



These Test Guidelines have been superseded by a later version. The latest adopted version of Test Guidelines can be found at http://www.upov.int/test_guidelines/en/list.jsp

Ces principes directeurs d'examen ont été remplacés par une version ultérieure. La version adoptée la plus récente des principes directeurs d'examen figure à l'adresse suivante : http://www.upov.int/test_guidelines/fr/list.jsp

Diese Prüfungsrichtlinien wurden durch eine neuere Fassung ersetzt. Die neueste angenommene Fassung von Prüfungsrichtlinien ist unter http://www.upov.int/test_guidelines/de/list.jsp zu finden.

Las presentes directrices de examen han sido reemplazadas por una versión posterior. La versión de las directrices de examen de más reciente aprobación está disponible en http://www.upov.int/test_guidelines/es/list.jsp.



TG/81/6

INTERNATIONAL UNION
FOR THE PROTECTION
OF NEW VARIETIES OF
PLANTS

UNION INTERNATIONALE
POUR LA PROTECTION
DES OBTENTIONS
VÉGÉTALES

INTERNATIONALER
VERBAND ZUM SCHUTZ
VON PFLANZEN-
ZÜCHTUNGEN

UNIÓN INTERNACIONAL
PARA LA PROTECCIÓN
DE LAS OBTENCIONES
VEGETALES

PRINCIPES DIRECTEURS
POUR LA CONDUITE DE L'EXAMEN
DES CARACTÈRES DISTINCTIFS, DE L'HOMOGENÉITÉ
ET DE LA STABILITÉ

TOURNESOL

(Helianthus annuus L.)

GENÈVE
2000

Des exemplaires de ce document peuvent être obtenus sur demande au prix de 10 francs suisses l'exemplaire, y compris les frais de port par voie de surface, en s'adressant au Bureau de l'UPOV, 34, chemin des Colombettes, boîte postale 18, 1211 Genève 20, Suisse.

Ce document peut être reproduit, traduit et publié, en tout ou en partie, sans qu'il soit nécessaire d'obtenir l'autorisation expresse de l'UPOV pour autant que la source soit mentionnée.

* * * * *



TG/81/6

ORIGINAL : anglais

DATE : 2000-04-05

**INTERNATIONAL UNION
FOR THE PROTECTION
OF NEW VARIETIES OF
PLANTS**

**UNION INTERNATIONALE
POUR LA PROTECTION
DES OBTENTIONS
VÉGÉTALES**

**INTERNATIONALER
VERBAND ZUM SCHUTZ
VON PFLANZEN-
ZÜCHTUNGEN**

**UNIÓN INTERNACIONAL
PARA LA PROTECCIÓN
DE LAS OBTENCIONES
VEGETALES**

**PRINCIPES DIRECTEURS
POUR LA CONDUITE DE L'EXAMEN
DES CARACTÈRES DISTINCTIFS, DE L'HOMOGENÉITÉ
ET DE LA STABILITÉ**

TOURNESOL

(Helianthus annuus L.)

Ces principes directeurs doivent être interprétés en relation avec le document TG/1/2, qui contient des explications sur les principes généraux qui sont à la base de leur rédaction.

<u>SOMMAIRE</u>	<u>PAGE</u>
I. Objet de ces principes directeurs d'examen	3
II. Matériel requis	3
III. Conduite de l'examen	3
IV. Méthodes et observations	4
V. Groupement des variétés	6
VI. Caractères et symboles	6
VII. Tableau des caractères	7
VIII. Explications du tableau des caractères	19
IX. Littérature	28
X. Questionnaire technique	29

ANNEXE

I. Objet de ces principes directeurs d'examen

Ces principes directeurs d'examen s'appliquent à toutes les variétés d'*Helianthus annuus* L., y compris aux lignées endogames, aux variétés hybrides et aux variétés à fécondation libre.

II. Matériel requis

1. Les autorités compétentes décident de la quantité de matériel végétal nécessaire pour l'examen de la variété, de sa qualité ainsi que des dates et lieux d'envoi. Il appartient au demandeur qui soumet du matériel provenant d'un pays autre que celui où l'examen doit avoir lieu de s'assurer que toutes les formalités douanières ont été dûment accomplies. La quantité minimale de semences à fournir par le demandeur est de :

5000 grains pour les lignées endogames, et
1 kg pour les variétés hybrides ou à fécondation libre.

Pour les variétés hybrides, le demandeur doit fournir 5000 grains supplémentaires pour chaque composant (p. ex. : pour un hybride simple, la lignée femelle (la lignée mâle stérile) et la lignée mâle). Pour les lignées mâles stériles, le demandeur doit fournir 5000 grains supplémentaires du mainteneur. Les semences doivent au moins satisfaire aux conditions minimales exigées pour la faculté germinative, la teneur en eau et la pureté pour la commercialisation des semences dans le pays dans lequel la demande est faite. La faculté germinative doit être aussi élevée que possible.

2. Le matériel végétal ne doit pas avoir subi de traitement sauf autorisation ou demande expresse des autorités compétentes. S'il a été traité, le traitement appliqué doit être indiqué en détail.

III. Conduite de l'examen

1. La durée minimale d'examen est de deux cycles de végétation indépendants.

2. En règle générale, les essais doivent être conduits en un seul lieu. Si ce lieu ne permet pas de faire apparaître certains caractères importants de la variété, celle-ci peut être étudiée dans un autre lieu.

3. Les essais doivent être conduits dans des conditions normales de culture. La taille des parcelles doit être telle que l'on puisse prélever des plantes ou parties de plantes pour effectuer des mesures ou des dénombrements sans nuire aux observations ultérieures qui doivent se poursuivre jusqu'à la fin de la période de végétation. Chaque essai doit porter sur au moins 40 plantes, qui doivent être réparties en deux ou plusieurs répétitions. On ne peut utiliser des parcelles séparées, destinées l'une aux observations et l'autre aux mesures, que si elles sont soumises à des conditions de milieu similaires.

4. Pour certaines déterminations, des essais additionnels peuvent être établis, notamment des essais sur capitule ligne au cas où les autorités compétentes accepteraient les résultats obtenus par le demandeur avant la date de dépôt de la demande.

5. Lorsqu'il s'agit de contrôler la formule des hybrides par électrophorèse des enzymes, l'essai doit être effectué sur au moins 10 plantules de chaque lignée endogame. Au moins quatre plantules doivent être analysés pour la détermination des hybrides simples et au moins 10 plantules pour celle des hybrides trois voies. En cas de doute, il convient d'analyser des plantules supplémentaires.

IV. Méthodes et observations

1. Les caractères décrits au chapitre VII doivent être utilisés aux fins de l'examen de la distinction des lignées endogames, des variétés hybrides et des variétés à fécondation libre.

2. Toutefois, aux fins de l'évaluation de la distinction des hybrides, un système d'examen préalable peut être défini sur la base des lignées parentales et de la formule, conformément aux recommandations suivantes :

a) description des lignées parentales dans le respect des principes directeurs d'examen;

b) vérification de l'originalité de ces lignées parentales à l'aide de la collection de référence établie sur la base des caractères énumérés au chapitre VII, en vue d'examiner les lignées endogames les plus proches;

c) vérification de l'originalité de la formule des hybrides à l'aide de celle des hybrides connus, compte tenu des lignées endogames les plus proches;

d) évaluation des possibilités de distinction, au niveau des hybrides, des variétés ayant une formule proche.

3. Toutes les observations relatives à l'évaluation de la distinction et de l'homogénéité, y compris les caractères électrophorétiques s'il y en a, doivent être effectuées sur au moins 40 plantes ou 40 parties de plantes à raison de 1 pour chacune des 40 plantes pour chaque lieu d'examen et chaque cycle de végétation.

4. Toutes les observations doivent être effectuées sur la tige principale.

5. Toutes les observations relatives à la feuille doivent être effectuées sur les feuilles complètement développées situées au 2/3 de la tige à partir du sol, après le stade bouton mais avant la floraison. La taille du bouton doit être de l'ordre de 5 cm.

6. Pour l'évaluation de l'homogénéité des lignées endogames, il faut appliquer une norme de population de 2 % avec une probabilité d'acceptation d'au moins 95 %. En outre, les mêmes normes de population et de probabilité d'acceptation doivent être appliquées pour évaluer l'homogénéité dans l'ensemble d'une ligne mâle stérile vis-à-vis des hybrides naturels et de plantes isogéniques mâles fertiles. Pour l'évaluation de l'homogénéité des hybrides simples, il faut appliquer une norme de population de 5 % avec une probabilité d'acceptation d'au moins 95 %. Les pays craignant qu'une adaptation trop radicale de leur système aux règles récemment adoptées ne soit à l'origine de difficultés bénéficieront d'un délai de deux ans à compter de l'adoption des principes directeurs d'examen pour mettre en application ces

nouvelles règles. Pour les hybrides trois voies et les variétés à fécondation libre, la variabilité au sein de la variété ne doit pas être supérieure à la variabilité des variétés comparables déjà connues.

