

TGP/15/4 Draft 1 Rev. – Clean version**Original:** englisch**Datum:** 16. Oktober 2026**ENTWURF
(ÜBERARBEITUNG)**

Verbundenes Dokument zur
Allgemeine Einführung zur Prüfung auf Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit und Erarbeitung
harmonisierter Beschreibungen von neuen Pflanzensorten (Dokument TG/1/3)

DOKUMENT TGP/15**ANLEITUNG ZUR VERWENDUNG BIOCHEMISCHER UND MOLEKULARER MARKER BEI DER
PRÜFUNG DER UNTERSCHIEDBARKEIT, HOMOGENITÄT UND BESTÄNDIGKEIT (DUS)**

Vom Verbandsbüro erstelltes Dokument

zu prüfen vom

Technischen Ausschuss, Verwaltungs- und Rechtsausschuss, und vom Rat in 2026

Haftungsausschluss: dieses Dokument gibt nicht die Grundsätze oder eine Anleitung der UPOV wieder

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	3
2. MODELLE FÜR DIE ANWENDUNG	3
2.1 Merkmalsspezifische molekulare Marker.....	3
<i>Beispiel 1: Genspezifische Marker für Herbizidtoleranz</i>	<i>4</i>
<i>Beispiel 2: Genspezifischer Marker mit unvollständigen Informationen über die Ausprägungsstufe für Krankheitsresistenz bei Tomate</i>	<i>5</i>
2.2 Kombination phänotypischer und molekularer Abstände bei der Verwaltung von Sortensammlungen	6
<i>Beispiel 1: Elternlinien von Mais.....</i>	<i>6</i>
<i>Beispiel 2: Genetische Auswahl von ähnlichen Sorten für die erste Wachstumsperiode</i>	<i>10</i>
3. RICHTLINIEN FÜR DIE VALIDIERUNG EINES NEUEN MERKMALSPEZIFISCHEN PROTOKOLLS FÜR MOLEKULARE MARKER ALS EINE ALTERNATIVE ERFASSUNGSMETHODE	11
3.1 Ziel dieser Richtlinien.....	11
3.2 Anwendung dieser Richtlinien	12
3.3 Leistungskriterien für ein neues Protokoll auf der Grundlage von molekularen Markern.....	12
<i>Spezifität</i>	<i>12</i>
<i>Empfindlichkeit und Nachweisgrenze.....</i>	<i>12</i>
<i>Wiederholbarkeit</i>	<i>13</i>
<i>Reproduzierbarkeit.....</i>	<i>13</i>
<i>Robustheit.....</i>	<i>14</i>
3.4 Prüfbericht.....	14
<i>Inhalt des Prüfberichts</i>	<i>14</i>
<i>Veröffentlichung</i>	<i>14</i>
3.5 Standardprotokoll für merkmalspezifische molekulare Marker	14
3.6 Überwachung nach Annahme des Markerprotokolls	17
3.7 Literatur	18

1. EINLEITUNG

1.1 In Dokument UPOV/INF/18 „Mögliche Verwendung molekularer Marker bei der Prüfung der Unterscheidbarkeit, der Homogenität und der Beständigkeit (DUS)“ werden mögliche Anwendungsmodelle für die Verwendung biochemischer und molekularer Marker bei der DUS-Prüfung untersucht, die der Technische Ausschuss (TC) der Ad-hoc-Untergruppe technischer und juristischer Sachverständiger für biochemische und molekulare Verfahren (BMT-Überprüfungsgruppe) auf der Grundlage der Arbeiten der Arbeitsgruppe für biochemische und molekulare Verfahren und insbesondere für DNS-Profilierungsverfahren (BMT) und der artenspezifischen Untergruppen für molekulare Verfahren (artenspezifische Untergruppen) (vergleiche <http://www.upov.int/about/de/organigram.html>) vorgeschlagen hat. Die Beurteilung durch die BMT-Überprüfungsgruppe und die Meinungen des Technischen Ausschusses und des Verwaltungs- und Rechtsausschusses (CAJ) zu diesen Modellen werden in Dokument UPOV/INF/18 dargelegt.

1.2 Dieses Dokument soll Anleitung zur Verwendung biochemischer und molekularer Marker bei der Prüfung der Unterscheidbarkeit, der Homogenität und der Beständigkeit (DUS) auf der Grundlage der Modelle, die positiv beurteilt wurden und für die anerkannte Beispiele gegeben wurden.

1.3 Die einzigen verbindlichen Verpflichtungen für die Verbandsmitglieder sind diejenigen, die das UPOV-Übereinkommen selbst vorsieht, und das vorliegende Dokument darf nicht in einer Weise ausgelegt werden, die in Widerspruch zu der für das jeweilige Verbandsmitglied geltenden Akte steht.

1.4 Folgende Abkürzungen werden in diesem Dokument verwendet:

CAJ:	Verwaltungs- und Rechtsausschuss
TC:	Technischer Ausschuss
TWP:	Technische Arbeitsgruppen
BMT:	Arbeitsgruppe für biochemische und molekulare Verfahren und insbesondere für DNS-Profilierungsverfahren
BMT- Überprüfungsgruppe:	Ad-hoc-Untergruppe technischer und juristischer Sachverständiger für biochemische und molekulare Verfahren
Artenspezifische Untergruppe:	artenspezifische Ad-hoc-Untergruppe für molekulare Verfahren

2. MODELLE FÜR DIE ANWENDUNG

2.1 Merkmalsspezifische molekulare Marker

2.1.1 Molekulare Marker können auf der folgenden Grundlage als eine Methode zur Prüfung von DUS Merkmalen, die die Kriterien für die in der Allgemeinen Einführung, Kapitel 4, Abschnitt 4.2 dargelegten Merkmale erfüllen, verwendet werden:

a) die Prüfung des Markers wird für die gleiche Anzahl Einzelpflanzen mit den gleichen Kriterien für die Unterscheidbarkeit, die Homogenität und die Beständigkeit durchgeführt wie bei der Prüfung des Merkmals durch eine biologische Prüfung;

b) es erfolgt eine Überprüfung der Zuverlässigkeit der Kopplung zwischen dem Marker und dem Merkmal;

c) verschiedene Marker für dasselbe Merkmal sind verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals;

d) Marker, die mit verschiedenen Genen gekoppelt sind, die die Ausprägung desselben Merkmals übertragen, sind verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals; und

e) Marker, die mit verschiedenen regulatorischen Elementen für dasselbe Gen verbunden sind, das die Ausprägung desselben Merkmals überträgt, sind verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals.

2.1.2 Absätze 2.1.5 bis 2.1.18 enthalten Beispiele für die Verwendung merkmalspezifischer molekularer Marker.

2.1.3 Es ist Sache der entsprechenden Behörde, zu prüfen, ob die Annahmen bei Anwendung des Modells und der Beispiele, wie in den Absätzen 2.1.5 bis 2.1.18 dargelegt, erfüllt sind.

2.1.4 Zur Aufnahme einer Methode aufgrund des Modells in die Prüfungsrichtlinien müssten die entsprechende Technische Arbeitsgruppe und der TC vereinbaren, dass die Anforderung der Zuverlässigkeit der Kopplung zwischen dem Gen und der Ausprägung des Merkmals erfüllt ist.

