

Technischer Ausschuss

Sechzigste Tagung
Genf, 21. und 22. Oktober 2024

SESSIONS/2024/6

Original: Englisch
Datum: 25. September 2024

Verwaltungs- und Rechtsausschuss

Einundachtzigste Sitzung
Genf, 23. Oktober 2024

MOLEKULARE TECHNIKEN*Vom Verbandsbüro erstelltes Dokument*

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

Dieses Dokument wurde mit Hilfe einer maschinellen Übersetzung erstellt, und die Genauigkeit kann nicht garantiert werden. Daher ist der Text in der Originalsprache die einzige authentische Version.

KURZFASSUNG

1. Zweck dieses Dokuments ist es, dem Technischen Ausschuss (TC) und dem Verwaltungs- und Rechtsausschuss (CAJ) über die Entwicklungen im Bereich der molekularen Verfahren zu berichten.

2. Der TC wird dazu eingeladen:

(a) die Technischen Arbeitsgruppen (TWP) zu ersuchen, auf ihren Tagungen im Jahre 2025 den Vorschlag für Richtlinien für die Validierung neuer merkmalspezifischer molekularer Markerprotokolle für die DUS-Prüfung, wie in der Anlage dieses Dokuments enthalten, zu prüfen;

(b) das Ersuchen der Züchterorganisationen um Ausarbeitung einer Anleitung in der UPOV zur Vertraulichkeit molekularer Daten und das Angebot, einen Entwurf einer Mustervorlage für eine Vereinbarung vorzuschlagen, die auf der dritten Tagung der Technischen Arbeitsgruppe für Prüfungsmethoden und -techniken (TWM) vorgelegt werden soll, zur Kenntnis zu nehmen; und

(c) die in diesem Dokument enthaltenen Informationen zur Kenntnis zu nehmen.

3. In diesem Dokument werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

CAJ:	Verwaltungs- und Rechtsausschuss
ISTA:	International Seed Testing Association
OECD:	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
TC:	Technischer Ausschuss
TWA:	Technische Arbeitsgruppe für landwirtschaftliche Arten
TWF:	Technische Arbeitsgruppe für Obstarten
TWM:	Technische Arbeitsgruppe für Prüfmethoden und -techniken
TWO:	Technische Arbeitsgruppe für Zierpflanzen und forstliche Baumarten
TWP:	Technische Arbeitsgruppe(n)
TWV:	Technische Arbeitsgruppe für Gemüsearten

4. Der Aufbau dieses Dokuments ist wie folgt:

RICHTLINIEN FÜR DIE VALIDIERUNG EINES NEUEN MERKMALSPEZIFISCHEN MOLEKULAREN MARKERPROTOKOLLS ALS ALTERNATIVE METHODE ZUR BEOBACHTUNG	2
Hintergrund.....	3
Entwicklungen in den Technischen Arbeitsgruppen auf ihren Tagungen in 202 4	3
<i>Technische Arbeitsgruppe für Prüfmethode und -techniken (TWM)</i>	3
FRAGEN ZUR INFORMATION.....	4
Entwicklungen auf der zweiten Tagung der Technischen Arbeitsgruppe für Prüfmethode und -techniken (TWM)....	4
Entwicklungen in der Molekulartechnik und Bioinformatik	4
<i>Neueste Entwicklungen in der Molekulartechnik und Bioinformatik</i>	4
<i>Zusammenarbeit zwischen internationalen Organisationen</i>	4
<i>Bericht über die Arbeit an molekularen Verfahren im Zusammenhang mit der DUS-Prüfung</i>	4
<i>Die Anwendung molekularer Verfahren bei der Sortenidentifikation</i>	6
ANHANG: Richtlinien für die Validierung eines neuen merkmalspezifischen molekularen Markerprotokolls für DUS-Studien als alternatives Verfahren für die Beobachtung"	

RICHTLINIEN FÜR DIE VALIDIERUNG EINES NEUEN MERKMALSPEZIFISCHEN MOLEKULAREN MARKERPROTOKOLLS ALS ALTERNATIVE METHODE ZUR BEOBACHTUNG

5. Die TWM¹ hörte auf ihrer zweiten Tagung ein Referat von Frau Amandine LeVan (Frankreich) über "Richtlinien für die Validierung eines neuen merkmalspezifischen molekularen Markerprotokolls für DUS-Studien als alternatives Verfahren für die Erfassung", das in Dokument TWM/2/17 wiedergegeben ist. Die TWM nahm zur Kenntnis, daß die während des Referats gemachten Vorschläge von der TWV geprüft und dem TC auf seinen Tagungen im Jahr 2024 berichtet werden würden.

6. Die TWV² prüfte auf ihrer achtundfünfzigsten Tagung das Dokument TWV/58/9, das von einem Sachverständigen aus den Niederlanden (Königreich) vorgelegt wurde. Das Dokument TWV/58/9 ist in der Anlage zu diesem Dokument wiedergegeben.

7. Die TWV vereinbarte, daß eine Anleitung zur Prüfung von Merkmalen unter Verwendung der in den Prüfungsrichtlinien dargelegten molekularen Marker von einer internationalen Harmonisierung profitieren würde.

8. Die TWV vereinbarte, die Streichung des letzten Satzes in Absatz 5 und die Aufnahme eines Verweises auf die jeweilige UPOV-Anleitung, die für die erwähnten ISO-Normen gilt, vorzuschlagen.

