



TGP/15/1

ORIGINAL: englisch

DATUM: 24. Oktober 2013

**INTERNATIONALER VERBAND ZUM SCHUTZ VON PFLANZENZÜCHTUNGEN**

Genf

Verbundenes DokumentzurAllgemeinen Einführung zur Prüfung aufUnterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit und zurErarbeitung harmonisierter Beschreibungen von neuen Pflanzensorten (Dokument TG/1/3)

DOKUMENT TGP/15

ANLEITUNG ZUR VERWENDUNG BIOCHEMISCHER UND MOLEKULARER MARKER BEI DER  
PRÜFUNG DER UNTERSCHIEDBARKEIT, DER HOMOGENITÄT UND DER BESTÄNDIGKEIT (DUS)

vom Rat angenommen  
auf seiner siebenundvierzigsten ordentlichen Tagung  
am 24. Oktober 2013

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG .....	3
2. MODELLE FÜR DIE ANWENDUNG .....	3
2.1 Merkmalspezifische molekulare Marker (vergleiche Anlage 1).....	3
2.2 Kombination phänotypischer und molekularer Abstände bei der Verwaltung von Sortensammlungen (vergleiche Anlage 2).....	4

ANLAGE 1      MODELL: MERKMALSPEZIFISCHE MOLEKULARE MARKER  
                    BEISPIEL: GENSPEZIFISCHE MARKER FÜR HERBIZIDTOLERANZ

ANLAGE 2      MODELL: KOMBINATION PHÄNOTYPISCHER UND MOLEKULARER ABSTÄNDE  
                    BEI DER VERWALTUNG VON SORTENSAMMLUNGEN  
                    BEISPIEL: ELTERNLINIEN VON MAIS

## 1. EINLEITUNG

1.1 In Dokument UPOV/INF/18 „Mögliche Verwendung molekularer Marker bei der Prüfung der Unterscheidbarkeit, der Homogenität und der Beständigkeit (DUS)“ werden mögliche Anwendungsmodelle für die Verwendung biochemischer und molekularer Marker bei der DUS-Prüfung untersucht, die der Technische Ausschuss der Ad-hoc-Untergruppe technischer und juristischer Sachverständiger für biochemische und molekulare Verfahren (BMT-Überprüfungsgruppe) auf der Grundlage der Arbeiten der Arbeitsgruppe für biochemische und molekulare Verfahren und insbesondere für DNS-Profilierungsverfahren (BMT) und der artenspezifischen Untergruppen für molekulare Verfahren (artenspezifische Untergruppen) (vergleiche <http://www.upov.int/about/de/organigram.html>) vorgeschlagen hat. Die Beurteilung durch die BMT-Überprüfungsgruppe und die Meinungen des Technischen Ausschusses und des Verwaltungs- und Rechtsausschusses (CAJ) zu diesen Modellen werden in Dokument UPOV/INF/18 dargelegt.

1.2 Dieses Dokument soll Anleitung zur Verwendung biochemischer und molekularer Marker bei der Prüfung der Unterscheidbarkeit, der Homogenität und der Beständigkeit (DUS) auf der Grundlage der Modelle in Dokument UPOV/INF/18 geben, die positiv beurteilt wurden und für die anerkannte Beispiele gegeben wurden.

1.3 Die einzigen verbindlichen Verpflichtungen für die Verbandsmitglieder sind diejenigen, die das UPOV-Übereinkommen selbst vorsieht, und das vorliegende Dokument darf nicht in einer Weise ausgelegt werden, die in Widerspruch zu der für das jeweilige Verbandsmitglied geltenden Akte steht.