Beispiel 1: Genspezifische Marker für Herbizidtoleranz

Von Sachverständigen aus Frankreich erstellt

2.1.5 Eine Sorte wird durch Einführung eines Gens für die Toleranz gegenüber dem Herbizid „Formel X“ genetisch modifiziert. Sorten mit diesem Gen werden nicht geschädigt, wenn sie mit Formel X besprüht werden; Sorten ohne dieses Gen werden hingegen stets abgetötet, wenn sie mit diesem bestimmten Herbizid behandelt werden. Die Toleranz gegenüber der Formel X, die in Feldprüfungen durch Besprühen von Parzellen untersucht wurde, ist ein akzeptiertes DUS-Merkmal und kann zur Begründung der Unterscheidbarkeit von Sorten verwendet werden.

2.1.6 Es wird vorgeschlagen, dass das Merkmal „Toleranz gegenüber der Formel X“ geprüft werden sollte, indem eine Prüfung auf Vorhandensein eines mit dem Gen verbundenen molekularen Markers durchgeführt wird, anstatt die Sorten im Feld zu besprühen (dies ist bei der Standard-DUS-Prüfung schwer durchzuführen). Dieser Marker befindet sich auf einem Teil des Gen-„Konstrukts“. Das Gen-„Konstrukt“ umfasst alle Elemente die während der genetischen Modifizierung in die Pflanze eingeführt werden, und enthält außer dem Gen selbst zusätzliche Elemente für die Regulierung des Gens, wenn es in der Pflanze ist. Der Markerlocus kann sich im Gen, teilweise auf dem Gen oder außerhalb des Gens selbst befinden.

Annahmen, die im Beispiel aufzustellen sind

2.1.7 Folgende Annahmen werden aufgestellt:

a) Die DUS-Prüfung

2.1.8 Es wird angenommen, dass die Prüfung des Markers im gleichen Umfang wie die Feldprüfung durchgeführt wird, d. h. die gleiche Anzahl Einzelpflanzen über die gleiche Anzahl Jahre und mit den gleichen Kriterien für die Unterscheidbarkeit, die Homogenität und die Beständigkeit.

b) Zuverlässigkeit der Verbindung

2.1.9 Es wird angenommen, dass die Verbindung zwischen dem Marker und dem Gen überprüft würde, um sicherzustellen, dass der Marker ein verlässlicher Prädiktor für die Toleranz gegenüber der Formel X ist. Diese Überprüfung wäre notwendig, um beispielsweise sicherzustellen, dass der Marker nicht vom Gen getrennt wird und dass das Vorhandensein des Gens noch immer zur Toleranz gegenüber der Formel X führt.

c) Entwicklung verschiedener molekularer Marker für dasselbe Gen

2.1.10 Es wäre möglich, verschiedene Genkonstrukte zu entwickeln, die die Toleranz gegenüber der Formel X enthalten, und getrennte molekulare Marker für diese einzelnen Genkonstrukte zu identifizieren, die sämtlich mit genau demselben Gen für die Toleranz gegenüber der Formel X verbunden wären. Wenn alle verschiedenen Marker für dasselbe Gen als verschiedene Methoden für die Prüfung *desselben vorhandenen phänotypischen Merkmals* akzeptiert würden, wäre die Prüfung des Vorgehens gleich. Für die Verwendung „Molekularer [...] [Marker] als Prädiktoren für herkömmliche Merkmale“ muss auf der Grundlage gearbeitet werden, dass die Marker einem herkömmlichen, d. h. bestehenden, akzeptierten Merkmal entsprechen. Daher wird angenommen, dass verschiedene Marker für dasselbe Gen als verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals behandelt würden, d. h. der Toleranz gegenüber der Formel X.

d) Verschiedene Gene, die eine Toleranz gegenüber demselben Herbizid erzeugen

2.1.11 Es wäre möglich, verschiedene Gene zu entwickeln, die die Toleranz gegenüber der Formel X übertragen. Im einfachsten Fall könnte dies gleich angesehen werden wie verschiedene Marker für dasselbe Gen, d. h. die verschiedenen Gene mit ihren entsprechenden Markern würden als verschiedene Methoden für

die Prüfung desselben Merkmals, d. h. der Toleranz gegenüber der Formel X, angesehen. Die verschiedenen Gene hätten jedoch vermutlich einen verschiedenen chemischen Mechanismus für die Erzeugung der Toleranz gegenüber der Formel X. So werden die aus den verschiedenen Genen erzeugten chemischen Substanzen verschieden sein, und diese verschiedenen chemischen Substanzen könnten in einigen Fällen die Grundlage für die Begründung der Unterscheidbarkeit bilden. Dennoch wäre es nach diesem Modell zunächst notwendig, die chemischen Bestandteile als UPOV-Merkmale zu akzeptieren, bevor die mit diesen potentiellen Merkmalen verbundenen molekularen Marker akzeptiert werden. Dies wiederum wäre ein getrenntes Beispiel. Daher wird angenommen, dass verschiedene Gene als verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals, d. h. der Toleranz gegenüber der Formel X, behandelt werden.

- e) Verschiedene Genkonstrukte, die dieselbe Herbizidtoleranz erzeugen, jedoch mit einer verschiedenen Ausprägungskontrolle

2.1.12 Es ist auch möglich, dass verschiedene Genkonstrukte entwickelt werden könnten, die dasselbe Gen für die Toleranz gegenüber der Formel X enthalten, jedoch eine unterschiedliche Kontrolle haben. Die Kontrollelemente können beispielsweise dazu führen, dass die Toleranz gegenüber der Formel X nur in bestimmten Entwicklungsstadien eingeschaltet wird. Der Einfachheit halber wird bei der Prüfung dieses Beispiels angenommen, dass die verschiedenen Marker, die mit verschiedenen Kontrollelementen für dasselbe Gen verbunden sind, sämtlich als verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals der Toleranz gegenüber der Formel X behandelt würden. Es wird jedoch auch angenommen, dass diese Frage zu einem späteren Zeitpunkt weiter untersucht wird.

Beispiel 2: Genspezifischer Marker mit unvollständigen Informationen über die Ausprägungsstufe für Krankheitsresistenz bei Tomate

Von Sachverständigen aus dem Königreich der Niederlanden erstellt

2.1.13 Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) Pathotyp 0 in Tomate wird durch das Vorhandensein von Allel *Tm1* des Gens *Tm1* oder von Allelen *Tm2* oder *Tm2²* des Gens *Tm2* verliehen.

2.1.14 Ein einzelner Marker zeigt das Vorhandensein der Resistenzallele *Tm2* und *Tm2²* und des Anfälligkeitsallels *tm2* an. Der Marker für *Tm2/2²* liegt in der Protein kodierenden Sequenz.

2.1.15 Eine Sorte ist resistent gegen ToMV Pathotyp 0, wenn das Resistenzallel *Tm2* oder das Resistenzallel *Tm2²* vorhanden ist.

2.1.16 Eine Sorte mit homozygotem Allel *tm2* wird anfällig gegen ToMV Pathotyp 0 sein, es sei denn, die Resistenz ist durch das Resistenzallel *Tm1* codiert. In diesem Fall kann die Resistenz gegen ToMV Pathotyp 0 nicht durch einen DNS-Marker-Test beurteilt werden, da es keinen zuverlässigen Marker für das Gen *Tm1* gibt.

Tabelle 1: Schematischer Überblick über die Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus und Resistenzallelen:

Genetischer Hintergrund	<i>tm2/tm2</i> und <i>tm1/tm1</i>	<i>Tm2/Tm2</i> oder <i>Tm2²/Tm2²</i> oder <i>Tm2²/Tm2</i> oder <i>Tm2/tm2</i> oder <i>Tm2²/tm2</i> und <i>Tm1/Tm1</i> oder <i>Tm1/tm1</i> oder <i>tm1/tm1</i>	<i>tm2/tm2</i> und <i>Tm1/Tm1</i> oder <i>Tm1/tm1</i>
Marker <i>Tm2/2²</i>	Anfälligkeitsallel	Resistenzallel	Anfälligkeitsallel
Resistenz gegen ToMV - Pathotyp 0	fehlend	vorhanden	vorhanden

2.1.17 Wenn eine Sorte als resistent gegen ToMV Pathotyp 0 angegeben wird, kann der DNS-Marker-Test durchgeführt werden. In Fällen, in denen die Resistenz auf dem Vorhandensein des Allels *Tm2* oder *Tm2²* basiert, könnte der DNS-Marker-Test den herkömmlichen Biotest ersetzen.