Nombre de plantes aberrantes toléré dans différents cas et pour différentes tailles d'échantillons

	Plantes aberrantes	Nombre de plantes observées	Nombre de plantes aberrantes toléré
<u>Lignée endogame mâle stérile¹</u> (norme de population : 2 %, probabilité d'acceptation : 95 %)	Plantes hybrides naturels et plantes isogéniques fertiles	19 - 41	2
		42 - 69	3
		70 - 99	4
	Autres plantes aberrantes	100 - 131	5
		19 - 41	2
		42 - 69	3
		70 - 99	4
	<u>Lignée endogame mâle fertile</u> (norme de population : 2 %, probabilité d'acceptation : 95 %)	Tous types de plantes aberrantes confondus	100 - 131
19 - 41			2
42 - 69			3
70 - 99			4
<u>Hybrides simples</u> (norme de population : 5 %, probabilité d'acceptation : 95 %)	Tous types de plantes aberrantes confondus	17 - 28	3
		29 - 40	4
		41 - 53	5
		54 - 67	6
		68 - 81	7
		82 - 95	8
		96 - 110	9
		111- 125	10

7. Si l'électrophorèse des enzymes est utilisée aux fins de l'examen de la distinction, il convient d'appliquer la même norme de population et la même probabilité d'acceptation que pour les autres caractères. Dans le cas d'une lignée, toute plante avec un locus ou plusieurs loci présentant une hétérogénéité avec, à chaque locus, un allèle de cette lignée (par ex. AX), doit être considérée comme un hybride naturel. Tous les autres cas d'hétérogénéité ainsi que tous les cas où un allèle différent est présent à l'état homozygote doivent être considérés comme des plantes hors-types.

¹ Ainsi, on acceptera, pour 40 plantes observées, une lignée endogame mâle stérile comportant deux plantes hybrides naturels et deux plantes aberrantes pour les caractères des feuilles. Mais on refusera, pour 40 plantes observées, une lignée endogame mâle stérile comportant trois plantes aberrantes pour les caractères des feuilles.

V. Groupement des variétés

1. La collection des variétés à cultiver doit être divisée en groupes pour faciliter la détermination de la distinction. Les caractères à utiliser pour définir les groupes sont ceux dont on sait par expérience qu'ils ne varient pas, ou qu'ils varient peu, à l'intérieur d'une variété. Les différents niveaux d'expression doivent être assez uniformément répartis dans la collection.

2. Il faut commencer par séparer les variétés en deux groupes, à savoir d'une part les lignées endogames et d'autre part les autres variétés. Il est recommandé aux autorités compétentes d'utiliser les caractères ci-après pour le groupement des variétés au sein de chaque groupe :

- a) Feuille : couleur verte (caractère 4)
- b) Feuille : gaufure (caractère 5)
- c) Époque de floraison (caractère 14)
- d) Plante : hauteur (caractère 28)
- e) Plante : ramification (à l'exclusion de la ramification due à l'environnement) (caractère 29)
- f) Grain : stries sur le bord (caractère 39)
- g) Grain : stries entre les bords (caractère 40).

VI. Caractères et symboles

1. Pour évaluer les possibilités de distinction, l'homogénéité et la stabilité, on doit utiliser les caractères indiqués dans le tableau des caractères, avec leurs différents niveaux d'expression.

2. En regard des différents niveaux d'expression de chaque caractère figurent des notes (chiffres) destinées au traitement électronique des données.

3. Légende

(*) Caractères qui doivent être utilisés pour toutes les variétés, à chaque cycle de végétation au cours duquel les essais sont réalisés, et qui doivent toujours figurer dans la description de la variété, sauf si le niveau d'expression d'un caractère précédent ou les conditions de milieu régionales le rendent impossible.

(+) Voir l'explication du tableau des caractères au chapitre VIII.

(1) Le stade optimal de développement pour l'examen de chaque caractère est indiqué par des numéros portés dans la deuxième colonne. Les stades de développement sont décrits à la fin du chapitre VIII.

VII. Table of Characteristics/Tableau des caractères/Merkmalestabelle/Tabla de caracteres

	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
1.	A2	Hypocotyl: anthocyanin coloration	Hypocotyle: pigmentation anthocyanique	Hypokotyl: Anthocyanfärbung	Hipocotilo: pigmentación antocianica		
		absent	absente	fehlend	ausente	HA 850	1
		present	présente	vorhanden	presente	RHA 271	9
2.	A2	Hypocotyl: intensity of anthocyanin coloration	Hypocotyle: intensité de la pigmentation anthocyanique	Hypokotyl: Intensität der Anthocyanfärbung	Hipocotilo: intensidad de la pigmentación antocianica		
		weak	faible	gering	débil	H 52.6.3	3
		medium	moyenne	mittel	media	HA 290	5
		strong	forte	stark	fuerte	RHA 271	7
3. (*)	E4	Leaf: size	Feuille: taille	Blatt: Größe	Hoja: tamaño		
		small	petite	klein	pequeña	HA 124	3
		medium	moyenne	mittel	media	HA 821	5
		large	grande	groß	grande	DK 3790	7
4. (*)	E4	Leaf: green color	Feuille: couleur verte	Blatt: Grünfärbung	Hoja: color verde		
		light	claire	hell	claro	H 52.9.1.1	3
		medium	moyenne	mittel	medio	HA 821	5
		dark	foncée	dunkel	oscuro	HA 303	7
5. (*)	E4	Leaf: blistering	Feuille: gaufrure	Blatt: Blasigkeit	Hoja: abullonado		
		absent or very weak	absente ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil		1
		weak	faible	gering	débil	HA 342, RHA 273	3
		medium	moyenne	mittel	medio	HA 291	5
		strong	forte	stark	fuerte	HA 303, RHA 361	7

Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota	
6. (*) (+)	E4	Leaf: serration	Feuille: denture	Blatt: Zähnung	Hoja: dentado		
		isolated or very fine	isolée ou très fine	vereinzelt oder sehr fein	aislado o muy fino	HA 393	1
		fine	fine	fein	fino	HA 124	3
		medium	moyenne	mittel	medio	RHA 271	5
		coarse	grossière	grob	grosero	RHA 299	7
		very coarse	très grossière	sehr grob	muy grosero		9
7. (+)	E4	Leaf: shape of cross section	Feuille: forme de la section transversale	Blatt: Form des Querschnitts	Hoja: forma de la sección transversal		
		strongly concave	fortement concave	stark konkav	fuertemente cóncava		1
		weakly concave	faiblement concave	schwach konkav	débilmente cóncava	RHA 273	2
		flat	droite	gerade	plana	H 55.9.2.1.1	3
		weakly convex	faiblement convexe	schwach konvex	débilmente convexe	HA 303	4
		strongly convex	fortement convexe	stark konvex	fuertemente convexe		5
8. (+)	E4	Leaf: shape of distal part	Feuille: forme de la partie distale	Blatt: Form des distalen Teiles	Hoja: forma de la parte distal		
		lanceolate	lancéolée	lanzettlich	lanceolada		1
		lanceolate to narrow triangular	lancéolée à triangulaire étroite	lanzettlich bis schmal dreieckig	lanceolada a triangular estrecha		2
		narrow triangular	triangulaire étroite	schmal dreieckig	triangular estrecha	RHA 855	3
		narrow triangular to broad triangular	triangulaire étroite à triangulaire large	schmal dreieckig bis breit dreieckig	triangular estrecha a triangular ancha		4
		broad triangular	triangulaire large	breit dreieckig	triangular ancha	HA 821	5
		broad triangular to acuminate	triangulaire large à acuminée	breit dreieckig bis zugespitzt	triangular ancha a acuminada		6
		broad triangular to rounded	triangulaire large à arrondie	breit dreieckig bis rundlich	triangular ancha a redondeada	HA 303	7
		acuminate	acuminée	zugespitzt	acuminada	HA 124	8
		rounded	arrondie	rundlich	redondeada	HA 234	9

	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
9. (* (+)	E4	Leaf: auricles	Feuille: oreillettes	Blatt: Größe der Ohren	Hoja: aurículas		
		none or very small	absentes ou très petites	fehlend oder sehr klein	ausentes o muy pequeñas	HA 290	1
		small	petites	klein	pequeñas		3
		medium	moyennes	mittel	medias	HA 852	5
		large	grandes	groß	grandes	HA 89	7
		very large	très grandes	sehr groß	muy grandes	HA 303	9
10. (+)	E4	Leaf: wings	Feuille: ailes	Blatt: Flügel	Hoja: alas		
		none or very weakly expressed	absentes ou très faiblement marquées	keine oder sehr schwach ausgeprägt	ausentes o muy débilmente definidas	HA 89	1
		weakly expressed	faiblement marquées	schwach ausgeprägt	débilmente definidas		2
		strongly expressed	fortement marquées	stark ausgeprägt	fuertemente definidas	RHA 274, RHA 348	3
11. (* (+)	E4	Leaf: angle of lowest lateral veins	Feuille: angle des nervures latérales plus basses	Blatt: Winkel der untersten Seitennerven	Hoja: ángulo de los nervios laterales inferiores		
		acute	aigu	spitz	agudo	HA 290, RHA 295	1
		right angle or nearly right angle	droit ou presque droit	rechtwinklig oder fast rechtwinklig	ángulo recto o casi ángulo recto	HA 89	2
		obtuse	obtus	stumpf	obtuso	HA 303	3