1.4 Folgende Abkürzungen werden in diesem Dokument verwendet:

CAJ:	Verwaltungs- und Rechtsausschuß
TC:	Technischer Ausschuß
TC-EDC:	Erweiterter Redaktionsausschuß
TWA:	Technische Arbeitsgruppe für landwirtschaftliche Arten
TWC:	Technische Arbeitsgruppe für Automatisierung und Computerprogramme
TWF:	Technische Arbeitsgruppe für Obstarten
TWO:	Technische Arbeitsgruppe für Zierpflanzen und forstliche Baumarten
TWV:	Technische Arbeitsgruppe für Gemüsearten
TWP:	Technische Arbeitsgruppen
BMT:	Arbeitsgruppe für biochemische und molekulare Verfahren und insbesondere für DNS-Profilierungsverfahren
BMT-Überprüfungsgruppe:	Ad-hoc-Untergruppe technischer und juristischer Sachverständiger für biochemische und molekulare Verfahren
Artenspezifische Untergruppe:	artenspezifische Ad-hoc-Untergruppe für molekulare Verfahren

## 2. MODELLE FÜR DIE ANWENDUNG

### 2.1 Merkmalspezifische molekulare Marker (vergleiche Anlage 1)

2.1.1 Molekulare Marker können auf der folgenden Grundlage als eine Methode zur Prüfung von DUS-Merkmalen, die die Kriterien für die in der Allgemeinen Einführung, Kapitel 4, Abschnitt 4.2 dargelegten Merkmale erfüllen, verwendet werden:

a) die Prüfung des Markers wird für die gleiche Anzahl Einzelpflanzen mit den gleichen Kriterien für die Unterscheidbarkeit, die Homogenität und die Beständigkeit durchgeführt wie bei der Prüfung des Merkmals durch eine biologische Prüfung;

b) es erfolgt eine Überprüfung der Zuverlässigkeit der Kopplung zwischen dem Marker und dem Merkmal;

c) verschiedene Marker für dasselbe Merkmal sind verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals;

d) Marker, die mit verschiedenen Genen gekoppelt sind, die die Ausprägung desselben Merkmals übertragen, sind verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals; und

e) Marker, die mit verschiedenen regulatorischen Elementen für dasselbe Gen verbunden sind, das die Ausprägung desselben Merkmals überträgt, sind verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals.

2.1.2 Anlage 1 dieses Dokuments „Genspezifische Marker für Herbizidtoleranz“ gibt ein Beispiel für die Verwendung merkmalspezifischer molekularer Marker.

## 2.2 Kombination phänotypischer und molekularer Abstände bei der Verwaltung von Sortensammlungen (vergleiche Anlage 2)

2.2.1 Ein Schlüsselaspekt des Prozesses der Eliminierung allgemein bekannter Sorten vor der DUS-Anbauprüfung ist, daß die Schwelle mit einer angemessenen Sicherheitsmarge festgesetzt wird. Diese Schwelle wird als „Unterscheidbarkeitsschwelle plus“ bezeichnet, was bedeutet, daß die Abstände zwischen einer Kandidatensorte und Sorten mit „Unterscheidbarkeit plus“ robust genug sind, um ohne direkten Vergleich in der Anbauprüfung eine Entscheidung zu treffen.

2.2.2 Eine Kombination phänotypischer Unterschiede und molekularer Abstände kann auf folgender Grundlage verwendet werden, um innerhalb der Sortensammlung diejenigen Sorten auszuweisen, die mit Kandidatensorten verglichen werden müssen, um die Auswahl der Sorten mit „Unterscheidbarkeit plus“ zu verbessern:

a) es gibt zuverlässige Information, daß die molekularen Abstände in ausreichendem Bezug zu phänotypischen Unterschieden stehen, so daß

b) die Methode Sorten in der Sortensammlung auswählt, die den Kandidatensorten ähnlich sind;  
und

c) die Methode kein erhöhtes Risiko schafft, daß eine Sorte in der Sortensammlung, die im Feld mit den Kandidatensorten verglichen werden muß, nicht ausgewählt wird.

2.2.3 Anlage 2 dieses Dokuments „Kombination phänotypischer und molekularer Abstände bei der Verwaltung von Sortensammlungen“ gibt ein Beispiel für die Verwendung der Kombination phänotypischer Unterschiede und molekularer Abstände bei der Verwaltung von Sortensammlungen.