2.1.18 Wenn der DNS-Marker-Test die angegebene Resistenz nicht bestätigt oder wenn die Sorte als anfällig angegeben wird, muss ein Biotest durchgeführt werden.

2.2 Kombination phänotypischer und molekularer Abstände bei der Verwaltung von Sortensammlungen

Beispiel 1: Elternlinien von Mais

2.2.1 Ein Schlüsselaspekt des Prozesses der Eliminierung allgemein bekannter Sorten vor der DUS-Anbauprüfung ist, dass die Schwelle mit einer angemessenen Sicherheitsmarge festgesetzt wird. Diese Schwelle wird als „Unterscheidbarkeitsschwelle plus“ bezeichnet, was bedeutet, dass die Abstände zwischen einer Kandidatensorte und Sorten mit „Unterscheidbarkeit plus“ robust genug sind, um ohne direkten Vergleich in der Anbauprüfung eine Entscheidung zu treffen.

2.2.2 Eine Kombination phänotypischer Unterschiede und molekularer Abstände kann auf folgender Grundlage verwendet werden, um innerhalb der Sortensammlung diejenigen Sorten auszuweisen, die mit Kandidatensorten verglichen werden müssen, um die Auswahl der Sorten mit „Unterscheidbarkeit plus“ zu verbessern:

- a) es gibt zuverlässige Information, dass die molekularen Abstände in ausreichendem Bezug zu phänotypischen Unterschieden stehen, so dass
- b) die Methode Sorten in der Sortensammlung auswählt, die den Kandidatensorten ähnlich sind;
und
- c) die Methode kein erhöhtes Risiko schafft, dass eine Sorte in der Sortensammlung, die im Feld mit den Kandidatensorten verglichen werden muss, nicht ausgewählt wird.

2.2.3 Absätze 2.2.4 bis 2.2.16 enthalten ein von Sachverständigen aus Frankreich erstelltes Beispiel für die Verwendung der Kombination phänotypischer Unterschiede und molekularer Abstände bei der Verwaltung von Sortensammlungen.

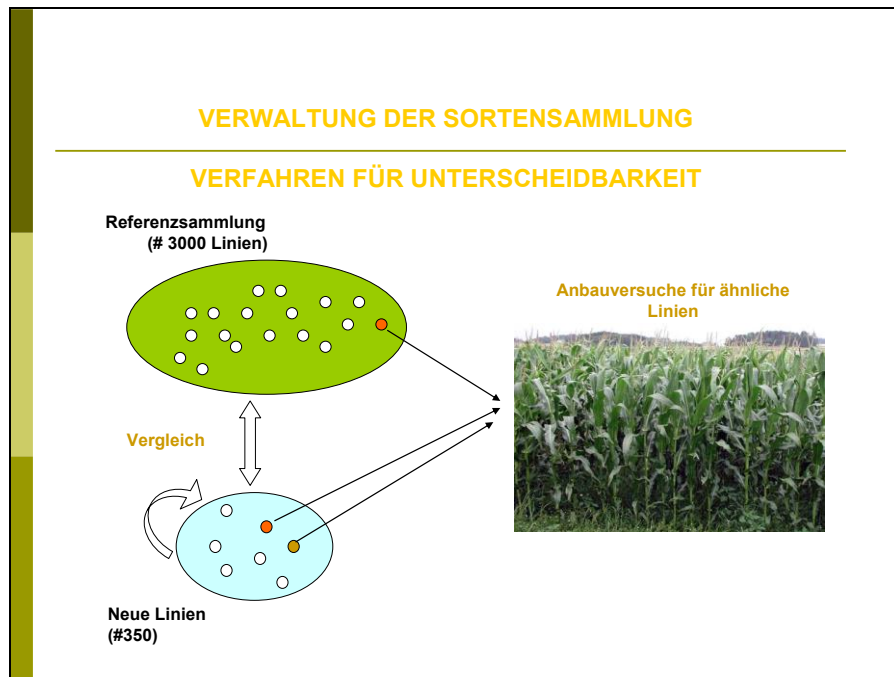
Beschreibung

2.2.4 Ein Schlüsselaspekt des Prozesses der Eliminierung allgemein bekannter Sorten vor der DUS-Anbauprüfung ist, dass die Schwelle für die Entscheidung, welche Sorten mit Sicherheit ausgeschlossen werden können (d. h. aufgrund der Beschreibungen unterscheidbar sind), mit einer angemessenen Sicherheitsmarge festgesetzt werden kann, weil diejenigen Sorten, die eliminiert werden, nicht in die Anbauprüfung eingeschlossen werden. Diese Schwelle mit einer Sicherheitsmarge wird als „Unterscheidbarkeitsschwelle plus“ bezeichnet, was bedeutet, dass die Abstände zwischen einer Kandidatensorte und Sorten mit „Unterscheidbarkeit plus“ robust genug sind, um ohne direkten Vergleich in der Anbauprüfung eine Entscheidung zu treffen.

2.2.5 Zweck dieses Beispiels ist es, ein effizientes Hilfsmittel aufgrund einer Kombination phänotypischer und molekularer Abstände zu entwickeln, um innerhalb der Sortensammlung diejenigen Sorten auszuweisen, die mit Kandidatensorten verglichen werden müssen (vergleiche Abbildung 1), um die Auswahl der Sorten mit „Unterscheidbarkeit plus“ zu verbessern und dadurch die Arbeitsbelastung zu begrenzen, ohne die Qualität der Prüfung zu verringern. Die Herausforderung besteht darin, ein sicheres System zu entwickeln, das

- a) nur Sorten auswählt, die der Kandidatensorte ähnlich sind, und
- b) das Risiko begrenzt, dass eine Sorte in der Sortensammlung, die im Feld verglichen werden muss, nicht ausgewählt wird, insbesondere wenn eine umfangreiche oder aufwendige Sortensammlung vorhanden ist.

Abbildung 1



2.2.6 Das neue System wurde vor nachstehendem Hintergrund ausgearbeitet:

a) Studien über molekulare Abstände bei Mais für die DUS-Prüfung und die wesentliche Ableitung, die den Zusammenhang mit dem Verwandtschaftsgrad zwischen Sorten aufzeigten (vergleiche Dokumente BMT/3/6 „The Estimation of Molecular Genetic Distances in Maize or DUS and ED Protocols: Optimierung der Informationen und neue Ansätze für die Verwandtschaft“ und Dokument BMT/3/6 Add.);

b) Ein von GEVES durchgeführtes Experiment an einer Serie von Elternlinien von Mais, das aufzeigte, dass eine Verbindung zwischen der Beurteilung der Unterscheidbarkeit durch Sachverständige (globale Prüfung) und einem molekularen Abstand besteht, der anhand molekularer Daten aufgrund einfacher Sequenzwiederholungen (Simple Sequence Repeat, SSR) berechnet wird (vergleiche Abbildung 2).