9. Die TWV vereinbarte, eine Änderung der Informationen in der Protokolltabelle, Punkt 8, vorzuschlagen, um klarzustellen, daß "für den Fall, daß das Ergebnis des DNA-Marker-Tests die Erklärung im Technischen Fragebogen nicht bestätigt, ein Feldversuch oder ein Bioassay durchgeführt werden sollte, um die Richtigkeit der Erklärung im Technischen Fragebogen zu beurteilen".

10. Die TWV nahm zur Kenntnis, daß merkmalspezifische molekulare Marker von den Züchtern verwendet werden könnten, und vereinbarte, daß sie berechtigt seien, den Prüfer über das zur Bewertung der Merkmale im Technischen Fragebogen verwendete Verfahren zu informieren, wenn ein molekularer Marker als Alternative zu dem im Technischen Fragebogen angegebenen verfügbar sei.

11. Der TC wird ersucht, die TWP zu ersuchen, auf ihren Tagungen im Jahre 2025 den Vorschlag für Richtlinien für die Validierung neuer merkmalspezifischer molekularer Markerprotokolle für die DUS-Prüfung, wie in der Anlage dieses Dokuments enthalten, zu prüfen.

¹ TWM, zweite Tagung, vom 8. bis 11. April 2024 auf elektronischem Wege abgehalten. Siehe Dokument TWM/2/21 "Bericht", Absätze 57 bis 61.

² TWV, achtundfünfzigste Tagung, vom 22. bis 25. April 2024 auf elektronischem Wege abgehalten. Siehe Dokument TWV//58/11 "Bericht", Absätze 54 bis 58.

VERTRAULICHKEIT UND EIGENTUM AN MOLEKULAREN INFORMATIONEN

Hintergrund

12. Der TC nahm auf seiner achtundfünfzigsten Tagung³ die Erörterungen der TWP auf ihren Tagungen im Jahre 2022 über "Vertraulichkeit und Eigentum an molekularen Informationen" zur Kenntnis. Der TC nahm die von den Züchterorganisationen auf der TWM geäußerte Besorgnis zur Kenntnis, daß molekulare Informationen, die bei der Prüfung einer Sorte verwendet werden, von der Behörde, die den Antrag erhalten hat, nicht ohne die Zustimmung des Züchters weitergegeben werden sollten. Der TC vereinbarte, die Mitglieder und Beobachter aufzufordern, auf ihren Tagungen im Jahr 2023 über die bestehende Politik bezüglich der Vertraulichkeit molekularer Informationen bei den TWP zu berichten (vergleiche Dokument TC/58/31 "Bericht", Absätze 48 bis 50).

13. Der TC nahm auf seiner neunundfünfzigsten Tagung⁴ die Grundsätze, über die berichtet wurde, und die Erörterungen über die Vertraulichkeit molekularer Informationen auf den Tagungen der TWP im Jahr 2023 zur Kenntnis. Der TC vereinbarte, die Aufforderung an Mitglieder und Beobachter zu wiederholen, auf den Tagungen der TWP im Jahr 2024 über bestehende Grundsätze zur Vertraulichkeit molekularer Informationen zu berichten.

14. Weitere Hintergrundinformationen zu diesem Thema sind in Dokument SESSIONS/2023/5 "Molekulare Techniken" enthalten.

Entwicklungen in den Technischen Arbeitsgruppen auf ihren Tagungen in 2024

15. Die TWP wurden ersucht, auf ihren Tagungen im Jahr 2024 Referate zu halten und über Beispiele von Strategien für die Vertraulichkeit und den Zugang zu molekularen Daten zu berichten. In der TWA, der TWF, der TWO und der TWV wurden keine Berichte über bestehende Politiken zur Vertraulichkeit vorgelegt.

Technische Arbeitsgruppe für Prüfmethode und -techniken (TWM)

16. Die TWM⁵ hörte ein Referat über "Vertraulichkeit molekularer Informationen" von Herrn Marcel Bruins, CropLife International, im Namen des Afrikanischen Saatguthandelsverbandes (AFSTA), der Saatgutvereinigung für Asien und den Pazifik (APSA), der Internationalen Gemeinschaft der Züchter vegetativ vermehrbare Gartenbaupflanzen (CIOPORA), CropLife International, Euroseeds, des International Seed Federation (ISF) und der Seed Association of the Americas (SAA) ("Züchterorganisationen"). Eine Kopie der Präsentation ist in Dokument TWM/2/7 enthalten.

17. Die TWM nahm das Ersuchen von Züchterorganisationen um Ausarbeitung einer Anleitung in der UPOV zur Vertraulichkeit molekularer Daten und das Angebot, einen Entwurf einer Mustervorlage für eine Vereinbarung vorzuschlagen, zur Kenntnis, der auf ihrer dritten Tagung vorgelegt werden soll.

Beispiele für Strategien zur Vertraulichkeit und zum Zugang zu molekularen Informationsdaten

18. Die TWM nahm zur Kenntnis, dass die Europäische Union voraussichtlich eine Politik für den Zugang zu Sortenproben, einschließlich DNA-Proben, annehmen werde, über die auf den TWP im Jahr 2024 berichtet werden soll.

19. Die TWM vereinbarte, die UPOV-Mitglieder zu ersuchen, auf ihrer dritten Tagung über die bestehende Politik bezüglich der Vertraulichkeit molekularer Informationen zu berichten.

20. Der TC wird ersucht, das Ersuchen der Züchterorganisationen um Ausarbeitung einer Anleitung in der UPOV zur Vertraulichkeit molekularer Daten und das Angebot, einen Entwurf einer Mustervorlage für eine Vereinbarung vorzuschlagen, der auf der dritten Tagung der TWM vorgelegt werden soll, zur Kenntnis zu nehmen.

³ TC, achtundfünfzigste Tagung, die am 24. und 25. Oktober 2022 in Genf stattfand.

