



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agreed by the Council of UPOV, only documents that have been adopted by the Council of UPOV and that have not been superseded can represent UPOV policies or guidance.

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

---

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

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

---

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

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

---

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

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



TC/28/4

0149

ORIGINAL: englisch

DATUM: 26. September 1992

**INTERNATIONALER VERBAND ZUM SCHUTZ VON PFLANZENZÜCHTUNGEN**

GENÈVE

**TECHNISCHER AUSSCHUSS**

**Achtundzwanzigste Tagung  
Genf, 21. bis 23. Oktober 1992**

**BESTIMMUNG DER UNTERSCHIEDBARKEIT, HOMOGENITÄT UND BESTÄNDIGKEIT  
VON SORTEN UNTER VERWENDUNG VON DNS-PROFILIERUNGSTECHNIKEN**

Von Sachverständigen aus Australien erstelltes Dokument

0150

BESTIMMUNG DER UNTERSCHIEDBARKEIT, HOMOGENITAET UND BESTAENDIGKEIT  
VON SORTEN UNTER VERWENDUNG VON DNS-PROFILIERUNGSTECHNIKEN

von Australien erstelltes Dokument

Lloyd, H.L., Plant Variety Rights Office, Canberra;  
Appels, R; Preston, L.R.; Morell, M.K. & Buller, C.D.S., Cooperative Research  
Centre for Plant Science, Australian National University, Canberra;  
Armitage, P.J., Intellectual Property Group, Blake Dawson Waldron, Sydney

I. Einführung

1. Die Verbandsstaaten und das Büro des Internationalen Verbands zum Schutz von Pflanzenzüchtungen ("der Verband") haben durch die rechtzeitige Ausarbeitung und Annahme der Akte (des Uebereinkommens) von 1991 des Verbands sowohl Weitsicht als auch Anpassungsfähigkeit an die Entwicklungen der Biotechnologie bewiesen.
2. Während die technischen und juristischen Verfeinerungen des in der Akte von 1991 festgelegten Sortenschutzes das Arbeitsergebnis von UPOV-Ausschüssen auf allen Ebenen ist, hat sich der Technische Ausschuss besonders erfolgreich um die Koordinierung der Annahme neuer Technologien in den Verbandsstaaten verdient gemacht.
3. So ist z. B. die wirksame Koordinationsrolle des Technischen Ausschusses bei der elektronischen Farbmessung und Protein-Elektrophorese zur Feststellung der Unterscheidbarkeit deutlich erkennbar.
4. In einer Vorprüfung hat sich der Technische Ausschuss zudem mit DNS-Merkmalen zur Ermittlung der Sortenunterscheidbarkeit befasst (TC/27/9).
5. Das vorliegende Dokument dient dem Zweck:
  - a) kurz die Natur und Entwicklungen der DNS-gestützten Analyse sowie deren Anwendung für die Charakterisierung von Sorten zu prüfen;
  - b) die ergänzende Rolle der DNS-gestützten Analyse bei der Prüfung auf Unterscheidbarkeit zu erörtern;
  - c) die Gültigkeit der Verwendung von DNS-Profilierungsmerkmalen zur Feststellung der Unterscheidbarkeit einer Sorte im Sinne der Akte des Verbands von 1991 festzulegen; und
  - d) dem Technischen Ausschuss zu empfehlen, die Annahme der DNS-gestützten Analyse für die Sortencharakterisierung innerhalb des Verbands zu beschleunigen.

## II. DNS-gestützte Analyse und Charakterisierung von Sorten

6. Die Charakterisierung von Molekülen hat eine Vielfalt von Möglichkeiten erschlossen, von denen für die Identifizierung von Pflanzensorten Gebrauch gemacht werden kann. Bildliche Darstellungen aufgrund von DNS-Merkmalen, die häufig als DNS-Profile bezeichnet werden, scheinen besonders für die Bestimmung der Unterscheidbarkeit von Sorten geeignet zu sein.

### DNS-Profilierung

7. Ein DNS-Profil (oder DNS-'Fingerprint') ist ein bildliches Ergebnis, das auf einer Analyse einiger Teile des DNS-Moleküls beruht. Das DNS-Profil kann mit einem 'Strich-Code' oder menschlichen Fingerabdruck verglichen werden. Es handelt sich um eine einzigartige Kombination von Identifizierungsmerkmalen des Produkts oder Individuums, ohne eine Beziehung zum Aussehen (Beschreibung) oder Leistungspotential (Wert) des betreffenden Produkts oder Individuums aufzuweisen.