Komponenten des Systems

GAIA-Abstand

2.2.7 Die Komponente GAIA-Abstand wird mit der von GEVES entwickelten GAIA-Software berechnet. Der GAIA-Abstand ist eine Kombination von Unterschieden, die an phänotypischen Merkmalen erfasst werden, wobei jeder Unterschied je nach Zuverlässigkeit der Merkmale, insbesondere ihrer Variabilität und Umweltsensibilität, zum Abstand beiträgt. Je größer der Unterschied und je größer die Zuverlässigkeit des Merkmals ist, desto stärker trägt der Unterschied zum GAIA-Abstand bei. Lediglich diejenigen Unterschiede, die gleich oder größer als der für jedes einzelne Merkmal erforderliche Mindestabstand sind, werden einbezogen.

Molekularer Abstand

2.2.8 Die Komponente des molekularen Abstands wird anhand der an einem Markersatz erfassten Unterschiede berechnet. Es können verschiedene Typen molekularer Marker und Abstände angewandt werden. Im Falle der in Frankreich an Mais durchgeführten Studie wurden 60 SSR-Marker und der Rogers'sche Abstand angewandt. Es ist wichtig, dass genügend Marker mit einer angemessenen Verteilung auf den Chromosomen verwendet werden. Der Typ der Marker, der Effekt der Anzahl Marker und die Verteilung der Marker müssen je nach der betreffenden Art berücksichtigt werden.

2.2.9 Bevor diese beiden Komponenten kombiniert werden, muss eine Beurteilung des Zusammenhanges zwischen dem molekularen Abstand und einer globalen Beurteilung der Unterscheidbarkeit durch ein Gremium von Sachverständigen an einer Serie von Sortenpaaren erfolgen. Im Falle von Mais wurde diese Beurteilung auf folgender Grundlage durchgeführt:

Material: 504 Sortenpaare, die parallel mit molekularen Markern geprüft wurden

Feldanlage: nebeneinander angebaute Sortenpaare
(1 Parzelle = 2 Reihen mit je 15 Pflanzen)

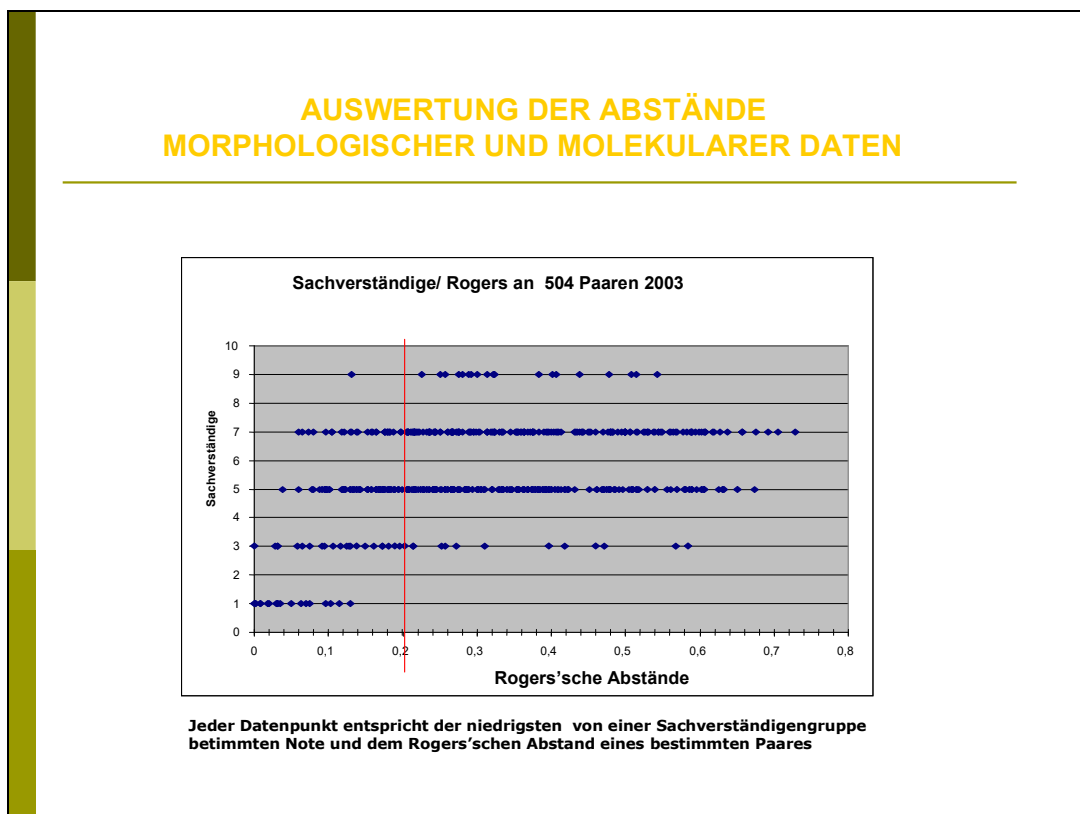
Visuelle Erfassung durch Sachverständige für Mais:

Ähnlichkeitsskala:

1. die beiden Sorten sind gleich oder sehr ähnlich
3. die beiden Sorten sind unterscheidbar, jedoch ähnlich
5. der Vergleich war nützlich, doch die Sorten sind deutlich unterscheidbar
7. der Vergleich hätte vermieden werden sollen, weil die Sorten stark verschieden sind
9. der Vergleich hätte vermieden werden sollen, weil die Sorten vollkommen verschieden sind
(„gerade“ Noten werden in der Skala nicht benutzt)

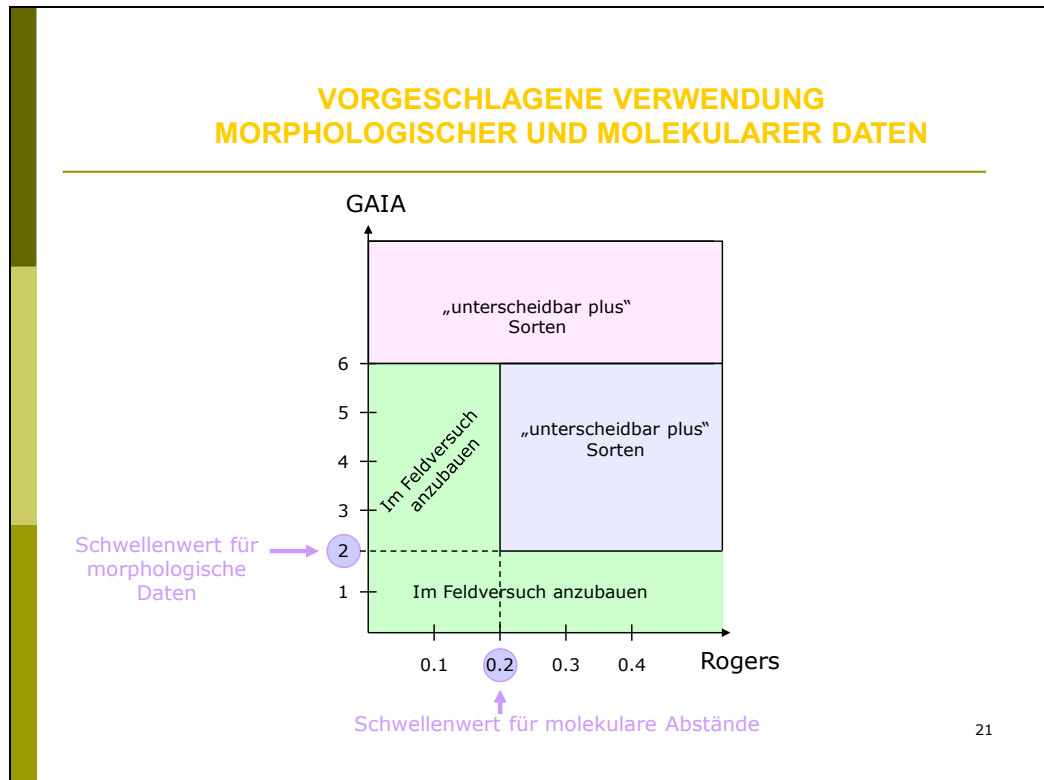
2.2.10 Im Falle von Mais zeigte diese Beurteilung, dass keine Elternlinien mit einem molekularen Abstand von mehr als 0,15 bei einer Beurteilung durch einen DUS-Sachverständigen als gleich oder sehr ähnlich angesehen wurden (vergleiche Abbildung 2).