⁴ TC, neunundfünfzigste Tagung, am 23. und 24. Oktober 2023 in Genf.

⁵ TWM, zweite Tagung, elektronisch abgehalten, vom 8. bis 11. April 2024. Siehe Dokument TWM/2/21 "Bericht", Absätze 57 bis 61.

FRAGEN ZUR INFORMATION

Entwicklungen auf der zweiten Tagung der Technischen Arbeitsgruppe für Prüfmethoden und -techniken (TWM)

21. Die TWM hielt ihre zweite Tagung vom 8. bis 11. April 2024 auf elektronischem Wege ab. In den folgenden Abschnitten wird über die Entwicklungen bei den molekularen Verfahren berichtet.

Entwicklungen in der Molekulartechnik und Bioinformatik*Neueste Entwicklungen in der Molekulartechnik und Bioinformatik*WIPO-Norm ST.26 - WIPO-Reihenfolge

22. Die TWM hörte ein Referat von Frau Emma Francis, Weltorganisation für geistiges Eigentum (WIPO), über den "WIPO-Standard ST.26 - WIPO-Sequenz", von dem eine Kopie in Dokument TWM/2/15 enthalten ist.

23. Die TWM nahm zur Kenntnis, daß Suchalgorithmen für Datenbanken entwickelt werden könnten, die Nucleotid- oder Aminosäureinformationen unter Verwendung des WIPO-Standarddatenformats ST.26, einschließlich Pflanzensortendaten, enthalten.

*Zusammenarbeit zwischen internationalen Organisationen*OECD

24. Die TWM hörte ein Referat von Herrn Csaba Gaspar, Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD), über "Neueste Entwicklungen bei der Anwendung der BMT im Rahmen der OECD-Saatgutssysteme", das in Dokument TWM/2/19 wiedergegeben ist.

25. Die TWM nahm die Verwendung molekularer Verfahren in den OECD-Saatgutssystemen als zusätzliches Verfahren für die Sortenidentifikation in Feldversuchen zur Kenntnis.

26. Die TWM nahm zur Kenntnis, daß die OECD die Bewertung von Merkmalen unter Verwendung der Bildanalyse prüfe und daß die Verwendung von Algorithmen der künstlichen Intelligenz in Zukunft in Betracht gezogen werden dürfte.

ISTA

27. Die TWM hörte ein Referat von Frau Ana Laura Vicario, Internationale Vereinigung für Saatgutprüfung (ISTA), über den "ISTA-Bericht über die Anwendung molekularer Verfahren", von dem eine Kopie in Dokument TWM/2/18 enthalten ist.

28. Die TWM nahm die Einladung an interessierte Sachverständige zur Teilnahme an den Tätigkeiten des ISTA-Sortenausschusses zur Kenntnis.

29. Die TWM dankte der OECD und der ISTA für die Berichterstattung über die Entwicklungen bei der Anwendung molekularer Verfahren in ihren jeweiligen Organisationen.

30. Die TWM nahm die Einladung der UPOV zur Kenntnis, künftig eine gemeinsame Arbeitstagung der OECD, der ISTA und der UPOV zu veranstalten, um die Anwendung molekularer Verfahren in jeder Organisation zu erörtern und eine weitere Zusammenarbeit in diesem Bereich zu untersuchen.

*Bericht über die Arbeit an molekularen Verfahren im Zusammenhang mit der DUS-Prüfung*Verwaltung von Referenzsammlungen mit Hilfe molekularer Marker: ein neuer Ansatz auf der Grundlage genomischer Vorhersagen

31. Die TWM prüfte das Dokument TWM/2/4 und hörte ein Referat von Herrn Adrian Roberts (Vereinigtes Königreich) über "Genomische Vorhersage für die Verwaltung von Vergleichssammlungen", dessen Abschrift in Dokument TWM/2/4 Add. wiedergegeben ist.

32. Die TWM nahm zur Kenntnis, daß das genomische Vorhersageverfahren darauf abziele, Verbindungen zwischen molekularen Markern und der phänotypischen Ausprägung von Merkmalen bei Weidelgrassorten herzustellen, und daß es möglicherweise bei der Verwaltung von Sortensammlungen behilflich sein könnte.

33. Die TWM nahm zur Kenntnis, daß das genomische Vorhersageverfahren unter Verwendung von Daten aus einem einzigen Prüfungsstandort entwickelt worden sei und bei anderen Pflanzen, für die Daten aus verschiedenen Standorten verfügbar seien, weiter bewertet werden werde.

Prüfung der Homogenität anhand molekularer Marker

34. Die TWM prüfte das Dokument TWM/2/5 und hörte ein Referat von Herrn Adrian Roberts (Vereinigtes Königreich) über die "Prüfung der Homogenität anhand molekularer Marker", dessen Abschrift in Dokument TWM/2/5 Add. wiedergegeben ist.

35. Die TWM merkte an, daß die Forschung zur Bewertung der genetischen Variabilität einer fremdbefruchtenden Pflanze (Weidelgras) mit gemessenen Merkmalen durchgeführt und nicht auf pseudoqualitative Merkmale geprüft worden sei.

36. Die TWM merkte an, daß die nächsten Schritte der Forschung den mit der Sequenzierungsmethodik verbundenen Meßfehler durch unabhängige Läufe mit derselben gepoolten Stichprobe untersuchen könnten.

Molekulare Ansätze zur Unterstützung der DUS-Prüfung

37. Die TWM prüfte das Dokument TWM/2/6 und hörte ein Referat von Frau Vanessa McMillan (Vereinigtes Königreich) über "Molekulare Ansätze zur Unterstützung der DUS-Prüfung", von dem eine Kopie in Dokument TWM/2/6 Add. wiedergegeben ist.