8. Es bestehen derzeit zwei grössere DNS-Profilierungstechniken, die für die Charakterisierung von Sorten relevant sind: die Restriction Polymorphic DNS (RFLP)- und die Random Amplified Polymorphic DNS (RAPD)-Analyse (Anhang 1). Die RFLP-Analyse ergibt begrenzte Informationen über den Genotyp. Die RAPD-Analyse beruht auf der in vitro-Ausprägung einiger polymorphischer Abschnitte des DNS-Moleküls. Die RAPD-Analyse ergibt weder Informationen über den Genotyp noch stellt sie eine Analyse des Genotyps selbst dar. DNS-Techniken erlauben die Analyse eines beliebigen Bereichs des Genoms, der Polymorphismus aufweist (was zumeist in nicht-kodierenden Teilen des DNS-Moleküls der Fall ist). Einzelheiten über die Analyseverfahren von RAPD und RFLP werden nachfolgend in den Absätzen 15 bis 20 kurz beschrieben.

### Vorteile der DNS-Profilierung gegenüber anderen molekularen Verfahren

9. Die DNS-Struktur (auf die sich die DNS-Profilierungstechniken begründen) ist wahrscheinlich durch Klima, Umwelt, Breitengrad oder Entwicklungsstadium der Pflanze unbeeinflusst. Dies steht im Gegensatz zur Quantität und Natur aller anderen Moleküle, die mehr oder weniger durch Umwelt, Breitengrad und Entwicklungsstadium der Pflanze beeinflusst werden.

10. Proteinverfahren, einschliesslich der Isoenzym-Analyse, können nur einen kleinen Teil des Genoms prüfen, in dem eine höchst spezifische Gruppe löslicher Proteine kodiert ist, die insgesamt gesehen keine Heterogenität aufweist. Demgegenüber wird durch DNS-Profilierungstechniken jeder Bereich des Polymorphismus aufweisenden DNS-Moleküls (der am häufigsten in nicht-kodierenden Abschnitten des DNS-Moleküls anzutreffen ist) analysiert.

11. Die durch die Elektrophorese von Vorratsproteinen erhaltenen Bandmuster sind sehr detailliert und weisen eine grosse Zahl sich überschneidender Bänder auf. Hierdurch wird die Auslegung des Gel-Bildes kompliziert und ist nicht ohne weiteres für eine automatisierte Analyse geeignet.

12. In der Regel erfordert die Isoenzym-Analyse die Durchführung einer Reihe von unterschiedlichen enzymatischen Verfahren, um ein 'Fingerprint'-Profil zu entwickeln. Auch weichen die Verfahren für verschiedene Gewebe und Arten oft voneinander ab. Das RAPF-Standard-Analyseverfahren wird allgemein benutzt, und nur das angewandte 'Primer-Set' wird verändert, um die Auflösungskraft der Analyse zu erhöhen. Dies bedeutet, dass weniger Chemikalien notwendig sind, es gibt weniger zu standardisierende Bedingungen sowie weniger Bedienungsfehler, und die Automatisierung wird erleichtert.

0152

13. Früher waren DNS-Analyse-Techniken kostenaufwendiger als Protein-Analyse-Techniken. Die Entwicklung der RAPD-Analyse im Jahre 1990 hat aber die Analysekosten vergleichbar gemacht. Durch die Automatisierung der DNS-Profilierung werden die Kosten noch weiter gesenkt, und es ist wahrscheinlich, dass weniger DNS-gestützte Analysen für die Charakterisierung von Sorten notwendig werden.

14. Im Gegensatz zu DNS-gestützten Merkmalen werden sekundäre Metaboliten (Phenolverbindungen, Pigmente, Lipide usw.), die das Produkt komplexer biochemischer Reaktionsserien sind, stark durch Umweltbedingungen, Ernährungszustand, Breitengrad und Entwicklungsstadium der Pflanze beeinflusst. Deshalb bieten sie keinen besonderen Vorteil für die Sortencharakterisierung.

#### Vergleich von RAPD- mit RFLP-Analysen

15. Folgende Tabelle enthält einen Vergleich der RAPD- und RFLP-Eigenschaften, die sich auf solche Aspekte beziehen, die in Zusammenhang mit einer eventuellen Verwendung beider Techniken zur Sortencharakterisierung stehen.

EIGENSCHAFT	RFLP	RAPD
Anwendung	alle Arten	alle Arten
Ermittlung von Allelvariante	ja	nein
Zahl der ermittelten Loci	1-3	1-10
überprüftes Genom	'low copy'-Abschnitte	ganzes Genom
DNS-Qualität	gereinigt	ungereinigt
DNS-Quantität	2-10 Mikrogramm	10-50 Nanogramm
Verwendung von Radioisotopen	ja	nein
'Probe' (Primer)-Typ	spezifisch 'low copy' DNS oder cDNS-Arten	willkürlich 9-10 mer Oligonukleotide
techn. Schwierigkeit	mittelgross	gering
Dauer der Analyse	3-6 Tage	1 Tag(automat.) 2 Tage(manuell)
Vorinformation	DNS-Sequenzierung von Art	keine

In Anhang 1 sind Ablaufdiagramme für RAPD- und RFLP-Verfahren dargestellt.

