



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agreed by the Council of UPOV, only documents that have been adopted by the Council of UPOV and that have not been superseded can represent UPOV policies or guidance.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

UNION INTERNATIONALE POUR LA PROTECTION DES OBTENTIONS VÉGÉTALES

GENÈVE

COMITE TECHNIQUE

Vingt-cinquième session
Genève, 5 et 6 octobre 1989

METHODES, TECHNIQUES ET MATERIEL NOUVEAUX
POUR L'EXAMEN DES VARIETES

Document établi par le Bureau de l'UPOV

1. En 1988, plusieurs groupes de travail techniques ont examiné la question du recours éventuel à des méthodes, techniques et matériel nouveaux pour l'examen des variétés aux fins de la protection des obtentions végétales.

2. A la suite de la proposition présentée visant à créer un nouveau groupe de travail technique sur les techniques nouvelles, qui étudierait la question précitée, le Comité technique et le Conseil de l'UPOV se sont prononcés contre la création de ce nouveau groupe de travail et sont convenus que les travaux consacrés à l'utilisation des nouvelles techniques pour l'examen des variétés devraient être intensifiés et menés sur une base ad hoc.

3. Dans un premier temps, le Comité technique a pris les deux décisions ci-après :

a) Il a invité les groupes de travail techniques à dresser un inventaire des espèces et des méthodes pour lesquelles l'application des nouvelles techniques précitées fait l'objet de recherches au niveau national dans chacun des Etats membres. En outre, ils devraient examiner et tenter de fournir une réponse commune à la question de savoir si les caractères recensés au moyen de ces méthodes pourraient ou devraient remplacer certains caractères moins importants figurant dans les principes directeurs d'examen de l'UPOV en vigueur ou si ces caractères devraient seulement être utilisés de la même manière que tout autre caractère complémentaire. A cet égard, une attention particulière devrait être accordée à la question de l'homogénéité des nouveaux caractères.

b) Des experts devraient élaborer, pour un certain nombre d'espèces, des propositions clairement formulées sur la façon d'intégrer d'une manière très efficace et rentable les nouvelles techniques (pour l'instant, électrophorèse et analyse d'images) dans les principes directeurs d'examen de l'UPOV en vigueur pour les espèces considérées. Ces propositions devraient être examinées au cours des prochaines sessions des groupes de travail techniques et de

leurs sous-groupes. Les groupes de travail techniques devraient élaborer des propositions finales en vue de la prochaine session du comité. Les espèces et les Etats membres retenus en vue de l'élaboration des propositions précitées sont les suivants :

France	Maïs, pois	Electrophorèse
Pays-Bas	Pâturin des prés	Electrophorèse
Afrique du Sud	Brassica	Electrophorèse
Royaume-Uni	Blé, orge, avoine, ray-grass	Electrophorèse
France	Oeillet	Analyse d'images
Royaume-Uni	Blé, oignon	Analyse d'images

4. Le présent document contient, dans ses annexes, les renseignements reçus, sur sa demande, par le Bureau de l'UPOV en ce qui concerne les points visés au paragraphe 3.a) et b), ainsi que d'autres indications fournies pendant les dernières sessions des groupes de travail techniques et considérées comme une contribution utile au débat.

5. Des renseignements supplémentaires communiqués par les Etats membres et les groupes de travail techniques ainsi que le point de vue et les propositions finales des groupes de travail techniques sur la façon dont les caractères précités devraient être utilisés, feront l'objet d'un autre document.

6. On trouvera ci-dessous la liste des annexes du présent document :

Annexe I* A list of species for which member States study the possible use of electrophoresis in the examination of varieties for distinctness: Information received in compliance with the request of the Office of UPOV made in Circular U 1384 of January 12, 1989 (Liste des espèces pour lesquelles les Etats membres étudient la possibilité d'utiliser l'électrophorèse pour examiner les caractères distinctifs des variétés : renseignements reçus en réponse à la demande du Bureau de l'UPOV (circulaire U 1384 du 12 janvier 1989)).

Annexe II* A list of new methods, other than electrophoresis, under study in the UPOV member States (Liste des nouvelles méthodes, autres que l'électrophorèse, examinées dans les Etats membres de l'UPOV).

Annexe III* A list of species for which, besides wheat, barley and oats, electrophoresis has been investigated as a means for variety identification, copied from Annex III of document TWA/XVII/9 (Liste des espèces pour lesquelles, en dehors du blé, de l'orge et de l'avoine, le recours à l'électrophorèse a été envisagé en tant que moyen d'identification des variétés; reprise de l'annexe III du document TWA/XVII/9).

* En anglais seulement

- Annexe IV Proposition d'intégration de l'électrophorèse et de l'analyse d'images assistée par ordinateur (blé seulement) dans les principes directeurs d'examen des céréales, élaborée par des experts du Royaume-Uni pour la réunion du sous-groupe des graminées tenue en avril 1989 (propositions émanant uniquement du NIAB).
- Annexe V Proposition visant à intégrer l'électrophorèse dans les principes directeurs d'examen du ray-grass et éventuellement dans d'autres principes directeurs d'examen, élaborée par des experts du Royaume-Uni (proposition présentée à titre purement personnel par l'expert).
- Annexe VI Rapport sur les résultats de l'utilisation de l'électrophorèse pour Poa pratensis L. aux Pays-Bas.
- Annexe VII Proposition visant à incorporer l'analyse d'images dans les examens DHS des oignons, élaborée par des experts du Royaume-Uni (propositions émanant uniquement du NIAB).
- Annexe VIII Présentation des différentes applications de l'électrophorèse au laboratoire de biochimie du G.E.V.E.S., pour l'inscription des variétés et la certification des semences; exposé présenté à la dernière session du Groupe de travail technique sur les plantes agricoles (repris de l'annexe IV du document TWA/XVII/9).
- Annexe IX Extrait du rapport de la dernière session du Groupe de travail technique sur les plantes agricoles (paragraphe 21 à 30 - consacrés à l'électrophorèse - du document TWA/XVII/9).

7. Le Comité technique est invité à prendre note des renseignements figurant dans le présent document et dans ses annexes ainsi que dans le document supplémentaire qui doit être élaboré après les sessions des groupes de travail techniques, et à adopter les mesures à prendre.

[Neuf annexes suivent]

ANNEXE I

Species for which member States study the possible use of electrophoresis
in the examination of varieties for distinctness purposes

SPECIES	COUNTRY	TEST PLANNED	UNDER STUDY	APPLIED FOR	IDEN- TIFICATION	FOR DIS- TINCTNESS	FOR HOMO- GENEITY	ORGAN	PROTEIN	METHOD
Apple	FR		X		X			Pollen	Isoenzymes	
Apple	FR		X					Leaf	Acid phos- phatase	Polyacrylamid gel
Apple	FR		X						Endopeptidase	Polyacryl.gel
Apple	FR		X						Esterase	Polyacryl.gel
Apple	FR		X						Phosphogluco- isomerase	Starch gel
Apple	FR		X						Superoxyd dismutase	Polyacrylamid gel
Apple	FR		X						Peroxydase	Polyacryl.gel
Apple	GB		X				X		Isoenzymes	
Asparagus	DE		X					Phyllo- clades	Albumine, Globuline	PAGE, pH 7,9
Asparagus	DE		X					Phyllo- clades	Peroxydase	IEF, pH 3-10
Barley	DE			X	X			Endo- sperm	Prolamine	IEF pH 4-8
Barley	DE			X	X			Endo- sperm	Prolamine	SDS-PAGE
Barley	DE			X	X			Endo- sperm	Albumine, Globuline	PAGE pH 8,9
Carnation	NL		X		X					
Edible Mushrooms	JP		X						Isoenzymes	
Forest trees	JP		X						Isoenzymes	
Hazelnut	FR	X								
Maize	CH	X			X					
Maize	DE		X					Endo- sperm	Zeine	IEF pH 4-8
Maize	DE		X					Embryo	MDH	PAGE pH 8,9
Maize	DE		X					Embryo	Esterase	PAGE pH 8,9
Maize	DE	X						Embryo	Peroxydase	PAGE pH 8,9
Maize	DE	X						Cotyle- don	Isoenzyme	
Maize lines	HU			X			X		Isoenzymes	
Oats	DE			X	X			Endo- sperm	Prolamine	PAGE pH 9,1
Oats	DE			X	X			Endo- sperm	Prolamine	SDS-PAGE
Oats	DE			X	X			Embryo	Peroxydase	IEF pH 3-10
Peach	FR		X						Zimylase	PAGE
Peach	FR		X						Alcooldeshy- drogenase	
Peach	FR		X						Malate des- hydrogenase	
Pears	GB		X							
Pe largonium	DE		X					Leaf or root tips	Isoenzymes	IEF or PAGE
Potatoe	DE			X	X			Tuber	Albumine, Globuline	PAGE pH 7,9
Potatoe	DE			X	X			Tuber	Peroxydase	PAGE pH 7,9
Potatoe	DE			X	X			Tuber	Esterase	PAGE pH 7,9