[Anlagen folgen]

MODELL: MERKMALSPEZIFISCHE MOLEKULARE MARKER
--

## BEISPIEL: GENSPEZIFISCHE MARKER FÜR HERBIZIDTOLERANZ

*von Sachverständigen aus Frankreich ausgearbeitet*

## Beispiel

1. Eine Sorte wird durch Einführung eines Gens für die Toleranz gegenüber dem Herbizid „Formel X“ genetisch modifiziert. Sorten mit diesem Gen werden nicht geschädigt, wenn sie mit Formel X besprüht werden; Sorten ohne dieses Gen werden hingegen stets abgetötet, wenn sie mit diesem bestimmten Herbizid behandelt werden. Die Toleranz gegenüber der Formel X, die in Feldprüfungen durch Besprühen von Parzellen untersucht wurde, ist ein akzeptiertes DUS-Merkmal und kann zur Begründung der Unterscheidbarkeit von Sorten verwendet werden.

2. Es wird vorgeschlagen, daß das Merkmal „Toleranz gegenüber der Formel X“ geprüft werden sollte, indem eine Prüfung auf Vorhandensein eines mit dem Gen *verbundenen* molekularen Markers durchgeführt wird, anstatt die Sorten im Feld zu besprühen (dies ist bei der Standard-DUS-Prüfung schwer durchzuführen). Dieser Marker befindet sich auf einem Teil des Gen-„Konstrukts“. Das Gen-„Konstrukt“ umfaßt alle Elemente die während der genetischen Modifizierung in die Pflanze eingeführt werden, und enthält außer dem Gen selbst zusätzliche Elemente für die Regulierung des Gens, wenn es in der Pflanze ist. Der Markerlocus kann sich im Gen, teilweise auf dem Gen oder außerhalb des Gens selbst befinden.

Annahmen, die im Beispiel aufzustellen sind

3. Folgende Annahmen werden aufgestellt:

a) Die DUS-Prüfung

Es wird angenommen, daß die Prüfung des Markers im gleichen Umfang wie die Feldprüfung durchgeführt wird, d. h. die gleiche Anzahl Einzelpflanzen über die gleiche Anzahl Jahre und mit den gleichen Kriterien für die Unterscheidbarkeit, die Homogenität und die Beständigkeit.

b) Zuverlässigkeit der Verbindung

Es wird angenommen, daß die Verbindung zwischen dem Marker und dem Gen überprüft würde, um sicherzustellen, daß der Marker ein verlässlicher Prädiktor für die Toleranz gegenüber der Formel X ist. Diese Überprüfung wäre notwendig, um beispielsweise sicherzustellen, daß der Marker nicht vom Gen getrennt wird und daß das Vorhandensein des Gens noch immer zur Toleranz gegenüber der Formel X führt.

c) Entwicklung verschiedener molekularer Marker für dasselbe Gen

Es wäre möglich, verschiedene Genkonstrukte zu entwickeln, die die Toleranz gegenüber der Formel X enthalten, und getrennte molekulare Marker für diese einzelnen Genkonstrukte zu identifizieren, die sämtlich mit genau demselben Gen für die Toleranz gegenüber der Formel X verbunden wären. Wenn alle verschiedenen Marker für dasselbe Gen als verschiedene Methoden für die Prüfung desselben vorhandenen phänotypischen Merkmals akzeptiert würden, wäre die Prüfung des Vorgehens gleich. Für die Verwendung „Molekularer [...] [Marker] als Prädiktoren für herkömmliche Merkmale“, muß auf der Grundlage gearbeitet werden, daß die Marker einem herkömmlichen, d. h. bestehenden, akzeptierten Merkmal entsprechen. Daher wird angenommen, daß verschiedene Marker für dasselbe Gen als verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals behandelt würden, d. h. der Toleranz gegenüber der Formel X.

d) Verschiedene Gene, die eine Toleranz gegenüber demselben Herbizid erzeugen

Es wäre möglich, verschiedene Gene zu entwickeln, die die Toleranz gegenüber der Formel X übertragen. Im einfachsten Fall könnte dies gleich angesehen werden wie verschiedene Marker für dasselbe Gen, d. h. die verschiedenen Gene mit ihren entsprechenden Markern würden als verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals, d. h. der Toleranz gegenüber der Formel X, angesehen. Die verschiedenen Gene hätten jedoch vermutlich einen verschiedenen chemischen Mechanismus für die Erzeugung der Toleranz gegenüber der Formel X. So werden die aus den verschiedenen Genen erzeugten chemischen Substanzen verschieden sein, und diese verschiedenen chemischen Substanzen könnten in einigen Fällen die Grundlage für die Begründung der Unterscheidbarkeit bilden. Dennoch wäre es nach diesem Modell zunächst notwendig, die chemischen Bestandteile als UPOV-Merkmale zu akzeptieren, bevor die mit diesen potentiellen Merkmalen verbundenen molekularen Marker akzeptiert werden. Dies wiederum wäre ein getrenntes Beispiel. Daher wird angenommen, daß verschiedene Gene als verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals, d. h. der Toleranz gegenüber der Formel X, behandelt werden.

