



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agreed by the Council of UPOV, only documents that have been adopted by the Council of UPOV and that have not been superseded can represent UPOV policies or guidance.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/XXV/9

ORIGINAL: englisch

DATUM: 15. August 1989

INTERNATIONALER VERBAND ZUM SCHUTZ VON PFLANZENZÜCHTUNGEN

GENEVE

TECHNISCHER AUSSCHUSS**Fünfundzwanzigste Tagung
Genf, 5. und 6. Oktober 1989****NEUE METHODEN, TECHNIKEN UND GERÄTE
BEI DER PRUEFUNG VON SORTEN**vom Verbandsbüro vorbereitetes Dokument

1. Als Ergebnis der Erörterungen über neue Methoden, Techniken und Geräte bei der Prüfung von Sorten im Technischen Ausschuss hat das Verbandsbüro der UPOV Dokument TC/XXV/4 ausgearbeitet, das den Technischen Arbeitsgruppen zur Erörterung vorgelegt wurde.

2. Dieses Dokument erklärte kurz die zwei vorzunehmenden Schritte: (i) nachzuforschen und eine Inventur der Arten und neuen Methoden bei der Prüfung in Verbindung mit der Anwendung der obigen Technologien aufzustellen und (ii) deutliche Vorschlagsentwürfe für die Integration der neuen Technologie vorzubereiten.

3. In den Anlagen zu Dokument TC/XXV/4 hat das Verbandsbüro der UPOV die folgenden Informationen wiedergegeben:

Anlage I Eine Liste der Arten für die Verbandsstaaten die etwaige Verwendung von Elektrophorese bei der Prüfung von Sorten auf Unterscheidbarkeit untersuchen. Die eingegangenen Informationen gingen entsprechend der Anfrage des Verbandsbüros in Rundschreiben U 1384 vom 12. Januar 1989 ein.

Anlage II Eine Liste neuer Methoden, die abgesehen von Elektrophorese zur Zeit in den Verbandsstaaten geprüft werden.

Anlage III Eine Liste von Arten, abgesehen von Weizen, Gerste und Hafer, für die Elektrophorese als ein Mittel für die Sortenidentifizierung untersucht wurde. Diese Liste wurde aus Anlage III von Dokument TWA/XVII/9 übernommen.

- Anlage IV Vorschlag für die Integrierung von Elektrophorese und Bildauswertung (ausschliesslich für Weizen) in die Prüfungsrichtlinien für Getreide, der von Sachverständigen vom Vereinigten Königreich für die Tagung der Untergruppe für Gräser im April 1989 vorbereitet wurde (nur Vorschläge von NIAB).
- Anlage V Vorschlag für die Integrierung von Elektrophorese in die Prüfungsrichtlinien für Weidelgras und möglicherweise in andere Prüfungsrichtlinien, der von Sachverständigen vom Vereinigten Königreich erstellt wurde (nur persönlicher Vorschlag des Sachverständigen).
- Anlage VI Bericht über die mit der Verwendung von Elektrophorese bei Poa pratensis L. in den Niederlanden gemachte Erfahrungen.
- Anlage VII Vorschlag für die Aufnahme der Bildauswertungstechnik in die DHS-Prüfung für Zwiebeln, der von Sachverständigen vom Vereinigten Königreich vorbereitet wurde (nur Vorschläge von NIAB).
- Anlage VIII Einführung in die verschiedenen Anwendungen von Elektrophorese im Zusammenhang mit der Saatgutregistrierung und Saatgutzertifizierung im biochemischen Labor von G.E.V.E.S., wie auf der letzten Tagung der Technischen Arbeitsgruppe für landwirtschaftliche Arten gegeben (und aus Anlage IV von Dokument TWA/XVIII/9 übernommen).
- Anlage IX Auszug aus dem Bericht über die letzte Tagung der Technischen Arbeitsgruppe für landwirtschaftliche Arten, der Elektrophorese behandelt (und aus Dokument TWA/XVII/9, Absätze 21 bis 30 übernommen wurde).

4. Anlage I zu diesem Dokument enthält auf den neusten Stand gebrachte Informationen von Südafrika.

5. Die Ergebnisse der Erörterungen in den einzelnen Technischen Arbeitsgruppen sind in den folgenden Dokumenten wiedergegeben:

TWA/XVIII/9 Prov., Absätze 8 bis 14
TWC/VII/20 Prov., Absätze 29 bis 32
TWO/XXII/8 Prov., Absätze 20 und 21
TWP/XXII/19 Prov., Absätze 17 bis 22.