38. Die TWM nahm zur Kenntnis, daß bei Gerstensorten eine Korrelation zwischen Markern und Merkmalen von bis zu 75% erzielt worden sei, allerdings nicht in bezug auf DUS-Merkmale. Die TWM nahm die Absicht zur Kenntnis, die im Rahmen des Projekts ermittelten molekularen Marker zu veröffentlichen, die auch für die Authentifizierung von neuem Saatgut von Sorten verwendet werden könnten. Die TWM vereinbarte, den Sachverständigen aus dem Vereinigten Königreich einzuladen, auf ihrer dritten Tagung über den Fortschritt zu berichten.

F&E-Aktivitäten des CPVO

39. Die TWM hörte ein Referat von Frau Cécile Collonnier (Europäische Union) über "CPVO-F&E-Tätigkeiten", das in Dokument TWM/2/12 wiedergegeben ist.

40. Die TWM nahm die Beiträge der verschiedenen vorgestellten Projekte zur Kenntnis, insbesondere das Projekt INVITE, das im Jahr 2024 auslaufen wird.

Mais6H-60K: Ein genomweiter Einzelnukleotid-Polymorphismus-Array und seine Anwendung

41. Die TWM hörte ein Referat von Frau Hongli Tian (China) über "Maize6H-60K: Ein genomweiter Einzelnukleotid-Polymorphismus-Array und seine Anwendung", das in Dokument TWM/2/16 wiedergegeben ist.

42. Die TWM stellte fest, dass sich 21% der SNPs in dem Array in kodierenden Regionen des Genoms befinden, obwohl ihr Zusammenhang mit der Ausprägung von Merkmalen noch nicht identifiziert worden ist.

Richtlinien für die Validierung eines neuen merkmalspezifischen molekularen Markerprotokolls für DUS-Studien als alternatives Verfahren für die Erfassung

43. Die TWM hörte ein Referat von Frau Amandine LeVan (Frankreich) über "Richtlinien für die Validierung eines neuen merkmalspezifischen molekularen Markerprotokolls für DUS-Studien als alternatives Verfahren für die Erfassung", das in Dokument TWM/2/17 wiedergegeben ist.

44. Die TWM nahm zur Kenntnis, daß der Vorschlag von der TWV geprüft und dem TC auf seinen Tagungen im Jahr 2024 berichtet werden würde.

*Die Anwendung molekularer Verfahren bei der Sortenidentifikation*Verwendung von auf künstlicher Intelligenz basierenden Markern für die Rückverfolgbarkeit von Sorten

45. Die TWM hörte ein Referat von Frau Ana Laura Vicario (Argentinien) über die "Verwendung von auf künstlicher Intelligenz beruhenden Markern für die Rückverfolgbarkeit von Sorten", das in Dokument TWM/2/9 wiedergegeben ist.

46. Die TWM nahm zur Kenntnis, daß die Technologie bei Routineverfahren für die Marktkontrolle und die Rückverfolgbarkeit von Gersten- und Weizensorten in Argentinien eingesetzt werde. Die TWM nahm zur Kenntnis, daß die Technologie für Sojabohnensorten entwickelt werde.

47. Die TWM merkte an, daß der verwendete Algorithmus eindeutige Muster für jede Sorte aufgrund der Samenmorphologie erstellt. Die TWM merkte an, daß die Schwellenwerte für die Entscheidungsfindung und den akzeptierten Fehler angepaßt werden könnten, um die Analyse der Sortenreinheit zu ermöglichen.

LociScan, ein Tool für das Screening genetischer Markerkombinationen zur Unterscheidung von Pflanzensorten

48. Die TWM hörte ein Referat von Herrn Yang Yang (China) über "LociScan, ein Instrument für das Screening genetischer Markerkombinationen für die Unterscheidung von Pflanzensorten", das in Dokument TWM/2/14 wiedergegeben ist.

49. Die TWM nahm zur Kenntnis, daß das Software-Tool LociScan Kombinationen von Markersätzen identifiziere, um die Anzahl der für die Unterscheidung von Sorten erforderlichen Marker zu optimieren. Die TWM merkte an, daß die vom Tool benötigte Analysezeit von der Anzahl der verarbeiteten Proben und nicht von der Anzahl der verwendeten Marker beeinflusst werde.

50. Die TWM nahm zur Kenntnis, daß das Software-Tool LociScan zum Testen zur Verfügung stehe, und vereinbarte, interessierte Sachverständige einzuladen, das Tool zu testen und dem Sachverständigen aus China über die Ergebnisse zu berichten.

51. Der TC und der CAJ werden ersucht, die in diesem Dokument enthaltenen Punkte zur Information zur Kenntnis zu nehmen.

[Anhang folgt]

RICHTLINIEN FÜR DIE VALIDIERUNG EINES NEUEN MERKMALSSPEZIFISCHEN MOLEKULAREN MARKERPROTOKOLLS ALS ALTERNATIVE METHODE FÜR DIE ERFASSUNG

Von Experten aus Frankreich, Italien und dem Königreich der Niederlande erstelltes Dokument

Haftungsausschluss: Dieses Dokument stellt keine Politik oder Anleitung der UPOV dar.