SPECIES	COUNTRY	TEST PLANNED	UNDER STUDY	APPLIED	FOR IDEN- TIFICATION	FOR DIS- TINCTNESS	FOR HOMO- GENEITY	ORGAN	PROTEIN	METHOD
Quinces	GB		X							
Rape	DE		X					Seed- ling	Peroxydase	IEF pH 4-8
Rape	DE		X					Seed- ling	Acid Phos- phatase	IEF pH 3-10
Rice	HU			X		X	X	Seed	Polypeptides	
Strawberries	GB		X							
Triticale	DE			X	X			Endo- sperm	Prolamine	PAGE pH 3,1
Triticale	DE			X	X			Endo- sperm	Gluteline	SDS-PAGE
Triticale	DE			X	X			Endo- sperm	Amylasen	PAGE pH 8,9
Walnut	FR	X								
Wheat	CH	X			X					
Wheat	HU			X			X	Seed	Storage protein	
Wheat	DE			X	X			Endo- sperm	Prolamine	PAGE pH 3,1
Wheat	DE			X	X			Endo- sperm	Gluteline	SDS-PAGE
Wheat	DE			X	X			Endo- sperm	Amylasen	PAGE pH 8,9

[L'annexe II suit]

ANNEXE II

New Methods Other than Electrophoresis Under Study in the UPOV Member States

COUNTRY	START OF STUDY	METHOD	SPECIES	CHARACTERISTIC
NL		Image analysis	Carnation	Shapes (crenellation) Color patterns
NL	1989	Somaclonal variation	Gerbera	
ZA	1988	Numerical comparison (same principle as image analysis)	Mango	Shapes
DE	1988	Hand colorimeter + microprocessor with liquid cristal indication	Elatior Begonia	Flower color
JP	1983	Ultraviolet absorption, capsaicinoid content	Sweet pepper, chili	Bitterness
JP	1983	Gas-chromatography, fragrance components	Tea	Fragrance
JP	1983	Gas-chromatography, aroma components	Melon	Aroma
JP	1984	Gas-chromatography, fragrance components	Rose	Fragrance
JP	1984	Gas-chromatography, aroma components	Vine	Aroma
JP	1984	Gas-chromatography, allicin content	Garlic	Allicin (stink)
JP	1985	Gas-chromatography, fragrance	Common stock (<u>Matthiola incana</u> (L.) R. Br.)	Fragrance
JP	1986	Gas-chromatography, aroma components	Apple	Aroma
JP	1986	Gas-chromatography, aroma components	Strawberry	Aroma
GB		Image analysis	Wheat	Shapes
GB		Image analysis	Onion	Shapes

[L'annexe III suit]

ANNEXE III

Electrophoresis and Variety Identification:
A Summary of Species Which Have Been Investigated
(Other than the Self-Pollinating Cereals Wheat, Barley and Oats)

Species	Protein/enzyme(s) analysed
<u>Pisum sativum</u> (pea)	seed globulins seed albumins/globulins seedling Prx shoot/root Est,Lap,Prx seed Amy, Est,Got seed legumin/vicilin SDS-soluble seed proteins buffer-soluble seed proteins water-soluble seed proteins urea-soluble seed proteins
<u>Phaseolus vulgaris</u> (French bean, common bean, snap bean, kidney bean, field bean (US))	water-soluble seed proteins isozymes (10 systems) from seeds and seedlings leaf, stem root Est, Prx, Acp acid salt-soluble proteins seed globulins SDS-soluble seed proteins
<u>Glycine max</u> (soybean)	buffer-soluble seed proteins seed Est isozymes (9 different systems) from seeds and leaves seed β -Amy, urease isozymes (11 different systems) from seedlings seed Adh,Amy,Acp,trypsin inhibitor buffer-soluble seed proteins
<u>Arachis hypogaea</u> (peanut, groundnut)	buffer-soluble seed proteins seed Est,Cat,Lap,Acp,Adh, 'INT oxidase'
<u>Trifolium subterraneum</u> (subterranean clover)	seed globulins isozymes (15 different systems) from seeds root Est
<u>Lolium perenne, L.multiflorum</u> (perennial and Italian ryegrass)	leaf Pgi,Got (and other enzymes). SDS-soluble seed proteins
<u>Solanum tuberosum</u> (potato)	soluble proteins from tubers Est from tubers

0184

<u>Oryza sativa</u> (rice)	buffer-soluble seed proteins seed prolamins urea-soluble seed proteins
<u>Allium</u> spp. (onions)	seed Est
<u>Zea mays</u> (maize)	seed zeins (prolamins) isozymes (12 systems) from coleoptiles
<u>Medicago sativa</u> (lucerne, alfalfa)	buffer-soluble seed proteins leaf Prx, Est, Acp root Prx, root or leaf Est, seed or pod Lap, seed Adh
<u>Festuca rubra</u> (fescue)	seed Est SDS-soluble seed proteins
<u>Dactylis glomerata</u> (cocksfoot)	SDS-soluble seed proteins
<u>Bromus</u> spp. (bromegrass)	SDS-soluble seed proteins
<u>Agrostis palustris</u> (creeping bentgrass)	buffer-soluble leaf proteins
<u>Digitaria</u> spp. (digitgrass)	leaf Est
<u>Phleum</u> spp. (timothy)	seedling Est
<u>Vicia faba</u> (broad, field or faba bean)	water-soluble seed proteins seed globulins water- or buffer + urea- soluble seed proteins SDS-soluble seed proteins urea-soluble seed proteins
<u>Psophocarpus tetragon^olobus</u> (winged bean)	buffer-soluble seed proteins
<u>Secale cereale</u> (rye)	seed Prx, Alp, seedling α -Amy seed secalins (prolamins) germinated seed α -Amy
<u>Beta vulgaris</u> (sugar beet)	leaf Pgi, Mdh, Pgm
<u>Brassica</u> spp. (Brussels sprouts, cabbage etc)	seed Acp seedling Acp seedling Pgm, Lap, Adh, Got
<u>Coffea</u> spp. (coffee)	water- or SDS-soluble seed proteins
<u>Lens</u> spp. (lentil)	leaf Got, Pgm, Pgd, Adh

<u>Olea europea</u> (olive)	salt-soluble pollen Est, Me, Lap
<u>Persea americana</u> (avocado)	leaf Prx, Mdh, Lap, Pgm
<u>Carya illinoensis</u> (pecan)	pollen Got, Est
<u>Rosea spp.</u> (rose)	leaf proteins, Prx, Est, Mdh (and others)
<u>Dianthus spp.</u> (carnation)	leaf Pgi, Lap, Est, Pgm, Sdh
<u>Lycopersicon spp.</u> (tomato)	leaf Acp, Est, Got, Prx
<u>Capsicum spp.</u> (pepper)	buffer-soluble seed proteins
<u>Raphanus sativus</u> (radish)	root Ldh, Pgm, Pgd, Est, Lap
<u>Apium spp.</u> (celery)	seed (or seedling) Adh, Mdh, Pgi, Pgm, Sdh
<u>Lactuca sativa</u> (lettuce)	seed protein, Est
<u>Cucumis spp.</u> (cucumber)	buffer-soluble seed/cotyledon proteins, Pgi, Pgd, Pgm (and others)
<u>Malus spp.</u> (apple)	leaf Pgd, as partate aminotransferase
<u>Pyrus spp.</u> (pear)	leaf Prx
<u>Prunus spp.</u> (peach)	buffer-soluble proteins of woody tissue
<u>Fragaria spp.</u> (strawberry)	fruit Est, Prx, Adh
<u>Vitis spp.</u> (grape)	buffer-soluble fruit proteins, Est, Prx, Mdh fruit Est, Acp, Adh, Lap (and others)

Intégration de l'électrophorèse dans l'examen DHS des céréales

1. INTRODUCTION

1.1 Le Comité technique de l'UPOV a demandé récemment au NIAB d'élaborer des propositions sur la façon d'intégrer de manière très efficace et rentable les "nouvelles techniques" dans les principes directeurs d'examen de l'UPOV pour le blé, l'orge et l'avoine. Le présent document suggère certaines façons d'incorporer l'électrophorèse dans la procédure suivie pour le blé, l'orge et l'avoine et propose aussi de recourir à l'analyse d'images assistée par ordinateur pour le blé.

En ce qui concerne l'électrophorèse, deux démarches semblent envisageables :

A. L'électrophorèse peut être considérée comme un caractère supplémentaire à ajouter à la liste actuelle des caractères morphologiques; l'électrophorèse pourrait éventuellement remplacer certains caractères morphologiques et non pas simplement être utilisée comme complément;

B. L'incorporation de l'électrophorèse peut être considérée comme l'occasion d'un réexamen fondamental du système DHS. Ce serait probablement la seule façon de réduire sensiblement les coûts.

1.2 Toute proposition relative à une réévaluation du système DHS devrait remplir les conditions ci-après :

1.2.1 Comparaison avec le système existant

Toute nouvelle procédure devra être évaluée de manière à vérifier que la distinction entre les variétés correspond au niveau souhaité. Cela pourrait être réalisé, dans une large mesure, rétrospectivement, à l'aide de données existantes. Il pourrait être nécessaire d'appliquer parallèlement les deux systèmes pendant une période déterminée.

