüfungsrichtlinien aufzuführen und damit eine besondere Kategorie von Merkmalen zu bilden, da die Mehrheit der UPOV Verbandsstaaten der Meinung ist, daß es nicht möglich ist, die Unterscheidbarkeit allein auf der Grundlage eines Unterschiedes zu begründen, der in einem mit Hilfe der Elektrophorese sich ergebenden Merkmal erfaßt wurde. Solche Merkmale sollten daher nur ergänzend zu anderen Unterschieden in morphologischen oder physiologischen Merkmalen verwendet werden. Die UPOV bestätigt, daß diese Merkmale als nützlich angesehen werden; es könnte aber sein, daß sie alleine für sich genommen für die Erstellung der Unterscheidbarkeit nicht ausreichen. Sie sollten nicht als Routinemerkmale verwendet werden, sondern nur auf Antrag oder mit Zustimmung des Anmelders der Kandidatensorte.

Für die Analyse von HMW-Gluteninen sollte die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in Anwesenheit von Natrium-Dodecylsulfat (SDS-PAGE) verwendet. Glutenine sind durch drei zusammengesetzte Loci kodiert, die als Glu-A1, Glu-B1 und Glu-D1 auf den langen Schenkeln der Chromosome der Gruppe 1 (Payne, 1987) bekannt sind. In jedem Locus ist eine Reihe von Allelen vorhanden, und die Analyse von HMW-Gluteninen beruht auf der Erkennung dieser Allele aus den Proteinen, die in den Gelen als eine Serie gut definierter Banden oder Bandenmuster erscheinen. Die Allele werden gemäß der von Payne und Lawrence, 1983, (siehe Kapitel IX, Literatur) gegebenen Definition mit Bandennummern bezeichnet. Die entsprechenden Buchstaben und angenommenen Molekulargewichte sind in der Beschreibung der zu verwendenden Methode wiedergegeben.

Teil II

Merkmale die sich bei Verwendung der Elektrophorese ergeben

Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielsorten	Note
27. (+) Glutenin composition: allele expression at locus Glu-A1		band 1	bande 1	Bande 1	Kadett	1
		band 2*	bande 2*	Bande 2*	Courtot	2
	Gluténine: expression de l'allèle occupant le locus Glu-A1	no band	pas de bande	keine Bande	Talent	3
Glutenin-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung im Locus Glu-A1						
28. (+) Glutenin composition: allele expression at locus Glu-B1		bands 6 + 8	bandes 6 + 8	Banden 6 + 8	Norman	1
		bands 7 + 8	bandes 7 + 8	Banden 7 + 8	Courtot	2
	Composition de la gluténine: expression de l'allèle occupant le locus Glu-B1	bands 7 + 9	bandes 7 + 9	Banden 7 + 9	Kadett	3
		band 7 (or 7 + 9 in the presence of bands 5 + 10 of char. 29)	bande 7 (ou 7 + 9 en présence des bandes 5 + 10 du car. 29)	Bande 7 (oder 7 + 9 in Gegenwart der Banden 5 + 10 des Merkm. 29)	Okapi	4
	Glutenin-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung im Locus Glu-B1	bands 13 + 16	bandes 13 + 16	Banden 13+ 16	Carala	5
		bands 14 + 15	bandes 14 + 15	Banden 14 + 15	Troll	6
		bands 17 + 18	bandes 17 + 18	Banden 17 + 18	Moulin	7
		band 20	bande 20	Bande 20	Figaro	8
		bands 6.1 + 22	bandes 6.1 + 22	Banden 6.1 + 22	Schwabenkorn	9
29. (+) Glutenin composition: allele expression at locus Glu-D1		bands 2 + 12	bandes 2 + 12	Banden 2 + 12	Courtot	1
		bands 3 + 12	bandes 3 + 12	Banden 3 + 12	Norman	2
	Composition de la gluténine: expression de l'allèle occupant le locus Glu-D1	bands 4 + 12	bandes 4 + 12	Banden 4 + 12	Talent	3
		bands 5 + 10	bandes 5 + 10	Banden 5 + 10	Kadett	4
Glutenin-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung im Locus Glu-D1						

Teil III

Beschreibung der zu verwendenden Methode

Glutenin-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in den Loci Glu-A1 (27), Glu-B1 (28) and Glu-D1 (29)

SDS-PAGE-Methode für die Analyse von HMW-Gluteninen von T. aestivum

1. Geräte und Ausrüstung

Verwendet werden kann jedes geeignete vertikale Elektrophorese-System unter der Voraussetzung, daß die Gele auf einer konstanten Temperatur gehalten werden können. Es wird eine Geldicke von nicht mehr als 1,5 mm empfohlen. Die verwendete Energiequelle sollte sowohl konstante Stromstärke als auch eine konstante Stromspannung liefern.