- e) Verschiedene Genkonstrukte, die dieselbe Herbizidtoleranz erzeugen, jedoch mit einer verschiedenen Ausprägungskontrolle

Es ist auch möglich, daß verschiedene Genkonstrukte entwickelt werden könnten, die dasselbe Gen für die Toleranz gegenüber der Formel X enthalten, jedoch eine unterschiedliche Kontrolle haben. Die Kontrollelemente können beispielsweise dazu führen, daß die Toleranz gegenüber der Formel X nur in bestimmten Entwicklungsstadien eingeschaltet wird. Der Einfachheit halber wird bei der Prüfung dieses Beispiels angenommen, daß die verschiedenen Marker, die mit verschiedenen Kontrollelementen für dasselbe Gen verbunden sind, sämtlich als verschiedene Methoden für die Prüfung desselben Merkmals der Toleranz gegenüber der Formel X behandelt würden. Es wird jedoch auch angenommen, daß diese Frage zu einem späteren Zeitpunkt weiter untersucht wird.

[Anlage 2 folgt]

**MODELL: KOMBINATION PHÄNOTYPISCHER UND MOLEKULARER ABSTÄNDE BEI DER VERWALTUNG VON SORTENSAMMLUNGEN**

**BEISPIEL: ELTERNLINIEN VON MAIS**

*von Sachverständigen aus Frankreich ausgearbeitet*

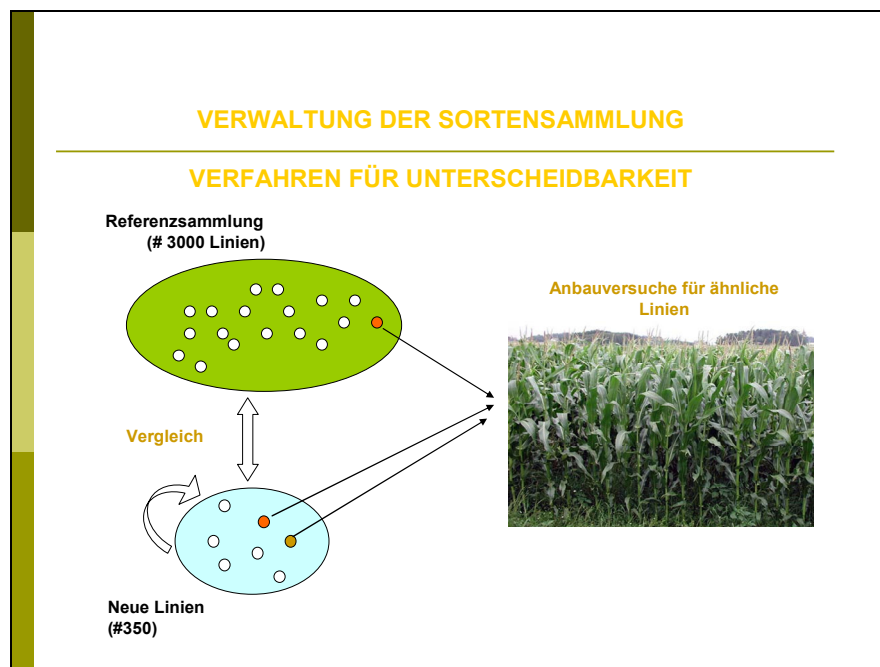
**1. Beschreibung**

1.1 Ein Schlüsselaspekt des Prozesses der Eliminierung allgemein bekannter Sorten vor der DUS-Anbauprüfung ist, daß die Schwelle für die Entscheidung, welche Sorten mit Sicherheit ausgeschlossen werden können (d. h. aufgrund der Beschreibungen unterscheidbar sind), mit einer angemessenen Sicherheitsmarge festgesetzt werden kann, weil diejenigen Sorten, die eliminiert werden, nicht in die Anbauprüfung eingeschlossen werden. Diese Schwelle mit einer Sicherheitsmarge wird als „Unterscheidbarkeitschwelle plus“ bezeichnet, was bedeutet, daß die Abstände zwischen einer Kandidatensorte und Sorten mit „Unterscheidbarkeit plus“ robust genug sind, um ohne direkten Vergleich in der Anbauprüfung eine Entscheidung zu treffen.