ZUGEHÖRIGE DOKUMENTE	1
I. ZIELSETZUNG DIESER RICHTLINIEN	2
II. GELTUNGSBEREICH DIESER RICHTLINIEN.....	2
III. LEISTUNGSKRITERIEN FÜR EIN NEUES, AUF MOLEKULAREN MARKERN BASIERENDES PROTOKOLL	2
Spezifität.....	2
<i>Definition</i>	2
<i>Anforderung</i>	2
Wie man sie bewertet.....	2
Empfindlichkeit und Nachweisgrenze	2
<i>Definition</i>	2
<i>Anforderung</i>	3
Reproduzierbarkeit	3
<i>Definition (basierend auf ISO 16 577:2016)</i>	3
<i>Anforderung</i>	3
<i>Wie ist sie zu bewerten?</i>	3
Reproduzierbarkeit	3
<i>Definition (basierend auf ISO 16 577:2016)</i>	3
<i>Anforderung</i>	3
<i>Wie ist sie zu bewerten?</i>	3
Robustheit	4
<i>Definition</i>	4
<i>Anforderung</i>	4
<i>Wie ist sie zu bewerten?</i>	4
IV. VALIDIERUNGSBERICHT	4
Inhalt des Validierungsberichts.....	4
Öffentlichkeitsarbeit.....	4
V. STANDARDPROTOKOLL FÜR DAS PROTOKOLL DER MERKMALSSPEZIFISCHEN MOLEKULAREN MARKER	5
VI. FOLGEERHEBUNG NACH DER GENEHMIGUNG	7

ZUGEHÖRIGE DOKUMENTE

1. Bitte beachten Sie, dass die hervorgehobenen Textstellen Zitate aus den nachstehenden Dokumenten darstellen:

- TG/1/3: Allgemeine Einführung zur Prüfung auf Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit und Erarbeitung harmonisierter Beschreibungen von neuen Pflanzensorten
- TG/44: Richtlinien für die Durchführung der Prüfungen auf Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit für Tomate
- TGP/12: Anleitung zu bestimmten physiologischen Merkmalen
- TGP/15: Anleitung zur Verwendung biochemischer und molekularer Marker bei der Prüfung der Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit (DUS)
- UPOV/INF/17 **Richtlinien für die DNS-Profilierung: Auswahl molekularer Marker und Aufbau von Datenbanken**
- UPOV/INF/18 Mögliche Verwendung molekularer Marker bei der Prüfung der Unterscheidbarkeit, der Homogenität und der Beständigkeit (DUS)
- TWV/54/7 + Add Verwendung von molekularen Verfahren bei der DUS-Prüfung

I. ZIELSETZUNG DIESER RICHTLINIEN

2. Zweck dieser Richtlinien ist es, die in der Allgemeinen Einführung (Dokument TG/1/3) und den damit verbundenen TGP-Dokumenten enthaltenen Grundsätze zu einer detaillierten praktischen Anleitung für die harmonisierte Validierung einer neuen Methode auf der Grundlage molekularer Marker vor ihrer Verwendung als alternativer Test auszuarbeiten. Die für die Validierung erforderlichen Leistungskriterien werden beschrieben und es wird Anleitung zu ihrer Bewertung gegeben. Diese Leitlinien beschreiben auch ein Standardprotokoll mit obligatorischen und fakultativen Kapiteln. Auch die Erhebung nach der Annahme wird beschrieben.

3. Wenn eine andere Technik verwendet wird, muss das Labor seine Methode im Vergleich zur Referenzmethode validieren (um zu zeigen, dass die alternative Technik die gleichen Ergebnisse liefert).

II. GELTUNGSBEREICH DIESER RICHTLINIEN

Alle Pflanzen

Merkmalspezifische molekulare Marker

Für die Prüfung der Unterscheidbarkeit, der Homogenität und der Beständigkeit (DUS).

III. LEISTUNGSKRITERIEN FÜR EIN NEUES, AUF MOLEKULAREN MARKERN BASIERENDES PROTOKOLL

Spezifität

Definition

4. Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp, *d. h.* die Zuverlässigkeit der Verbindung zwischen dem Marker und dem Merkmal.

Anforderung

5. Im Prinzip 100%ige Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp. Wenn die Korrelation weniger als 100% beträgt, sollte(n) ein oder mehrere Folgetests durchgeführt werden, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. In diesem Fall kann eine Entscheidungsregel verwendet werden. Eine Korrelation von weniger als 100% kann durch andere genetische Faktoren bedingt sein. Sie kann auch darauf hindeuten, dass die Nichtkorrelation nicht durch den Marker, sondern durch externe Faktoren in den phänotypischen Beobachtungen (z. B. Biotest für eine Krankheitsresistenz) verursacht wird.

Wie man sie bewertet

6. Anzahl der Sorten: "**Zu Beginn des Markerauswahlprozesses ist eine angemessene Anzahl von Sorten (Entwicklungsreihe) erforderlich, die höchstens die innerhalb der Gruppe/Kulturpflanze/Art/Typ, für die die Marker unterscheidend sein sollen, beobachtete Vielfalt widerspiegelt.**"

7. Die Sorten sollten die verschiedenen Ausprägungsstufen repräsentieren (falls Sorten mit heterozygoter und homozygoter Ausprägung bekannt sind), von verschiedenen Saatgutunternehmen stammen und einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund für das Merkmal und verschiedene Typen aufweisen. Wenn verfügbar, sollten gut phänotypisch charakterisierte Sorten für das Merkmal von Interesse verwendet werden.

8. Anzahl der Pflanzen pro Sorte: Mindestens eine Pflanze je Sorte, wenn phänotypisch gut charakterisierte Sorten vorhanden sind. Ist dies nicht der Fall, muß die Anzahl der Pflanzen dieselbe sein wie bei der in der UPOV-Richtlinie beschriebenen morphologischen Erfassung.