2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sollten mindestens Analysenreinheit aufweisen.

Acrylamid (Spezialqualität für Elektrophorese-Zwecke)
Bisacrylamid (Spezialqualität für Elektrophorese-Zwecke)
Tris(Hydroxymethyl) methylamin (TRIS)
Natriumdodecylsulfat (SDS)
Ammoniumpersulfat (APS)
2-Mercaptoethanol
NNN'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)
Trichloressigsäure (TCA)
Salzsäure (HCL)
Eisessig
Glycin
n-Butanol
Pyronin Y (oder G)
Glycerin (d = 1.256)
Methanol oder Äthanol
Coomassie Brilliant Blue R-250 (oder gleichwertig)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (oder gleichwertig)

3. Lösungen

3.1 Extraktionslösung

3.1.1 Extraktion der Glutenine

Stammlösung:

6,25 ml Sammelpuffer (siehe 3.3.2)
12,05 ml destilliertes Wasser
2 g SDS
10 mg Pyronin Y (oder G)
10 ml Glycerin
Diese Lösung kann zwei Monate bei 4 °C gelagert werden.

Die Extraktionslösung wird unmittelbar vor Verwendung wie folgt zubereitet:

5,25 ml Stammlösung (s. oben) und 0,75 ml 2-Mercaptoethanol werden mit destilliertem Wasser auf 10,0 ml verdünnt. Diese Lösung muß unmittelbar vor der Benutzung vorbereitet werden und kann nicht gelagert werden.

3.1.2 Zweistufige Extraktion der Glutenine und Gliadine

Lösung A: 25 ml 2 - Chlorethanol und 50 mg Pyronin Y/G werden mit destilliertem Wasser auf 100 ml verdünnt.

Lösung B: 27,0 g Harnstoff, 3,0 ml 2 - Mercaptoethanol und 10,0 g SDS werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

3.2 Elektrophoresepuffer

Stammlösung:

141,1 g Glycin
30,0 g TRIS
10,0 g SDS
werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Unmittelbar vor Verwendung wird die Stammlösung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Die Stammlösung kann 2 Monate bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Der verdünnte Puffer darf nicht länger als eine Woche aufbewahrt werden. Der pH-Wert des Puffers muß bei knapp 8,3 liegen.

3.3 Lösungen für die Gelpräparation

3.3.1 Trenngelpuffer (1M TRIS HCl, pH 8,8)

121,14 g TRIS und etwa 20 ml HCl (d = 1,19) werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Dieser Puffer kann 2 Monate bei 4 °C gelagert werden.

3.3.2 Sammelgelpuffer (1M TRIS HCl, pH 6,8)

121,14 g TRIS und etwa 78 ml HCl (d = 1,19) werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Dieser Puffer kann 2 Monate bei 4 °C gelagert werden.

3.3.3 10% (w/v) SDS-Lösung

10 g SDS werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung kann 2 Monate bei 4 °C gelagert werden. Vor der Verwendung wird gegebenenfalls die Lösung behutsam gerührt und erwärmt, um SDS wieder aufzulösen.

3.3.4 1% (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung

1 g APS wird in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung muß unmittelbar vor der Verwendung vorbereitet werden.

3.3.5 Acrylamid-Stammlösung

40,02 g Acrylamid werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

3.3.6 Bisacrylamid-Stammlösung

0,5198 g Bisacrylamid werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 130 ml aufgefüllt.

3.4 Farblösungen

3.4.1 0,25 g Coomassie Brilliant Blue G-250 und 0,75 g Coomassie Brilliant Blue R-250 werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

3.4.2 55 g TCA, 65 ml Eisessig, 180 ml Methanol oder Äthanol und 25 ml Lösung 3.4.1 werden mit destilliertem Wasser auf 1 Liter verdünnt.