1.2 Zweck dieses Beispiels ist es, ein effizientes Hilfsmittel aufgrund einer Kombination phänotypischer und molekularer Abstände zu entwickeln, um innerhalb der Sortensammlung diejenigen Sorten auszuweisen, die mit Kandidatensorten verglichen werden müssen (vergleiche Abbildung 1), um die Auswahl der Sorten mit „Unterscheidbarkeit plus“ zu verbessern und dadurch die Arbeitsbelastung zu begrenzen, ohne die Qualität der Prüfung zu verringern. Die Herausforderung besteht darin, ein sicheres System zu entwickeln, das

- a) nur Sorten auswählt, die der Kandidatensorte ähnlich sind, und
- b) das Risiko begrenzt, daß eine Sorte in der Sortensammlung, die im Feld verglichen werden muß, nicht ausgewählt wird, insbesondere wenn eine umfangreiche oder aufwendige Sortensammlung vorhanden ist.

*Abbildung 1*



### 1.3 Das neue System wurde vor nachstehendem Hintergrund ausgearbeitet:

a) Studien über molekulare Abstände bei Mais für die DUS-Prüfung und die wesentliche Ableitung, die den Zusammenhang mit dem Verwandtschaftsgrad zwischen Sorten aufzeigten (vergleiche Dokumente BMT/3/6 „The Estimation of Molecular Genetic Distances in Maize or DUS and ED Protocols: Optimierung der Informationen und neue Ansätze für die Verwandtschaft“ und Dokument BMT/3/6 Add.);

b) Ein von GEVES durchgeführtes Experiment an einer Serie von Elternlinien von Mais, das aufzeigte, daß eine Verbindung zwischen der Beurteilung der Unterscheidbarkeit durch Sachverständige (globale Prüfung) und einem molekularen Abstand besteht, der anhand molekularer Daten aufgrund einfacher Sequenzwiederholungen (Simple Sequence Repeat, SSR) berechnet wird (vergleiche Abbildung 2).

### 1.4 Komponenten des Systems

#### 1.4.1 GAIA-Abstand

Die Komponente GAIA-Abstand wird mit der von GEVES entwickelten GAIA-Software berechnet. Der GAIA-Abstand ist eine Kombination von Unterschieden, die an phänotypischen Merkmalen erfaßt werden, wobei jeder Unterschied je nach Zuverlässigkeit der Merkmale, insbesondere ihrer Variabilität und Umweltanfälligkeit, zum Abstand beiträgt. Je größer der Unterschied und je größer die Zuverlässigkeit des Merkmals ist, desto stärker trägt der Unterschied zum GAIA-Abstand bei. Lediglich diejenigen Unterschiede, die gleich oder größer als der für jedes einzelne Merkmal erforderliche Mindestabstand sind, werden einbezogen.

#### 1.4.2 Molekularer Abstand

Die Komponente des molekularen Abstands wird anhand der an einem Markersatz erfaßten Unterschiede berechnet. Es können verschiedene Typen molekularer Marker und Abstände angewandt werden. Im Falle der in Frankreich an Mais durchgeführten Studie wurden 60 SSR-Marker und der Rogers'sche Abstand angewandt. Es ist wichtig, daß genügend Marker mit einer angemessenen Verteilung auf den Chromosomen verwendet werden. Der Typ der Marker, der Effekt der Anzahl Marker und die Verteilung der Marker müssen je nach der betreffenden Art berücksichtigt werden.