9. Die Spezifität kann innerhalb eines Labors beurteilt werden.

Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

Definition

10. Die Nachweisgrenze ist definiert als die minimale Menge des Ziels, die zuverlässig nachgewiesen werden kann.

11. Bei Analysen von Sammelproben (z. B. Pool von verschiedenen Pflanzen derselben Sorte) ist die Empfindlichkeit entscheidend und muss bewertet werden. Bei der Verwendung an einzelnen Pflanzen ist die Menge des Ziels nicht entscheidend und dieses Leistungskriterium ist fakultativ.

Anforderung

12. Im Falle des Pools wäre die Anforderung, mindestens einen Abweicher im Pool zu entdecken.

Wie ist sie zu bewerten?

13. Verwendung künstlicher Proben, indem ein Abweicher in einen Pool gemischt wird, um die Empfindlichkeit des Nachweises zu überprüfen.

Reproduzierbarkeit

Definition (basierend auf ISO 16 577:2016)

14. "Wiederholbarkeit; wenn identische Prüfergebnisse mit der gleichen Methode, an identischen Prüfgegenständen, im gleichen Labor, durch den gleichen Bediener, unter Verwendung der gleichen Ausrüstung innerhalb kurzer Zeitabstände erzielt werden."

15. Bei qualitativen Methoden entspricht die Übereinstimmung der Wiederholbarkeit von quantitativen Methoden (Langton *et al.*, 2002).

Anforderung

16. Idealerweise 100%, eine Leistung $\geq 90\%$ wird allgemein akzeptiert. Wenn die Wiederholbarkeit der Referenzmethode veröffentlicht wird, sollte die Wiederholbarkeit der Alternativmethode mindestens gleichwertig sein.

Wie ist sie zu bewerten?

17. Die Wiederholbarkeit kann innerhalb eines Labors bewertet werden.

18. Mindestens drei technische Wiederholungen von ein und derselben Pflanze (drei unabhängige DNA-Extraktionen). Mindestens alle erwarteten Genotyp-Typen müssen enthalten sein.

Reproduzierbarkeit

Definition (basierend auf ISO 16 577:2016)

19. "Reproduzierbarkeit; wenn die Prüfergebnisse mit derselben Methode, an identischen Prüfgegenständen, innerhalb desselben Labors oder zwischen verschiedenen Labors, mit verschiedenen Bedienern, unter Verwendung verschiedener Geräte" zu verschiedenen Zeiten erzielt werden.

20. Bei qualitativen Methoden ist die Konkordanz gleichbedeutend mit der Reproduzierbarkeit quantitativer Methoden (Langton *et al.*, 2002).

Anforderung

21. Idealerweise 100%, eine Leistung $\geq 90\%$ wird allgemein akzeptiert. Wenn die Reproduzierbarkeit der Referenzmethode veröffentlicht wird, sollte die Reproduzierbarkeit der Alternativmethode mindestens gleichwertig sein.

Wie ist sie zu bewerten?

22. Die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Laboratorien sollte durch eine laborübergreifende Validierungsstudie (Ringtest) mit kodierten Proben bekannter Genotypen bewertet werden. Dabei sollten alle zu erwartenden Genotypen einbezogen werden.

23. An dem Ringtest sollten mindestens drei verschiedene Laboratorien, darunter mindestens zwei verschiedene Untersuchungsämter, beteiligt sein (z. B. waren im INVITE-Projekt drei Untersuchungsämter an der Validierungsprüfung beteiligt). Wenn möglich, sollten erfahrene Laboratorien, die mit der Tierart und der Technik vertraut sind, beteiligt sein. Falls nicht, kann vor dem Ringtest eine Schulung mit nicht codierten

Proben organisiert werden. Laboratorien können auf freiwilliger Basis an einem Ringversuch teilnehmen-. Falls es keine Freiwilligen gibt, kann die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors bestimmt werden.

24. Alle Laboratorien müssen das zu validierende Protokoll befolgen. Im Protokoll können obligatorische und optionale Teile vom Validierungsteam festgelegt werden. Siehe z. B. das Protokoll CPVO/TP-044/4-Rev., in dem obligatorische und optionale Schritte festgelegt wurden.

25. Anzahl der Sorten: Mindestens alle zu erwartenden Genotypentypen müssen enthalten sein.

26. Leitlinien/Normen für Ringversuche können befolgt werden: ISO 13495 *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 kann die befolgten Richtlinien in seinem Bericht anführen.

Robustheit

Definition

27. "Robustheit; ein Maß für die Fähigkeit, von kleinen, aber absichtlichen Abweichungen von den in den Verfahrensparametern beschriebenen Versuchsbedingungen unbeeinflusst zu bleiben, und gibt einen Hinweis auf die Zuverlässigkeit bei normalem Gebrauch" (z. B. Wechsel der DNA-Extraktionsmethode oder Wechsel der Echtzeitmaschine).

Anforderung

28. Im Idealfall 100%, andernfalls bedeutet dies, dass die Methode gegenüber der Änderung eines Parameters nicht robust ist, und dies sollte im Protokoll als obligatorischer Schritt angegeben werden (z. B. eine Änderung einer Mastermischung, die kritisch wäre).

Wie ist sie zu bewerten?

29. Die Bewertung der Robustheit ist fakultativ und wird teilweise während der Ringprüfung (Reproduzierbarkeit) vorgenommen (verschiedene Labors, Geräte, Maschinen, Personen usw.).

IV. VALIDIERUNGSBERICHT

30. Der Validierungsbericht und die Ergebnisse müssen von zwei (vorzugsweise drei, wenn die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors durchgeführt wurde) der Prüfstellen begutachtet werden. Die Überprüfung erfolgt auf freiwilliger Basis, sollte jedoch vorzugsweise von einem Labor durchgeführt werden, das mit der betreffenden Tierart und der Methode vertraut ist.