Abbildung 2



2.2.11 Aufgrund dieses Ergebnisses bietet die Kombination morphologischer und molekularer Abstände die Möglichkeit, folgendes Entscheidungsschema aufzustellen (vergleiche Abbildung 3):

Abbildung 3



2.2.12 Alle Sortenpaare mit einem GAIA-Abstand, der gleich oder größer als 6 ist, und alle Sorten mit einem GAIA-Abstand zwischen 2 und 6 zuzüglich eines molekularen Abstandes, der gleich oder größer als 0,2 ist, werden als „unterscheidbar plus“ bezeichnet.

2.2.13 Dieses Schema zeigt, dass im Vergleich zu der Situation, in der lediglich ein GAIA-Abstand von 6 allein benutzt wird, weniger Elternlinien im Feld erfasst werden müssen.

2.2.14 Die Robustheit dieses Systems wurde anhand verschiedener GAIA- und molekularer Abstände untersucht.

Vorteile und Einschränkungen

2.2.15 Vorteile

- a) Verbesserung der Verwaltung von Sortensammlungen, da weniger Sorten im Feld verglichen werden müssen
- b) Anwendung morphologischer und molekularer Abstände mit Schwellenwerten, die von DUS-Sachverständigen festgelegt werden. GAIA wurde bei der Entwicklung durch GEVES auch gegen die Beurteilungen von DUS-Sachverständigen kalibriert;
- c) Verwendung molekularer Daten, die nicht umweltschädlich sind; der Markersatz und das Laborprotokoll sind gut definiert;
- d) nur Verwendung phänotypischer Merkmale mit einer angemessenen Robustheit und Möglichkeit, Beschreibungen zu verwenden, die verschiedener Herkunft sind und aus enger Zusammenarbeit stammen (die Maisdatenbank, die in Zusammenarbeit zwischen Deutschland, Frankreich, Spanien und dem Gemeinschaftlichen Sortenamts der Europäischen Union (CPVO) entwickelt wurde, ist ein gutes Beispiel, um den Nutzen dieses Ansatzes bei einer Sortensammlung, die von verschiedenen Ämtern gemeinsam genutzt wird, zu verdeutlichen);
- e) Elektrophoresemerkmale können auch ersetzt werden, und

f) fehlende Homogenität bei molekularen Profilen übt keinen Einfluss aus, sofern genügend Marker verwendet werden und die Zahl der Varianten gering ist. Im Falle von Elternlinien von Mais ist das Niveau der molekularen Homogenität hoch; dies könnte bei anderen Pflanzen jedoch ein Problem sein.

2.2.16 *Einschränkungen*

- a) Nicht oder weniger effizient für Arten mit synthetischen Sorten oder Populationen;
- b) es ist notwendig, über hinreichend gute DNS-Marker und genügend phänotypische Merkmale mit geringer Umweltanfälligkeit zu verfügen, und
- c) vorherige Arbeit mit der Kalibrierung im Vergleich zur Beurteilung der Unterscheidbarkeit durch DUS-Sachverständige.

Beispiel 2: Genetische Auswahl von ähnlichen Sorten für die erste Wachstumsperiode

2.2.17 Dieser Ansatz beinhaltet einen Schritt zur Prüfung auf genetische Ähnlichkeit vor der ersten Wachstumsperiode.

2.2.18 In Fällen, in denen die Mindestprüfungsdauer normalerweise zwei Wachstumsperioden beträgt, wird eine Auswahl ähnlicher Sorten in der Sortensammlung für den Vergleich mit Kandidatensorten in der ersten Wachstumsperiode gemäß genetischer Ähnlichkeit vorgenommen. Im nächsten Schritt wird anhand der Angaben des Antragstellers im Technischen Fragebogen (TQ) geprüft, ob einige der genetisch ähnlichen Sorten aufgrund von Unterschieden bei den DUS-Merkmalen nicht in einer Anbauprüfung verglichen werden müssen.

2.2.19 Auf der Grundlage der in der ersten Wachstumsperiode erstellten Sortenbeschreibung von DUS-Merkmalen wird unter den Sorten in der Sortensammlung weiter nach ähnlichen Sorten gesucht, die in der ersten Wachstumsperiode nicht verglichen wurden und die in der zweiten Wachstumsperiode mit der Kandidatensorte verglichen werden sollten.

2.2.20 Absätze 2.2.21 bis 2.2.31 enthalten ein von Sachverständigen aus dem Königreich der Niederlanden erstelltes Beispiel für die genetische Auswahl ähnlicher Sorten für die erste Wachstumsperiode bei Gartenbohne.

Einleitung

2.2.21 Dieser Ansatz beinhaltet einen Schritt zur Prüfung auf genetische Ähnlichkeit vor der ersten Wachstumsperiode.

2.2.22 In Fällen, in denen die Mindestprüfungsdauer normalerweise zwei Wachstumsperioden beträgt, wird eine Auswahl ähnlicher Sorten in der Sortensammlung für den Vergleich mit Kandidatensorten in der ersten Wachstumsperiode gemäß genetischer Ähnlichkeit vorgenommen. Im nächsten Schritt wird anhand der Angaben des Antragstellers im Technischen Fragebogen (TQ) geprüft, ob einige der genetisch ähnlichen Sorten aufgrund unterschiedlicher DUS-Merkmale nicht in einer Anbauprüfung verglichen werden müssen.

2.2.23 Auf der Grundlage einer in der ersten Wachstumsperiode erstellten Sortenbeschreibung von DUS-Merkmalen wird unter den Sorten in der Sortensammlung weiter nach ähnlichen Sorten gesucht, die in der ersten Wachstumsperiode nicht verglichen wurden und die in der zweiten Wachstumsperiode mit der Kandidatensorte verglichen werden sollten.

Verfahren

Bestimmung genetischer Ähnlichkeit

2.2.24 Das DNS-Profil der Kandidatensorte wird erstellt, sobald das Pflanzenmaterial eingetroffen ist.

2.2.25 Das DNS-Profil wird mit den Profilen aller Sorten in der Sortensammlung verglichen und genetisch ähnliche Sorten werden ermittelt.

Angaben im Technischen Fragebogen

2.2.26 Dann wird anhand der vom Antragsteller im Technischen Fragebogen (TQ) gemachten Angaben geprüft, ob es bei den DUS-Merkmalen klare Unterschiede von einigen der genetisch ähnlichen Sorten gibt, so dass sie nicht mit den Kandidatensorten in einer Anbauprüfung verglichen werden müssen.

Anbauprüfung:

Erste Wachstumsperiode

2.2.27 Die Kandidatensorte und die mittels des oben beschriebenen Verfahrens ausgewählten genetisch ähnlichen Sorten werden in derselben Prüfung angebaut. Eine vollständige Beschreibung der DUS-Merkmale der Kandidatensorte wird erstellt und mit den Beschreibungen aller Sorten in der Sortensammlung anhand einer Datenbank, die in den Vorjahren am selben Ort erstellte Beschreibungen enthält, verglichen.