	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
12.	E4	Leaf: height of the tip of the blade compared to insertion of petiole (at 2/3 height of plants)	Feuille: hauteur de l'extrémité du limbe par rapport à l'insertion du pétiole (aux 2/3 de la tige à partir du sol)	Blatt: Höhe der Blattspitze im Verhältnis zur Ansatzstelle des Stieles (in 2/3 der Pflanzhöhe)	Hoja: altura de la punta del limbo en relación con la inserción del pecíolo (a 2/3 de la altura de la planta)		
(+)		low	basse	niedrig	baja	RHA 275	3
		medium	moyenne	mittel	media	RHA 274	5
		high	haute	hoch	alta	RHA 400	7
13.	F1	Stem: hairiness at the top (last 5 cm)	Tige: pilosité au sommet (5 derniers cm)	Stengel: Behaarung an der Spitze (obere 5 cm)	Tallo: velloso en el extremo (últimos 5 cm)		
		absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil		1
		weak	faible	gering	débil	RHA 271	3
		medium	moyenne	mittel	media	RHA 273	5
		strong	forte	stark	fuerte	HA 303	7
		very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte		9
14.	(*) (+)	Time of flowering	Époque de floraison	Zeitpunkt der Blüte	Época de la floración		
		very early	très précoce	sehr früh	muy temprana	HA 302, RHA 381	1
		early	précoce	früh	temprana	RHA 273	3
		medium	moyenne	mittel	media	RHA 274	5
		late	tardive	spät	tardía	RHA 271	7
		very late	très tardive	sehr spät	muy tardía	RHA 361	9
15.	F3.2	Ray florets: density	Fleurs ligulées: densité	Zungenblüten: Dichte	Flores liguladas: densidad		
		sparse	faible	locker	laxas	HA 385	3
		medium	moyenne	mittel	medias	HA 89	5
		dense	forte	dicht	densas		7

	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
16. (+)	F3.2	Ray floret: shape	Fleur ligulée: forme	Zungenblüte: Form	Flor ligulada: forma		
		fusiform	allongée	spindelförmig	fusiforme	H 52.9.1.1	1
		narrow ovate	ovoïde étroite	schmal eiförmig	oval estrecha	RHA 274	2
		broad ovate	ovoïde large	breit eiförmig	oval ancha	HA 821	3
		rounded	arrondie	rundlich	redondeada		4
17.	F3.2	Ray floret: dis- position	Fleur ligulée: dis- position	Zungenblüte: An- ordnung	Flor ligulada: dis- posición		
		flat	plane	eben	plana	HA 89	1
		longitudinal recurved	recourbée longitu- dinalement	längsseits nach außen gebogen	recurvada longitu- dinalmente	HA 850	2
		undulated	ondulée	gewellt	ondulada	HA 234	3
		strongly recurved to back of head	fortement recour- bée vers le dos du capitule	stark gebogen zur Korbrückseite	fuertemente recur- vada hacia la parte posterior del capítulo	CM 592	4
18.	F3.2	Ray floret: length	Fleur ligulée: lon- gueur	Zungenblüte: Länge	Flor ligulada: longitud		
		short	courte	kurz	corta	RHA 361	3
		medium	moyenne	mittel	media	HA 89	5
		long	longue	lang	larga	H 52.6.3	7
19. (*)	F3.2	Ray floret: color	Fleur ligulée: couleur	Zungenblüte: Farbe	Flor ligulada: color		
		yellowish white	blanc jaunâtre	gelblichweiß	blanco amarillento		1
		light yellow	jaune pâle	hellgelb	amarillo pálido		2
		medium yellow	jaune moyen	mittelgelb	amarillo medio	HA 89	3
		orange yellow	jaune orange	orangegelb	amarillo naranja	RHA 361	4
		orange	orange	orange	naranja	CM 587, RHA 295	5
		purple	pourpre	purpur	púrpura		6
		reddish brown	brun rougeâtre	rotbraun	marrón rojizo		7
		multicolored	multicolore	mehrfarbig	multicolor	8	

	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
20.	F3.2	Disk flower: color	Fleuron: couleur	Röhrenblüte: Farbe	Flósculo (flor del disco): color		
		yellow	jaune	gelb	amarillo		1
		orange	orange	orange	naranja	HA 89	2
		purple	pourpre	purpur	púrpura		3
21. (+)	F3.2	Disk flower: anthocyanin coloration of stigma	Fleuron: pigmentation anthocyanique des stigmates	Röhrenblüte: Anthocyanfärbung der Narbe	Flósculo (flor del disco): pigmentación antocianica del estigma		
		absent	absente	fehlend	ausente	HA 89	1
		present	présente	vorhanden	presente	H 55.9.2.1.1, HA 348	9
22. (+)	F3.2	Disk flower: intensity of anthocyanin coloration of stigma	Fleuron: intensité de la pigmentation anthocyanique des stigmates	Röhrenblüte: Intensität der Anthocyanfärbung der Narbe	Flósculo (flor del disco): intensidad de la pigmentación antocianica del estigma		
		weak	faible	gering	débil	HA 290, HA 394	3
		medium	moyenne	mittel	media	HA 60, HA 291	5
		strong	forte	stark	fuerte	RHA 348	7
23.	F3.2	Disk flower: production of pollen	Fleuron: production de pollen	Röhrenblüte: Pollenproduktion	Flósculo (flor del disco): producción de polen		
		absent	absente	fehlend	ausente		1
		present	présente	vorhanden	presente		9
24. (+)	F3.2	Bract: shape	Bractée: forme	Hüllblatt: Form	Bráctea: forma		
		clearly elongated	nettement allongée	deutlich länglich	claramente elongada	HA 379	1
		neither clearly elongated nor clearly rounded	ni nettement allongée ni nettement arrondie	weder deutlich länglich noch deutlich rundlich	ni claramente elongada ni claramente redondeada	HA 292	2
		clearly rounded	nettement arrondie	deutlich rundlich	claramente redondeada	RHA 801	3

	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
25.	F3.2	Bract: length of tip	Bractée: longueur du sommet	Hüllblatt: Länge der Spitze	Bráctea: longitud del acumen		
(+)		short	court	kurz	corta	RHA 273, RHA 361	3
		medium	moyen	mittel	media	HA 302	5
		long	long	lang	larga	HA 292, HA 55.9.2.1.1	7
		very long	très long	sehr lang	muy larga	H 52.6.3	9
26.	F3.2	Bract: green color of outer side	Bractée: couleur verte de la face externe	Hüllblatt: Grünfärbung der Außenseite	Bráctea: color verde de la cara externa		
		light	claire	hell	claro	H 52.9.1.1	3
		medium	moyenne	mittel	medio	HA 850	5
		dark	foncée	dunkel	oscuro	HA 303	7
27.	M0	Bract: attitude in relation to head	Bractée: port par rapport au capitule	Hüllblatt: Haltung zum Korb	Bráctea: porte en relación con el capítulo		
		not embracing or very slightly embracing	non enveloppante ou très faiblement enveloppante	nicht umfassend oder sehr gering umfassend	no envolvente o muy ligeramente envolvente	H 52.9.1.1	1
		slightly embracing	faiblement enveloppante	gering umfassend	ligeramente envolvente	HA 337, HA 343	2
		strongly embracing	fortement enveloppante	stark umfassend	fuertemente envolvente	RHA 234	3
28.	M0	Plant: natural height	Plante: hauteur	Pflanze: Natürliche Höhe	Planta: altura		
(*)		very short	très courte	sehr kurz	muy baja	HA 379	1
(+)		short	courte	kurz	baja	HA 291	3
		medium	moyenne	mittel	media	RHA 801	5
		tall	haute	lang	alta	H 52.9.1.1	7

	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
29. (*)	M0 - M2	Plant: branching (excluding environmental branching)	Plante: ramification (à l'exclusion de la ramification due à l'environnement)	Pflanze: Verzweigung (ohne umweltbedingte Verzweigung)	Planta: ramificación (excluyendo la causada por el medio ambiente)		
		absent	absente	fehlend	ausente	HA89	1
		present	présente	vorhanden	presente	RHA 271	9
30. (*) (+)	M0 - M2	Plant: type of branching (as for 29)	Plante: type de ramification (comme pour 29)	Pflanze: Art der Verzweigung (wie unter 29)	Planta: tipo de ramificación (como para 29)		
		only basal	uniquement basale	nur basal	sólo basal	RHA 295	1
		predominantly basal	prédominance basale	überwiegend basal	predominantemente basal		2
		overall	totale	vollständig	total	RHA 273	3
		predominantly apical	prédominance apicale	überwiegend apikal	predominantemente apical	RHA 271	4
only apical	uniquement apicale	nur apikal	solo apical	RHA 294	5		
31.	M0 - M2	Plant: natural position of highest lateral head to the central head	Plante: position naturelle du capitule latéral le plus haut par rapport au capitule central	Pflanze: Natürliche Position des höchsten Seitenkorbes zum Hauptkorb	Planta: posición natural del capítulo lateral más alto, en relación con el capítulo central		
		below	au-dessous	unterhalb	debajo	RHA 361	1
		same level	au même niveau	gleiche Höhe	al mismo nivel	RHA 857	2
		above	au-dessus	oberhalb	encima	RHA 274	3

Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielsorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
32.	M3	Head: attitude	Capitule: port	Korb: Haltung	Capítulo: porte	
(*)		horizontal	horizontal	waagerecht	horizontal	1
(+)		inclined	incliné	geneigt	inclinado	2
		vertical	vertical	senkrecht	vertical	RHA 395 3
		half-turned down with straight stem	demi-renversé avec tige droite	halbüberhängend mit geradem Stengel	semiinvertido con el tallo recto	4
		half-turned down with curved stem	demi-renversé avec tige arquée	halbüberhängend mit gebogenem Stengel	semiinvertido con el tallo arqueado	5
		turned down with straight stem	renversé avec tige droite	überhängend mit geradem Stengel	invertido con el tallo recto	6
		turned down with slightly curved stem	renversé avec tige légèrement arquée	überhängend mit gering gebogenem Stengel	invertido con el tallo ligeramente arqueado	7
		turned down with strongly curved stem	renversé avec tige fortement arquée	überhängend mit stark gebogenem Stengel	invertido con el tallo fuertemente arqueado	8
		over turned	retourné	zurückgebogen	retorcido	9
33.	M3	Head: size	Capitule: taille	Korb: Größe	Capítulo: tamaño	
(*)		small	petit	klein	pequeño	RHA 273 3
		medium	moyen	mittel	medio	RHA 271 5
		large	grand	groß	grande	H 52.9.1.1 7