1.4.3 Bevor diese beiden Komponenten kombiniert werden, muß eine Beurteilung des Zusammenhanges zwischen dem molekularen Abstand und einer globalen Beurteilung der Unterscheidbarkeit durch ein Gremium von Sachverständigen an einer Serie von Sortenpaaren erfolgen. Im Falle von Mais wurde diese Beurteilung auf folgender Grundlage durchgeführt:

Material: 504 Sortenpaare, die parallel mit molekularen Markern geprüft wurden

Feldanlage: nebeneinander angebaute Sortenpaare  
(1 Parzelle = 2 Reihen mit je 15 Pflanzen)

Visuelle Erfassung durch Sachverständige für Mais:

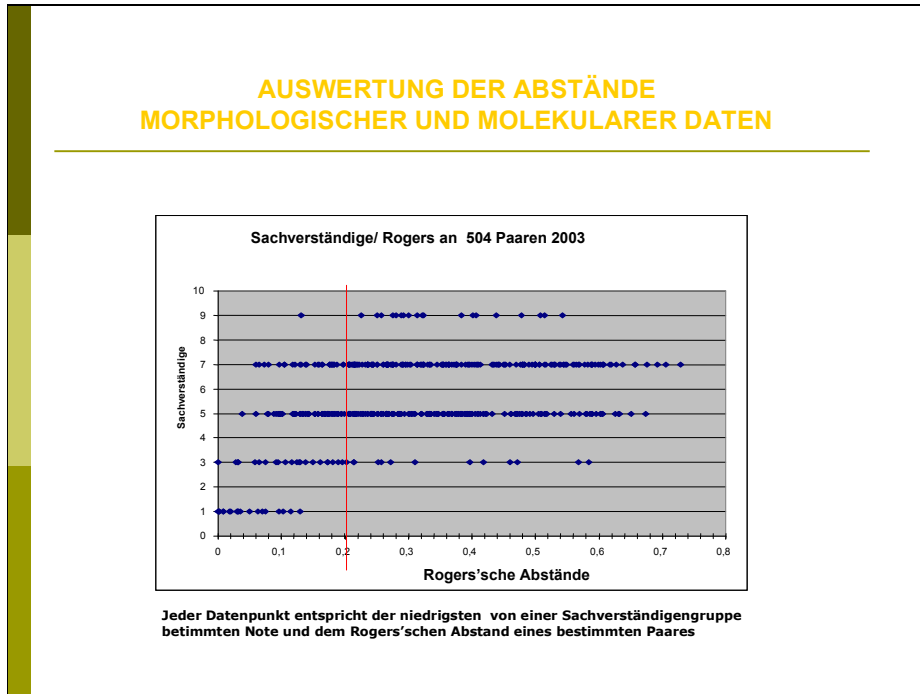
Ähnlichkeitsskala:

1. die beiden Sorten sind gleich oder sehr ähnlich
3. die beiden Sorten sind unterscheidbar, jedoch ähnlich
5. der Vergleich war nützlich, doch die Sorten sind deutlich unterscheidbar
7. der Vergleich hätte vermieden werden sollen, weil die Sorten stark verschieden sind
9. der Vergleich hätte vermieden werden sollen, weil die Sorten vollkommen verschieden sind („gerade“ Noten werden in der Skala nicht benutzt)

Im Falle von Mais zeigte diese Beurteilung, daß keine Elternlinien mit einem molekularen Abstand von mehr als 0,15 bei einer Beurteilung durch einen DUS-Sachverständigen als gleich oder sehr ähnlich angesehen wurden (vergleiche Abbildung 2).