1.2.2 Coût des nouvelles propositions

Toute nouvelle proposition qui est censée susciter une large adhésion ne doit pas raisonnablement être plus coûteuse que le système existant. Nous devons donc essayer d'élaborer une solution très rentable conforme à notre rigueur scientifique et aux buts de l'examen DHS.

1.2.3 Utilisation pour le contrôle des semences

Il est important d'élaborer un système qui puisse être adopté ou adapté par les services de contrôle des semences. Le recours à des examens chimiotaxonomiques pourrait être inapproprié si ces examens ne peuvent pas être effectués assez rapidement aux fins de contrôle des semences.

1.2.4 Uniformité

Il faut montrer que les nouvelles variétés sont uniformes en ce qui concerne les caractères servant à établir le caractère distinctif. Ces variétés devraient aussi apparaître uniformes au producteur, qui pourrait avoir une réaction négative face à une variété caractérisée par une absence d'uniformité morphologique même si les résultats obtenus à d'autres égards sont bons. Il

est par ailleurs essentiel que des caractères importants tels que la hauteur de la plante et l'époque à laquelle l'épi apparaît et arrive à maturité soient uniformes.

1.3 Il convient aussi de prendre note des éléments ci-après :

1.3.1 L'électrophorèse des protéines de réserve de la graine est probablement la méthode disponible la plus efficace pour déterminer les caractères distinctifs dans les variétés de céréales.

1.3.2 L'examen de la morphologie de l'épi et des graines permet aussi de dégager un grand nombre de caractères distinctifs.

1.3.3 Dans tout système, le coût imputable directement aux travaux techniques ne correspond qu'à une partie du coût total, le reste étant constitué par les dépenses administratives et les frais généraux.

1.3.4 Il faut disposer d'un nombre minimal de caractères observés en plein champ pour pouvoir procéder à une description variétale appropriée aux fins du contrôle des semences. Ce nombre ne dépasse probablement pas la trentaine.

1.3.5 Actuellement, aucun caractère utilisé pour l'examen DHS des céréales n'est enregistré en tant que donnée ayant un caractère véritablement continu. Pour prendre des décisions en ce qui concerne le caractère distinctif, il n'y a donc pas lieu de disposer de deux années de données statistiques.

1.3.6 La procédure appliquée auparavant au Royaume-Uni reposait sur des séries de deux ans, mais, par suite des modifications apportées récemment, il est possible d'arriver dans certains cas à des décisions sur une année.

Une procédure d'examen DHS modifiée est proposée ci-dessous pour l'orge d'hiver, compte tenu de tous les points énumérés précédemment; les caractères électrophorétiques y occupent une place fondamentale. Un système analogue pourrait être utilisé pour l'orge de printemps et l'avoine. Une procédure applicable au blé est examinée à part.

2. PROCEDURE APPLIQUEE ACTUELLEMENT EN CE QUI CONCERNE L'EXAMEN DHS DE L'ORGE D'HIVER

Les variétés proposées sont cultivées dans deux centres pendant deux ans. S'agissant des caractères distinctifs, elles sont comparées avec la liste nationale du Royaume-Uni. Aux fins de l'examen de l'uniformité, les variétés proposées sont cultivées en épi-lignes. Elles sont considérées comme stables sauf preuve du contraire. Des observations sont faites pour toutes les variétés pendant le cycle de végétation, de telle sorte qu'une quarantaine de caractères sont notés. Il n'est pas tenu compte du diagramme électrophorétique de la variété. L'examen DHS et l'examen VCU ont lieu simultanément mais séparément.

Nombre de variétés d'orge d'hiver ayant fait l'objet d'examens DHS au Royaume-Uni (1984-1986)

Année du semis	Liste nationale	Variétés proposées		Total
		1re année	2e année	
1984	39	24	13	76
1985	42	26	15	83
1986	37	23	21	81

3. RESUME DE LA METHODE D'EXAMEN DHS PROPOSEE POUR L'ORGE D'HIVER

3.1 La procédure proposée tient compte des caractères électrophorétiques et de la morphologie de l'épi et de la graine en tant que principaux caractères distinctifs des variétés. D'autres renseignements essentiels sont obtenus dans le cadre d'un essai réalisé en plein champ sur une petite échelle. Les parcelles correspondantes sont semées dans un centre (un autre centre faisant office de réserve) sur la base d'une année. Pour la plupart des variétés proposées, l'examen DHS ne s'étend pas sur une deuxième année.

3.2 Les variétés reçues des obtenteurs seraient examinées au moyen de la technique de l'électrophorèse (il est suggéré d'utiliser la méthode habituelle de l'ISTA dite "méthode PAGE" pour l'analyse des protéines de réserve). Initialement, seulement 14 graines seraient examinées et les résultats de l'examen seraient disponibles avant les semis. La morphologie des épis et des graines serait aussi examinée avant la période des semis.

3.3 Les résultats de l'examen électrophorétique et de l'examen morphologique des épis et des graines serviraient à regrouper les variétés proposées (à supposer que les variétés actuelles de la liste nationale aient déjà été classées) et un plan de semis en plein champ serait élaboré à partir des groupements opérés. Les parcelles comprendraient des variétés de la liste nationale classées par groupes morphologiques, qui seraient subdivisés selon le diagramme électrophorétique. Les variétés proposées seraient incorporées dans ces groupes/sous-groupes en fonction de la morphologie des épis et des graines et des caractères électrophorétiques.

3.4 La totalité des caractères visés au paragraphe 1.3.4 ci-dessus sont notés pour toutes les parcelles.

3.5 Pendant la période hivernale qui suit les semis, un nombre beaucoup plus important (par ex. 2 x 50) de graines serait examiné à l'aide de la technique de l'électrophorèse et des indications détaillées sur la morphologie des épis et des grains seraient notées. Les variétés doivent présenter un degré d'uniformité approprié pour tous les caractères notés. Il est proposé de ne pas autoriser de variation dans le diagramme électrophorétique. Les variétés présentant des lignées ou des biotypes électrophorétiques seraient refusées.

3.6 Les variétés proposées qui se distingueraient suffisamment des autres par des caractères morphologiques ou le diagramme électrophorétique et qui présenteraient le degré d'uniformité convenu seraient considérées comme ayant réussi l'examen DHS. Il existe déjà des règles permettant d'établir les caractères distinctifs et l'uniformité à partir de la morphologie. En ce qui concerne l'électrophorèse, la présence ou l'absence d'au moins une bande nette serait nécessaire en tant que critère de distinction. Les règles applicables en matière d'uniformité autoriseraient l'existence d'un diagramme de bandes différent pour les 100 (2 x 50) semences analysées. La variété devra ensuite subir avec succès les examens VCU avant de figurer sur la liste nationale.

4. AUTRES ESPECES

La procédure proposée ci-dessus pourrait aussi être utilisée pour l'examen DHS de l'orge de printemps et de l'avoine d'hiver et de printemps.

5. METHODE D'EXAMEN DHS PROPOSEE POUR LE BLE

La procédure présentée ci-dessus pourrait être utilisée pour l'examen DHS du blé de printemps et d'hiver. Toutefois, dans ce cas précis, outre le fait que les variétés proposées seraient examinées par électrophorèse et que les caractères morphologiques de leurs épis/graines seraient notés, les variétés en question feraient l'objet d'une analyse d'images assistée par ordinateur. Cette analyse permettrait de dégager des caractères morphologiques supplémentaires de la graine qui pourraient être utilisés en vue d'établir les caractères distinctifs et de décrire la variété. Les parcelles seraient semées comme indiquées dans le paragraphe 3.3 ci-dessus. La méthode proposée serait par ailleurs suivie en tous points.

6. CONCLUSIONS

6.1 La procédure proposée semble constituer une formule appropriée aussi bien sur le plan technique qu'à d'autres égards pour incorporer l'électrophorèse et l'analyse d'images assistée par ordinateur dans l'examen DHS des espèces de céréales autogames.

6.2 Cette procédure serait, dans la plupart des cas, plus rapide que la procédure actuelle et ne reviendrait pas plus cher.

6.3 La procédure proposée présente le grand avantage d'intégrer effectivement dans l'examen DHS, et ce à un stade précoce, les méthodes qui sont d'une très grande importance dans la commercialisation ultérieure de la plante, à savoir l'électrophorèse des protéines des graines et l'analyse d'images assistée par ordinateur. Les nouvelles variétés seraient protégées par un certificat d'obtention végétale et seraient diffusées assorties de leurs descriptions fondées, comme à l'heure actuelle, sur leurs caractères morphologiques et, en outre, sur leurs caractères électrophorétiques et les caractères mis en évidence par l'analyse d'images assistée par ordinateur.

6.4 La procédure proposée peut être considérée comme une première étape vers une éventuelle révision fondamentale des méthodes d'examen DHS dans le sens d'un plus grand recours aux "techniques nouvelles".