Mögliche Ergebnisse:

2.2.28 Ist die Kandidatensorte aufgrund von DUS-Merkmalen nicht von den genetisch ähnlichen Sorten unterscheidbar, wird die Prüfung für eine weitere Wachstumsperiode fortgesetzt.

2.2.29 Auf jeden Fall wird die in der ersten Wachstumsperiode von der Kandidatensorte erstellte Beschreibung anhand einer Datenbank, die am selben Ort erstellte Beschreibungen enthält, mit den Beschreibungen der Sorten in der Sortensammlung verglichen.

a) Wird festgestellt, dass sich die Kandidatensorte am Ende der ersten Wachstumsperiode von allen Sorten, die in der ersten Wachstumsperiode angebaut wurden, und von allen anderen Sorten in der Sortensammlung unterscheidet und sie die Anforderungen der Homogenität und Beständigkeit erfüllt, kann die DUS-Prüfung nach der ersten Wachstumsperiode beendet werden.

b) In allen anderen Fällen wird eine zweite Wachstumsperiode durchgeführt.

Zweite Wachstumsperiode

2.2.30 In der zweiten Wachstumsperiode wird die Kandidatensorte mit allen Sorten in der Sortensammlung, von denen sie am Ende der ersten Wachstumsperiode als nicht unterscheidbar befunden wurde, angebaut.

2.2.31 Am Ende der zweiten Wachstumsperiode wird eine DUS-Bewertung vorgenommen. Ist es nicht möglich, am Ende der zweiten Wachstumsperiode eine Entscheidung über DUS zu treffen, kann eine weitere Wachstumsperiode durchgeführt werden.

3. RICHTLINIEN FÜR DIE VALIDIERUNG EINES NEUEN MERKMALSPEZIFISCHEN PROTOKOLLS FÜR MOLEKULARE MARKER ALS EINE ALTERNATIVE ERFASSUNGSMETHODE

3.1 Ziel dieser Richtlinien

3.1.1 Ziel dieser Richtlinien ist es, praktische Anleitung für die harmonisierte Prüfung einer neuen Methode auf der Grundlage des Anwendungsmodells „merkmalsspezifischer molekularer Marker“ umzusetzen, bevor diese als alternative Prüfmethode eingesetzt wird (siehe Abschnitt 2.1 dieses Dokuments). Die für die Validierung erforderlichen Leistungskriterien sowie Anleitungen für deren Prüfung werden beschrieben. Die Richtlinien beschreiben außerdem ein Standardprotokoll und die Überwachung.

3.1.2 Wird ein anderes Verfahren angewendet, sollte das Labor seine Methode im Vergleich zur Referenzmethode validieren, um nachzuweisen, dass das alternative Verfahren zu denselben Ergebnissen führt.

3.2 Anwendung dieser Richtlinien

- Alle Pflanzenarten
- Merkmalspezifische molekulare Marker
- Für die Prüfung der Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit (DUS).

3.3 Leistungskriterien für ein neues Protokoll auf der Grundlage von molekularen Markern

Spezifität

Definition

3.3.1 Unter Spezifität versteht man die Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp, *d.h.* die Zuverlässigkeit der Kopplung zwischen dem Marker und dem Merkmal.

Anforderung

3.3.2 Die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp sollte 100% betragen. Liegt die Korrelation unter 100 %, sollten weitere Prüfungen durchgeführt werden, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse sicherzustellen. In diesem Fall kann eine Entscheidungsregel verwendet werden. Eine Korrelation von unter 100 % kann durch andere genetische Faktoren verursacht werden.

Wie lässt sich dies beurteilen?

3.3.3 Anzahl der Sorten: Zum Beginn des Markerauswahlverfahrens wird eine geeignete Anzahl von Sorten benötigt (Entwicklungsserie), um die Vielfalt widerzuspiegeln, die innerhalb der Gruppe, der Pflanzenart bzw. des Typs beobachtet wird, für die bzw. den die Marker unterscheidend sein sollen.

3.3.4 Die Sorten sollten die verschiedenen Ausprägungsstufen repräsentieren (sofern bekannt, heterozygote und homozygote Sorten), von verschiedenen Züchtern stammen, einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund hinsichtlich des Merkmals aufweisen und verschiedenen Typen angehören. Sofern verfügbar, sollten Sorten verwendet werden, die hinsichtlich des relevanten Merkmals phänotypisch gut beschrieben sind.

3.3.5 Anzahl der Pflanzen pro Sorte: Es sollte mindestens eine Pflanze pro Sorte evaluiert werden, sofern die verfügbaren Sorten phänotypisch gut beschrieben sind. Ist dies nicht der Fall, sollte die Anzahl der Pflanzen derjenigen entsprechen, die für die in den UPOV-Prüfungsrichtlinien beschriebene morphologische Erfassung vorgesehen ist.

3.3.6 Die Spezifität kann in einem Labor geprüft werden.

Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

Definition

3.3.7 Die Nachweisgrenze ist definiert als die geringste Menge der Zielsubstanz, die zuverlässig nachgewiesen werden kann.

3.3.8 Bei Analysen von Mischproben (z. B. eine Mischprobe aus verschiedener Pflanzen derselben Sorte) ist die Empfindlichkeit von entscheidender Bedeutung und sollte bestimmt werden. Bei der Untersuchung von Einzelpflanzen ist die Menge der Zielsubstanz nicht entscheidend, sodass dieses Leistungskriterium fakultativ ist.

Anforderung

3.3.9 Im Falle von Mischproben müsste jeder Abweicher in der Mischung nachweisbar sein.

Wie lässt sich dies beurteilen?

3.3.10 Die Nachweisempfindlichkeit sollte anhand künstlicher Mischproben überprüft werden, die durch Beimischung eines Abweichers hergestellt wurden.

Wiederholbarkeit

Definition (basierend auf ISO 16 577:2016; Verweis auf Dokument UPOV/INF/17)

3.3.11 Unter Wiederholbarkeit versteht man identische Prüfungsergebnisse, die anhand desselben Verfahrens, an identischen Testgegenständen, im gleichen Labor, durch denselben Prüfer, unter Verwendung der gleichen Ausrüstung innerhalb kurzer Zeitintervalle erzielt werden.“

3.3.12 „Accordance“ bei qualitativen Methoden entspricht der Wiederholbarkeit bei quantitativen Methoden (Langton *et al.*, 2002).

Anforderung

3.3.13 Idealerweise sollte eine Wiederholbarkeit von 100 % erreicht werden, aber ein Wert von ≥ 90 % wird allgemein als akzeptabel angesehen. Ist die Wiederholbarkeit der Referenzmethode veröffentlicht, sollte die Wiederholbarkeit der alternativen Methode mindestens gleichwertig sein.

Wie lässt sich dies beurteilen?

3.3.14 Die Wiederholbarkeit kann in einem Labor geprüft werden.

3.3.15 Es sollen mindestens drei technische Wiederholungen von derselben Pflanze (drei unabhängige DNA-Extraktionen) analysiert werden. Es sollten mindestens alle erwarteten Genotypen berücksichtigt werden.

Reproduzierbarkeit

Definition (basierend auf ISO 16 577:2016; Verweis auf UPOV/INF/17)

3.3.16 Unter Reproduzierbarkeit versteht man identische Prüfungsergebnisse, die anhand desselben Verfahrens, an identischen Testgegenständen, im gleichen Labor oder zwischen verschiedenen Laboren, durch verschiedene Prüfer, unter Verwendung unterschiedlicher Ausrüstungen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten erzielt werden.