Sie können wie folgt zusammengefasst werden:

Elektrophorese

Allgemeine Erörterungen

6. Die TWA nahm Kenntnis von den drei möglichen in Dokument TWA/XVIII/7 wiedergegebenen Verwendungen der Elektrophorese: als Mittel zur Sortenidentifizierung, als Mittel zur Entscheidung über Unterscheidbarkeit beizutragen und als Mittel die Entscheidung über Unterscheidbarkeit zu fällen. Sie nahm weiter Kenntnis von Anlage V des Dokumentes TC/XXV/4 über die Integration der Elektrophorese in die UPOV Prüfungsrichtlinien mit Vorschlägen für Weidelgras. Sie betonte, dass es erforderlich sei, standardisierte Methoden und Merkmale anzunehmen, über standardisierte Trennung und Mindestabstände Uebereinstimmung zu erzielen, multilaterale Verfahren für die Prüfung der Ergebnisse aufzustellen, Homogenitätskriterien für Elektrophoresemerkmale zu erwägen und authentifizierte Datenbasen für die Sammlung allgemeiner Kenntnisse zu erstellen. Sie stimmte der Empfehlung zu,

dass sie sich am Anfang auf die Stärkegel-Elektrophorese der vier Isoenzym-systeme Phosphoglucoisomerase (PGI), Säure-Phosphatase (ACP), Isocytase-dehydrogenase (IDH), und Glutaminoxalotransaminase (GOT), zusammen mit PAGE in Saatgutglobulinen beschränken würde. Begonnen werden sollte jedoch mit PGI. Um die begrenzte Zeit am bestens zu verwenden, sollten die Länder sich jedoch in erster Linie auf Getreide konzentrieren.

7. Die TWV nahm Kenntniss von Dokument TWV/XXII/10, das eine Inventur der Methoden, die bis jetzt in den Verbandsstaaten untersucht wurden, enthielt. Sie erörterte die Nützlichkeit, das Erfordernis und die möglichen Konsequenzen der Einführung der Elektrophoresemerkmale als Unterscheidungsmerkmale für Gemüsearten. Gegenwärtig werde die Methode nur untersucht und noch nicht zur Unterscheidbarkeit verwendet. Einige Sachverständige waren besorgt über die möglichen Konsequenzen der Zulassung zu kleiner Unterschieden (ein Unterschied in einem Band) als ausreichende Unterschiede für eine geänderte Sorte im Hinblick auf die Unterminierung des Schutzes einer bestehenden Sorte. Gegenwärtig werde ebenfalls von einigen Sachverständigen keine Notwendigkeit gesehen, sich auf die neuen Methoden zu stürzen, da auf dem Gebiet der Gemüsearten gegenwärtig die Erstellung der Unterscheidbarkeit mit ausreichenden traditionellen Merkmalen keinerlei Probleme aufgewiesen haben. Es wurde ebenfalls betont, dass es keine Korrelation gäbe zwischen einigen Elektrophoreseebändern und einigen morphologischen Aenderungen oder Verbesserungen der Sorte. Anmelder sollten wirklich gebeten werden anzugeben, wo der Vorteil ihrer Kandidatensorte gegenüber einer anderen bereits bestehenden Sorte, die nur geringfügig von dieser abweichen würde, läge.

8. Die Gemüsezüchter, die den Erörterungen der TWV folgten, waren noch nicht in der Lage anzugeben, ob sie die Einführung der Elektrophorese für Unterscheidbarkeitszwecke bei Gemüsesorten begrüßen würden oder nicht, da sie gegenwärtig diese neuen Methoden selber nicht verwendeten.

9. Die TWO tauschte Erfahrungen über die Möglichkeiten der neuen Technologie bei Zierpflanzenarten aus. Gemäss der Erfahrung der Sachverständigen wurden nur sehr geringe Möglichkeiten gesehen. Um die Situation jedoch klarzustellen, werden die Sachverständige der Niederlande eine Liste der allgemeinen Bemerkungen und alle Argumenten die für oder gegen die Anwendung der Elektrophorese, der Bildauswertungsanalysemethode und der DNA-Probs für Unterscheidbarkeitszwecke zur Verteilung an die Arbeitsgruppe für weitere Ergänzungen oder Bemerkungen erstellen.