4. Verfahren

4.1 Protein-Extraktion

4.1.1 Extraktion der Glutenine

Die einzelnen Samen werden unter Verwendung eines Hammers oder einer anderen Einrichtung zerstoßen. In einem 3 ml Polypropylen-Hämolyse- oder ähnlichem Röhrchen mit einem Schraub- oder Kapselverschluß wird der zerstoßene Samen in Extraktionslösung suspendiert (3.1.1). Das Verhältnis Samen/Extraktionslösung ist 50 mg/0,75 ml. Die Proben werden zwei Stunden bei Raumtemperatur extrahiert, dabei mehrmals unter Verwendung eines Vortex-Mixers geschüttelt und anschließend 10 Minuten in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Danach läßt man die Proben abkühlen und zentrifugiert sie bei 18000 g 5 Minuten lang.

4.1.2 Zweistufige Extraktion der Gliadine und Glutenine

Glutenine und Gliadine können am gleichen Samen analysiert werden. Zuerst werden die Gliadine extrahiert, indem man 0,25 ml der Lösung A (3.1.2) zu dem zerquetschten (oder halben) Samen gibt (Mikrotiterplatte oder Mikrozentrifugenröhrchen) und dann eine Nacht bei Raumtemperatur inkubieren läßt. Danach werden die Glutenine durch Zugabe von 0,5 ml Lösung B (3.1.2) und Inkubation über eine weitere Nacht bei Raumtemperatur extrahiert.

Je nach Geldicke und Größe der Geltaschen kann das Volumen des entnommenen Extrakts variieren. Für gewöhnlich reichen 10 bis 25 µl aus.

4.2 Präparation des Gels

Saubere und trockene Gel-Kassetten werden gemäß der Anleitung der verwendeten Ausrüstung zusammengesetzt. Wird zur Versiegelung der Kassetten Klebeband verwendet, so ist anzuraten, die Kassette zumindest einen Tag vor der Verwendung zusammenzubauen, damit das Klebeband 'altern' und besser haften kann.

4.2.1 Trenngel (10% Acrylamid, pH 8,8)

Um zwei Gele im Format von 180 x 160 x 1,5 mm anzufertigen, wird folgende Mischung hergestellt:

- 20 ml Acrylamid-Stammlösung (3.3.5)
- 26 ml Bisacrylamid-Stammlösung (3.3.6)
- 30 ml Trenngelpuffer (3.3.1).

Die Temperatur sollte Raumtemperatur betragen. Die Mischung wird 2 - 3 Minuten lang in einer 100 ml Büchner-Flasche entgast. Alsdann wird hinzugefügt:

2 ml APS-Lösung (3.3.4)
0,8 ml SDS-Lösung (3.3.3)
40 µl TEMED.

Dann werden die Gele sorgfältig gegossen, wobei die Bildung von Luftbläschen vermieden wird.

Die Gekassetten werden nicht ganz gefüllt, damit noch Platz (3-4 cm) für das Sammelgel bleibt. Dann wird mittels einer Spritze sorgfältig n-Butanol (oder destilliertes Wasser) auf die Gel-Oberfläche aufgetragen. Ist die Polymerisierung (nach etwa 30 Min.) beendet, wird die Gel-Oberfläche sorgfältig mit destilliertem Wasser abgespült und mit Filterpapier getrocknet.

4.2.2 Trenngel (7% Acrylamid, pH 8.8)

Um die Untereinheiten 2 und 2* aufzulösen, muß ein Trenngel mit einer Konzentration von 7% verwendet werden.

Für die Herstellung von zwei Gelen im Format 180 x 160 x 1,5 mm wird folgende Mischung hergestellt:

14 ml Acrylamid-Stammlösung (3.3.5)
6 ml destilliertes Wasser
26 ml Bisacrylamid-Stammlösung (3.3.6)
30 ml Trenngelpuffer (3.3.1).

Die Temperatur sollte Raumtemperatur betragen. Die Mischung wird 2 - 3 Minuten lang in einer 100 ml Büchner Flasche entgast. Alsdann wird hinzugefügt:

2 ml APS-Lösung (3.3.4)
0,8 ml SDS-Lösung (3.3.3)
40 µl TEMED.

Dann werden die Gele sorgfältig gegossen, wobei die Bildung von Luftbläschen vermieden wird.

Die Gekassetten werden nicht ganz gefüllt, damit noch Platz (3-4 cm) für das Sammelgel bleibt. Dann wird mittels einer Spritze sorgfältig n-Butanol (oder destilliertes Wasser) auf die Gel-Oberfläche aufgetragen. Ist die Polymerisierung (nach etwa 30 Min.) beendet, wird die Gel-Oberfläche sorgfältig mit destilliertem Wasser abgespült und mit Filterpapier getrocknet.