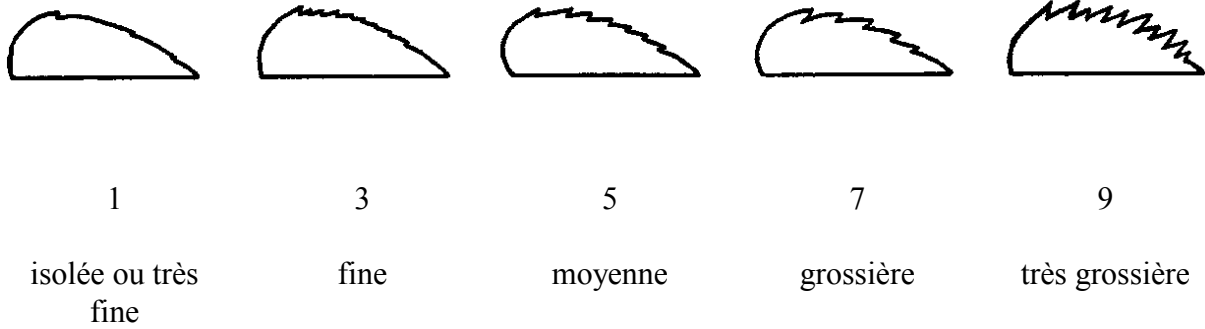
	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
34. (*) (+)	M3	Head: shape of grain side	Capitule: forme de la face portant les grains	Korb: Form der Kornseite	Capítulo: forma de la parte del grano		
		strongly concave	fortement concave	stark konkav	fuertemente cóncavo		1
		weakly concave	faiblement concave	schwach konkav	débilmente cóncavo		2
		flat	plan	gerade	plano	RHA 273	3
		weakly convex	faiblement convexe	schwach konvex	débilmente convexo	HA 89	4
		strongly convex	fortement convexe	stark konvex	fuertemente convexo	CM 400	5
		deformed	diforme	verunstaltet	deformado	RHA 271	6
35.	M4	Seed: size	Grain: taille	Korn: Größe	Semilla: tamaño		
		small	petit	klein	pequeña	RHA 801	3
		medium	moyen	mittel	media	HA 89	5
		large	gros	groß	grande	HA 292	7
		very large	très gros	sehr groß	muy grande	HA 316	9
36. (*) (+)	M4	Seed: shape	Grain: forme	Korn: Form	Semilla: forma		
		elongated	allongé	länglich	elongada	HA 60	1
		narrow ovoid	ovoïde étroit	schmal eiförmig	ovoïde estrecha	RHA 271	2
		broad ovoid	ovoïde large	breit eiförmig	ovoïde ancha	HA 89	3
		rounded	arrondi	rundlich	redondeada	CM 447	4
37.	M4	Seed: thickness relative to width	Grain: épaisseur par rapport à la largeur	Korn: Dicke im Verhältnis zur Breite	Semilla: grosor con relación a la anchura		
		thin	mince	dünn	delgada	RHA 274	3
		medium	moyen	mittel	media	RHA 271	5
		thick	épais	dick	gruesa		7
	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota

38. (* (+)	M4	Seed: main color	Grain: couleur principale	Korn: Hauptfarbe	Semilla: color principal		
		white	blanc	weiß	blanca		1
		whitish grey	gris-blanchâtre	weißlich grau	gris blancuzca		2
		grey	gris	grau	gris	TRISUN 860	3
		light brown	brun clair	hellbraun	marrón clara		4
		medium brown	brun moyen	mittelbraun	marrón medio	RHA 273	5
		dark brown	brun foncé	dunkelbraun	marrón oscuro		6
		black	noir	schwarz	negra	HA 89	7
	purple	pourpre	purpur	púrpura		8	
39. (* (+)	M4	Seed: stripes <u>on</u> margin	Grain: stries <u>sur</u> les bords	Korn: Streifen <u>am</u> Rand	Semilla: estrías <u>en</u> el borde		
		none or very weakly expressed	aucune ou très faiblement marquées	keine oder sehr schwach ausgeprägt	ninguna o muy débilmente definidas	RHA 273	1
		weakly expressed	faiblement marquées	schwach ausgeprägt	débilmente definidas	H 52.9.1.1	2
	strongly expressed	fortement marquées	stark ausgeprägt	fuertemente definidas	HA 89	3	
40. (* (+)	M4	Seed: stripes <u>between</u> margins	Grain: stries <u>entre</u> les bords	Korn: Streifen <u>zwischen</u> den Rändern	Semilla: estrías <u>entre</u> los bordes		
		none or very weakly expressed	aucune ou très faiblement marquées	keine oder sehr schwach ausgeprägt	ninguna o muy débilmente definidas	RHA 273	1
		weakly expressed	faiblement marquées	schwach ausgeprägt	débilmente definidas	RHA 293	2
	strongly expressed	fortement marquées	stark ausgeprägt	fuertemente definidas	HA 89	3	

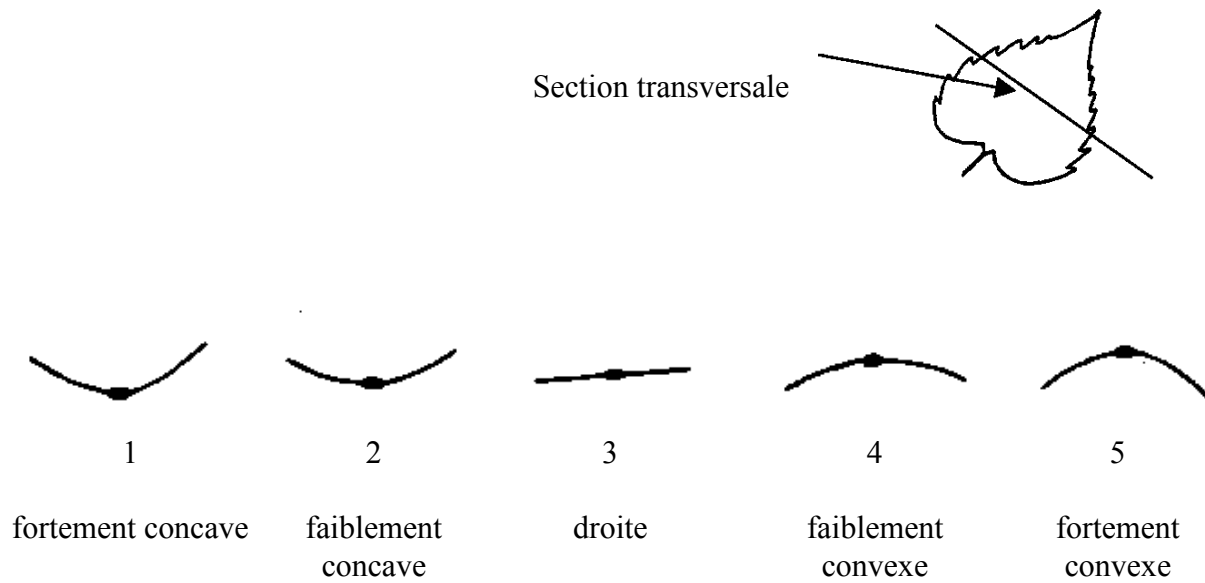
	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
41.	M4	Seed: color of stripes	Grain: couleur des stries	Korn: Farbe der Streifen	Semilla: color de las estrias		
		white	blanches	weiß	blanco	RHA 295	1
		grey	grises	grau	gris	HA 89	2
		brown	brunes	braun	marrón	HA 292	3
		black	noires	schwarz	negro	Narval 30	4
42.	M4	Seed: spots on pericarp	Grain: tâches sur le péricarpe	Korn: Flecken auf der Samenschale	Semilla: manchas en el pericarpio		
		absent	absentes	fehlend	ausentes		1
		present	présentes	vorhanden	presentes		9

VIII. Explications du tableau des caractères

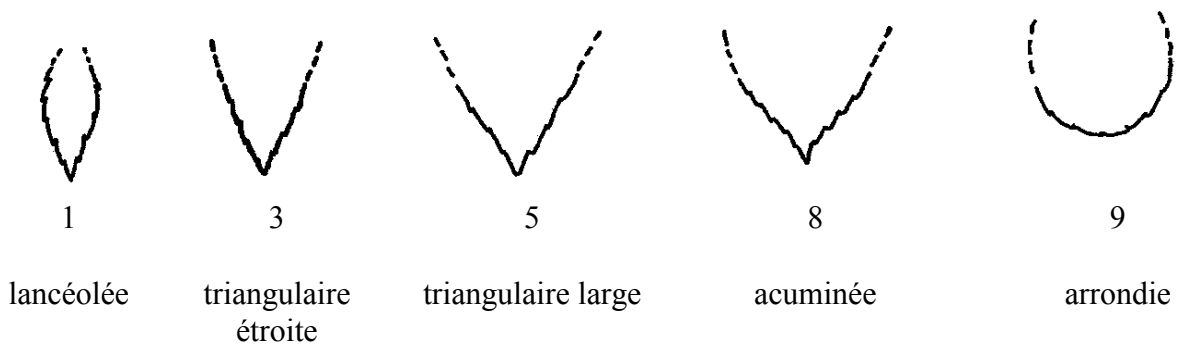
Add. 6 : Feuille : denture



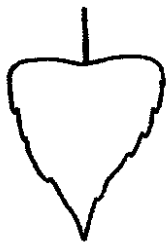
Add. 7 : Feuille : forme de la section transversale
(moitié de la feuille)