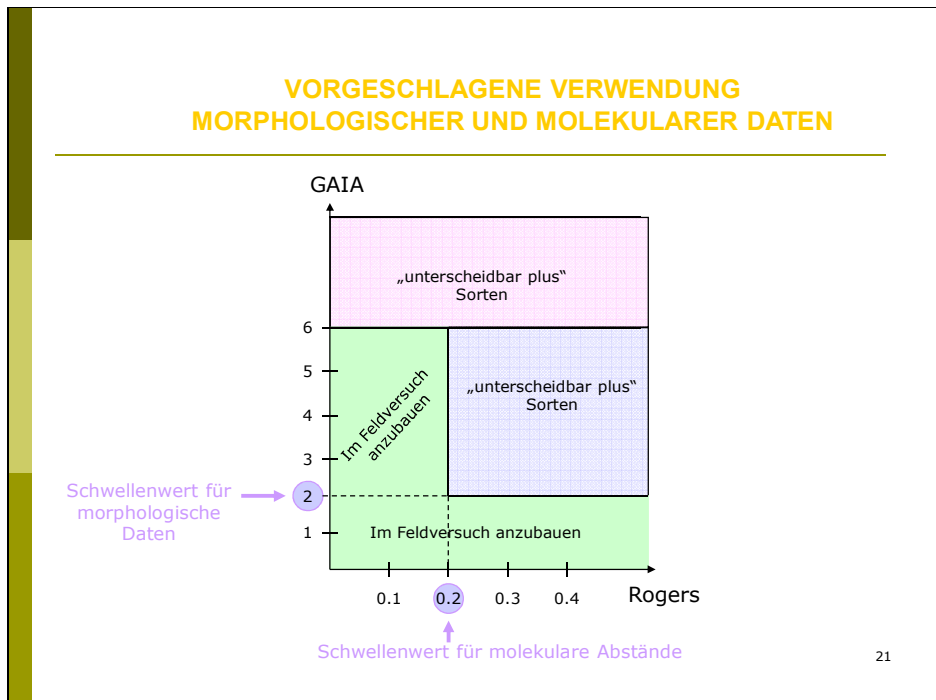


Abbildung 2



1.4.4 Aufgrund dieses Ergebnisses bietet die Kombination morphologischer und molekularer Abstände die Möglichkeit, folgendes Entscheidungsschema aufzustellen (vergleiche Abbildung 3):

Abbildung 3



1.4.5 Alle Sortenpaare mit einem GAIA-Abstand, der gleich oder größer als 6 ist, und alle Sorten mit einem GAIA-Abstand zwischen 2 und 6 zuzüglich eines molekularen Abstandes, der gleich oder größer als 0,2 ist, werden als „unterscheidbar plus“ bezeichnet.

1.4.6 Dieses Schema zeigt, daß im Vergleich zu der Situation, in der lediglich ein GAIA-Abstand von 6 allein benutzt wird, weniger Elternlinien im Feld erfaßt werden müssen.

1.4.7 Die Robustheit dieses Systems wurde anhand verschiedener GAIA- und molekularer Abstände untersucht.

## 2. Vorteile und Einschränkungen

### 2.1 Vorteile

a) Verbesserung der Verwaltung von Sortensammlungen, da weniger Sorten im Feld verglichen werden müssen

b) Anwendung morphologischer und molekularer Abstände mit Schwellenwerten, die von DUS-Sachverständigen festgelegt werden. GAIA wurde bei der Entwicklung durch GEVES auch gegen die Beurteilungen von DUS-Sachverständigen kalibriert;

c) Verwendung molekularer Daten, die nicht umweltschädlich sind; der Markersatz und das Laborprotokoll sind gut definiert;

d) nur Verwendung phänotypischer Merkmale mit einer angemessenen Robustheit und Möglichkeit, Beschreibungen zu verwenden, die verschiedener Herkunft sind und aus enger Zusammenarbeit stammen (die Maisdatenbank, die in Zusammenarbeit zwischen Deutschland, Frankreich, Spanien und dem Gemeinschaftlichen Sortenamt der Europäischen Union (CPVO) entwickelt wurde, ist ein gutes Beispiel, um den Nutzen dieses Ansatzes bei einer Sortensammlung, die von verschiedenen Ämtern gemeinsam genutzt wird, zu verdeutlichen);

e) Elektrophoresemerkmale können auch ersetzt werden, und

f) fehlende Homogenität bei molekularen Profilen übt keinen Einfluß aus, sofern genügend Marker verwendet werden und die Zahl der Varianten gering ist. Im Falle von Elternlinien von Mais ist das Niveau der molekularen Homogenität hoch; dies könnte bei anderen Pflanzen jedoch ein Problem sein.

### 2.2 Einschränkungen

a) Nicht oder weniger effizient für Arten mit synthetischen Sorten oder Populationen;

b) es ist notwendig, über hinreichend gute DNS-Marker und genügend phänotypische Merkmale mit geringer Umweltschädlichkeit zu verfügen, und

c) vorherige Arbeit mit der Kalibrierung im Vergleich zur Beurteilung der Unterscheidbarkeit durch DUS-Sachverständige.

[Ende der Anlage 2 und des Dokuments]