



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agreed by the Council of UPOV, only documents that have been adopted by the Council of UPOV and that have not been superseded can represent UPOV policies or guidance.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 VARIETESdocument établi par le Bureau de l'UPOV

1. A la suite des discussions sur les méthodes, techniques et matériel nouveaux pour l'examen des variétés qui ont eu lieu au sein du Comité technique, le Bureau de l'UPOV a établi le document TC/XXV/4, qui a été présenté aux groupes de travail techniques pour examen.

2. Ce document explique brièvement les deux décisions qui ont été prises, soit : i) dresser un inventaire des espèces et des nouvelles méthodes en rapport avec l'application des nouvelles techniques précitées et ii) élaborer des propositions clairement formulées sur la façon d'intégrer les nouvelles techniques.

3. En annexe au document TC/XXV/4, le Bureau de l'UPOV a joint les renseignements ci-après :

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).
- 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).

4. L'annexe I du présent document consiste en une mise à jour des renseignements ci-dessus communiquée par l'Afrique du Sud.

5. Il est rendu compte des résultats des travaux des différents groupes de travail techniques dans les documents ci-après :

TWA/XVIII/9 Prov., paragraphes 8 à 14
TWC/VII/20 Prov., paragraphes 29 à 32
TWO/XXII/8 Prov., paragraphes 20 et 21
TWV/XXII/19 Prov., paragraphes 17 à 22

Ces travaux peuvent être résumés comme suit :

Electrophorèse

Débat général

6. Le TWA a pris note des trois utilisations possibles de l'électrophorèse exposées dans le document TWA/XVIII/7; cette technique sert à identifier les variétés, aide à prendre des décisions en ce qui concerne les caractères distinctifs et permet de trancher en la matière. Il a également pris note de l'annexe V du document TC/XXV/4 sur "l'intégration de l'électrophorèse dans les principes directeurs d'examen de l'UPOV", contenant des propositions pour le ray-grass. Il a insisté sur la nécessité d'adopter des méthodes et des caractères normalisés et des normes relatives à la distinction et aux écarts minimaux, de définir la procédure à suivre pour les essais à réaliser dans les différents Etats en vue de vérifier les résultats, de prendre en considération le critère d'homogénéité pour les caractères électrophorétiques et d'élaborer une base de données authentifiées pour la collection de variétés notoirement connues. Il a accepté la proposition qui lui avait été faite de n'étudier pour le moment que l'électrophorèse sur gel d'amidon pour quatre systèmes isoenzymatiques, à savoir la phosphoglucoisomérase (PGI), la phosphatase acide (ACP), l'isocytase-déshydrogénase (IDH) et la transaminase glutamique oxalique (GOT), et l'application de la méthode PAGE sur des globulines de semences. Il faudrait toutefois commencer par la PGI. Afin d'utiliser au mieux le peu de temps dont ils disposent, les pays devraient cependant axer leurs efforts en premier lieu sur les céréales.

7. Le TWV a pris note du document TWV/XXII/10 qui dresse un inventaire des méthodes étudiées jusqu'ici par les Etats membres. Il a examiné l'intérêt, la nécessité et les conséquences possibles d'un recours aux caractères électrophorétiques comme caractères de distinction des variétés potagères. La méthode n'est actuellement qu'à l'étude et n'est pas utilisée pour distinguer une variété d'une autre. Selon plusieurs experts, en acceptant des différences trop faibles (une différence d'une bande) comme suffisantes pour une variété modifiée, on risque de remettre en question la protection d'une variété existante. Actuellement, certains experts considèrent aussi qu'il ne faut pas faire preuve de précipitation à l'égard des nouvelles méthodes, la distinction des plantes potagères en présence de caractères traditionnels suffisants n'ayant posé aucun problème jusqu'ici. Il a également été souligné qu'il n'y a aucune corrélation entre une bande électrophorétique donnée et un changement morphologique ou une amélioration de la variété. Il faudrait en fait demander aux déposants d'indiquer l'avantage de la variété qu'ils proposent sur une autre variété qui existe déjà et qui n'en diffère que légèrement.

8. Les obtenteurs de plantes potagères qui ont suivi les travaux du TWV ne sont pas encore en mesure de dire s'ils se prononceront pour ou contre un recours à l'électrophorèse pour distinguer des plantes potagères, étant donné que pour le moment ils n'utilisent pas eux-mêmes ces méthodes nouvelles.