Anwendung auf Getreide

10. Die TWA nahm zustimmend Kenntnis von Dokument TWA/XVIII/5, das die wichtigsten Punkte enthielt, auf die man sich hinsichtlich Elektrophorese auf der Sitzung der Untergruppe über Getreide, die in Hannover, Bundesrepublik Deutschland, im April 1989 stattgefunden hatte, geeinigt hatte. Diese Untergruppe empfiehlt, Merkmale, die mit Hilfe der Elektrophorese erreicht worden sind, als zusätzliche Merkmale in die obengenannten Prüfungsrichtlinien für Weizen, Gerste und Hafer aufzunehmen. Diese Merkmale würden die Möglichkeit eröffnen, (a) die Prüfung auf Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit auf nur ein Jahr zu verringern und (b) die Anzahl der Merkmale in den gegenwärtigen Prüfungsrichtlinien zu reduzieren. Die nächste Sitzung der Untergruppe ist für den 14. Mai 1990 in Wageningen, Niederlande, am Tag vor der nächsten Tagung der TWA vorgesehen. Es ist geplant, ebenfalls Sachverständige der Berufsorganisationen zu diesen Erörterungen über den Einschluss der Elektrophoresemerkmale in die Prüfungsrichtlinien für Weizen, Gerste und Hafer einzuladen.

11. Merkmale, die mit Hilfe der Elektrophorese erzielt worden sind, sollten in die Prüfungsrichtlinien für Weizen, Gerste und Hafer als neue Merkmale ohne Sternchen aufgenommen werden. Jedes Band sollte hierbei als ein getrenntes Merkmal aufgefasst werden. Jedoch sollten nur diejenigen Bänder akzeptiert werden, die die normalen Voraussetzungen für die Annahme jedweder anderer neuer Merkmale erfüllten, und für die ein deutliches Vorhandensein oder ein deutliches Fehlen beobachtet werden könnte. Die Proteine und die Methoden, die zugelassen werden sollten, sollten folgende sein:

<u>Arten</u>	<u>Proteine</u>	<u>Methoden</u>
Gerste	B, C and D Hordeine	vorzugsweise SDS-PAGE zweite Wahl: PAGE pH 3,1
Weizen	Gliadine, Gluteline	PAGE pH 3,1, SDS-PAGE
Hafer	Prolamine	PAGE pH 3,1

12. Weiterreichende detaillierte Informationen sind in den Anlagen II und III [nur in Englisch] zu diesem Dokument wiedergegeben, das folgendes enthält:

Anlage II: Eine Zusammenfassung der Empfehlungen für den Einschluss der Elektrophorese in die Prüfungsrichtlinien für Weizen, Gerste und Hafer, einschliesslich von Erwägungen darüber, wie Gel-Interpretationssysteme harmonisiert werden können;

Anlage III: das Protokoll für die ISTA Säure-Polyacrylamidgelelektrophorese-Methode, vorbereitet von Dr. Cooke (GB).

13. Die TWA entschied, dass für den Einschluss der Elektrophorese-Merkmale der normale Homogenitätsstandard von 3 in 100 angewandt werden sollte, wenn ein solches Merkmal als das einzige Unterscheidungsmerkmal für die betreffende Kandidatensorte verwendet würde. Wenn Elektrophorese-Merkmale für die Unterscheidbarkeit einer gegebenen Kandidatensorte nicht erforderlich seien, sollte für eine Uebergangsperiode die doppelte Toleranz (6 in 100) anwendbar sein.

Anwendung auf Mais

14. Die TWA nahm Kenntnis davon, dass in Frankreich Studien gemacht würden, um die Möglichkeit des Einschlusses des Enzym polymorphismus von Mais in die Unterscheidbarkeitsprüfungen für neue Sorten zu untersuchen sowie die unterschiedliche Wichtung der Merkmale gemäss der Informationen über ihren genetischen Hintergrund.

Anwendung auf Gräser

15. Die TWA nahm Kenntnis von Anlage VI des Dokuments TC/XXV/4 über die "Erfahrungen bei der Verwendung der Elektrophorese bei Poa pratensis L." Sie hob dabei die Methode der Isoelektrischen Fokusing bei Saatgut und die PAGE-Methode bei Jungpflanzen hervor. Die gesamte Studie sei noch im experimentellen Stadium und würde fortgesetzt. Vermischungen beim Saatgut bildeten noch Probleme, für Jungpflanzen müsse ein gutes System für die Probenahme entwickelt werden.