#### Random Amplified Polymorphic DNS (RAPD)

16. Die RAPD-Analyse wurde zuerst im Jahre 1990 entwickelt. Sie ist technisch einfach und leicht automatisierbar. Für die RAPD werden lediglich geringe DNS-Mengen (nur ein Nanogramm) benötigt. Im Gegensatz zur RFLP-Analyse erfordert sie nicht die Verwendung von artenspezifischen 'Primers', radioaktiven 'Probes', cDNS-Bibliotheksaufbau oder 'Southern' Hybridisierungen, und die RAPD-Analyse ist auch nicht von Klonen oder vorheriger DNS-Sequenzierung der Art abhängig.

17. Methodologie: Die Basis von RAPD besteht darin, dass kurze oligonukleotide 'Primers' willkürlicher Sequenz im pflanzengenomischen DNS inkubiert werden und sich dort kombinieren (hybridisieren) können. Die 'Primers' binden zu viele verschiedene Positionen (Loci) auf dem Genom, und man erlaubt ihre Replizierung von solchen Hybridisierungspunkten in einer thermischen Kreislaufreaktion (PCR - 'polymerase chain reaction'), die variierende DNS-Längen ergibt, je nachdem, wie nahe sich zwei dieser 'Primers' auf entgegengesetzten DNS-Strängen befanden.

18. Dieser Prozess wird während einer Reihe von Replizierungen wiederholt, bis die geschaffenen Fragmente in ausreichenden Quantitäten vorhanden sind, um auf einem Agarosegel oder auf einem Polyacrylamid-Gel sichtbar gemacht zu werden. Bei den meisten Pflanzen ergeben 'Primers', die 9-10 Nukleotide lang sind, 2-10 Amplifikationsprodukte (Bänder) pro 'Primer set'. Die Schaffung dieser DNS-Fragmente ist voll wiederholbar.

19. Die Produkte können leicht durch elektrophoretische Standardverfahren getrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden, indem sie mit Ethidium-Bromid gefärbt werden. Polyacrylamid-Gels können ebenfalls benutzt und mit Silber-Einfärbung von DNS kombiniert werden, um die Auflösung und das Auffinden von weniger amplifizierten Fragmenten zu steigern.

20. Individuelle Amplifizierungsprodukte weisen in der Regel ein Allel pro Genort auf und werden als dominierende Marker übertragen. Eine geringe Variationsbreite im RAPD-Profil kann von DNS-Sequenz-Variation - d. h. entweder Einfügung oder Aufhebung - herrühren, aber dies ist kein wesentliches Problem bei der DNS-Profil-Analyse.

21. Muster: Welche Gewebe? Wieviele Muster? Das am häufigsten verwendete Gewebe ist frisch - d. h. aktiv wachsendes Blatt oder Knolle - obwohl derzeit auch die Verwendung anderer Gewebe untersucht wird. Die Analyse ist unter Verwendung von weniger als einem Gramm Pflanzenmaterial durchführbar.

22. Die Zahl der Muster, die Art der Musterauswahl und die Loci pro Probe für die einzelnen, für die Sortencharakterisierung zu analysierenden Arten müssen festgelegt und normalisiert werden.

23. Automatisierung und Instrumentenausstattung: Die RAPD-Analyse ist zur Automatisierung geeignet, wodurch weniger Bedienungsfehler des Laborpersonals, eine kürzere Analysedauer sowie ein erhöhter Durchsatz und infolgedessen weniger Kosten bewirkt werden. Zudem wird die Resultatsvariation unter den Labors verringert.

RAPD-Automatisierung kann zur Zusammenstellung von Computerdaten von DNS-Fingerprints der Sorten sowie zur zentralisierten Datenspeicherung führen.

Zwei Hersteller von wissenschaftlichen Instrumenten bieten Pakete für die automatisierte Analyse von RAPD-Profilen an:

- Applied Biosystems International - 373-DNS-Sequenzierer unter Verwendung von 'Genescan 672' Software
- Pharmacia LKB Biotechnology - ALF-DNS-Sequenzierer unter Verwendung von 'Fragment Manager' Software.

24. Diese Programme und Instrumente sind nicht untereinander austauschbar, und das Ergebnis der beiden Systeme ist nicht unmittelbar vergleichbar. Sollte die UPOV die RAPD-Analyse und automatisierte Profil-Analyse als eine Methode zur Feststellung der Unterscheidbarkeit von Pflanzensorten akzeptieren, so ist es unabdingbar, dass die Instrumentenausstattung im Hinblick auf die nationale und internationale Kompatibilität des DNS-Profil-Datenmanagements sobald wie möglich standardisiert wird.