6.5 Une des particularités importantes de la procédure proposée réside dans l'identification du nombre minimal de caractères morphologiques qui permettra à la fois de dégager les caractères distinctifs appropriés et de procéder à un contrôle approprié (voir paragraphe 1.3.4). Des travaux sont en cours au NIAB en vue de déterminer le nombre en question.

[L'annexe V suit]

Intégration de l'électrophorèse
dans les principes directeurs d'examen de l'UPOV

Propositions pour le ray-grass
(élaborées par M. M. Camlin (Royaume-Uni))

Un premier projet de texte des nouveaux principes directeurs proposés pour le ray-grass a été élaboré, il sera soumis pour examen au Groupe de travail technique sur les plantes agricoles (TWA) à sa prochaine réunion. Le présent document envisage différents moyens possibles d'incorporer des méthodes d'analyse électrophorétique dans les principes directeurs, sur la demande du Comité technique et du Conseil.

INTRODUCTION

Jusqu'à présent, l'UPOV s'en est généralement tenue à l'idée selon laquelle, en raison des incidences qu'elle pourrait avoir sur le plan des écarts minimaux, l'électrophorèse ne devrait servir qu'à confirmer les caractères distinctifs de telle ou telle variété lorsque, malgré les avantages qu'une variété présente sur le plan agronomique, les caractères utilisés habituellement par l'UPOV ne permettent pas de distinguer la variété en question d'une autre. Il est aussi convenu que les caractères distinctifs d'une variété se fondent normalement sur des critères agronomiques et non pas sur les seuls résultats de l'électrophorèse. Toutefois, l'UPOV souhaite maintenant étudier la possibilité d'intégrer l'électrophorèse dans les principes directeurs d'examen de diverses plantes.

En ce qui concerne le ray-grass, qui est une plante allogame, les électrophorogrammes soulèvent des difficultés du fait de leur manque d'uniformité (d'homogénéité) par suite de la présence de différences génétiques entre plantes d'une même variété. Cela signifie que les caractères électrophorétiques ne peuvent pas encore être pris en considération pour l'examen DHS dans le strict respect de la Convention UPOV. En outre, les obtenteurs ont encore des avis partagés au sujet de l'application sur une large échelle et de façon systématique de l'électrophorèse au ray-grass compte tenu des problèmes supplémentaires que cette absence d'uniformité peut poser tant sur le plan des risques de plagiat que sur celui de l'affaiblissement de la protection conférée par les certificats d'obtention végétale.

Ces difficultés importantes doivent être surmontées avant que l'UPOV puisse envisager sérieusement de reconnaître les caractères électrophorétiques pour cette plante. Compte tenu des problèmes supplémentaires que posent le ray-grass et les plantes allogames similaires, il pourrait être difficile d'avancer aussi rapidement que pour les plantes à multiplication végétative ou autogames. On considère qu'il est essentiel que les producteurs participent à un stade précoce aux études relatives à l'application de l'électrophorèse aux examens DHS. Cette participation sera particulièrement importante au moment où il sera question des problèmes relatifs au ray-grass et à d'autres plantes allogames. Ce n'est que si cette condition préalable est remplie et que si un accord intervient que l'UPOV peut espérer commencer d'envisager de tenir compte des caractères électrophorétiques dans les examens DHS.

PROPOSITIONS TECHNIQUES

L'examen de ces propositions passe par une participation active des obtenteurs. Elles sont principalement de nature technique et visent à permettre l'utilisation éventuelle, à l'avenir, de l'électrophorèse dans le cadre des principes directeurs d'examen de l'UPOV applicables au ray-grass. Les besoins ont été déterminés sur le plan de la recherche et des dispositions sont prévues pour la réalisation d'études supplémentaires sur les méthodes et les techniques à appliquer avant que l'utilisation des caractères électrophorétiques soit finalement envisagée.

- 1) Il conviendrait d'arrêter au sein de l'UPOV une série de méthodes et de caractères électrophorétiques pour le ray-grass. Pour que les méthodes puissent être acceptées, il devra avoir été prouvé qu'elles permettent d'opérer une distinction utile entre les variétés et d'obtenir des résultats reproductibles, insensibles aux facteurs du milieu et du développement. Jusqu'à présent, parmi les systèmes isoenzymatiques, il ressort que seul le PGI remplit totalement ces conditions; toutefois, d'autres systèmes, au nombre desquels figurent l'ACP, l'IDH et le GOT, font l'objet d'une étude suivie. Des premiers résultats utiles ont aussi été obtenus par l'ISTA sur des globulines de semences à l'aide de la méthode PAGE. Il est donc proposé pour le moment de ne s'intéresser qu'à l'électrophorèse sur gel d'amidon pour quatre systèmes isoenzymatiques (PGI, ACP, IDH et GOT) et à l'application de la méthode PAGE sur des globulines de semences. Il importerait de convenir d'une méthode normalisée et de décrire cette méthode.
- 2) Le nombre de plantes examinées en vue d'établir des descriptions électrophorétiques devrait être normalisé. Cela permettra de faire en sorte que tous les laboratoires travaillent en fonction de niveaux de distinction analogues et contribuera à standardiser les "écarts minimaux", même si ceux-ci peuvent être réduits globalement. Toutefois, il est aussi proposé que, lorsque cela est possible, un nombre identique de plantes soit examiné pour chaque variété, comme c'est actuellement le cas pour les caractères morphologiques, de façon à limiter la réduction des "écarts minimaux".
- 3) Une fois convenus et normalisés la méthode et le nombre de lots, des essais devraient être organisés dans les différents Etats de façon à vérifier si les laboratoires participants peuvent obtenir des résultats identiques et sont capables d'arriver à des niveaux de distinction analogues entre les variétés.
- 4) Il faut résoudre le problème constitué par l'absence inhérente d'uniformité entre les caractères électrophorétiques obtenus au sein des variétés de la plupart des plantes allogames. Pour que des examens DHS puissent être menés conformément à la Convention UPOV, il pourrait être nécessaire de modifier la notion d'uniformité (homogénéité) pour les caractères électrophorétiques. La méthode PAGE utilisée sur les globulines de semences, étudiée actuellement par l'ISTA, fait appel à des lots en vrac et, contrairement à l'examen des isoenzymes, n'exploite pas les variations qui surviennent d'une plante à l'autre dans les variétés. Elle constituerait peut-être une méthode plus satisfaisante sur le plan de l'uniformité (homogénéité) étant donné que l'absence intrinsèque d'uniformité variétale n'est pas observée directement.

- 5) Une base de données globale, dont les composantes seraient authentifiées par des contrôles portant sur les différents lots de chaque variété de référence, devrait être constituée pour les variétés existantes notoirement connues, sur la base des caractéristiques électrophorétiques convenues au sein de l'UPOV.
- 6) Pour permettre l'élaboration ultérieure d'une base de données complète, les descriptions des nouvelles variétés proposées devraient, à l'avenir, contenir des renseignements sur les caractères électrophorétiques, dans l'hypothèse où le consentement de l'obtenteur peut être obtenu.
- 7) Tant que les méthodes électrophorétiques n'auront pas été étudiées et qu'un accord ne sera pas intervenu à leur sujet au sein de l'UPOV, et tant qu'une base de données complète et fiable sur les électrophorogrammes et les fréquences des génotypes n'aura pas été établie, il ne devrait pas être question de réduire la liste des 14 caractères morphologiques énumérés dans le projet de principes directeurs ou la liste des caractères assortis d'un astérisque. Toutefois, aucun caractère morphologique nouveau ne devrait être ajouté tant qu'une décision n'aura pas été prise sur la façon d'utiliser les caractères électrophorétiques.
- 8) Le projet de principes directeurs de l'UPOV pour le ray-grass devrait être modifié au paragraphe III ("Conduite de l'examen") et au paragraphe IV ("Méthodes et observations") de manière à faire état des examens et des méthodes reposant sur la technique de l'électrophorèse, et ce, par exemple, de la façon ci-après :

Par. III Conduite de l'examen

Ajouter (alinéa 7) "Electrophorèse". Des descriptions électrophorétiques des variétés peuvent être établies à l'aide de méthodes approuvées par l'UPOV."

Par. IV Méthodes et observations

Ajouter (alinéa 7) "Des méthodes d'analyse électrophorétiques sont à l'étude."

Par ailleurs, il pourrait être nécessaire de modifier le projet de questionnaire technique en vue d'obtenir l'approbation des obtenteurs pour l'établissement de descriptions électrophorétiques.

Aucun caractère électrophorétique ne devrait figurer dans le tableau des caractères tant que la méthode qui doit être adoptée n'aura pas été normalisée et que l'UPOV ne se sera pas prononcée en faveur de l'utilisation de caractères électrophorétiques pour le ray-grass.

RESUME

PROPOSITIONS TECHNIQUES

- 1) Adoption de méthodes et de caractères normalisés.
- 2) Adoption de normes relatives à la distinction et aux "écarts minimaux".
- 3) Définition de la procédure à suivre pour les essais à réaliser dans les différents Etats en vue de vérifier les résultats.