Add. 8 : Feuille : forme de la partie distale



Add. 9 : Feuille : oreillettes



1

absentes ou
très petites



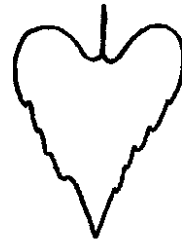
3

petites



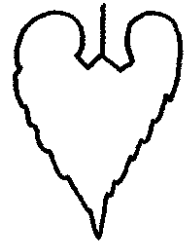
5

moyennes



7

grandes

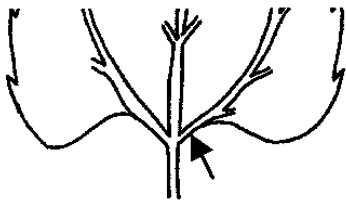


9

très grandes

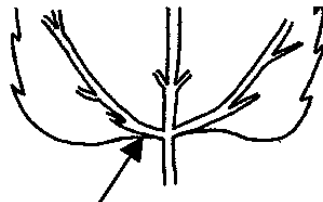
Add. 10 : Feuille : ailes

(parenchyme à la base des nervure latérales)



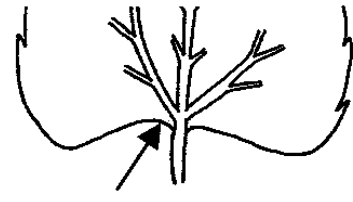
1

absentes ou très faiblement
marquées



2

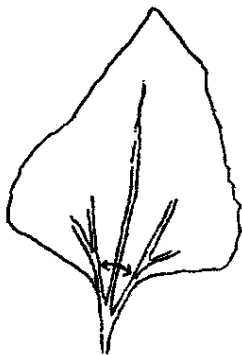
faiblement marquées



3

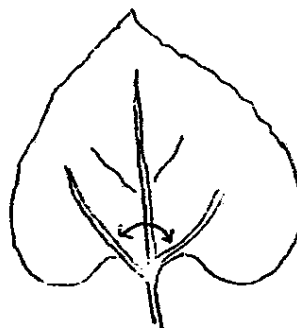
fortement marquées

Add. 11 : Feuille : angle des nervures latérales les plus basses



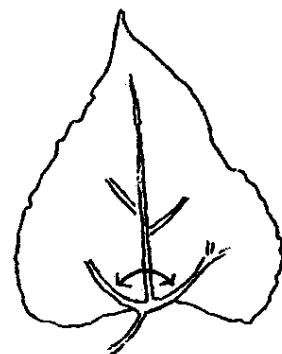
1

aigu



2

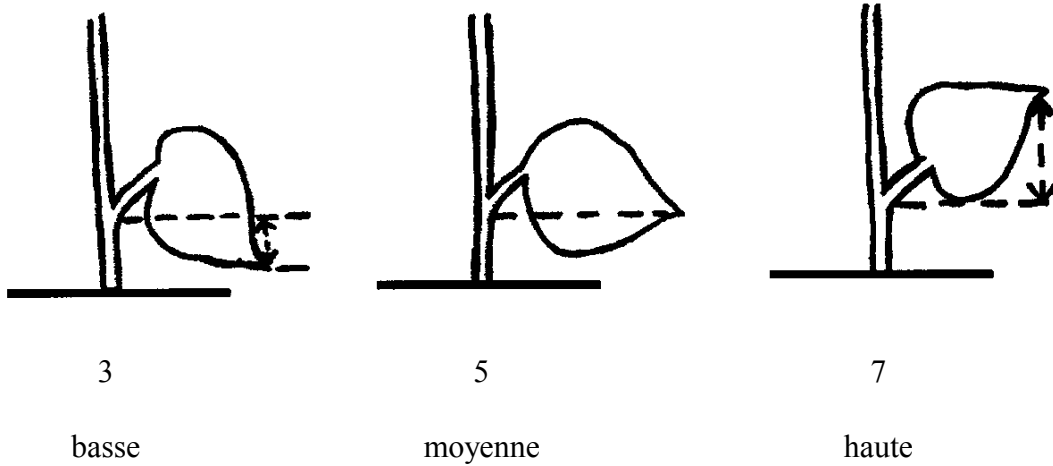
droit ou presque droit



3

obtus

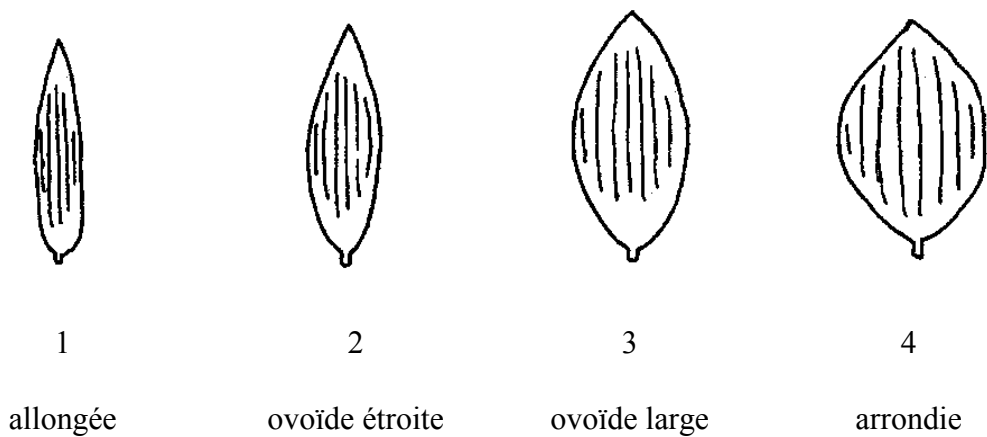
Add. 12 : Feuille : hauteur de l'extrémité du limbe par rapport à l'insertion du pétiole



Add. 14 : Époque de floraison

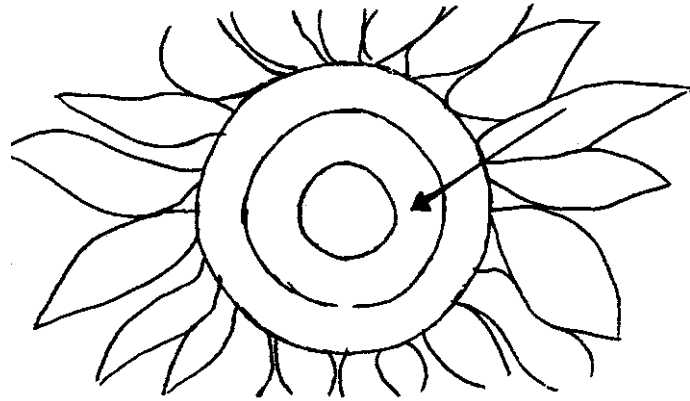
L'époque de floraison est l'époque où 50 % des plantes sont fleuries. Une plante est fleurie lorsqu'elle montre au moins une fleur ligulée dressée et colorée.

Add. 16 : Fleur ligulée : forme

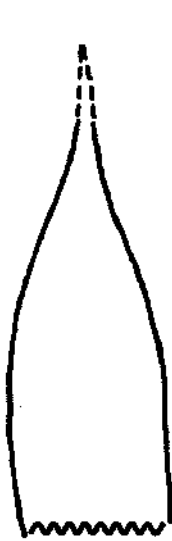


Add. 21 et 22 : Fleuron : pigmentation anthocyanique des stigmates

La pigmentation anthocyanique des stigmate doit être notée sur des stigmates prélevés dans le tiers moyen du capitule au moment où le pollen apparaît au sommet des anthères.

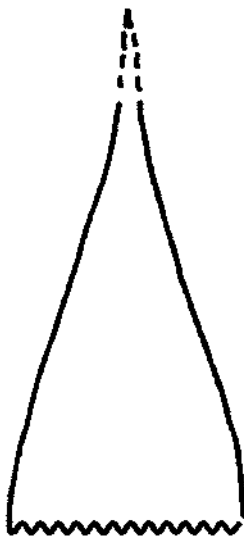


Add. 24 : Bractée : forme



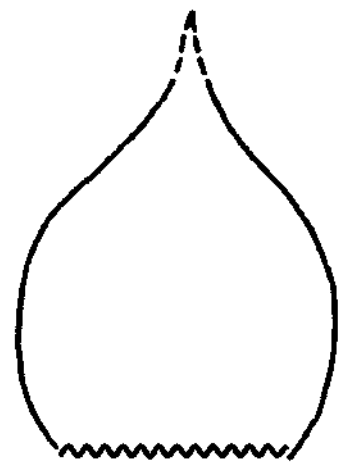
1

nettement allongée



2

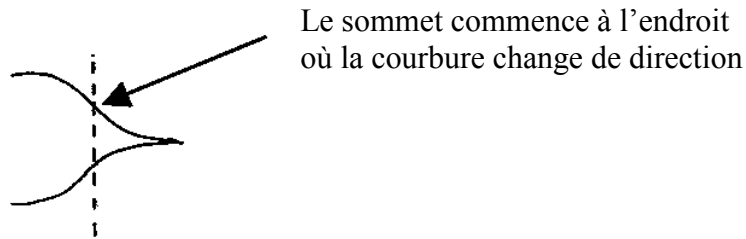
ni nettement allongée ni
nettement arrondie