9. Le TWO a été le cadre d'un échange d'idées sur les possibilités d'utilisation des techniques nouvelles pour les espèces ornementales. D'après l'expérience des experts, il y aurait très peu de possibilités. Afin de faire le point de la situation, les experts des Pays-Bas établiront une liste d'observations générales et de tous les arguments plaidant pour et contre l'utilisation de l'électrophorèse, de l'analyse d'images et de la sonde ADN aux fins de la distinction des variétés, liste qui sera diffusée aux membres du groupe de travail pour qu'ils la complètent et pour observations.

Application aux céréales

10. Le TWA a pris note en l'approuvant du document TWA/XVIII/5 qui rend compte des principaux points convenus à propos de l'électrophorèse pendant la réunion du sous-groupe sur les céréales qui s'est tenue à Hanovre (République fédérale d'Allemagne), en avril 1989. Ce sous-groupe recommande d'ajouter dans les principes directeurs d'examen du blé, de l'orge et de l'avoine les caractères obtenus au moyen de l'électrophorèse comme caractères supplémentaires. Ces caractères permettraient a) de ramener la durée des tests DUS à une année et b) de réduire le nombre des caractères figurant dans les principes directeurs d'examen actuels. La prochaine réunion du sous-groupe devrait se tenir à Wageningen (Pays-Bas), le 14 mai 1990, soit la veille de la prochaine session de la TWA. Il est prévu d'inviter également à cette occasion des experts des organisations professionnelles à participer au débat sur l'inclusion des caractères électrophorétiques dans les principes directeurs d'examen du blé, de l'orge et de l'avoine.

11. Les caractères obtenus au moyen de l'électrophorèse devraient être inclus dans les principes directeurs d'examen du blé, de l'orge et de l'avoine comme caractères nouveaux sans astérisque. Chaque bande devrait donc être considérée comme un caractère distinct. Toutefois, seules devraient être acceptées les bandes qui remplissent les conditions normales d'acceptation valables pour tout autre caractère nouveau et dont l'absence ou la présence ressort clairement. Les protéines et les méthodes admises devraient être les suivantes :

<u>espèces</u>	<u>protéines</u>	<u>méthodes</u>
orge	hordéines B, C et D	de préférence SDS-PAGE, sinon : PAGE pH 3,1
blé	gliadines, glutélines	PAGE pH 3, 1, SDS-PAGE
avoine	prolamines	PAGE pH 3,1

12. Des renseignements plus détaillés figurent dans les annexes II et III du présent document qui ont la teneur suivante :

Annexe II : (Résumé des recommandations relatives à l'inclusion de l'électrophorèse dans les principes directeurs d'examen du blé, de l'orge et de l'avoine, avec étude des méthodes possibles d'harmonisation des systèmes d'interprétation du gel);

Annexe III : The protocol for the ISTA acid polyacrylamide gel electrophoresis method (Protocole de la méthode ISTA de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide acide) établi par M. Cooke (GB) (en anglais seulement).

13. Le TWA a décidé que pour l'utilisation des caractères électrophorétiques, il conviendrait d'appliquer la norme d'homogénéité de 3 sur 100 lorsqu'on utilise un tel caractère comme seul et unique caractère de distinction pour la variété proposée en cause. Si les caractères électrophorétiques ne sont pas nécessaires pour distinguer une variété proposée déterminée, il conviendrait d'appliquer pendant une période transitoire le double de la tolérance (6 sur 100).

Application au maïs

14. Le TWA a noté que des études sont menées en France en vue d'examiner la possibilité d'inclure le polymorphisme enzymatique du maïs dans les études sur la distinction des variétés nouvelles et les différences de pondération des caractères selon les informations concernant leur déterminisme génétique.

Application aux graminées

15. Le TWA a pris note de l'annexe VI du document TC/XXV/4 sur les "Résultats de l'utilisation de l'électrophorèse pour Poa pratensis L.". Il a insisté sur la méthode de la recherche du point isoélectrique appliquée aux graines et la méthode PAGE appliquée aux plantules. Toute cette étude est encore au stade expérimental et sera poursuivie. En ce qui concerne les graines, les mélanges posent des problèmes, et pour les plantules il faudra mettre au point un bon système d'échantillonnage.