4.2.3 Sammelgel (3% Acrylamid, pH 6.8)

In einer 50 ml Büchner-Flasche werden vermischt und entgast:

1,50 ml Acrylamid-Stammlösung (3.3.6)
2,15 ml Bisacrylamid-Stammlösung (3.3.6)
2,50 ml Sammelgelpuffer (3.3.2) und
13,15 ml destilliertes Wasser.

Dann wird folgendes hinzugefügt:

0,75 ml APS-Lösung (3.3.4)
0,2 ml SDS-Lösung (3.3.3)
15 µl TEMED.

Die Sammelgele werden sofort auf die Trenngele gegossen. Die Probenkämme zur Bildung der Geltaschen werden unter Vermeidung von Luftbläschen in die Sammelgele eingetaucht. Man läßt 2 Stunden bei Raumtemperatur die Gele aushärten. Dann werden die Probenkämme entfernt und die Geltaschen mit Elektrophoresepuffer (3.2) ausgespült.

4.3 Elektrophorese

Die Elektrophoresekammer wird mit dem passenden auf 15 °C abgekühlten Volumen des Elektrophoresepuffers (3.2) gefüllt. Die Proteinextrakte (4.1.1 oder 4.1.2) werden in die Geltaschen gefüllt und die Elektrophorese wird bei konstantem Strom von 8 mA/cm² Gelquerschnitt durchgeführt. Ist der Pyronin Y/G-Marker durch das Sammelgel gewandert, wird die Stromstärke auf 16 mA/cm² Gelquerschnitt (bis maximal 300 V) erhöht. Die Temperatur sollte bei 15 °C gehalten werden. Erreicht der Pyronin Y/G-Marker das untere Ende des Trenngels, wird die Elektrophorese abgestoppt.

4.4 Fixierung und Färbung

Die Gekassetten werden aus der Elektrophoresekammer genommen und geöffnet. Die Gele werden in 250 ml 15% (w/v) Trichloressigsäure mindestens 30 Minuten lang fixiert, mit destilliertem Wasser abgespült und über Nacht in 250 ml Farblösung (3.4.2) bei Raumtemperatur gefärbt. Entfärben ist gewöhnlich nicht nötig. Die Gele sollten aber in destilliertem Wasser gewaschen werden, bevor sie in versiegelten Polyäthylen-Beuteln aufbewahrt werden.

Andere Färbungen können verwendet werden (wie z. B. Coomassie Brilliant Blue G oder gleichwertig, gelöst nur in TCA). Das Kriterium für die Qualitätskontrolle besteht sowohl für die Gelherstellung als auch für die Gelfärbung darin, die vorgeschlagenen Beispielsorten in jeder Gelpartie zu prüfen. Die Trennung der vorgeschlagenen Banden und ihre relativen elektrophoretischen Mobilitäten (Molekulargewichte) müssen eindeutig sein, damit die Verfahren als zufriedenstellend beurteilt werden.

Merkmal 29: **Glu-D1** locus

		Beispielssorte (Courtot)	Note			
			1 (a)	2 (b)	3 (c)	4 (d)
1	(113)---					
2/2*	(108)---	2/2*---	2---			
3	(107)---			3---		
4	(106)---				4---	
5	(105)---					5---
6	(100)---					
6.1	(99)---					
7	(98)---	7 ---				
13/14/ 20	(94)---					
15	(91)---					
16/	(90)---					
17/18	89.5)					
22	(87)---					
8	(86)---	8 ---				
9/10	(83)---					10---
12	(80)---	12 ---	12---	12---	12---	

Anmerkung: Bestimmte Banden (z. B. Banden 9 und 10) haben ähnliche Molekulargewichte. Das führt dazu, daß in Gegenwart der Banden 5 + 10 des Merkmals 29 zwei Ausprägungsstufen des Merkmals 28, Bande 7 und Banden 7 + 9, nicht voneinander unterschieden werden können. Daher kann, in Gegenwart der Banden 5 + 10 des Merkmals 29, die Note 4 des Merkmals 28 entweder Bande 7 sein oder Banden 7 + 9. Andere Banden, die ähnliche Molekulargewichte haben, können durch ihre bekannte Verbindung mit anderen Banden voneinander unterschieden werden. Für Merkmal 28 ist Bande 13 immer mit Bande 16 verbunden und Bande 14 mit Bande 15, während Bande 40 isoliert bleibt.

[End of document/
Fin du document/
Ende des Dokuments]