Anwendung auf Gemüsearten (Spargel, Erbsen, Wassermelone)

16. Die TWV kam schliesslich überein, einige exakte Prüfungen vorzunehmen, um mehr Erfahrung über die mögliche Verwendung der Elektrophorese zu erhalten. Sie wählte Spargel, Erbsen und Wassermelone als Arten für diese Studie aus. Dr. Habben (DE) würde der Studie über Spargel vorstehen, Herr Brand (FR) derjenigen über Erbsen und Herr Tabata (JP) (oder ein anderer Sachverständiger von Japan) derjenigen über Wassermelone. Das Verbandsbüro der UPOV hat ein Rundschreiben (U 1473) vorbereitet, in dem alle Verbandstaaten aufgefordert werden, an dieser Studie teilzunehmen und mehr Einzelheiten hinsichtlich jeder dieser Arten beizusteuern.

Handhabung der Daten durch Computer

17. Die TWC nahm Kenntnis von Dokument TWC/VII/2 über die Analyse von Elektrophoresedaten mit Hilfe des Computers, und betonte, dass die Kodierung der Bänder harmonisiert werden sollte, dass sogar die Chemikalien möglicherweise standardisiert werden müssten, dass ein einzelner Unterschied für Unterscheidbarkeitszwecke nicht ausreichend sei, dass die Entscheidung über Mindestabstände abhängig sei von jedem Merkmal und von der Kenntnis über seine Vererbarkeit, ob polygenetisch oder oligogenetisch, und dass Datenbasen harmonisiert werden sollten und man sich über die Mindestfelder, die in sie eingeschlossen werden sollten, einigen sollte.

18. Die TWC nahm Kenntnis von Dokument TWC/VII/15 über das Computerprogramm für die Speicherung und Analyse von Elektrophoresedaten im Bundessortenamt der Bundesrepublik Deutschland. Sie betonte die drei Stufen, die zu dem Bandmuster führten, die Identifizierung und die Kodifizierung des Musters, die Datenstruktur und die Programmfunktionen. Für die weitere Arbeit seien mehr Kenntnisse erforderlich, die Bänder müssten identifiziert werden und man müsste sich auch auf eine harmonisierte Kodifizierung einigen.

19. In der TWC stellte sich die Frage, ob die Behandlung von Elektrophoresedaten ausserhalb oder als Teil der Behandlung von Daten im allgemeinen behandelt werden sollte, ob ein kleines ad hoc-System erstellt werden sollte, das auf den gegenwärtigen Erfahrungen aufbauen könnte, oder ob eine globale Lösung abgewartet werden sollte. Es wurde schliesslich entschieden, eine kleine Gruppe unter der Führung von Herrn Grégoire (FR), und mit Frau Campbell (GB), Dr. Laidig (DE) und Herrn Van der Heijden (NL) zu bilden, die für die nächste Tagung der TWC einen Entwurf für Datenbasen für Elektrophoresedaten erstellen würde, wobei sie berücksichtigen würde, dass der Entwurf eine globale Lösung nicht ausschliessen sollte.

Methoden ausserhalb der Elektrophorese

20. Die TWA einigte sich darauf, dass es wegen der Einführung der Elektrophorese und der ausreichenden Anzahl morphologischer Merkmale gegenwärtig kein Erfordernis für die Einführung der Bildauswertungsanalyse bei Getreide gebe. Es sei nötig, mehr Kenntnisse zu gewinnen, bevor eine erneute Erörterung über die Möglichkeiten ihrer Einführung stattfindet.

21. Die TWV nahm Kenntnis von Dokument TWV/XXII/7, das in seinem ersten Teil die Ergebnisse der Anwendung der Bildauswertungsanalyse auf einige Zwiebelarten beinhaltet. Sie betonte, dass bis jetzt die Methode nur verwendet würde, um bereits in die Prüfungsrichtlinien eingeschlossene Merkmale zu erfassen. Jedoch könnten in Zukunft ebenfalls einige neue Merkmale vorgeschlagen werden. Die Arbeitsgruppe wird auf ihrer nächsten Tagung einen weiteren Bericht mit weiteren Ergebnissen erhalten.