3.3.17 „Concordance“ bei qualitativen Methoden entspricht der Reproduzierbarkeit bei quantitativer Methoden (Langton *et al.*, 2002).

Anforderung

3.3.18 Idealerweise sollte eine Reproduzierbarkeit von 100 % erreicht werden, aber ein Wert von ≥ 90 % wird allgemein als akzeptabel angesehen. Ist die Reproduzierbarkeit der Referenzmethode veröffentlicht, sollte die Reproduzierbarkeit der alternativen Methode mindestens gleichwertig sein.

Wie lässt sich dies beurteilen?

3.3.19 Die Reproduzierbarkeit sollte zwischen verschiedenen Laboren im Rahmen einer laborübergreifenden Validierungsstudie (Ringprüfung) mit kodierten Proben bekannter Genotypen geprüft werden. Dabei sind alle erwarteten Genotypen zu berücksichtigen.

3.3.20 An den Ringtests sollten mindestens drei verschiedene Labore beteiligt sein, darunter mindestens zwei verschiedene Prüfungsämter. Nach Möglichkeit sollten erfahrene Labore einbezogen werden, die mit der Art und dem Verfahren vertraut sind. Ist dies nicht der Fall, kann vor dem Ringtest eine Schulung mit nichtkodierten Proben organisiert werden. Labore können auf freiwilliger Basis an einem Ringtest teilnehmen. Falls es nicht genügend teilnehmende Labore gibt, ist eine Prüfung der Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Laboren mit verschiedenen Prüfern möglich.

3.3.21 Alle Labore sollten das zu validierende Protokoll befolgen. Im Protokoll können vom Validierungsteam standardmäßige und optionale Teile festgelegt werden. Labore können auf freiwilliger Basis an einem Ringtest teilnehmen. Falls sich es nicht genügend teilnehmende Labore gibt, ist eine Prüfung der Reproduzierbarkeit in einem Labor möglich.

3.3.22 Anzahl der Sorten: Es sollten mindestens alle erwarteten Genotypen berücksichtigt werden.

3.3.23 Es können Richtlinien/Normen für laborübergreifende Untersuchungen angewendet werden, z.B. ISO 3495 *Foodstuffs - Principles of selection and criteria of validation for varietal identification methods using specific nucleic acid*, ISO 17043 *Conformity assessment - General requirements for proficiency testing*, EPPO pm7-122-2 *Guidelines for the organization of interlaboratory comparisons by plant pest diagnostic laboratories*, ISTA TCOM-P-10-*Validation of seed health methods and organization and analysis of interlaboratory comparative tests (CT)*... Das Validierungsteam soll in seinem Bericht auf die befolgten Richtlinien verweisen.

Robustheit

Definition (basierend auf ISO 16 577:2016; Verweis auf UPOV/INF/17)

3.3.24 Robustheit ist ein Maß für die Fähigkeit, von kleinen, aber absichtlichen Abweichungen von den in den Verfahrensparametern beschriebenen Versuchsbedingungen unbeeinflusst zu bleiben. Die Robustheit liefert auch einen Hinweis auf die Zuverlässigkeit der Methode bei normaler Verwendung (z.B. Änderung der DNA-Extraktionsmethode oder Änderung des Real-Time-Geräts).

Anforderung

3.3.25 Idealerweise sollte die Robustheit 100 % betragen. Weniger als 100% bedeutet, dass das Verfahren gegenüber einer Änderung eines Parameters nicht robust ist, und dies sollte im Protokoll als obligatorischer Schritt vermerkt werden (z. B. eine Änderung des Mastermixes, die kritisch wäre).

Wie lässt sich dies beurteilen?

3.3.26 Die spezifische Prüfung der Robustheit ist fakultativ. Die Robustheit wird teilweise im Rahmen der Ringtests (Reproduzierbarkeit) bewertet (unterschiedliche Labore, Geräte, Maschinen usw.).

3.4 Prüfbericht

3.4.1 Der Prüfbericht und die Ergebnisse sollten von zwei (vorzugsweise drei, falls die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors geprüft wurde) der zuständigen Stellen einer Begutachtung unterzogen werden („peer-reviewed“). Die Prüfung erfolgt auf freiwilliger Basis, sollte jedoch vorzugsweise von einem Labor durchgeführt werden, das mit der Art und dem Verfahren vertraut ist.

3.4.2 Während des Prüfungsverfahrens können die Prüfer in Absprache mit dem Validierungsteam weitere Validierungsdaten anfordern.

Inhalt des Prüfberichts

- Rohdaten, die während der verschiedenen Schritte des Prüfverfahrens generiert wurden
- Detailliertes Protokoll mit definierten Standard- und optionalen Schritten
- Beurteilung der Leistungskriterien
- Schlussfolgerung

Veröffentlichung

3.4.3 Der Prüfbericht sollte auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden. Im neuen Protokoll sollte das Prüfverfahren unter Angabe des zuständigen Prüfungsamts angegeben werden.

3.5 Standardprotokoll für merkmalspezifische molekulare Marker

3.5.1 Standardelemente sind in der Spalte „wesentliche Informationen“ aufgeführt; die übrigen Elemente können je nach Merkmal, auf welches sich das Prüfprotokoll bezieht, verwendet werden. Möchte ein Labor ein Standardkapitel abändern, sollte es sein Verfahren im Vergleich zum Referenzverfahren validieren.

Table 1: Standardprotokoll für merkmalspezifische molekulare Marker als eine alternative Erfassungsmethode

Kapitel	Elemente eines Standardprotokolls für merkmalspezifische molekulare Marker	Unerlässliche Informationen zur Harmonisierung	Anmerkung
1	Merkmal	JA	Die Bezeichnung des Merkmals.
2	Gene und Allele	JA	Dominante Marker oder Vorhanden/Fehlen-Marker sind zu vermeiden; andernfalls sollte die Robustheit bewertet werden.
2.1	Target-Gen(e)	JA	a) Datei(en), die die DNA-Sequenzinformationen (Reihenfolge der Nukleotide) enthalten. b) Verweis auf DNA-Informationen in öffentlichen Datenbanken (z. B. GenBank). c) Verweis auf Veröffentlichungen, in denen die DNA-Sequenzinformationen zu den Ausprägungsstufen des Merkmals offengelegt werden. d) Verweis auf eine bestimmte Position in der veröffentlichten Referenzgenomversion.
2.2	Allel für Ausprägungsstufe 1	JA	a) Datei(en), die die DNA-Sequenzinformationen (Reihenfolge der Nukleotide) enthalten. b) Verweis auf DNA-Informationen in öffentlichen Datenbanken (z. B. GenBank). c) Verweis auf Veröffentlichungen, in denen die DNA-Sequenzinformationen zu den Ausprägungsstufen des Merkmals offengelegt werden. d) Verweis auf eine bestimmte Position in der veröffentlichten Referenzgenomversion in Verbindung mit dem SNP oder INDEL, das für die Ausprägungsform verantwortlich ist.
2.3	Allel für Ausprägungsstufe n	JA	a) Datei(en), die die DNA-Sequenzinformationen (Reihenfolge der Nukleotide) enthalten. b) Verweis auf DNA-Informationen in öffentlichen Datenbanken (z. B. GenBank). c) Verweis auf Veröffentlichungen, in denen die DNA-Sequenzinformationen zu den Ausprägungsstufen des Merkmals offengelegt werden. d) Verweis auf eine bestimmte Position in der veröffentlichten Referenzgenomversion in Verbindung mit dem SNP oder INDEL, das für die Ausprägungsform verantwortlich ist.
3	Primer (und Sonden)	JA	Primer- und Sondensequenzen, Verweise auf Einträge und Sequenzen in öffentlichen Datenbanken (GenBank-Nummern), Literatur.
3.1	Primer (und Sonden) zum Nachweis des Allels '9'	JA	Primersequenzen, die dem/den Allel(en) für die Ausdrucksweise '9' (Resistenz) entsprechen.
3.2	Primer (und Sonden) zum Nachweis des Allels '1'	JA	Primersequenzen, die dem/den Allel(en) für die Ausdrucksweise '1' (Anfälligkeit) entsprechen.