Application aux plantes potagères (asperge, pois, pastèque)

16. Le TWV a finalement convenu de faire quelques études précises pour en savoir plus sur une utilisation éventuelle de l'électrophorèse. Il a choisi l'asperge, le pois et la pastèque comme objets de cette étude. M. Habben (DE) dirigera l'étude sur l'asperge, M. Brand (FR) celle sur le pois, et M. Tabata (JP) (ou un autre expert du Japon) celle sur la pastèque. Le Bureau de l'UPOV a rédigé une circulaire (U 1473) qui invite tous les Etats membres à prendre part à cette étude et à fournir davantage de renseignements sur chacune de ces espèces.

Traitement des données par ordinateur

17. Le TWC a pris note du document TWC/VII/2 sur l'analyse des données électrophorétiques par ordinateur, soulignant qu'il conviendra d'harmoniser la codification des bandes, que même les substances chimiques devront être normalisées, qu'une seule différence ne suffira pas à distinguer des variétés, que la décision concernant la différence minimale dépend de chaque caractère et des connaissances sur ses effets héréditaires (polygénique ou oligogénique), et qu'il conviendra d'harmoniser les bases de données et que le domaine minimum à inclure dans ces bases devra faire l'objet d'un accord.

18. Le TWC a pris note du document TWC/VII/15 sur les programmes d'ordinateur permettant le stockage et l'analyse des données électrophorétiques par le Service des variétés végétales de la République fédérale d'Allemagne. Il a mis en évidence les trois décisions qui doivent déboucher sur la configuration des bandes, à savoir l'identification et la codification de ces bandes, la structure des données et les fonctions du programme. Pour la poursuite des travaux, il faudra avoir d'autres connaissances, identifier les bandes et convenir d'une codification harmonisée.

19. Le TWC s'est interrogé sur la question de savoir si le traitement des données électrophorétiques doit se faire à part ou seulement dans le cadre du traitement des données en général et s'il faut créer spécialement un petit système en se fondant sur les connaissances actuelles ou attendre de trouver une solution globale. Il a finalement été convenu de créer un groupe restreint dirigé par M. Grégoire (FR) et composé de Mme Campbell (GB),

M. Laidig (DE) et M. Van der Heijden (NL), qui préparera pour la prochaine session du TWC un projet de base de données électrophorétiques, étant entendu que ce projet ne devra pas empêcher l'adoption d'une approche globale.

Méthodes autres que l'électrophorèse

20. Le TWA a convenu qu'en raison du recours à l'électrophorèse et du fait que le nombre de caractères morphologiques est actuellement suffisant, il n'est pas nécessaire d'appliquer l'analyse d'images aux céréales. Il faut attendre d'avoir davantage de connaissances pour réexaminer la possibilité de recourir à cette analyse.

21. Le TWV a pris note du document TWV/XXII/7 qui rend compte, dans sa première partie, des résultats de l'application de l'analyse d'images à certaines variétés d'oignons. Il a souligné que pour l'instant la méthode ne sera utilisée qu'en vue d'observer les caractères figurant déjà dans les principes directeurs. Toutefois, à l'avenir, certains caractères nouveaux pourront également être proposés. Ce groupe de travail recevra un autre rapport sur d'autres résultats pendant sa prochaine session.

22. Le TWC a pris note en particulier des annexes IV et VII du document TC/XXV/4. Il a également pris note du rapport des Pays-Bas sur le nouveau programme informatique et commercial d'analyse d'images acquis récemment (voir également l'annexe IV du document TWC/VII/20). M. Bar Tel (IL) a signalé qu'il a été mis fin aux études sur l'utilisation de l'analyse d'images pour les oeillettes dans son pays, ce type d'analyse étant jugé trop onéreux par rapport à son éventuelle application. Il est difficile d'apporter soi-même des modifications, d'où la nécessité de payer chaque fois.

23. Le TWC a noté que l'ISTA envisage de tenir son quatrième colloque international sur l'identification variétale à Ames, Iowa (Etats-Unis), du 12 au 18 août 1990; ce colloque portera sur l'utilisation de nouvelles méthodes pour l'examen des variétés.

[Trois annexes suivent]

Monsieur le vice-secrétaire général
de l'UPOV
34 chemin des Colombettes
Genève 20 (SUISSE)

COMITE TECHNIQUE : TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

Monsieur,

Les informations ci-après visent à mettre à jour le document TC/XXV/4 :

1. L'Afrique du Sud mène actuellement des études d'identification appliquées sur les tournesols en utilisant des protéines de réserve de la graine, la méthode SDS-Page et/ou la méthode Page, pH 6 à 8,9.
2. Des essais sont prévus ou sont déjà en cours à des fins d'identification sur une petite échelle en ce qui concerne le soja, le chou, le haricot et le sorgho avec les techniques précitées.