22. Die TWC nahm ins besondere Kenntnis von den Anlagen IV und VII des Dokuments TC/XXV/4. Sie nahm weiterhin Kenntnis von dem Bericht der Niederlande über neue kürzlich angeschafte Computer und kommerzielle Programme für die Bildauswertungsanalyse (siehe ebenfalls Anlage IV von TWC/VII/20). Herr Bar-Tel (IL) berichtete, dass die Studien über die Verwendung der Bildauswertungsanalyse bei Nelken in seinem Land eingestellt worden sein, da sie im Vergleich mit ihren möglichen Anwendungen als zu teuer angesehen würden. Änderungen seien schwierig von den Sachverständigen selbst vorzunehmen und würden daher jedesmal bezahlt werden müssen.

23. Die TWC nahm davon Kenntnis, dass die ISTA plant, ihr viertes internationales Symposium über Sortenidentifizierung in Ames, Iowa, Vereinigte Staaten, vom 12. bis 18. August 1990 abzuhalten, und während dieses Symposiums die Verwendung neuer Methoden bei der Prüfung von Sorten zu erörtern.

[Drei Anlagen folgen]

Schreiben
von Herrn D.C. Joubert, Direktor
Abteilung für Landwirtschaftliche Oekonomie und Vermarktung
vom 15. Juni 1989
an den Stellvertretenden Generalsekretär

Betrifft: Technischer Ausschuss: Elektrophorese-Techniken

Wir möchten das Dokument TC/XXV/4 durch die folgenden Informationen ergänzen:

1. Südafrika führt augenblicklich Studien zur Identifizierung von Sonnenblumen durch, unter Verwendung von Lagerungsproteinen im Saatgut, und der SDS-PAGE und/oder PAGE, pH 6 bis 8,9 Methode.
2. Prüfungen sind geplant oder werden bereits in kleinem Rahmen zur Identifizierung von Sojabohnen, Kohl, Bohnen und Sorghum unter Verwendung der obengenannten Techniken angewendet.

[Anlage II folgt]

DIE VERWENDUNG DER ELEKTROPHORESE ZUR UNTERSCHIEDBARKEITSPRUEFUNG
BEI WEIZEN, GERSTE UND HAFER

Dieses Papier fasst die wichtigsten Empfehlungen der Technischen Arbeitsgruppe für Landwirtschaftliche Arten hinsichtlich dieses Punktes zusammen, die sich aus der in Belfast im Juni 1989 abgehaltenen Sitzung ergeben. Die Technische Arbeitsgruppe wurde ihrerseits durch eine besondere Untergruppe für Getreide, die im April 1989 in Hannover getagt hatte, beraten.

1. Elektrophorese sollte in die revidierten Prüfungsrichtlinien für Weizen, Gerste und Hafer als Merkmal ohne Sternchen eingeführt werden.
2. Die Proteine, die geprüft werden sollten, und die Methoden, die verwendet werden sollten, sind die folgenden:

Für Weizen - entweder Säure-PAGE von Gliadinen
oder SDS-PAGE von Glutelinen (Glutelinuntereinheiten)

Für Gerste - entweder SDS-PAGE
oder Säure-PAGE von B, C und D-Hordeinen

Für Hafer - Säure-PAGE von Aveninen (Prolaminen).

Als Säure-PAGE Methode sollte die Methode angewandt werden, die von der Internationalen Saatgutprüfungsvereinigung (ISTA) als Standardreferenzmethode angenommen worden ist (beigefügt [Anlage III]; siehe ebenfalls *Seed Science & Technology* 15, 555-575, 1987). Die Einzelheiten für die SDS-PAGE Methode müssen noch festgelegt werden (Sachverständige aus Frankreich haben zugestimmt, einen Entwurf zur Prüfung durch die anderen Verbandsstaaten vorzubereiten).

3. Die Auslegung der Proteinebandmuster sollte gemäss der Methode erfolgen, die von Sachverständigen aus Frankreich, der Bundesrepublik Deutschland, dem Vereinigten Königreich, den Niederlanden und Spanien ausgearbeitet wird. Gegenwärtig haben die Verbandsstaaten Listen von Weizen-, Gerste- und Hafersorten ausgetauscht. Die Bundesrepublik Deutschland hat Saatgut der Referenzsorten, die am Bundessortenamt zur Bestimmung der Weizen- und Gerste-Bandmuster verwandt werden, an die anderen Länder verschickt. Das Vereinigte Königreich hat das gleiche für Hafer, wie an der NIAB verwendet, getan. Die an der Prüfung beteiligten Verbandsstaaten müssen die Referenzsorten analysieren, um festzustellen, ob sie alle Bänder oder Gruppen von Bändern, die gegenwärtig in ihren eigenen Sammlungen vorhanden sind, enthalten. Einzelheiten der Methode für die Klassifizierung und die Referenzsorten werden ausgetauscht. Die Prüfung wird Ende September beendet sein. Die Ziele dieser gemeinsamen Prüfung sind:
 - (i) zu versuchen, ein harmonisiertes System für die Interpretation und Bezeichnung der Proteinebänder der drei Arten aufzustellen;