3

nettement arrondie

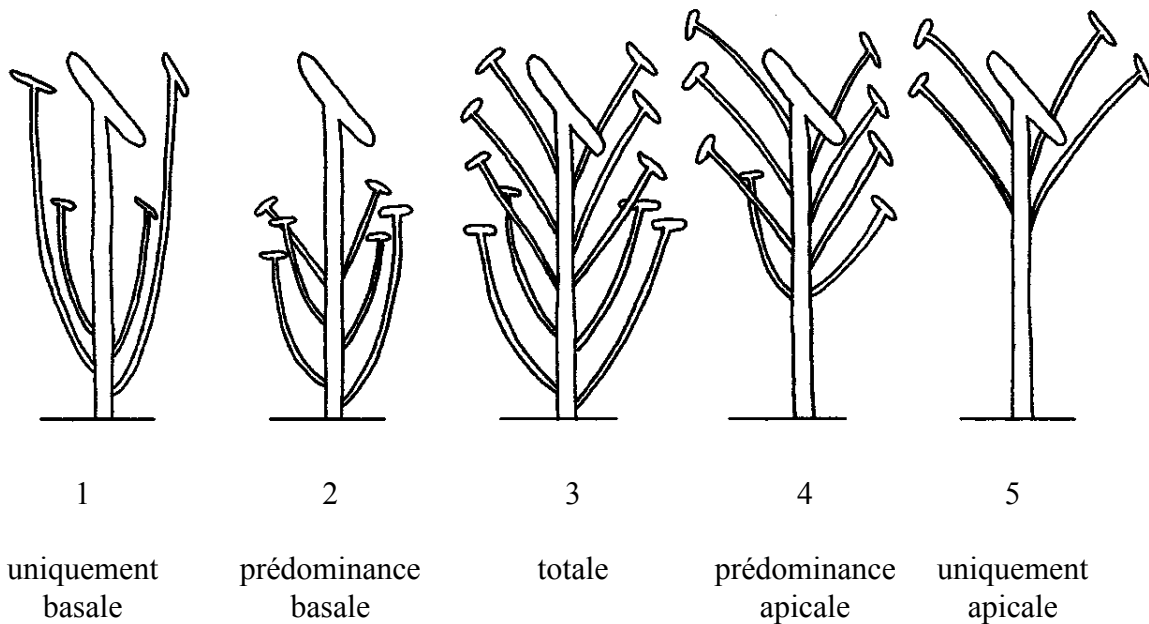
Add. 25 : Bractée : longueur du sommet



Add. 28 : Plante : hauteur

Des conditions environnementales différentes peuvent nécessiter des échelles de notation séparées pour les lignées, les hybrides et les variétés à pollinisation libre.

Add. 30 : Plante : type de ramification
(à l'exclusion de la ramification due à l'environnement)



Add. 32 : Capitule : port



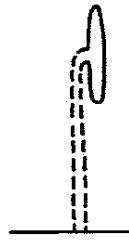
1

horizontal



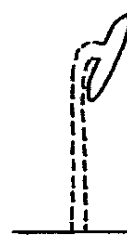
2

incliné



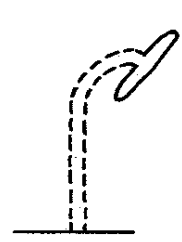
3

vertical



4

demi-renversé
avec tige droite



5

demi-renversé
avec tige arquée



6

renversé avec tige
droite



7

renversé avec tige
légèrement arquée



8

renversé avec tige
fortement arquée



9

retourné

Add. 34 : Capitule : forme de la face portant les grains



1

fortement
concave



2

faiblement
concave



3

plan



4

faiblement
convexe



5

fortement
convexe



6

difforme

Add. 36 : Grain : forme



1

allongé



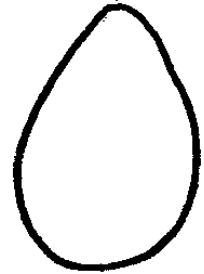
2

ovoïde étroit



3

ovoïde large



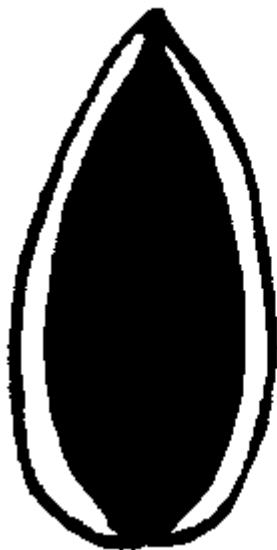
4

arrondi

Add. 38 : Grain : couleur principale

La couleur principale du grain est la couleur présentant la surface la plus importante. En cas de doute quant à la surface la plus importante, la couleur la plus foncée est la couleur principale.

Add. 39 et 40 : Grain : stries



sur les bords



entre les bords

STADES REPÈRES DU TOURNESOL¹

(Un stade est atteint lorsque 50 % des plantes sont à ce stade)

Germination - levée (A)

Phase végétative (B)



A 1

Apparition des hypocotyles en crosse.



A 2

Émergence des cotylédons et premières feuilles visibles.



B 3 – B 4

La seconde paire de feuilles opposées apparaît et a environ 4 cm de long; les pétioles sont visibles du dessus.

Phase bouton floral (E)



E 1

Apparition du bouton floral étroitement inséré au milieu des jeunes feuilles : stade bouton étoilé.



E 2

Le bouton se détache de la couronne foliaire, les bractées sont nettement distinguables des feuilles. Son diamètre varie de 0,5 à 2 cm.



E 4

Le bouton est nettement dégagé des feuilles, son diamètre varie de 5 à 8 cm, il demeure horizontal. Une partie des bractées se déploie.

¹ Document reproduit avec l'aimable permission du CETIOM (France)

Floraison (F)



F 1

Le bouton floral s'incline; les fleurs ligulées sont perpendiculaires au plateau.



F 3.2

Les trois cercles de fleurons les plus externes ont leurs anthères visibles et dégagées et leurs stigmates déployés. Les trois cercles suivants ont leurs anthères visibles et dégagées.

Maturation (M)



M 0

Chute des fleurs ligulées. Le dos du capitule est encore vert.

Maturation (M)



M 2

Le dos du capitule est jaune. Les bractées sont aux 3/4 brunes. L'humidité de la graine avoisine 20 - 25 %.



M 3

Le dos du capitule est marbré de brun. Les bractées sont brunes. La tige se dessèche. L'humidité de la graine avoisine 15 %.



M 4

Tous les organes de la plante sont bruns foncés. L'humidité de la graine avoisine 10 %.

IX. Littérature

J.F. Miller: “Update on Inheritance of Sunflower Characteristics,” USDA - ARS, Northern Crop Science Laboratory, Fargo, North Dakota 58105, États-Unis d’Amérique

ASFIS, GEVES, GNIS: “Description des géniteurs et variétés de tournesol”, édition 2000 (English, French, Spanish), ASFIS, 44, rue du Louvre, 75001 Paris, FR

X. Questionnaire technique

	Référence (réservé aux administrations)
<p>QUESTIONNAIRE TECHNIQUE à remplir en relation avec une demande de certificat d'obtention végétale</p>	
1. Espèce	<p><i>Helianthus annuus</i> L. TOURNESOL</p>
2. Demandeur (nom et adresse)	
3. Dénomination proposée ou référence de l'obtenteur	

5. Caractères de la variété à indiquer (le chiffre entre parenthèses renvoie au caractère correspondant dans les principes directeurs d'examen; prière de marquer d'une croix le niveau d'expression approprié).

Caractères	Exemples	Note
5.1 Feuille : couleur verte (4)		
claire	H 52.9.1.1	3[]
moyenne	HA 821	5[]
foncée	HA 303	7[]
5.2 Feuille : gaufrure (5)		
absente ou très faible		1[]
faible	HA 342, RHA 273	3[]
moyenne	HA 291	5[]
forte	HA 303, RHA 361	7[]
5.3 Époque de floraison (14)		
très précoce	HA 302, RHA 381	1[]
précoce	RHA 273	3[]
moyenne	RHA 274	5[]
tardive	RHA 271	7[]
très tardive	RHA 361	9[]

Caractères	Exemples	Note
5.4 Fleur ligulée : couleur (19)		
blanc jaunâtre		1[]
jaune pâle		2[]
jaune moyen	HA 89	3[]
jaune orange	RHA 361	4[]
orange	CM 587, RHA 295	5[]
pourpre		6[]
brun rougeâtre		7[]
multicolore		8[]
5.5 Plante : hauteur (28)		
très courte	HA 379	1[]
courte	HA 291	3[]
moyenne	RHA 801	5[]
haute	H 52.9.1.1	7[]
5.6 Plante : ramification (à l'exclusion de la ramification due à l'environnement) (29)		
absente	HA89	1[]
présente	RHA 271	9[]
5.7 Grain : stries sur les bords (39)		
aucune ou très faiblement marquées	RHA 273	1[]
faiblement marquées	H 52.9.1.1	2[]
fortement marquées	HA 89	3[]

Caractères		Exemples	Note
5.8 Grain : stries entre les bords (40)			
aucune ou très faiblement marquées		RHA 273	1[]
faiblement marquées		RHA 293	2[]
fortement marquées		HA 89	3[]
6. Variétés voisines et différences par rapport à ces variétés			
Dénomination de la variété voisine	Caractère par lequel la variété voisine diffère ⁰⁾	Niveau d'expression pour la variété voisine	Niveau d'expression pour la variété candidate
<p>⁰⁾ Au cas où les niveaux d'expression des deux variétés seraient identiques, prière d'indiquer l'amplitude de la différence.</p>			

7. Renseignements complémentaires pouvant faciliter la détermination des caractères distinctifs de la variété

7.1 Résistance aux parasites et aux maladies

a) Mildiou []
(indiquer les races)

.....
.....

b) Rouille []

c) Autres parasites ou maladies []
(préciser)

.....