- 4) Critère d'uniformité à prendre en considération pour les caractères électrophorétiques.
- 5) Elaboration d'une base de données authentifiées pour la collection de variétés notoirement connues.
- 6) Elaboration de descriptions électrophorétiques pour les futures variétés proposées.
- 7) Caractères existant dans les principes directeurs d'examen à conserver pour l'instant.
- 8) Les principes directeurs devront faire état des examens réalisés à l'aide de la technique de l'électrophorèse.

[L'annexe VI suit]

Résultats de l'utilisation de l'électrophorèse
pour Poa Pratensis L.

Introduction

Les perspectives en ce qui concerne l'utilisation de l'électrophorèse pour identifier rapidement les variétés et procéder aux examens DHS en ce qui concerne le pâturin des prés (*Poa pratensis* L.) sont très prometteuses a priori, étant donné que le pâturin des prés est généralement considéré comme une espèce apomictique.

En 1987 et 1988, plusieurs études ont été lancées en vue de déterminer dans quelle mesure l'électrophorèse pouvait permettre d'établir une distinction entre des variétés. Ces études se poursuivront et se développeront en 1989, et les résultats obtenus jusqu'à présent seront bientôt publiés.

Le présent document contient un résumé des principaux éléments d'information disponibles à cet égard.

Graines

La méthode la plus simple consiste à appliquer la technique de l'électrophorèse sur une quantité déterminée de graines. La recherche du point isoélectrique réalisée avec l'estérase sur 60 mg de graines moulues (environ 200 graines) donne des bandes bien délimitées mais très proches les unes des autres. Les différences variétales apparaissent clairement avec cette méthode. Les résultats sont assez difficiles à interpréter mais l'interprétation peut être facilitée si on procède à un groupement en fonction de la première bande d'estérase à partir de la cathode.

Cette méthode présente un inconvénient en ce sens que les mélanges de variétés peuvent ne pas être reconnus comme tels ce qui pourrait déboucher sur un diagramme différent par rapport à leurs composants. Lorsque des variétés qui présentent des diagrammes assez différents sont mélangées, l'effet des proportions du mélange (25 à 75%) est négligeable; le mélange laisse apparaître les bandes des deux variétés avec une intensité égale. Pour les variétés qui se ressemblent, les mélanges sont très difficiles à trouver.

L'application de l'électrophorèse des protéines de réserve sur différentes graines avec utilisation de solution d'argent a fait apparaître de nombreuses bandes nettes mais n'a indiqué aucune différence de variété.

Plantules

La méthode PAGE a été appliquée sur différentes plantules. La première étude a porté sur des plantules de trois à quatre mois cultivées en serre et a été réalisée avec huit systèmes enzymatiques, c'est-à-dire estérase, GOT, GPI, MDH, PGM, ACP, tyrosinase et peroxydase. Ce sont les systèmes estérase, peroxydase et GPI qui ont donné la meilleure combinaison d'activité enzymatique, de netteté des bandes et de différenciation entre les variétés. Pour établir l'homogénéité variétale, huit à douze plants ont été pris comme échantillons; quatre à huit germes par plant ont été pris comme échantillons en vue d'estimer la variation dans un plant.

Bien que les variétés étudiées aient pu être identifiées très clairement par leurs diagrammes électrophorétiques, une variation est apparue au sein de la variété et au sein de la plante. Par conséquent, dans une expérience ultérieure, les conditions de culture et les techniques d'échantillonnage ont été étudiées. Seule la méthode PAGE pour l'estérase et la peroxydase a été utilisée. En outre, la variation constatée en ce qui concerne le diagramme électrophorétique dans les variétés étudiées était liée à la variation des caractères morphologiques obtenus dans la serre. L'homogénéité électrophorétique des plants cultivés dans les chambres de culture a été améliorée par rapport à la serre. Les conditions de culture, l'âge des feuilles et la technique d'échantillonnage ont fortement influé sur l'homogénéité des diagrammes et la variation entre les variétés. Les isoenzymes utilisés ont aussi eu une incidence sur ces résultats. Il n'y a aucune relation entre l'hétérogénéité électrophorétique et l'hétérogénéité morphologique.

Conclusions

La recherche du point isoélectrique (méthode IEF) réalisée avec le système enzymatique de l'estérase sur des échantillons de graines donne d'assez bons diagrammes. Toutefois, leur interprétation peut être entravée en raison de l'impureté des échantillons de semences utilisés. Cette méthode constitue un moyen très efficace pour obtenir rapidement des renseignements à condition que des indications sur toutes les variétés soient disponibles et soient conservées de façon à permettre d'effectuer les comparaisons nécessaires. Actuellement, des données sur 120 variétés de pâturin des prés sont disponibles au RIVRO.

La caractérisation des différentes graines est techniquement possible mais ne fait apparaître aucune différence variétale.

En ce qui concerne l'application de l'électrophorèse aux examens DHS pour le pâturin des prés, l'utilisation de la méthode PAGE sur différentes plantes avec l'estérase et la peroxydase laisse espérer de bons résultats lorsque des méthodes d'échantillonnage optimales auront pu être mises au point et les conditions de culture appropriées pour les plantules auront pu être définies.

Comme pour d'autres plantes, il convient de commencer à s'intéresser au mode d'application de l'électrophorèse dans les examens DHS pour le pâturin des prés, compte tenu des résultats du Groupe de travail sur les plantes agricoles en 1988 (par. 21 à 29 du document TWA/XVII/9).

H.J. Baltjes
RIVRO-WAGENINGEN
890306

[L'annexe VII suit]

Incorporation de l'analyse d'images
dans les examens DHS des oignons (*Allium Cepa* L.)

Propositions

Il est proposé de remplacer par la technique de l'analyse d'images les méthodes de mesure traditionnelles pour les caractères de l'UPOV 9, 10, 11, et pour les caractères supplémentaires utilisés au Royaume-Uni "forme du sommet du bulbe", "forme de la base du bulbe" et "distance entre la base du bulbe et le point le plus large".

Ultérieurement, il sera demandé au groupe de travail technique de l'UPOV d'étudier l'utilisation de nouveaux caractères par suite de l'application de la technique de l'analyse d'images.

Cadre général

L'utilisation de l'analyse d'images dans le cadre des essais DHS des oignons au NIAB (Cambridge) est étudiée depuis la récolte de 1987. Dans le présent rapport, il n'est question que des travaux portant sur un petit groupe d'oignons et sur les bulbes de ce groupe d'oignons, à l'exclusion du feuillage.

Le groupe comprend sept variétés et deux sélections (conservation approuvée) de deux de ces variétés, tous les bulbes ayant la forme d'une fiole. Le rapport ne fait état que des données relatives à l'année 1987.

Méthodes

Des observations normales ont été réalisées sur 15 bulbes récoltés par parcelle à raison de quatre répétitions. De manière à réaliser une étude dans des conditions offrant une certaine souplesse, des photographies 35 mm ont été prises de ces bulbes au moment de la récolte et les négatifs ont été utilisés aux fins de l'analyse d'images. Les conditions d'éclairage et la distance focale standard ont été utilisées.

Les photographies des bulbes ont été prises de façon que les travaux d'étude puissent être menés à tout moment et en vue de à permettre la réalisation de diverses estimations successives.

La méthode utilisée pour le balayage des photographies a été décrite ailleurs (Keefe et Draper, 1988).

Caractères notés

Les caractères notés manuellement sont indiqués ci-dessous. Les mêmes caractères sont notés au moyen de la technique de l'analyse d'images.

Les caractères 10 (diamètre du bulbe) et 9 (hauteur du bulbe) de l'UPOV et le caractère 58 du Royaume-Uni (distance entre la base du bulbe et le point le plus large) sont mesurés en mm). Le caractère 11 de l'UPOV (forme du bulbe), les caractères 54 du Royaume-Uni (forme du sommet du bulbe) et 55 du Royaume-Uni (forme de la base du bulbe) sont notés de 1 à 9. Pour le caractère 11 de l'UPOV, il est tenu compte des diagrammes de forme figurant dans les principes directeurs de l'UPOV pour l'oignon (TG/46/3). Les caractères 54 et 55 du Royaume-Uni sont des composants du caractère 11 de l'UPOV. Ils ne figurent pas dans le document TG/46/3 mais font partie de la procédure d'examen du Royaume-Uni. De la même façon, le caractère 58 n'est utilisé que dans cette dernière procédure.

Résultats et analyse

Les résultats figurent à l'annexe I et représentent les valeurs moyennes obtenues pour 15 bulbes par parcelle avec quatre répétitions. Les données manuelles sont comparées avec les données obtenues par l'analyse d'images, variété par variété.

Les données obtenues au moyen de l'analyse d'images peuvent être analysées de la même façon que les données manuelles le sont actuellement en vue de déterminer les caractères distinctifs et aux fins d'examen de l'uniformité.

On estime que les données obtenues par l'analyse d'images sont plus exactes que celles obtenues manuellement, mais, point plus important, les caractères indiqués sont ceux qui figurent déjà dans les principes directeurs d'examen de l'UPOV ou la procédure d'examen du Royaume-Uni. Dans le cadre de l'étude réalisée, l'analyse d'images n'est donc rien d'autre qu'une méthode de saisie des données.