Anlage II, Seite 2

- (ii) sicherzustellen, dass das harmonisierte System alle erforderlichen Bandmuster beinhaltet, die erforderlich sind um alle gegenwärtig in den einzelnen Verbandsstaaten berücksichtigten Sorten einzuschließen;
- (iii) eine Sammlung von Referenzsorten aufzustellen, die alle geeigneten Proteinenbänder oder Bändergruppen enthält.

3.1 Beispiel - Die Harmonisierung der Interpretationssysteme für Gerstesorten.

Bei Gerste können Hordeinproteine elektrophoretisch in drei unterschiedliche Gruppen getrennt werden, die, in steigender Reihenfolge ihrer Mobilität, die D-, C- und B-Hordeine genannt werden. Die Gene für diese Proteingruppen können in drei getrennten, jedoch mit einander verbunden, Loci gefunden werden. Die unterschiedlichen Elektrophoresemuster der D-, C- und B-Hordeine können so als Vertreter von Allelen dieser Loci angesehen werden. In den Labors verschiedener Länder wurden unterschiedliche Systeme für die Nomenklatur dieser Bandmuster (Allele) aufgestellt und angenommen. Ein Beispiel hierfür ist die Sorte Igrí. Unter dem in der NIAB (Vereinigtes Königreich) verwendeten System ist angegeben, dass sie die Hordeinkomposition 2,7 beinhaltet, das bedeutet dass die D- und C-Hordeinkompositionen charakteristisch für die Gruppe 2 (willkürlich so benannt) ist, während die B-Hordeinkompositionen charakteristisch für die Gruppe 7 ist. Andere Labore haben auf der gleichen Grundlage die Hordeine von Igrí bezeichnet als C2, D6, D4, NC8B8, oder Hor 1 Fr/Hor 2 So. Das Bundessortenamt (Bundesrepublik Deutschland) hat ein etwas unterschiedliches System aufgestellt, das die unterschiedlichen Bänder der D-, C- und B-Hordeine entweder als vorhanden (9) oder fehlend (1) beschreibt, jedoch auch das Vorhandensein von Bändergruppen anerkennt. So wird die Sorte Igrí durch die Formel beschrieben D 1191 C 9119191119/1191 B 119111111. Das Problem ist daher überwiegend ein Problem der Nomenklatur (siehe Schaubild unten). Durch Austausch von Informationen über die Klassifizierungssysteme und Sorten, sollten die Verbandsstaaten in der Lage sein, Referenzsorten aufzustellen, die die besonderen Muster beschreiben. Die Namen, die diesen Mustern gegeben werden, würden in Erörterungen entschieden werden müssen. Es sollte relativ einfach sein, eine Tabelle aufzustellen, die die unterschiedlichen verwendeten Namen vergleicht und die Muster bekannter Sorten beschreibt. Die Harmonisierung könnte zum Beispiel die Form eines akzeptierten Standardreferenzsystems zur Verwendung beim Austausch von Informationen annehmen, während sie den Verbandsstaaten weiterhin erlaubt, für interne Zwecke ihr eigenes System zu verwenden. Die Muster der Hordeine könnten, sofern dies erforderlich ist, durch die vom Bundessortenamt aufgestellte Formel beschrieben werden. Jegliche neue Muster von D-, C- oder B-Hordeinen würden nach Uebereinstimmung anerkannt werden, und ihre Muster würden beschrieben und eine Standardreferenzsorte würde ausgewählt werden.