25. Die veranschlagten Kosten (AUD)\* der automatisierten und manuellen RAPD-Analyse, Kapitalaufwendungen ausgenommen, sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

\* AUD 1 = Schw.Fr. 0,96 = US\$ 0,74 (Wechselkurs vom 29.9.1992)

POSTEN	AUTOM. RAPD	MANUELLES RAPD
Primers	0,57	0,32
'Tag polymerase'	0,57	0,57
Puffer/dNTPs	0,26	0,26
Standardgrösse	0,37	0,32
Gel	0,11**	0,27***
	----	----
Kosten für Reagenzien/Loci	1,87	1,74
	----	----
Labor/Locus (\$15/h)	0,11	>0,33
Dauer	1 Tag	1-2 Tage
Datenspeicherung	automatisch	manuell

\* auf der Grundlage von 10 - 15 für die Identifizierung erforderlichen Loci

\*\* berechnet unter Verwendung einer Ladung von 72 Proben/Gel

\*\*\* berechnet unter Verwendung von Agar-Gels bei einer Ladung von 14 Proben/Gel und einer Standardgrösse.

#### Anwendung der RAPD für die Charakterisierung von Sorten

26. RAPD-Profil-Speicherung, Uebermittlung und Bewertung: Daten automatisch ausgewerteter RAPD-Profile können entweder als Chromatograph (Spitzenposition und Bereich) oder als Fragment-Grösstentabellen oder Fragment-Diagramme (Gel-Bilder) automatisch gespeichert werden.

27. Elektronisch gespeicherte RAPD-Profile können über elektronische Standardmittel (Modem, Floppy-Disketten oder CD) übertragen werden, und Software-Programme können für den elektronischen Vergleich von Sortenprofilen mit RAPD-Profilen in einer Datenbank entwickelt werden.

28. 'Reference DNS' einer Sorte kann fortdauernd gespeichert und bzw. oder für eine spätere RAPD-Analyse transportiert oder für alternative DNS-gestützte Sortencharakterisierungstechniken verwendet werden, die in Zukunft entwickelt werden könnten.

29. Quantifizierung und Cluster-Analyse: Die Bedeutung der An- oder Abwesenheit eines Bandes auf einem Gel-Bild ist bei der Verwendung von molekularen Techniken zur Charakterisierung von Sorten immer problematisch gewesen. Die Frage, was eine Sorte umfasst, kann durch die Anwendung von 'Cluster-Analysen' von Bändern in besonderen Positionen - kombiniert mit einem definierten empirischen Mindestabstand (% Ähnlichkeit) - beantwortet werden. Die ins Auge gefasste Auswertungsmethode von RAPD-Daten und die Erstellung von Similaritätsmatrizen und Cladogrammen werden kurz in Anhang 2 dargestellt.

30. Die statistischen Beweise können durch eine Erhöhung der Anzahl der analysierten 'Primer sets' gesteigert werden. Es ist anzunehmen, dass 40-80 % von Zufalls-'Primers' polymorphe Marker ergeben.

31. DNS-Profilierungstechniken werden meistens für hoch heterozygotische, Inzucht- und vegetativ vermehrte Pflanzen verwendet, bei denen die Zahl der für den Beweis der Einmaligkeit notwendigen 'Primer sets' minimal ist. Für Sorten dieser Artengruppe werden gewöhnlich Sortenschutzanmeldungen eingereicht.

### DUS-Anwendung der RAPD-Analyse

32. Unterscheidbarkeit: Das RAPD-Profil oder der 'Fingerprint' einer Sorte ist ebenso wie der Fingerabdruck eines Menschen ein einmaliges Unterscheidungsmerkmal eines Individuums (Sorte). Durch die Erhöhung der Zahl der 'Primer sets' wird die Auflösung der RAPD-Analyse gesteigert. Die Ergebnisse der RAPD-Analyse sind unter der Voraussetzung quantifizierbar, dass die statistische Analyse und 'Mindestabstände' aufgrund von Similaritätsmatrizen auf Prozentsätze gestützt werden können (Anhang 2).

33. Die RAPD-Analyse kann standardisiert, automatisiert werden, und die Profile können gespeichert und elektronisch ausgewertet werden. Zudem werden DNS-'Templates' nicht durch Klima, Umwelt, Breitengrad oder Entwicklungsstadium der Pflanze beeinflusst. Somit müssen die RAPD-Profile der zu prüfenden Sorte nur mit den gespeicherten Profilen der ähnlichsten Sorten verglichen werden, um die Unterscheidbarkeit festzustellen.

34. RAPD-Profile von allgemein bekannten Sorten können in zentralen Datenbanken gespeichert, in regelmässigen Abständen überarbeitet und durch CD-ROM übermittelt werden, und die Profile der zu prüfenden Kandidatensorten können mit allgemein bekannten Sorten in einer internationalen Profil-Datenbank verglichen werden.