La technique de l'analyse d'images fait l'objet actuellement d'une étude plus approfondie qui couvre tous les oignons d'hiver (1987/1988) et tous les oignons à jours longs (1988). A l'avenir, il sera peut-être possible d'introduire d'autres caractères supplémentaires pour les bulbes mais il faudra étudier l'utilité de ces caractères avant qu'on puisse proposer de les inclure dans une quelconque révision des principes directeurs d'examen de l'UPOV.

Ouvrages de référence

P.D. Keefe et S.R. Draper (1988). An automated machine vision system for the morphometry of new cultivars and plant genebank accessions. Plant Varieties and Seeds, 1, 1-11.

S.R. Draper et P.D. Keefe (1989). Machine vision for the characterisation and identification of cultivars. Plant Varieties and Seeds, (à l'impression).

Variété : De Mulhouse type auxaine

UPOV/RU N° Car.	Caractère	Observation manuelle					Analyse d'images				
		Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.	Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.
UPOV 10	Bulbe : diamètre (mm)	80	80	90	84	84	82	81	91	82	84
UPOV 9	Bulbe : hauteur (mm)	103	104	111	102	105	109	112	120	104	111
RU 54	Bulbe : forme du sommet (points)	6	6	6	6	6	7	7	7	6	7
RU 55	Bulbe : forme de la base (points)	6	6	5	5	6	6	6	5	5	6
RU 58	Bulbe : distance entre base et point le plus large (mm)	40	41	42	40	41	46	48	49	43	46
UPOV 11	Bulbe : forme générale (points)	4	4	4	4	4	3	2	3	3	3

Variété : Ailsa Craig

UPOV/RU N° Car.	Caractère	Observation manuelle					Analyse d'images				
		Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.	Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.
UPOV 10	Bulbe : diamètre (mm)	100	108	103	111	106	116	109	106	116	112
UPOV 9	Bulbe : hauteur (mm)	116	125	118	128	122	137	136	127	141	135
RU 54	Bulbe : forme du sommet (points)	5	5	4	5	5	5	5	5	6	5
RU 55	Bulbe : forme de la base (points)	6	6	6	6	6	5	6	6	5	6
RU 58	Bulbe : distance entre base et point le plus large (mm)	55	55	53	53	54	62	63	60	61	62
UPOV 11	Bulbe : forme générale (points)	4	5	5	4	4	4	4	4	4	4

Variété : The Kelsae

UPOV/RU N° Car.	Caractère	Observation manuelle					Analyse d'images				
		Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.	Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.
UPOV 10	Bulbe : diamètre (mm)	111		115	124	120	128		129	127	128
UPOV 9	Bulbe : hauteur (mm)	140		146	157	152	172		171	170	171
RU 54	Bulbe : forme du sommet (points)	6		6	6	6	6		6	6	6
RU 55	Bulbe : forme de la base (points)	7	6	7	6	6	7		7	6	7
RU 58	Bulbe : distance entre base et point le plus large (mm)	68		70	67	69	78		78	75	77
UPOV 11	Bulbe : forme générale (points)	3		3	4	4	3		3	3	3

Variété : Beacon

UPOV/RU N° Car.	Caractère	Observation manuelle					Analyse d'images				
		Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.	Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.
UPOV 10	Bulbe : diamètre (mm)	120	121	108	116	116	124	124	119	124	123
UPOV 9	Bulbe : hauteur (mm)	158	150	135	153	149	172	160	157	174	166
RU 54	Bulbe : forme du sommet (points)	6	5	5	6	6	6	5	6	6	6
RU 55	Bulbe : forme de la base (points)	7	7	7	7	7	8	7	7	7	7
RU 58	Bulbe : distance entre base et point le plus large (mm)	74	69	67	69	70	82	77	76	80	79
UPOV 11	Bulbe : forme générale (points)	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3

Variété : Mammoth - type résultant d'une sélection conservatrice approuvée : Mammoth Improved

UPOV/RU N° Car.	Caractère	Observation manuelle					Analyse d'images				
		Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.	Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.
UPOV 10	Bulbe : diamètre (mm)	121	117	112	109	115		121	117	122	120
UPOV 9	Bulbe : hauteur (mm)	141	133	138	124	134		143	153	143	146
RU 54	Bulbe : forme du sommet (points)	5	4	5	4	4		5	5	5	5
RU 55	Bulbe : forme de la base (points)	7	7	7	7	7		6	7	6	6
RU 58	Bulbe : distance entre base et point le plus large (mm)	64	62	64	64	64		70	74	68	71
UPOV 11	Bulbe : forme générale (points)	4	5	5	4	4		4	3	4	4

Variété : Mammoth

UPOV/RU N° Car.	Caractère	Observation manuelle					Analyse d'images				
		Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.	Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.
UPOV 10	Bulbe : diamètre (mm)	124	123	114	120	120	130	131	119	122	126
UPOV 9	Bulbe : hauteur (mm)	138	143	137	133	138	153	162	151	143	152
RU 54	Bulbe : forme du sommet (points)	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5
RU 55	Bulbe : forme de la base (points)	6	7	7	6	6	6	6	7	6	6
RU 58	Bulbe : distance entre base et point le plus large (mm)	62	65	64	62	63	71	76	73	70	72
UPOV 11	Bulbe : forme générale (points)	5	5	5	5	5	4	3	3	4	4

Variété : Monkston

UPOV/RU N° Car.	Caractère	Observation manuelle					Analyse d'images				
		Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.	Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.
UPOV 10	Bulbe : diamètre (mm)	109	120	115	111	114	125	124	119	117	121
UPOV 9	Bulbe : hauteur (mm)	130	146	143	135	138	154	159	154	150	154
RU 54	Bulbe : forme du sommet (points)	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6
RU 55	Bulbe : forme de la base (points)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
RU 58	Bulbe : distance entre base et point le plus large (mm)	60	64	62	59	61	68	72	68	68	69
UPOV 11	Bulbe : forme générale (points)	4	4	4	4	4	3	3	3	4	3

Variété : Ailsa Craig - type résultant d'une sélection conservatrice approuvée :
Crosslings Seedling

UPOV/RU N° Car.	Caractère	Observation manuelle					Analyse d'images				
		Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.	Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.
UPOV 10	Bulbe : diamètre (mm)	103	102	98	106	102	104	103	101	112	105
UPOV 9	Bulbe : hauteur (mm)	113	114	115	116	114	118	121	124	129	123
RU 54	Bulbe : forme du sommet (points)	4	4	5	4	4	5	5	5	5	5
RU 55	Bulbe : forme de la base (points)	6	5	6	6	6	6	5	6	6	6
RU 58	Bulbe : distance entre base et point le plus large (mm)	53	50	52	54	52	58	56	58	61	58
UPOV 11	Bulbe : forme générale (points)	5	5	5	5	5	4	4	3	4	4

Variété :
Lancastrian

UPOV/RU N° Car.	Caractère	Observation manuelle					Analyse d'images				
		Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.	Répl	Rép2	Rép3	Rép4	Moy.
UPOV 10	Bulbe : diamètre (mm)	106	111	86	100	101	111	116	92	105	106
UPOV 9	Bulbe : hauteur (mm)	111	114	87	108	105	118	124	99	116	114
RU 54	Bulbe : forme du sommet (points)	3	2	3	3	3	4	4	4	4	4
RU 55	Bulbe : forme de la base (points)	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6
RU 58	Bulbe : distance entre base et point le plus large (mm)	51	52	47	53	51	59	60	51	60	58
UPOV 11	Bulbe : forme générale (points)	6	6	5	6	6	4	5	4	4	4

EXPOSE UPOV - 6 JUILLET 1988

Présentation des différentes applications de l'électrophorèse
au Laboratoire de Biochimie du G.E.V.E.S., pour l'inscription des
variétés et la certification des semences

INTRODUCTION -

L'électrophorèse est une technique très utilisée pour toute étude concernant la génétique. Elle permet de séparer les protéines qui sont l'expression première des gènes.

Les protéines contenues dans un extrait frais sont mises à migrer dans un gel (amidon ou polyacrylamide) soumis à un champ électrique. Les protéines qui sont des molécules chargées peuvent être séparées selon leur charge électrique et leur taille. Une autre méthode, l'électrophorèse en SDS permet de séparer les protéines uniquement selon leur taille.

Plusieurs espèces sont étudiées : Le Maïs, Le Pois, Le Blé, Le Ray-grass et Le Soja.

MAIS -

Nous pratiquons l'électrophorèse des isoenzymes sur gel d'amidon, sur des coléoptiles de plantules âgées de 5 jours, comme l'ont décrit CARDY, GOODMAN et STUBER.

19 loci enzymatiques sont analysés dont 16 sont polymorphiques. Pour chaque locus, on connaît le déterminisme génétique ainsi que la localisation chromosomique.

Jusqu'à présent, l'analyse isoenzymatique a été faite sur 330 lignées : 60 % peuvent être identifiées de façon unique. Pour 16 % des lignées, on observe une variabilité résiduelle.