Le directeur

[L'annexe II suit]

L'UTILISATION DE L'ELECTROPHORESE POUR L'EXAMEN DU BLE, DE L'ORGE ET
DE L'AVOINE AUX FINS DE DISTINCTION

Ce document résume les principales recommandations faites à ce sujet par le Groupe de travail technique sur les plantes agricoles, à la suite de la réunion qui s'est tenue à Belfast en juin 1989. Ce groupe a été conseillé par un sous-groupe spécial sur les céréales qui s'était réuni à Hanovre en avril 1989.

1. L'électrophorèse devrait être incluse comme caractère sans astérisque dans les principes directeurs révisés d'examen du blé, de l'orge et de l'avoine.
2. Les protéines à examiner et les méthodes utilisées devraient être les suivantes :

Pour le blé : soit la méthode PAGE acide pour les gliadines
soit la méthode SDS-PAGE pour les glutélines (sous-unités de glutélines)

Pour l'orge : soit la méthode SDS-PAGE
soit la méthode PAGE acide des hordéines B, C et D

Pour l'avoine : la méthode PAGE acide pour les avénines (prolamines).

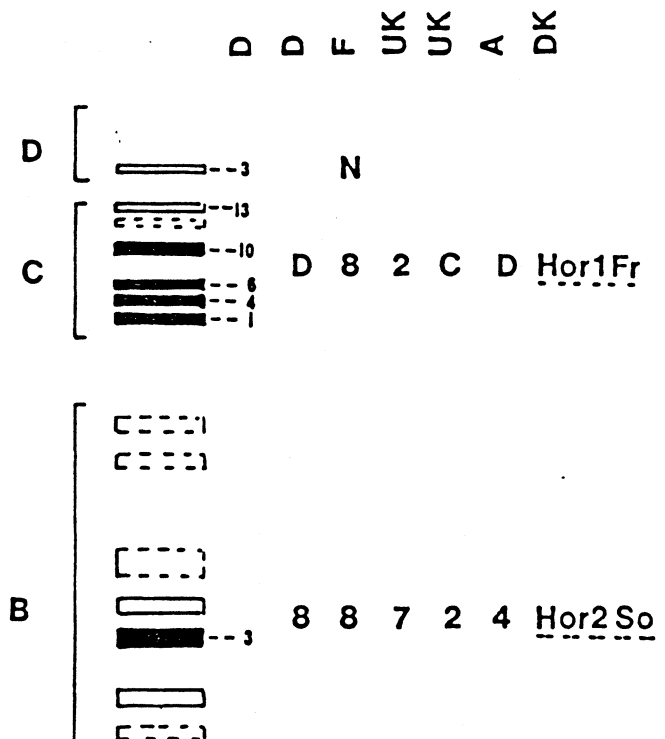
La méthode PAGE acide devrait être celle adoptée comme méthode de référence par l'Association internationale d'essais de semences (voir annexe; voir aussi Seed Sci. & Technol. 15, 555-575, 1987). Le protocole pour la méthode SDS-PAGE reste à définir (la France a accepté de soumettre un projet pour examen à d'autres Etats membres).

3. L'interprétation de l'électrophorégramme des protéines devrait être faite selon une méthode qui est actuellement élaborée par la France, la RFA, le Royaume-Uni, les Pays-Bas et l'Espagne. Pour l'instant, les Etats membres ont échangé des listes de variétés de blé, d'orge et d'avoine. La RFA a fourni aux autres pays des semences des variétés de référence utilisées par le "Bundessortenamt" (service des variétés végétales) pour définir les électrophorégrammes du blé et de l'orge; le Royaume-Uni a fait de même pour le système utilisé par le NIAB pour l'orge. Les Etats membres collaborateurs doivent analyser les variétés de référence pour déterminer si elles comprennent toutes les bandes ou groupes de bandes actuellement reconnus dans leurs propres collections. Les informations sur les systèmes de classement et sur les variétés de référence feront l'objet d'un échange qui devrait s'achever vers la fin du mois de septembre. Les objectifs de cette collaboration sont les suivants :
 - i) essayer de mettre au point un système harmonisé pour l'interprétation et la nomenclature des bandes de protéines pour les trois espèces;
 - ii) faire en sorte que le système harmonisé englobe toutes les configurations de bandes nécessaires pour inclure toutes les variétés actuellement étudiées dans les différents Etats membres;
 - iii) constituer une collection de variétés de référence comprenant toutes les bandes ou tous les groupes de bandes de protéines appropriés.