35. Notwendigenfalls kann ein 'Reference set' von extradiertem DNS unbegrenzt gespeichert und ohne weiteres zwischen Verbandsstaaten transportiert werden.

36. Homogenität und Beständigkeit einer Sorte können leicht festgestellt werden, indem für eine Anzahl individueller Pflanzen und Generationen RAPD-Profile erstellt werden. Variationstoleranzen ('Abweicher' - 'off-types') der Profile, die von der Vermehrungs- und Bestäubungsweise abhängen, brauchen nicht aufgestellt werden.

### III. Komplementäre Rolle der RAPD-Analyse zu morphologischen und physikalischen Kriterien der Sortenidentifizierung

37. Die RAPD-Analyse kann zwar ein objektives Mittel zur Feststellung der Unterscheidbarkeit von Sorten sein, aber das RAPD-Profil bietet keine beschreibende Information. Eine Beschreibung auf der Grundlage sichtbarer (morphologischer und physikalischer) Merkmale ist sowohl für die Vermarktung als auch für die Minimalisierung versehentlicher Verletzungen von praktischer Bedeutung.

38. Deshalb wird nicht ins Auge gefasst, die Erteilung von Rechten nur auf vergleichende RAPD-Profile zu stützen, sondern die Beschreibungsmerkmale (und möglicherweise die Leistungsdaten) aus den Prüfungsrichtlinien der UPOV sollten die RAPD-Profile für Hinterlegungszwecke ergänzen.

39. Zudem könnte es zum Zweck der Eintragung von Sorten angebracht sein, die Leistungsdaten von Sorten durch RAPD-Profile zu ergänzen.

### IV. Gültigkeit der Verwendung von DNS-Merkmalen als Unterscheidungskriterien im Sinne der Akte von 1991 des Uebereinkommens

40. Artikel 1 Nummer vi, Artikel 7 und Artikel 14 Absatz 5 Buchstabe b des UPOV-Uebereinkommens von 1991 sind für die Erwägung relevant, ob die Anwendung von molekularen Prüfungsverfahren durch die Sortenschutzämter der Verbandsstaaten gültig ist.

41. Artikel 1 Nummer vi enthält eine Definition von "Sorte", für welche erforderlich ist, dass sie eine Sorte ist,:

"- durch die sich aus einem bestimmten Genotyp oder einer bestimmten Kombination von Genotypen ergebende Ausprägung der Merkmale definiert werden kann,

- zumindest durch die Ausprägung eines der erwähnten Merkmale von jeder anderen pflanzlichen Gesamtheit unterschieden werden kann ..."

42. In Dokument TC/27/9 wurden einige Zweifel darüber geäußert, ob DNS-Profile zur Sortenbestimmung im Sinne der Definition von 'Sorte' in Artikel 1 Nummer iv der Akte von 1991 des Übereinkommens verwendet werden können.

43. Die RAPD-Analyse stellt eine einzigartige Kombination von identifizierenden Merkmalen einer Sorte dar; demgegenüber hat ein RAPD-Profil aber keine Beziehung zu dem Aussehen (Beschreibung) oder Leistungspotential dieser Sorte. Ein RAPD ist eine Ausprägung der physikalischen Struktur der polymorphen Abschnitte des DNS-Moleküls und keine bildliche Darstellung des Genotyps.

44. Ein RAPD-Profil ist eine Kombination von Merkmalen, die von den Replikat-Produkten von 'primed' Abschnitten von polymorphem DNS abgeleitet sind. Die Unterscheidbarkeit kann deshalb durch den Vergleich der RAPD-Profile von zwei oder mehr Sorten festgestellt werden.

45. Die Ausprägung selektiver oder 'primed' DNS-Abschnitte, die die DNS-Proflierung ergibt, stellt eine unmittelbare Analogie der morphologischen Merkmale dar, die eine Pflanze ausdrückt.

46. Artikel 7 sieht vor, dass eine Sorte unterscheidbar sein muss. Das Erfordernis, dass die Sorte "deutlich unterscheidbar" ist, kann durch molekulare Methoden, wie die RFLP- oder RAPD-Analyse, erfüllt werden, die einmalige Ausprägungen der Genotypen der Sorten ermitteln.

47. Erfüllen molekulare Techniken das Erfordernis der Unterscheidbarkeit nicht vollständig, so kann ein nationales Sortenschutzamt die molekularen Kriterien durch morphologische Vergleichsuntersuchungen ergänzen, die sich auf die von der UPOV angenommenen DUS-Prüfungsrichtlinien stützen.

48. Kommen die Verbandsstaaten der UPOV überein, dass eine standardisierte Form der RAPD-Analyse und -Bewertung für die Überprüfung der Unterscheidbarkeit verwendet werden kann, dann könnten die nationalen Behörden diese neuen Verfahren im Lichte ihrer individuellen nationalen Prioritäten beliebig anwenden.