7.2 Utilisation

a) huile et tourteau []

b) oisellerie et consommation humaine directe []

c) ornementale []

d) autre utilisation []

.....

7.3 Conditions particulières pour l'examen de la variété

7.4 Autres renseignements

8. Autorisation de dissémination

a) La législation en matière de protection de l'environnement et de la santé de l'homme et de l'animal soumet-elle la variété à une autorisation préalable de dissémination?

oui [] non []

b) Dans l'affirmative, une telle autorisation a-t-elle été obtenue?

oui [] non []

[L'annexe suit]

ANNEXE

Explications additionnelles utiles

	<u>SOMMAIRE</u>	<u>PAGE</u>
Partie I :	Introduction	2
Partie II :	Caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse	3
Partie III :	Description de la méthode à utiliser	5

Partie I

Introduction

L'annexe suivante comprend une liste des caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse et une description de la méthode à appliquer. L'UPOV a décidé de faire figurer ces caractères dans une annexe aux Principes Directeurs, en créant ainsi une catégorie spéciale de caractères, étant donné que la majorité des États membres de l'UPOV sont d'avis qu'il n'est pas possible d'établir la distinction uniquement sur la base d'une différence pour un caractère obtenu par l'utilisation de l'électrophorèse. Ces caractères doivent par conséquent être utilisés uniquement comme complément aux différences constatées pour des caractères morphologiques ou physiologiques. L'UPOV confirme que ces caractères sont considérés comme utiles, mais que, pris isolément, ils ne peuvent pas être suffisants pour établir la distinction. Ils ne doivent pas être utilisés comme caractères de routine, mais seulement sur demande ou avec accord du demandeur.

Partie II

Caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse

English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielsorten Variedades ejemplo	Note/ Nota	
43. (+)	Allele expression at locus Me1	Expression allélique au locus Me1	Allel-Ausprägung im Locus Me1	Expression alélica del locus Me1		
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	Genotipo 2/2	HA 89	1
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	Genotipo 4/4	RHA 274	2
	Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Genotipo 2/4	Florence	3
44. (+)	Allele expression at locus Pgd1	Expression allélique au locus Pgd1	Allel-Ausprägung im Locus Pgd1	Expression alélica del locus Pgd1		
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	Genotipo 2/2	RHA 274	1
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	Genotipo 4/4	HA 850	2
	Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Genotipo 2/4	Santafe	3
45. (+)	Allele expression at locus Pgi2	Expression allélique au locus Pgi2	Allel-Ausprägung im Locus Pgi2	Expression alélica del locus Pgi2		
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	Genotipo 2/2	RHA 274	1
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	Genotipo 4/4	H559211	2
	Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Genotipo 2/4	Santafe	3
46. (+)	Allele expression at locus Shdh1	Expression allélique au locus Shdh1	Allel-Ausprägung im Locus Shdh1	Expression alélica del locus Shdh 1		
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	Genotipo 2/2	HA 89	1
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	Genotipo 4/4	RHA 856	2
	Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Genotipo 2/4	Florence	3

	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
47. (+)	Allele expression at locus Pgm4	Expression allélique au locus Pgm4	Allel-Ausprägung im Locus Pgm4	Expression alélica del locus Pgm4		
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	Genotipo 2/2	RHA 274	1
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	Genotipo 4/4	HA 89	2
	Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Genotipo 2/4	Florence	3

Partie III

Description de la méthode à utiliser

Description de la méthode SGE pour l'analyse des Isoenzymes d'*Helianthus annuus L.*

1. **Nombre de plantules par test :**

- pour la vérification de la formule :
10 plantules de chacune des lignées parentales
4 plantules pour les hybrides simples
10 plantules pour les hybrides trois voies
- pour le test de distinction, homogénéité et stabilité :
au moins 40 plantules pour les lignées, hybrides et variétés - populations

2. **Equipement**

Tout système approprié d'électrophorèse en horizontal peut être utilisé, pourvu que la température de migration des gels puisse être maintenue à 4° C. Un gel d'épaisseur de 10 mm est recommandé. Le générateur électrique utilisé devra pouvoir délivrer un voltage constant.

3. **Produits chimiques**

Tous les produits chimiques doivent être au moins de qualité "Analytical Reagent".

3.1 Produits chimiques pour l'extraction des enzymes :

Tris : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
Acide chlorhydrique
 β -Mercaptoéthanol (ou 2-mercaptoéthanol)

3.2 Produits chimiques pour l'électrophorèse

Bleu de bromophénol
Acide citrique monohydraté
L-Histidine base
Amidon hydrolysé pour électrophorèse (Sigma S-4501 ou équivalent)

3.3 Produits chimiques pour la révélation des enzymes

Acide 6-phosphogluconique, sel trisodique dihydraté
Acide DL-malique, sel monosodique
Acide shikimique
EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique, sel disodique
Ethanol 95 %

D-Fructose 6-phosphate sel disodique
 α -D Glucose 1-phosphate, sel disodique monohydraté
Glucose 6-phosphate déshydrogénase (Sigma G5885)
HCl : Acide chlorhydrique
MgCl₂ : Chlorure de magnésium, 6H₂O
MTT : Diméthylthiazol diphényltétrazolium
 β -NADP : β -Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, sel disodique
NaOH : Hydroxyde de sodium (soude)
NBT : Nitro blue tétrazolium
PMS : Phénazine méthosulfate
Tris : Tris- (hydroxyméthyl) aminométhane

4. Solutions

4.1 Tampon d'extraction : Tris HCl 0,1M, pH 7,2 + β -mercaptoéthanol 0,2 % (v/v).

4.2 Tampons d'électrophorèse

4.2.1 Tampons pour l'électrophorèse à pH 6,5

4.2.1.1 Solution - mère : L-histidine-citrate 0,364 M

L-histidine 50,44 g
Acide citrique monohydraté 8,34 g
Eau désionisée q.s.p. 1 l.

4.2.1.2 Tampon de migration : L-histidine-citrate 0,072 M pH 6,5 (solution - mère diluée 5 fois)

Solution - mère (4.2.1.1) 400 ml
Eau désionisée q.s.p. 2 l

4.2.1.3 Tampon de gel : L-histidine-citrate 0,024 M (solution - mère diluée 15 fois)

Solution - mère (4.2.1.1) 80 ml
Eau désionisée q.s.p. 1200 ml

4.2.2 Tampons pour l'électrophorèse à pH 5,7

4.2.2.1 Tampon de migration : 0,067 M L-histidine-citrate pH 5,7 :

L-histidine 20,18 g
Acide citrique monohydraté 8,34 g
Eau désionisée q.s.p. 2 l.

4.2.2.2 Tampon de gel : 0,011 M L-histidine-citrate (tampon de migration dilué 6 fois) :

Tampon de migration t (4.2.2.1) 100 ml
Eau désionisée q.s.p. 1200 ml

4.2.2.3 Solution de Bleu de bromophénol :

Bleu de bromophénol 50 mg
Eau désionisée q.s.p. 100 ml

4.3 Solutions de révélation

4.3.1 Solutions - mères

4.3.1.1 Tris-HCl 1 M, pH 7,5

Tris 121,1 g
Ajusté à pH 7,5 avec HCl 50 %
Eau désionisée q.s.p. 1 l

4.3.1.2 Tris-HCl 1 M pH 8,5

Tris 121,1 g
Ajusté à pH 8,5 avec HCl 50 %
Eau désionisée q.s.p. 1 l

4.3.1.3 Solution de MTT

1.0 g MTT ajusté à 100 ml avec de l'eau désionisée.

4.3.1.4 Solution de NBT

1.0 g NBT ajusté à 100 ml avec de l'eau désionisée.

4.3.1.5 Solution de PMS

200 mg PMS ajusté à 100 ml avec de l'eau désionisée.

4.3.1.6 Solution de MgCl₂

10 g chlorure de magnésium ajusté à 100 ml avec de l'eau désionisée.

4.3.1.7 Solution de malate de sodium

2.5 g DL- acide malique
Ajusté à pH 8,0 avec NaOH 1M.
Eau désionisée q.s.p. 50 ml

4.3.2 Solutions des révélations enzymatiques

4.3.2.1 Solution de révélation des EM

100 ml Tris HCl 0,1M pH 7,5 (4.3.1.1 dilué 10 fois)
4 ml Solution de malate de sodium (4.3.1.7.)
1 ml Solution NBT (4.3.1.4.)
1 ml Solution PMS (4.3.1.5.)
1,8 ml Solution MgCl₂
17,5 mg NADP

4.3.2.2 Solution de révélation des PGD et des PGI

Les PGI migrent dans les deux premiers centimètres du gel.

Les PGD migrent au-dessus des PGI.

Il est donc possible de révéler ces deux enzymes sur la même tranche de gel.