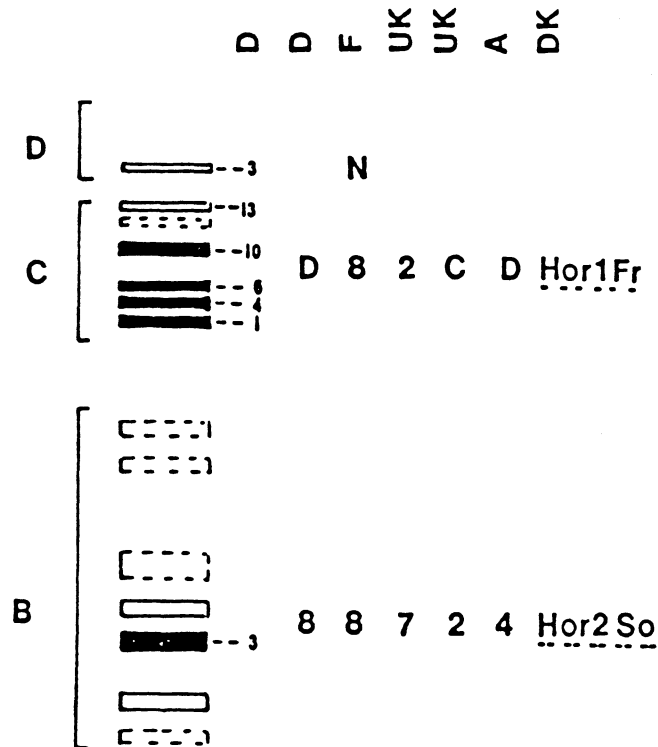


Abbildung - Beispiele für unterschiedliche Systeme zur Bezeichnung der Hordeinproteine in der Gerstensorte Igri.

In Princip kann das gleiche System für Gerste- und Weizengliadine aufgestellt werden. Erneut sollte auch hier die ausgetauschte Liste der Sorten und der Nomenklatur/Klassifizierungssysteme eine Harmonisierung erleichtern.

4. Eine quantitative Erfassung der Intensität der Proteinenbänder würde nicht vorgenommen, das bedeutet sie werden beschrieben als entweder fehlend oder vorhanden.
5. Das Unterscheidbarkeitskriterium bestände in einem deutlichen und wiederholbaren Unterschied in Bandmustern von zwei Sorten, die gemäss der angenommenen oben beschriebenen (siehe 3 oben) und noch zu harmonisierenden Nomenklaturmethode beschrieben würde.
6. Die Anzahl individueller Samen, die geprüft werden müssten, würde für einen Hinweis auf die Unterscheidbarkeit zwischen 10 und 15 liegen, und für die Prüfung auf Homogenität zwischen 80 und 100.

7. Der Standard für Homogenitätstoleranz würde anfänglich das doppelte des in Dokument TG/1/2 angegebenen betragen, das heisst 4 in 80 (oder 6 in 100) sofern Elektrophorese nicht das einzige Kriterium zur Erstellung der Unterscheidbarkeit darstellt, im letzten Falle würde der Standard 2 in 80 (3 in 100) betragen.
8. Es würde keine Verpflichtung bestehen, bereits bestehenden Sorten innerhalb der obigen Toleranzen homogen zu machen.
9. Gegenwärtig enthalten einige vorhandene Sorten zwei oder mehrere elektrophoretische Linien oder Biotypen, obwohl sie hinsichtlich der anderen Merkmale ausreichende Homogenität aufweisen. Während solche Sorten mit Biotypen auf der nationalen Liste stehen, würden Kandidatensorten mit allen elektrophoretischen Linien verglichen werden. Unterscheidbarkeit würde nicht ausreichend sein, wenn eine Kandidatensorte nur gegenüber einer Linie einer vorhandenen Sorte unterschiedlich wäre.

[Anlage III folgt]

ISTA STANDARD REFERENCE METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF VARIETIES OF WHEAT AND BARLEY BY ACID POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (PAGE)

1. Principle

The alcohol-soluble proteins (gliadins from wheat, hordeins from barley) are extracted from seeds and separated by PAGE at pH 3.2. The pattern of protein bands produced (electrophoregram) is related to genetic constitution and can be considered as a 'fingerprint' of a variety. The 'fingerprints' can be used to identify unknown samples and mixtures, by single seed analysis.

2. Apparatus and Equipment

2.1 The Pharmacia GE-2/4 electrophoresis apparatus and EPS 400/500 power supply have been successfully used, but any suitable vertical electrophoresis system should give comparable results.

2.2 Chemicals

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

Acrylamide ('specially purified for electrophoresis')

Bisacrylamide ('specially purified for electrophoresis')

Urea

Glacial acetic acid

Glycine

Ferrous sulphate

Ascorbic acid

Hydrogen peroxide (or ammonium persulphate and TEMED)

Monothioglycerol (or 2-mercaptoethanol)

Pyronine G (or methyl green)

Trichloroacetic acid

Ethanol

2-chloroethanol

PAGE Blue G-90 (or PAGE Blue 83) (or any similar reagent equivalent to the 'Coomassie Brilliant Blue' series of dyes).