49. Artikel 14(5)(b) definiert eine im wesentlichen abgeleitete Sorte als eine Sorte, die die wesentlichen Merkmale der Ursprungsorte, die eine Ausprägung des Genotyps sind, beibehält. Die Fähigkeit der DNS-Techniken, mit grosser Genauigkeit die Ähnlichkeit der Sorten auf der Grundlage des DNS-Moleküls zu identifizieren, macht sie zu der Ermittlung geeignet, ob die Voraussetzungen für die 'wesentliche Ableitung' erfüllt sind.

50. Im Falle einer Streitigkeit bezüglich der wesentlichen Ableitung wäre die Aufgabe der Gerichtshöfe erleichtert, weil die Verwendung der DNS-Techniken die Notwendigkeit des Nachweises betreffend den Ursprung und die Züchtungsgeschichte der betreffenden Sorten erübrigt.

51. Das Uebereinkommen von 1991 des Internationalen Verbands zum Schutz von Pflanzenzüchtungen würde infolgedessen die zuständigen Behörden der Verbandsstaaten in keiner Weise daran hindern, die RAPD-Profilierungstechnik anzuwenden, um die Unterscheidbarkeit einer Sorte zu ermitteln.

V. Empfehlungen

52. Der Technische Ausschuss möge:

a) die RAPD-Profilierung als eine Methode zur Feststellung der Unterscheidbarkeit von Sorten annehmen;

b) dem Rat empfehlen, eine Untergruppe aufzustellen, um die Entwicklung und Annahme der RAPD-Analyse zur Sortencharakterisierung durch die Verbandsstaaten der UPOV zu koordinieren;

c) die RAPD-Profil-Charakterisierung mit den für die Sorteneintragung und den Sortenschutz zuständigen Stellen der Verbandsstaaten koordinieren.

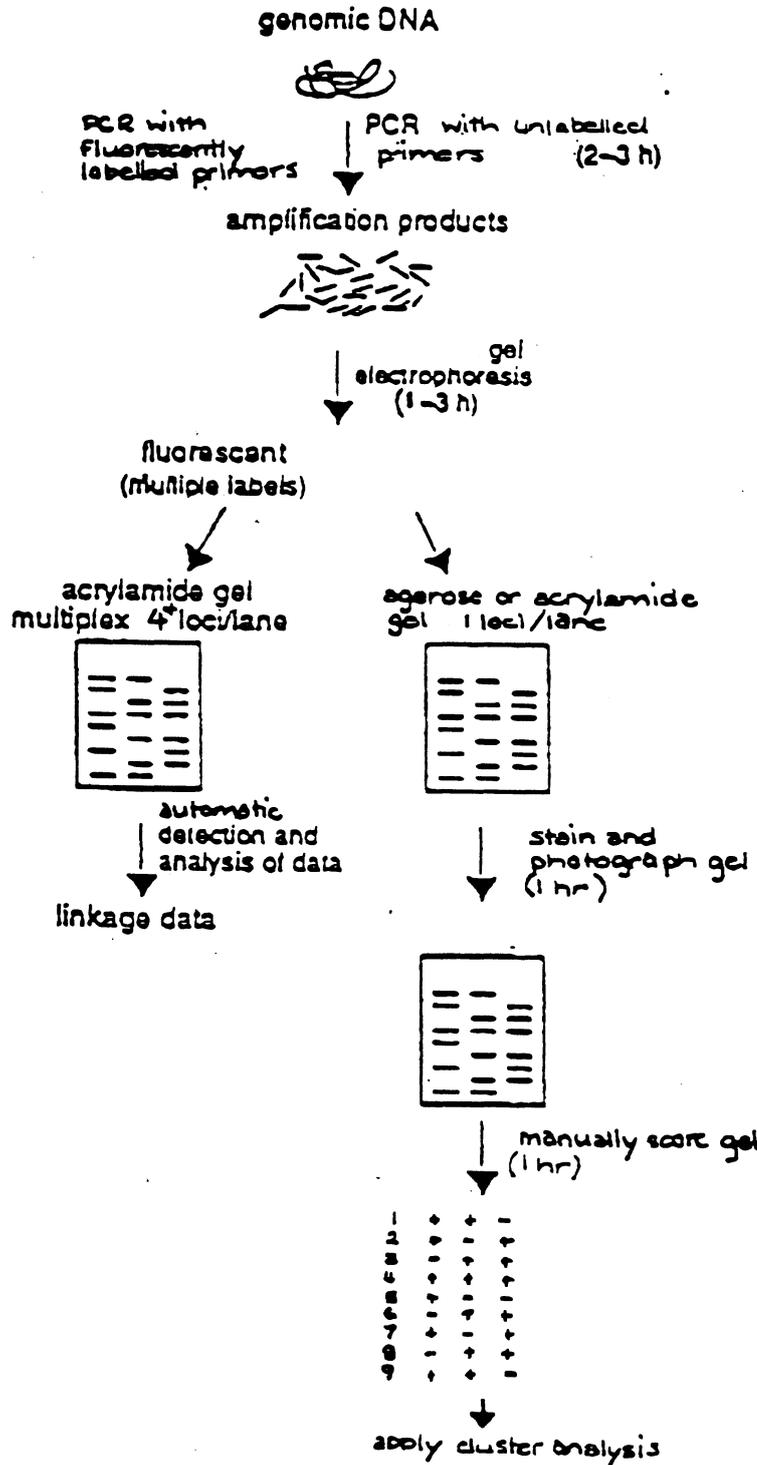
[Drei Anlagen (auf englisch) folgen]