100 ml Tris HCl 0,1M pH 7,5 (4.3.1.1. dilué 10 fois)
100 mg D-fructose 6-phosphate, sel disodique
60 mg Acide 6-phosphogluconique, sel trisodique
10 mg NADP
1 ml Solution MTT (4.3.1.3.)
1,5 ml Solution PMS (4.3.1.5.)
100 mg Solution MgCl₂ (4.3.1.6.)
40 unités Glucose 6-phosphate déshydrogénase (SIGMA G5885)

Pour ne révéler que les PGI, ne pas mettre d'acide 6-phosphogluconique dans la solution de révélation.

Pour ne révéler que les PGD, ne pas mettre de D-fructose 6-phosphate disodique et de glucose 6-phosphate déshydrogénase dans la solution de révélation.

4.3.2.3 Solution de révélation des ShDH

100 ml Tris HCl 0,2M pH 8,5 (4.3.1.2 dilué 5 fois)
50 mg Acide shikimique
1 ml Solution MTT (4.3.1.3.)
1.25 ml Solution PMS (4.3.1.5.)
12 mg NADP

4.3.2.4 Solution de révélation des PGM

100 ml Tris HCl 0,1M pH 8,5 (4.3.1.2. dilué 10 fois)
150 mg α-D-glucose 1-phosphate monohydraté, sel disodique
150 mg EDTA, sel disodique
10 mg NADP
1,5 ml Solution MTT (4.3.1.3.)
1 ml Solution PMS (4.3.1.5.)
4 ml Solution MgCl₂ (4.3.1.6.)
40 unités Glucose 6-phosphate déshydrogénase (SIGMA G5885)

5. Manipulation

5.1 Extraction des enzymes

Mettre les graines à germer sur du papier filtre à saturation d'eau, dans une étuve à 25°C et à l'obscurité, pendant 2 à 3 jours. Enlever les téguments et broyer les cotylédons à 4° C avec un pilon, dans des microtubes de 1,5 ml contenant 300 µl de tampon extraction (4.1).

Les extraits peuvent être conservés à -30 ° C ou -80.

5.2 Préparation du gel d'amidon

Préparer les gels, la veille de la migration

Pour faire deux gels à 12,5 % d'amidon (18 x 18 x 1 cm), mélanger 128 g d'amidon avec 1020 ml tampon de gel (4.2.1.3. or 4.2.2.2.) dans une fiole à vide de 1000 ml
Chauffer le mélange à 78 ° C en agitant (par exemple avec un agitateur à pales entraîné par un moteur). Dégazer le mélange avec une trompe à eau, pendant 30 s.
Couler les gels dans les moules, selon ce qui est décrit dans le manuel d'utilisation de l'appareil. Éviter la formation de bulles d'air. Laisser refroidir les gels pendant 45 mn, puis les placer au réfrigérateur pendant 1 h. Les recouvrir d'un film de polyéthylène et les conserver à température ambiante jusqu'au lendemain. Les refroidir à 4°C environ 1 heure avant la migration.

5.3 Electrophorèse

Chaque bac à électrode est rempli avec le volume approprié de tampon de migration (4.2.1.2. or 4.2.2.1.) pré-refroidi à 4 ° C.

Soulever le film de polyéthylène et couper deux fentes transversales dans le gel à 3 cm et 4cm de l'extrémité cathodale du moule.

Retirer la bande de gel de 1 cm gel et pratiquer les dépôts des extraits comme suit :

Après décongélation des extraits (5.1), imbiber de chaque extrait, une mèche de papier filtre (1.5 mm x 20 mm, Whatman N° 3).

Insérer les mèches dans le gel, contre la 1^{ère} fente.

Placer à chaque bord du gel, une mèche imbibée de bleu de bromophénol (4.2.2.3) (marqueur de migration).

Replacer très soigneusement la bande de gel. Remettre le film de polyéthylène sur chaque gel.

Placer les deux gels, avec la ligne de dépôt orientée côté cathode, sur les deux bacs à électrodes, dans une enceinte réfrigérée à 4°C.

L'électrophorèse est faite à 4° C, vers l'anode.

Après 15 mn de migration au 1^{er} voltage, retirer les mèches et augmenter le voltage.
Le voltage est maintenu constant pendant chaque phase.

Les conditions électrophorétiques sont indiquées dans le tableau suivant.

Systèmes de tampons	Voltage constant	Distance parcourue par le bleu de bromophénol	Durée de migration
Histidine citrate pH 5,7	260 V pendant 15 mn puis 290 V	13 cm	5 h
Histidine citrate pH 6,5	240 V pendant 15 mn puis 280 V	11 cm	5 h

Les ME, PGD et PGI sont séparées par électrophorèse à pH 5,7. Les ShDH et PGM sont séparées par électrophorèse à pH 6,5.

5.4 Révélation enzymatiques

Après coupure du courant, procéder au découpage des gels. Couper le gel horizontalement tranches de 1 mm d'épaisseur avec un fil d'acier très fin ou un fil à pêche. Eliminer la tranche supérieure. Mettre à incuber chaque tranche à 37 ° C, à l'obscurité dans une solution de révélation spécifique de l'enzyme :

Pour les EM :	solution 4.3.2.1	Temps d'incubation :15 h
pour les PGD et PGI :	solution 4.3.2.2	Temps d'incubation :1 h
pour les ShDH :	solution 4.3.2.3.	Temps d'incubation :1 h
pour les PGM :	solution 4.3.2.4	Temps d'incubation :1/2 h

Après coloration, rincer les tranches de gel à l'eau désionisée et les fixer dans une solution d'éthanol à 40 %. Pour un stockage des gels de longue durée, on peut soit les sécher entre deux feuilles de Cellophane, après trempage dans une solution de glycérol à 5 %, soit les conserver sous plastique scellé.

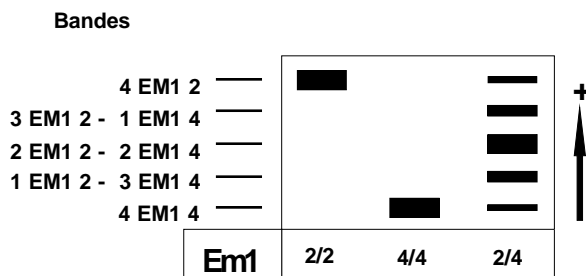
6. Description des allèles codant pour les isoenzymes

6.1 Description des allèles codant pour les EM

6.1.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Locus	Allèles
Enzyme malique (EM)	Tetramérique	Em1	2 4

6.1.2 Schématisation des zymogrammes

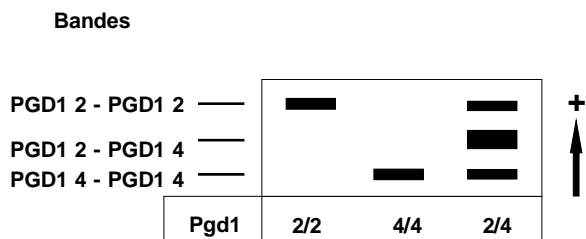


6.2 Description des allèles codant pour les PGD

6.2.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Locus	Allèles
6-phosphogluconate déshydrogénase (PGD)	Dimérique	Pgd1	2 4

6.2.2 Schématisation des zymogrammes



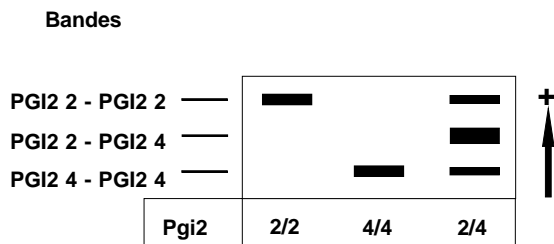
On observe deux zones de migration ; seules les bandes les plus lentes sont polymorphes.

6.3 Description des allèles codant pour les PGI

6.3.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Locus	Allèles
Phosphoglucoisomérase (PGI)	Dimérique	Pgi2	2 4

6.3.2 Schématisation des zymogrammes



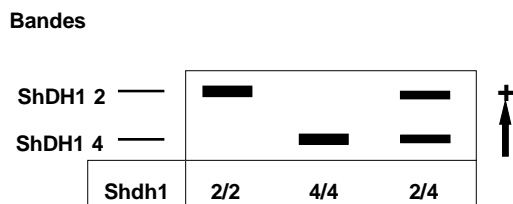
On observe deux zones de migration ; seules les bandes les plus lentes sont interprétées.

6.4 Description des allèles codant pour les ShDH

6.4.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Locus	Allèles
Shikimate déshydrogénase (SHDH)	Monomérique	Shdh1	2 4

6.4.2 Schématisation des zymogrammes

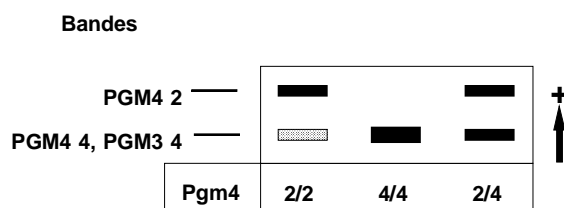


6.5 Description des allèles codant pour les PGM

6.5.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Locus	Allèles
Phosphoglucomutase	Monomérique	Pgm4	2 4

6.5.2 Schématisation des zymogrammes



On observe plusieurs zones de migration ; seule la zone rapide est polymorphe. Il y a un autre gène non pris en compte. Celui-ci a été désigné Pgm3, codifiant pour une enzyme qui co-migre avec PGM4 4.

C'est pourquoi, les génotypes Pgm4 2/2 and Pgm4 2/4 donnent un zymogramme à deux bandes. Ces deux génotypes diffèrent seulement par l'intensité relative des bandes.

[Fin du document]