Kapitel	Elemente eines Standardprotokolls für merkmalspezifische molekulare Marker	Unerlässliche Informationen zur Harmonisierung	Anmerkung
3.3	Primer (und Sonden) zum Nachweis des Allels 'X'	JA	Primersequenzen, die dem/den Allel(en) für die Ausdrucksweise 'X' entsprechen.
4	Prüfungsanlage		
4.1	Anzahl Pflanzen pro Genotyp	JA	Erforderliche Mindestanzahl an Einzelpflanzen: die Prüfung des Markers wird für die gleiche Anzahl Einzelpflanzen mit den gleichen Kriterien für die Unterscheidbarkeit, die Homogenität und die Beständigkeit durchgeführt wie bei der Prüfung des Merkmals durch direkte Erfassung (Dokumente TGP/9 und TGP/10).
4.2	Kontrollsorten	JA	Kontrollsorten (wie bei der direkten Merkmalerfassungsprüfung) als Standards, die alle relevanten Allelkombinationen repräsentieren. Beispielsweise homozygot für das Allel, das der Ausprägungsform 9 (vorhanden) entspricht, homozygot für das Allel, das der Ausprägungsform 1 (fehlend) entspricht, und heterozygot (beide Allele sind vorhanden), was je nach Genfunktion z.B. einer Resistenz, Anfälligkeit oder intermediären Resistenz der Sorte entspricht (dominant – rezessiv). DNA-Kontrollen können direkt verwendet werden.
4.3	Verfahrenskontrollen	JA	a) Negative Verfahrenskontrolle(n). b) Positive DNA-Kontrolle(n), bei denen es sich um die Kontrollsorten handeln kann. c) Interne Amplifikationskontrolle im Falle eines Vorhanden/Fehlen-Markers (ein Marker, der auf das Cytochrom-Oxidase-Gen abzielt und als interner Amplifikationsmarker dient). d) Für die Extraktion verwendeter Puffer.
5	Vorbereitungen	NEIN	Abhängig vom angewandten Verfahren. Nicht in den Prüfungsrichtlinien enthalten. Detaillierte Protokolle können als Beispiel in der Anlage beigefügt werden oder sind auf Anfrage bei der Organisation erhältlich, die den Marker entwickelt hat. In den meisten Fällen erfolgt die Probenahme an Sämlingen, gefolgt von einer DNA-Extraktion nach der CTAB-Methode.
6	Technik der Methode	JA	Herkömmliche PCR, TETRA-ARMS, qPCR, KASP, Amplikonsequenzierung.
6.1	Besondere Bedingungen	NEIN	Abhängig vom angewandten Verfahren. Nicht in den Prüfungsrichtlinien enthalten. Detaillierte Protokolle können als Beispiel in der Anlage beigefügt werden oder sind auf Anfrage bei dem Institut erhältlich, das den Marker entwickelt hat. PCR-Protokoll mit Angaben zu Primern, Enzymen, dNTP-Konzentrationen und dem Ablauf der PCR-Zyklen.

Kapitel	Elemente eines Standardprotokolls für merkmalspezifische molekulare Marker	Unerlässliche Informationen zur Harmonisierung	Anmerkung
6.2	Spezifische Hardware oder Infrastruktur	NEIN	Abhängig vom angewandten Verfahren. Nicht in den Prüfungsrichtlinien enthalten. Detaillierte Protokolle können als Beispiel in der Anlage beigefügt werden oder sind auf Anfrage bei dem Institut erhältlich, das den Marker entwickelt hat. Maschinen, handelsübliche Bausätze, Hersteller von Bauteilen, Chargennummern von Chemikalien.
7	Beobachtungen	NEIN	Abhängig vom angewandten Verfahren. Nicht in den Prüfungsrichtlinien enthalten. Detaillierte Protokolle können als Beispiel in der Anlage beigefügt werden oder sind auf Anfrage bei dem Institut erhältlich, das den Marker entwickelt hat. Banden auf Agarose-Gel (herkömmliche PCR), Ct-Werte (qPCR), Variantenbestimmung auf Grundlage von Sequenzierungs-Reads.
7.1	Wertbarkeit der Ergebnisse	JA	Abhängig vom angewandten Verfahren. Überprüfen, ob bei der qPCR typische exponentielle Amplifikationskurven vorliegen. Überprüfen, ob die Kontrollsorten den Erwartungen entsprechen (negative Kontrollsorten = zeigen kein Signal; positive Kontrollsorten = zeigen für alle Fluorophore die erwarteten Signale).
8	Auswertung der Ergebnisse	JA	Beziehung zwischen Allelen und Ausprägungsform (mit entsprechenden Anmerkungen). Falls das Ergebnis des DNA-Markertests die Angaben im technischen Fragebogen nicht bestätigt, sollte eine Feldprüfung oder ein Bioassay durchgeführt werden.
9	Validierung des Protokolls	JA	Kontaktieren des Prüfungsamtes für Auskünfte zur Validierung des Protokolls oder für weitere Informationen.
9.1	Kontakt zum Prüfungsamt	JA	Kontaktdaten der Institution, die das Protokoll entwickelt hat, Name der Dienststelle.

3.5.2 Ein Beispiel für ein „merkmalspezifisches Protokoll für molekulare Marker als alternative Erfassungsmethode“ ist enthalten in den Prüfungsrichtlinien für Tomate (TG/44/12), unter dem Merkmal „Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus“ (ToMV) (vergleiche Ad. 59(ii), „DNS-Marker-Test“). Obwohl es der vorliegenden Anleitung entspricht, wurde es vor der Einführung des in Tabelle 1 dargestellten Standarddarstellungsformats angenommen und wird daher in einem anderen Format dargestellt. Der Bericht über den von drei Laboren durchgeführten Vergleichstest ist auf Anfrage erhältlich unter info@naktuinbouw.nl.

3.6 Überwachung nach Annahme des Markerprotokolls

3.6.1 Die Validierung des Markers ist nicht festgeschrieben, da auf dem Markt neue genetische Kombinationen auftreten können. Dieser Evaluierungsprozess ist kontinuierlich weiterzuführen. Die Spezifität sollte nach der Validierungsabnahme durch Paralleltests mit der direkten Merkmalerfassung (Markertest und Bioassay) mindestens während des ersten Jahres erneut geprüft werden.

3.6.2 Nach dem ersten Jahr der Annahme des Protokolls sollten morphologische Prüfungen an etwa 10 % der neuen Sorten durchgeführt werden.

3.7 Literatur

Arens P., Mansilla C., Deinum D., Cavellini L., Moretti A., Rolland S., van der Schoot H., Calvache D., Ponz F., Collonnier C., Mathis R., Smilde D., Caranta C.; Vosman B., 2010: Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. Theoretical and applied genetics 120(3). pp. 655-64

Langton, S.D., Chevennement, R., Nagelkerke, N. und Lombard, B. (2002). Analyse von gemeinsamen Anbauprüfungen zu qualitativen mikrobiologischen Methoden: Übereinstimmung und Konkordanz. International Journal of Food Microbiology, 79, 175-181

[Ende des Dokuments]