0158

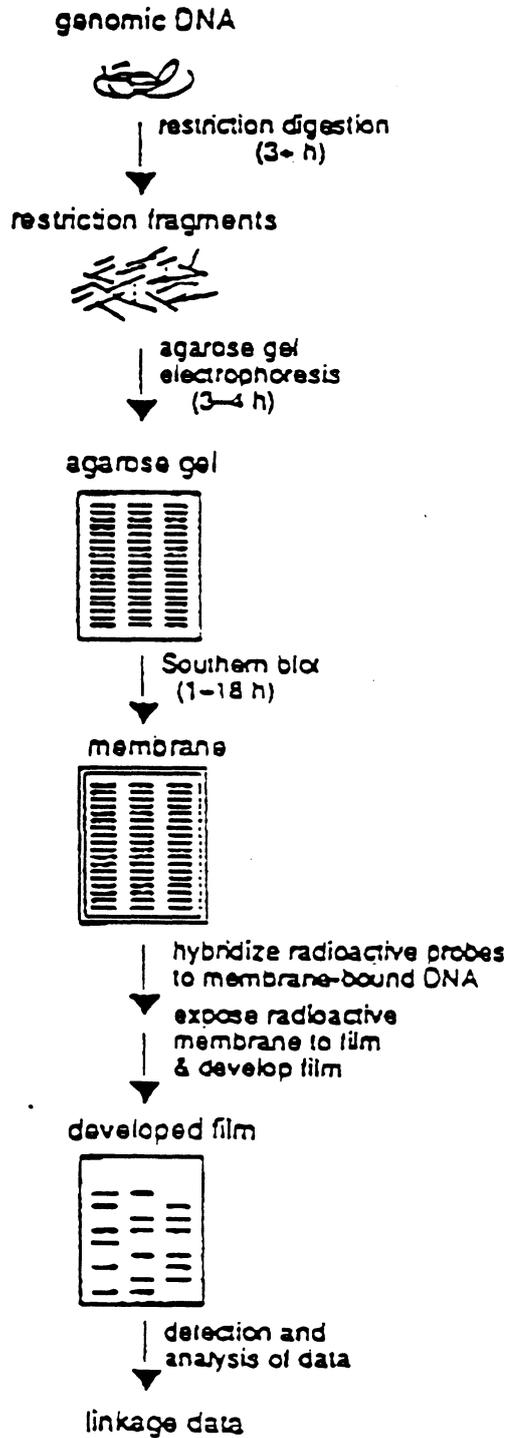
Attachment 1 Flow chart of DNA profiling techniques

**RAPDs -vs- RFLPs**

Random Amplified Polymorphic DNA



Restriction Fragment Length Polymorphism



Total Time = 1 day

Total Time = 1-2 days

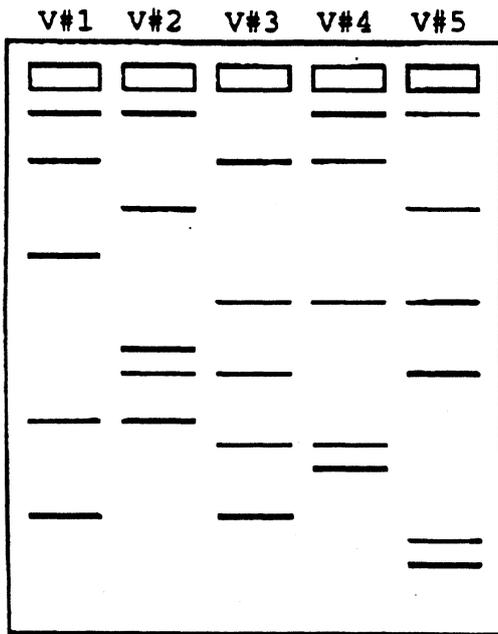
Total Time = 3-6 days

**Attachment 2. RAPD profile examples**

The most appropriate statistical cluster analysis is cladistic analysis. This seeks only to determine similarity or relatedness and not to define ancestry. There are 3 stages in the analysis: scoring the raw data, forming a similarity matrix, and preparing a cladogram

The raw data is the presence or absence of DNA bands (loci) on an electrophoretic gel. The presence of a band is scored as (+) and the absence as (-). The results of all of the primer sets used are combined and then made into a similarity matrix where relatedness is expressed as a percentage. This relatedness can then be expressed in graphical form.