Dans le cadre des études de D.H.S., l'analyse isoenzymatique est utilisée pour vérifier l'exactitude de la formule parentale d'un hybride. Selon les types d'hybrides (simples et 3 voies), le nombre d'individus testés est différent (tableau 1). P est la probabilité de ne détecter qu'un génotype au lieu de deux possibles.

Une autre application est le test de pureté d'hybride des lots commerciaux. Cent grains sont analysés par lot et pour chaque hybride ; les loci enzymatiques sont choisis selon le "fingerprint" des lignées parentales : ceux pour lesquels la contribution allélique des lignées parentales n'est pas la même. Une étude antérieure menée sur un hybride

et qui sera poursuivie ultérieurement sur d'autres hybrides a montré une bonne concordance entre le pourcentage d'impuretés estimé avec l'électrophorèse et celui estimé sur des caractères morphologiques. La bibliographie fournit également la description de travaux aboutissant aux mêmes conclusions.

Une utilisation future mais déjà mise en application pour un cas particulier, est la distinction des lignées parentales pour l'inscription des hybrides.

BLE -

Les variétés du Catalogue français sont décrites par leur diagramme électrophorétique des gliadines. Environ 60 mobilités de bandes ont été répertoriées, ce qui permet l'identification de 72 variétés sur les 78 décrites par un électrophorégramme caractéristique.

Chaque année, le diagramme-type des variétés nouvellement inscrites est établi, et la clé d'identification est remise à jour. L'homogénéité sur 50 grains est également testée. Si une variété présente deux diagrammes-types, le sélectionneur est invité à choisir un seul type.

Bien que les caractères électrophorétiques ne soient pas reconnus officiellement dans les études de D.H.S., l'électrophorèse peut constituer une aide complémentaire pour des variétés montrant de très faibles différences morphologiques.

Essentiellement, l'électrophorèse est utilisée pour l'identification d'une variété ou d'un mélange de variétés.

Une autre application concerne la pureté des hybrides de blé (recherche des graines autofécondées). La méthode utilisée est l'électrophorèse en SDS des protéines de réserve qui permet la séparation des sous-unités de gliadines et de gluténines. Le déterminisme génétique des sous-unités de haut poids moléculaire de gluténines est connu et permet de prévoir l'électrophorégramme hybride d'après ceux des parents.

POIS -

Huit loci enzymatiques polymorphes et le polymorphisme des protéines de réserve permettent d'identifier les variétés françaises de Pois protéagineux. Sur les 28 variétés analysées, 24 peuvent être distinguées de façon unique.

Pour l'inscription, l'électrophorèse n'est pas prise en compte mais est une aide à la décision, en complément des caractères morphologiques (cas de MAXI, CALYPSO).

La principale utilisation est le test de pureté des lots de semences pour la certification. 80 graines sont analysées, ce qui permet de détecter un taux d'impuretés de 4 % avec un risque de 5 %. Ce contrôle effectué a posteriori, va très prochainement être utilisé a priori, avant le semis pour effectuer un premier tri des lots.

O R G E

Les hordéines de l'orge ont été étudiées pour permettre l'identification des variétés à partir de la graine (problème des malteurs notamment). L'électrophorèse (gel d'acrylamide, méthode SDS) donne 4 zones bien séparées A à D. La zone A n'est pas interprétée ; il reste les zones B, C et D pour lesquelles on observe 5, 20 et 20 types respectivement sur le matériel étudié (environ 250 variétés inscrites sur le catalogue européen).

Ces résultats ont permis de classer les 250 variétés en 80 groupes ajoutant au pouvoir de distinction des caractères morphologiques seuls.

D'autres méthodes biochimiques (isozymes, RFLP) pourront améliorer les résultats. Dès à présent, des applications possibles sont :

- utilisation des caractères électrophorétiques pour la description des variétés
- détection d'hétérogénéités ou impuretés dans des lots de semences

RAY-GRASS

Le ray-grass étant une plante allogame, la variabilité intracultivars est importante et il est parfois difficile de distinguer deux cultivars l'un de l'autre. Les caractères électrophorétiques peuvent dans ce cas rendre de grands services. 3 systèmes enzymatiques (PGI, ACP, IDH) sont utilisés en routine au laboratoire de biochimie du G.E.V.E.S. pour les applications suivantes :

- D.H.S. : distinction, comparaisons de variétés entre elles
- Contrôle : vérification de la composition de mélanges
déttection de dérive génétique au cours de la multiplication des semences
déttection de lots aberrants
- Proposition de plan de semis a priori.

Les caractères électrophorétiques sont donnés sur 100 individus par variété. D'autres renseignements peuvent être obtenus grâce à ces résultats : structure génétique des variétés (pourcentage d'hétérozygotie, fréquence de di, tri et tétragénique chez les tétraploïdes), distinction entre ray-grass anglais et italiens, détection de tétraploïdes dans un lot de diploïdes, etc...

S O J A

Un certain nombre de systèmes enzymatiques (20) ont été testés pour la description des variétés du catalogue français. 9 ont donné de bons résultats. Les autres étaient, soit monomorphes sur notre échantillonnage, soit difficiles d'utilisation. D'autre part, l'utilisation des protéines totales de la graine a révélé aussi du polymorphisme, quoique faible.

Les valeurs obtenues sur les enzymes et les protéines totales combinées ont permis d'établir une clé de détermination des variétés du catalogue français ne laissant que 3 couples indifférenciés.

Un autre résultat des électrophorèses sur soja est de montrer un manque d'homogénéité des variétés : un tiers des variétés du catalogue présente 2 voire 3 types différents.

Enfin, les analyses électrophorétiques étendues à des variétés étrangères montrent une variabilité plus importante, en accord avec ce qu'on attend vu les bases génétiques étroites de la sélection française.

APPLICATIONS DE L'ELECTROPHORESE1) Amélioration des plantes :

- . Description du patrimoine génétique
Estimation de distances génétiques
- . Vérification précoce de la réussite d'une hybridation ou d'une autofécondation forcée
- . Détection précoce d'un caractère intéressant le sélectionneur dans le cas d'une liaison avec un marqueur électrophorétique
- . Estimation de la perte de variabilité au cours des générations dans les banques de gènes dynamiques

2) D.H.S. :

- . Caractère supplémentaire pour l'identification ou la distinction
- . Vérification de l'homogénéité des variétés candidates

3) Contrôle :

- . Identification de lots de semences
- . Vérification de formules d'hybrides
- . Détection d'impuretés

CONCLUSION -

Dans beaucoup d'applications pour l'inscription variétale et la certification des lots de semences, l'électrophorèse a l'avantage d'être plus rapide ; elle peut éviter des implantations (vérification de la formule parentale des hybrides de Maïs), ou permettre une optimisation de la mise en place d'essais pour comparer des variétés. De plus, le délai de réponse est très court par rapport aux tests classiques.

Comme les marqueurs électrophorétiques sont indépendants des conditions environnementales, les collections de références des différents pays pourraient être facilement décrites et des bases de données communes pourraient être établies.

Pour conclure qu'une variété est nouvelle, il est important de définir une distance génétique minimale. Pour cet objectif, l'analyse isoenzymatique semble être un outil qui convient parfaitement, parce que :

- . le déterminisme génétique des loci enzymatiques est souvent connu ou peut l'être assez facilement (déterminisme mendélien monogénique).
- . ainsi que leur localisation chromosomique.

Cette information génétique permet de bien décrire la variabilité génétique et de calculer des distances génétiques. Il serait possible de pondérer ces distances selon la distribution des différents loci sur les chromosomes.

MAIZE

OFFSPRING

No OF INDIVIDUALS

Single hybrid

100%

2

Three - Way hybrid

$$\left(\begin{array}{c} a \\ - \\ a \end{array} \times \begin{array}{c} a \\ - \\ a \end{array} \right) \times \begin{array}{c} b \\ - \\ b \end{array}$$



100%

$$\begin{array}{c} a \\ - \\ b \end{array}$$

2

$$\left(\begin{array}{c} a \\ - \\ a \end{array} \times \begin{array}{c} b \\ - \\ b \end{array} \right) \times \begin{array}{c} a \\ - \\ a \end{array}$$



50%

$$\begin{array}{c} a \\ - \\ b \end{array},$$

6

50%

$$\begin{array}{c} a \\ - \\ a \end{array}$$

$$\left(\begin{array}{c} a \\ - \\ a \end{array} \times \begin{array}{c} b \\ - \\ b \end{array} \right) \times \begin{array}{c} c \\ - \\ c \end{array}$$



50%

$$\begin{array}{c} a \\ - \\ c \end{array},$$

6

50%

$$\begin{array}{c} b \\ - \\ c \end{array}$$

$$\text{Probability} = \left(\frac{1}{2} \right)^n + \left(\frac{1}{2} \right)^n = 2 \left(\frac{1}{2} \right)^n$$

For n = 5

P = 0,06

n = 6

P = 0,03

n = 7

P = 0,015

[L'annexe IX suit]