31. Während des Überprüfungsprozesses können die Prüfer in Absprache mit dem Validierungsteam zusätzliche Validierungsdaten anfordern.

Inhalt des Validierungsberichts

- Rohdaten, die während der verschiedenen Schritte des Validierungsprozesses erzeugt werden
- Detailprotokoll mit fakultativen und obligatorischen Schritten definiert
- Bewertung der Leistungskriterien
- Schlussfolgerung

Öffentlichkeitsarbeit

32. Der Validierungsbericht sollte auf Anfrage erhältlich sein. In dem neuen Protokoll sollte der Validierungsprozess mit dem Kontaktprüfungsamt erwähnt werden. In einigen besonderen Fällen, z. B. bei einem "Geschäftsgeheimnisprotokoll" (cytoplasmatische männliche Sterilität bei Kohl), können das Protokoll und der Validierungsbericht nicht außerhalb der Prüfungsämter weitergegeben werden.

V. STANDARDPROTOKOLL FÜR DAS PROTOKOLL DER MERKMALSPEZIFISCHEN MOLEKULAREN MARKER

33. Obligatorische Elemente sind in der Spalte "Wesentliche Informationen" angegeben, die anderen Elemente können je nach dem charakteristischen Prüfprotokoll verwendet werden. Wenn ein Laboratorium ein obligatorisches Kapitel oder ein Element eines obligatorischen Kapitels anpassen/ändern möchte, muss es seine Methode im Vergleich zur Referenzmethode validieren (um zu zeigen, dass es die gleichen Ergebnisse wie die veröffentlichte Methode erhält).

Tabelle 1: Standardmerkmal-spezifisches Protokoll für molekulare Marker (vergleiche Dokument TWV/54/7 "Verwendung molekularer Verfahren bei der DUS-Prüfung"). Änderungen sind **grau hervorgehoben**

Kapitel	Elemente in einem Standardmerkmal-spezifischen molekularen Markerprotokoll	Beispiel	Wichtige Informationen für die Harmonisierung	Bemerkung
1	Merkmal	Resistenz gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) <i>Siehe TG/44/11/rev3 - Zu 51: ii DNA-Marker-Test</i>	YES	
2	Gene und Allele	<i>Siehe TG/44/11/rev3 - Zu 51: ii DNA-Marker-Test hinzufügen 2</i>	YES	Dominante Marker oder Anwesenheits-/Abwesenheitsmarker müssen vermieden werden, ansonsten sollte die Robustheit bewertet werden.
2.1	Gezielte(s) Gen(e)	Resistenz Gen Tm2 Arens, P. et al (2010)	YES	a) Datei(en) mit den DNA-Sequenzinformationen (Reihenfolge der Nukleotide) b) Verweis auf DNA-Informationen in öffentlichen Datenbanken (wie GeneBank) c) Verweis auf (wissenschaftliche) Veröffentlichungen, in denen die DNA-Sequenzinformationen der Ausprägungsstufen des Merkmals offengelegt werden. d) Verweis auf eine bestimmte Position in der veröffentlichten Version des Referenzgenoms.
2.2	Allel, das dem Zustand 1 entspricht	Tm2 und Tm2 ² Arens, P. et al (2010)	YES	a) Datei(en) mit den DNA-Sequenzinformationen (Reihenfolge der Nukleotide) b) Verweis auf DNA-Informationen in öffentlichen Datenbanken (wie GeneBank) c) Verweis auf (wissenschaftliche) Veröffentlichungen, in denen die DNA-Sequenzinformationen der Ausprägungsstufen des Merkmals offengelegt werden. d) Verweis auf eine bestimmte Position in der veröffentlichten Referenzgenomversion in Kombination mit dem SNP oder INDEL, der für den Ausprägungszustand verantwortlich ist.

Kapitel	Elemente in einem Standardmerkmal-spezifischen molekularen Markerprotokoll	Beispiel	Wichtige Informationen für die Harmonisierung	Bemerkung
2.3	Allel, das dem Ausprägungszustand n entspricht	tm2 Arens, P. et al (2010)	YES	a) Datei(en) mit den DNA-Sequenzinformationen (Reihenfolge der Nukleotide) b) Verweis auf DNA-Informationen in öffentlichen Datenbanken (wie GeneBank) c) Verweis auf (wissenschaftliche) Veröffentlichungen, in denen die DNA-Sequenzinformationen der Ausprägungsstufen des Merkmals offengelegt werden. d) Verweis auf eine bestimmte Position in der veröffentlichten Referenzgenomversion in Kombination mit dem SNP oder INDEL, der für den Ausprägungszustand verantwortlich ist.
3	Primer (und Sonden)	<i>Siehe TG/44/11/rev3 - Zu 51: ii DNS-Marker-Test 3, 3.1 und 3.2 hinzufügen</i>	YES	Primer- und Sondensequenzen, Verweis auf Akzessionen und Sequenzen in öffentlichen Datenbanken (Genebank-Nummern), Literatur
3.1	Primer (und Sonden) zum Nachweis des Allels '9'		YES	Primer Sequenzen, die dem/den Allel(en) für die Ausprägung "9" (Resistenz) entsprechen
3.2	Primer (und Sonden) zum Nachweis des Allels '1'		YES	Primer Sequenzen, die dem/den Allel(en) für die Ausprägung "1" (Anfälligkeit) entsprechen
3.3	Primer (und Sonden) zum Nachweis des Allels 'x'		YES	Primer Sequenzen, die dem/den Allel(en) für die Ausprägung "x" entsprechen
4	Format der Prüfung			
4.1	Anzahl der Pflanzen pro Genotyp	>=20	YES	Eine Mindestzahl von Einzelpflanzen ist erforderlich (vgl. 5.2.1a). Die Prüfung des Markers wird an derselben Anzahl Einzelpflanzen mit denselben Kriterien für Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit wie bei der Prüfung des Merkmals durch einen Beobachtungstest durchgeführt (TGP 15).
4.2	Kontrollsorten	<i>Siehe TG/44/11/rev3 - Zu 51: ii DNS-Marker-Test hinzufügen 4.2</i>	YES	Kontrollsorten (wie im Beobachtungstest) als Standards, die alle relevanten Allelkombinationen repräsentieren. Zum Beispiel homozygot für das Allel, das der Ausprägungsstufe 9 (vorhanden) entspricht, homozygot für das Allel, das der Ausprägungsstufe 1 (anfällig) entspricht, und heterozygot (beide Allele sind in einem Diploid vorhanden), das entweder der resistenten, anfälligen oder intermediären Ausprägungsstufe entspricht (je nach Genfunktion; dominant - rezessiv). DNA-Kontrollen können direkt verwendet werden.
4.3	Prozesskontrollen	<i>z. B. Puffer für die Extraktion; ein Marker für das Cytochromoxidase-Gen als interner Amplifikationsmarker</i>	YES	a) Negative Prozesskontrolle(n) b) Positive DNA-Kontrolle(n), die die Kontrollsorten sein können c) Interne Amplifikationskontrolle im Falle eines Anwesenheits-/Abwesenheitsmarkers