Gel profile of RAPD fragments for primer #1



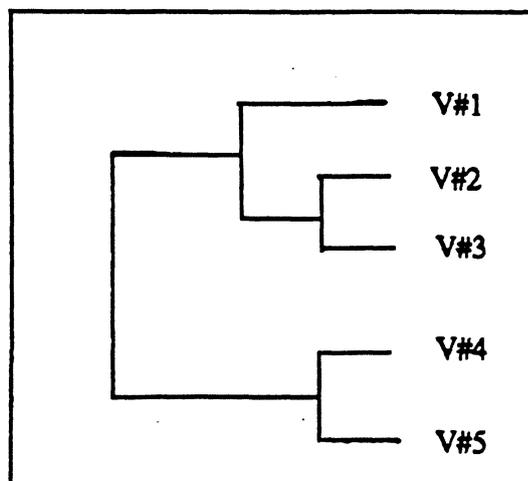
Scoring of Raw Data from Primer #1

Primer #1	V.#1	V.#2	V.#3	V.#4	V.5
Position#1	+	+	-	+	+
Position#2	+	-	+	+	-
Position#3	-	+	-	-	+
Position#4	+	-	-	-	-
Position#5	-	-	+	+	+
Position#6	-	+	-	-	-
Position#7	-	+	+	-	+
Position#8	+	+	-	-	-
Position#9	-	-	+	+	-
Position#10	-	-	-	+	-
Position#11	+	-	+	-	-
Position#12	-	-	-	-	+
Position#13	-	-	-	-	+

Similarity Matrix of Combined Primer Raw Data

	Variety#1	Variety#2	Variety#3	Variety#4	Variety#5
Variety#1	100%				
Variety#2	82%	100%			
Variety#3	46%	55%	100%		
Variety#4	12%	26%	83%	100%	
Variety#5	75%	12%	30%	27%	100%

Cladogram of Similarity Matrix



**Attachment 3 Glossary of Terms**

<b>Alleles</b>	Different forms of a gene
<b>Autoradiography</b>	The visualisation of radioactivity by exposure to an X-ray film
<b>Cloning</b>	Patching a length of DNA into a bacterial plasmid with compatible restriction enzyme sites
<b>Coding</b>	Those areas of the genome which are transcribed into RNA (leading to a protein product)
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid. The carrier of the genetic information in cells composed of 2 complementary chains of nucleotides wound in a double helix; capable of self replication as well as coding for RNA synthesis.
<b>Electrophoresis</b>	The separation by charge of nucleic acid or protein within a gel structure.
<b>Genome</b>	The complete set of chromosomes (DNA), with their associated genes
<b>Hybridisation</b>	Binding of fragments of nucleic acids to compatible regions of the genome
<b>Loci</b>	Defined genomic DNA positions.
<b>Markers</b>	Short fragments of DNA which bind to the genome at specific locations determined by their sequence
<b>mini-satellite DNA</b>	Small repeated units of DNA in the non-coding portions of genomes.
<b>Non-coding</b>	Portions of the genome which do not encode for RNA or protein products.
<b>Nucleotides</b>	The basic unit of nucleic acids. There are 5 types: Guanine Adenosine, Cytosine, Thymine, and Uracil. Thymine is found only in DNA, and is substituted by Uracil in RNA
<b>Oligonucleotide</b>	Lengths of nucleic acids
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction. Oligonucleotide primers are incubated with genomic DNA and allowed to hybridise. They bind to many different loci and then replicate from those points of hybridisation producing varying lengths of DNA depending on how close together 2 of these primers were on opposing DNA strands. The fragments produced are then released by increasing the temperature, and the hybridisation step repeated. This process continues through a number of cycles so that the fragments created are in sufficient quantities to be visualised on an agarose or polyacrylamide gel.
<b>Polymorphism</b>	The presence in a population of 2 or more phenotypically distinct forms of a trait.
<b>Primers</b>	Short fragments of nucleic acids which bind to the genome at specific locations determined by their sequence and act as starting points for nucleic acid replication.
<b>Probes</b>	Fragments of nucleic acids incorporating radioactively, enzymatically or fluorescently labelled nucleotides which bind to the genome at specific locations determined by their sequence allowing the visualisation of these points of hybridisation.
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA
<b>Restriction Enzymes</b>	Enzymes that cleave the DNA double helix at specific nucleotide sequences
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>Sequence</b>	The pattern of nucleic acids in the DNA molecules
<b>Southern Hybridisation</b>	The process of hybridising DNA probes with DNA bound to a membrane support
<b>Thermal Cycling Reaction</b>	see PCR