3.1 Exemple - Harmonisation des systèmes d'interprétation pour les variétés d'orge.

On peut séparer chez l'orge par électrophorèse trois groupes distincts de hordéines : les hordéines D, C et B par ordre croissant de mobilité. Les gènes de ces groupes de protéines se trouvent dans trois loci distincts mais liés entre eux. On peut donc considérer que les diagrammes électrophorétiques des hordéines D, C et B correspondent à des allèles dans ces loci. Les laboratoires de différents pays ont conçu et adopté différents systèmes de nomenclature pour ces configurations (allèles). Prenons, par exemple, la variété Igri. Dans le système utilisé au NIAB (Royaume-Uni), la composition hordéique de cette variété est désignée par 2.7, ce qui veut dire que la composition en hordéines D et C est caractéristique du groupe arbitrairement appelé groupe 2, et que la composition en hordéines B est caractéristique du groupe 7. C'est sur cette même base que d'autres laboratoires ont désigné les hordéines de l'Igri comme étant des hordéines C2, D6, D4, NC8B8 ou Hor 1 Fr/Hor 2 So. Le Bundessortenamt (RFA) a conçu un système légèrement différent qui décrit les différentes bandes de hordéines D, C et B comme étant soit présentes (9) soit absentes (1), tout en reconnaissant toujours l'existence de groupes de bandes. C'est ainsi que l'Igri est décrit par la formule D 1191 C 9119191119/1191 B 119111111. Le problème est donc essentiellement un problème de nomenclature (voir le schéma ci-dessous). En échangeant des informations sur les systèmes de classement et les variétés, les Etats membres devraient pouvoir établir des variétés de référence qui décrivent des configurations particulières. Les noms attribués à ces configurations devront faire l'objet d'une décision après délibération. Il devrait être relativement simple de dresser un tableau comparant les différents noms utilisés pour décrire les configurations des variétés connues. L'harmonisation pourrait se faire sous la forme d'un système de référence convenu, qui serait utilisé par exemple pour un échange d'informations, tout en permettant aux Etats membres de garder leur propre système à des fins d'utilisation interne. Les configurations des hordéines pourraient être décrites par la formule mise au point par le Bundessortenamt, le cas échéant. Toute configuration inédite de hordéines D, C ou B sera reconnue après accord, la configuration sera décrite et une variété de référence identifiée.

Schéma - Exemples de systèmes différents utilisés pour décrire les hordéines de la variété d'orge Igri.



En principe, on peut envisager le même genre de système pour l'orge et pour la gliadine du blé. Là aussi, l'échange de listes de variétés et les systèmes de nomenclature et de classement devraient faciliter l'harmonisation.

4. Il ne serait procédé à aucune évaluation de la densité des bandes de protéines; autrement dit la description se ferait en termes d'absence ou de présence.
5. Le critère de distinction serait l'observation d'une différence nette et reproductible dans la configuration des bandes de deux variétés, décrite selon la nomenclature harmonisée convenue (voir point 3 ci-dessus).
6. Le nombre de graines à examiner serait de 10 à 15, pour ce qui est de la distinction, et de 80 à 100 pour l'étude de l'homogénéité.
7. La norme de tolérance pour l'homogénéité serait, au départ, double de celle du document TG/1/2, soit 4 sur 80 (ou 6 sur 100) sauf si l'électrophorèse est le seul critère de distinction, auquel cas la norme serait de 2 sur 80 (ou 3 sur 100).
8. Il n'y aurait aucune obligation de rendre les variétés existantes homogènes dans les limites des tolérances précitées.
9. Actuellement, certaines variétés possèdent au moins deux lignées ou biotypes électrophorétiques tout en étant d'une homogénéité satisfaisante pour ce qui est d'autres caractères. Ces variétés à plusieurs biotypes figurant sur les listes nationales, on comparerait les variétés proposées avec toutes les lignées électrophorétiques. La distinction ne sera pas établie si une variété proposée ne diffère que d'une seule lignée d'une variété déterminée.

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 be 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.