Kapitel	Elemente in einem Standardmerkmal-spezifischen molekularen Markerprotokoll	Beispiel	Wichtige Informationen für die Harmonisierung	Bemerkung
5	Vorbereitungen	z. B. Probenahme von 4 Tage alten Sämlingen, gefolgt von einer DNA-Extraktion mit der CTAB-Methode	NO	Abhängig von der verwendeten Methode. Nicht in der Prüfrichtlinie enthalten. Detaillierte(s) Protokoll(e) kann/können als Beispiel im Anhang zur Verfügung gestellt werden oder auf Anfrage bei dem Institut erhältlich sein, das den Marker entwickelt hat
6	Leistung oder Technik der Methode	z. B. konventionelle PCR, TETRA-ARMS, qPCR, KASP, Amplikon-Sequenzierung Siehe TG/44/11/rev3 - Zu 51: ii DNA-Marker-Test hinzufügen 6	YES	.
6.1	Besondere Bedingungen	z. B. PCR-Protokoll mit Angabe von Primer-, Enzym- und dNTP-Konzentrationen, PCR-Zykusschema	NO	Abhängig von der verwendeten Methode. Nicht in der Prüfrichtlinie enthalten. Detaillierte(s) Protokoll(e) kann/können als Beispiel im Anhang zur Verfügung gestellt werden oder auf Anfrage bei dem Institut erhältlich sein, das den Marker entwickelt hat
6.2	Besondere Hardware oder Infrastruktur	z. B. Maschinen, kommerzielle Bausätze, Hersteller von Komponenten, Chargennummern von Chemikalien	NO	Abhängig von der verwendeten Methode. Nicht in der Prüfrichtlinie enthalten. Detaillierte(s) Protokoll(e) kann/können als Beispiel im Anhang zur Verfügung gestellt werden oder auf Anfrage bei dem Institut erhältlich sein, das den Marker entwickelt hat
7	Beobachtungen	z. B. Banden auf Agarosegel (konventionelle PCR), Ct-Werte (qPCR) Variantenaufruf auf der Grundlage von Sequenzierungslesungen	NO	Abhängig von der verwendeten Methode. Nicht in der Prüfrichtlinie enthalten. Detaillierte(s) Protokoll(e) kann/können als Beispiel im Anhang zur Verfügung gestellt werden oder auf Anfrage bei dem Institut erhältlich sein, das den Marker entwickelt hat
7.1	Gültigkeit der Ergebnisse	z. B. für qPCR: Prüfen Sie auf typische exponentielle Amplifikationskurven. Prüfen Sie, ob die Kontrollen den Erwartungen entsprechen (Negativkontrollen = kein Signal; Positivkontrollen = zeigen erwartete Signale für alle Fluorophore).	YES	Je nach der verwendeten Methode.
8	Auswertung der Testergebnisse	Siehe TG/44/11/rev3 - Zu 51: ii DNS-Marker-Test hinzufügen 8	YES	Beziehung zwischen Allelen und Ausprägungen (mit Anmerkungen)
9	Validierung der Methode,	Dieses Protokoll wurde durch einen Ringversuch mit verschiedenen Labors validiert (z.B. Interlaboratory Comparative Test Report, INVITE 2024).	YES	
9.1	Kontakt Prüfungsamt	z.B. Naktuinbouw	YES	Kontakt des Instituts, das dieses Protokoll entwickelt hat, Name des Dienstes.

VI. FOLGEERHEBUNG NACH DER GENEHMIGUNG

34. Die Validierung des Markers ist nicht festgelegt, da neue Genetik auf dem Markt auftauchen kann. Dies ist ein kontinuierlicher Bewertungsprozess. Die Spezifität sollte nach der Akzeptanz der Validierung durch Doppeltests zumindest im ersten Jahr mit der Beobachtungsmethode neu bewertet werden.

35. Nach dem ersten Jahr der Annahme des Protokolls müssen bei etwa 10% der neuen Sorten morphologische Kontrollen durchgeführt werden.

[Ende des Anhangs und des Dokuments]