0208

TC/XXV/4
Annexe VIII, page 8

TABLEAU 1

Extrait du rapport de la dix-septième session
du Groupe de travail technique sur les plantes agricoles
(paragraphe 21 à 30 du document TWA/XVII/9)

Application de l'électrophorèse au blé

21. M. R.J. Cooke (Royaume-Uni) a présenté un document de synthèse sur l'application de la technique de l'électrophorèse dans le cadre d'examens réalisés sur le blé; ce document, qui a été distribué au cours de la session, est reproduit à l'annexe III du présent rapport. Il a été rédigé de façon à cerner les problèmes soulevés à la dernière session du Comité technique (voir les paragraphes 37 et 38 du document TC/XXIII/6). M. Cooke a donné les indications ci-après :

i) Les résultats de l'électrophorèse sont indépendants des conditions du milieu dans la mesure où le même profil protéique est obtenu. Les travaux en laboratoire sont inévitablement fonction de la qualité des produits chimiques employés et de la conception du matériel utilisé, mais l'incidence de ces facteurs peut être éliminée à condition de définir avec précision la méthode, l'origine des produits chimiques et du matériel.

ii) L'application de l'électrophorèse pour l'examen DHS peut servir à comparer le "pouvoir discriminant" des caractères. Il est nécessaire de vérifier si les caractères permettent de détecter l'hétérogénéité au sein d'une variété. En tout état de cause, la méthode de l'électrophorèse doit être rigoureusement définie.

iii) Il a été fait état pour de nombreuses espèces de l'application de la technique de l'électrophorèse aux protéines et aux enzymes à des fins d'identification. L'électrophorèse des protéines de réserve de la graine permet de distinguer très efficacement les variétés de céréales autogames. Cette technique pourrait aussi être appliquée assez efficacement aux espèces à multiplication végétative. Toutefois, les espèces allogames posent davantage de problèmes sur le plan de la distinction des variétés. On trouvera aux pages 3 à 5 de l'annexe III la liste des espèces pour lesquelles l'application de l'électrophorèse a été étudiée. Cette liste a été fournie par M. Cooke après la session.

22. Mmes M. Greneche et J. Lallemand (France) ont expliqué en détail les études qu'elles ont réalisées sur l'application de l'électrophorèse au maïs et au blé ainsi qu'à l'orge, au soja et au ray-grass. On trouvera à l'annexe IV du présent rapport un résumé de leurs explications. Selon l'espèce considérée, ces études ont pour objet l'éventuelle utilisation de l'électrophorèse pour : le contrôle des variétés; la vérification des lots de semences; faciliter l'enregistrement; l'examen de la pureté; l'identification; la détection de mélanges; la vérification des lignées endogames afin de déterminer s'il s'agit des parents authentiques; la prévention des mutations génétiques; la stabilité; l'examen préliminaire destiné à assurer des conditions générales optimales pour l'examen en plein champ; le groupement des variétés; distinguer des lignées parentales d'hybrides; distinguer plus facilement les variétés. Toujours selon l'espèce considérée, une plus grande importance sera accordée aux protéines de la graine ou aux enzymes.

23. Les documents précités et les rapports présentés ont donné lieu à un débat approfondi sur les différentes méthodes d'électrophorèse et leur éventuelle utilisation aux fins de la protection des obtentions végétales. Les conclusions de ce débat peuvent être résumées de la façon ci-après :

24. Aspects techniques.- Il semble possible de résoudre sans grandes difficultés les problèmes techniques que pose la méthode d'électrophorèse utilisée en vue de déterminer le caractère distinctif. Les résultats obtenus sont très proches les uns des autres mêmes si les gels sont différents selon le matériel et les produits chimiques utilisés. Une solution doit être trouvée espèce par espèce. En ce qui concerne le blé, la méthode choisie par l'Association internationale d'essais de semences (ISTA) semble être une méthode à la fois bonne, stable et reproductible pour les protéines de réserve de la graine. Toutefois, afin de pouvoir arriver à une méthode convenue aux fins de la protection des obtentions végétales, il conviendrait d'harmoniser à cet égard des paramètres supplémentaires et d'harmoniser la nomenclature des bandes en leur donnant des numéros convenus. Par ailleurs, la question de l'homogénéité devrait faire l'objet d'une étude plus approfondie.

25. Aspects non techniques.- Le peu d'empressement manifesté en ce qui concerne l'utilisation de l'électrophorèse pour distinguer les variétés aux fins de la protection des obtentions végétales n'est pas tant imputable aux insuffisances de cette technique mais aux conséquences qu'aurait l'utilisation de cette technique pour l'ensemble du système de protection des obtentions végétales. Le principal obstacle réside dans la possibilité de détecter de très faibles différences ce qui, pour le cas où elles seraient acceptées, pourraient anéantir le travail de sélection ou aboutir à la dégradation de l'ensemble du système de protection des obtentions végétales. Il ne suffit donc pas de disposer d'une méthode satisfaisante et sûre (comme la méthode de l'ISTA pour le blé) qui réponde aux besoins du secteur des semences; l'UPOV doit arriver à un accord sur d'autres éléments, en particulier sur la façon d'interpréter les résultats et sur les différences qui doivent être considérées comme suffisantes pour justifier un titre de protection séparé juridiquement défendable ainsi que sur la différence que l'obtenteur sera capable de conserver.

26. Définition de la différence nécessaire pour établir le caractère distinctif.- Le groupe de travail a convenu que la tâche la plus importante et la plus difficile consistait à interpréter les résultats et à définir la différence nécessaire. Il a convenu que les différences de quantité dans une bande donnée n'étaient pas suffisantes, pas plus que l'absence ou la présence d'une seule bande, par exemple dans le cas du blé. Tout dépend de la connaissance des éléments génétiques pour chaque bande. Des allèles compteront pour certains groupes de bandes. Ainsi, avant de pouvoir établir une différence déterminée, par exemple un ensemble convenu de bandes, il conviendrait de connaître la différence génétique indiquée par cet ensemble. Cela nécessitera des études assez détaillées. L'électrophorèse ne pourra être utilisée pour la protection des obtentions végétales que si elle donne une mesure objective d'une différence génétique suffisante.

27. Remplacement d'autres caractères.- Ce ne sont pas tous les caractères traditionnels figurant dans les principes directeurs d'examen de l'UPOV qui permettent véritablement de bien mesurer la différence génétique. Certains d'entre eux présentent une plus forte variation que d'autres obtenus au moyen de l'électrophorèse. Une fois que les autres critères précités sont réunis, des caractères secondaires d'une importance discutable qui figurent dans les principes directeurs d'examen actuels pourraient être remplacés par des caractères obtenus au moyen de l'électrophorèse.

28. Point de vue des obtenteurs.- Avant de recourir à l'électrophorèse pour distinguer des variétés aux fins de la protection des obtentions végétales, il conviendrait également d'entendre le point de vue des obtenteurs. Les obtenteurs de graminées participant à la session se sont prononcés contre le recours à l'électrophorèse pour distinguer des variétés, tout au moins pour le moment, et ce bien que, pour les graminées, les caractères distinctifs valables fassent défaut. D'autres obtenteurs présents ont préféré les caractères de résistance à ceux obtenus au moyen de l'électrophorèse, malgré les examens plus compliqués et plus coûteux que cela sous-entend.

29. Conclusion.- Le groupe de travail a conclu que l'électrophorèse est utile en tant que technique d'examen des caractères distinctifs des variétés s'il peut être garanti que des différences minimales suffisantes entre les variétés sont maintenues soit au moyen d'une définition claire et nette de la méthode utilisée et de l'interprétation des résultats eux-mêmes soit d'une autre manière. La façon d'arriver à une garantie de ce genre varie selon le cas et l'espèce considérés. En ce qui concerne les variétés d'espèces qui doivent passer avec succès un examen VCU avant de pouvoir être commercialisées, cet examen réduit déjà considérablement le risque d'aboutir à des différences trop petites.

30. Proposition à l'intention du Comité technique.- Ayant pris note des études réalisées dans les différents Etats membres en ce qui concerne l'électrophorèse et conscient du fait que, dans quelques années, il ne sera plus possible de refuser de recourir à l'électrophorèse pour examiner les variétés afin d'en déterminer le caractère distinctif, et afin d'éviter que divers Etats membres élaborent des méthodes et des principes d'interprétation des résultats différents, le groupe de travail a proposé au Comité technique que l'UPOV étudie cette question de façon plus approfondie et lui accorde une plus grande priorité. Une possibilité consisterait à créer un groupe de travail technique supplémentaire sur les techniques nouvelles (voir aussi le paragraphe 35), qui traiterait de l'harmonisation de l'application de l'électrophorèse aux fins de l'examen DHS et essaierait d'élaborer un système concerté d'interprétation des résultats en matière d'écarts minimaux. Toutefois, dans l'intervalle, les Etats membres ne devraient pas utiliser les caractères obtenus au moyen de l'électrophorèse en tant que seuls et uniques caractères distinctifs pour délivrer un titre de protection.

[Fin de l'annexe IX et du document]