2.3 Solutions

2.3.1 Extraction solution - wheat: pyronine G (or methyl green) (0.05% w/v) in 2-chloroethanol (25% v/v) (keep cold)

- barley: pyronine G (or methyl green) (0.05% w/v) in 2-chloroethanol (20% v/v) containing urea (18% w/v) and monothioglycerol (or 2-mercaptoethanol) (1% v/v) (keep cold or prepare fresh)

2.3.2 Tank buffer solution: glacial acetic acid (4ml) and glycine (0.4g), made up to 1l with water; keep cold.

2.3.3 Gel buffer solution: glacial acetic acid (20ml) and glycine (1.0g), made up to 1l with water; keep cold.

2.3.4 Staining solutions: (1) trichloroacetic acid (100g) in 1l of water, (2) PAGE Blue G-90 (or PAGE Blue 83) (1g) in ethanol (100ml).

3. Procedure

3.1 Extraction

Single seeds are crushed with pliers or similar suitable instrument and transferred to 1.5ml polypropylene centrifuge tubes. Extraction solution (2.3.1) (0.2ml for wheat, 0.3ml for barley) is added, the contents of the tubes are thoroughly mixed and the tubes are allowed to stand overnight at room temperature. The tubes are centrifuged at 18000xg and the supernatants used for electrophoresis.

3.2 Preparation of the gel

Clean and dry gel cassettes are assembled, according to the design of the equipment. Treating the glass plates with a silicon spray prior to assembly can facilitate subsequent removal of the gel. Alternatively, the gel cassettes can incorporate a plastic backing sheet (eg 'Gel Bond PAG', FMC Corporation). This supports the gel during subsequent operations. The volume of gel mixture required will vary depending on the equipment used. To make 100ml of gel medium, gel buffer (2.3.3) (approx. 60ml) is taken and the following added - acrylamide (10g), bisacrylamide (0.4g), urea (6g), ascorbic acid (0.1g), ferrous sulphate (0.005g). The solution is stirred and made up to 100ml with gel buffer solution. Freshly prepared 0.6% (v/v) hydrogen peroxide solution (0.35ml per 100ml of gel medium) is added, mixed quickly and the gel poured. Note that the gel mixture can be cooled to near freezing prior to the addition of the peroxide to slow down the rate of polymerisation, which should be complete in 5-10 minutes. An acrylic 'comb' is placed in the top of the cassette, to make wells in the gel. The gel mixture should over-fill the cassette, or by over-layered with water, to ensure satisfactory polymerisation of the upper surface.

Note that as an alternative to the hydrogen peroxide catalyst, it is possible to use ammonium persulphate (0.1ml of 10% (w/v) solution, freshly prepared) and TEMED (0.3ml, full strength) added to the gel mixture prior to pouring the gel.

3.3 Electrophoresis

The acrylic comb is carefully removed from the gel and the sample wells washed with tank buffer. The electrophoresis tank is filled with an appropriate volume of tank buffer (2.3.2) (depending on the equipment used). Samples (10-20µl of clarified supernatant) are loaded into the wells using a syringe and the gel placed in the tank, ensuring that the sample wells are completely filled. Electrophoresis is carried out at 500V (constant voltage) for twice the time taken for the pyronine G marker dye to leave the gel, or three times if methyl green is used as a tracking dye. Note that the anode (positive electrode) must be at the top of gel. Water or other coolant should be circulated through the buffer tank to maintain the temperature at 15-20°C.

3.4 Fixing and staining

At the end of the electrophoresis, the power is switched off. The gel cassette is removed from the tank, opened and the gel placed in a plastic box containing 5-10ml of 1% PAGE G90 (or PAGE Blue 83) in 200ml of 10% trichloroacetic acid (2.3.4). The box should be agitated gently. Staining is complete in 1-2 days and de-staining is not usually needed. Precipitated stain should be carefully scraped from the surface of the gel. The gel is washed in water to enhance the stain and can then be examined or photographed. Any blue background in the gel is removed by washing in 10% (w/v) trichloroacetic acid. Gels can be stored in sealed polythene bags at 4°C for many months without deterioration.

[Ende der Anlage III
und des Dokuments]