Revision of/du/von TG/19/7

UPOV

TG/19/10
Original: English/anglais/englisch
Date/Datum: 1994-11-04

INTERNATIONALER VERBAND ZUM SCHUTZ VON PFLANZENZÜCHTUNGEN

UNION INTERNATIONALE POUR LA PROTECTION DES OBTENTIONS VEGETALES

INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS

GUIDELINES

FOR THE CONDUCT OF TESTS

FOR DISTINCTNESS, UNIFORMITY AND STABILITY

PRINCIPES DIRECTEURS

POUR LA CONDUITE DE L'EXAMEN

DES CARACTERES DISTINCTIFS, DE L'HOMOGENEITE ET DE LA STABILITE

RICHTLINIEN

FUER DIE DURCHFUEHRUNG DER PRUEFUNG

AUF UNTERSCHEIDBARKEIT, HOMOGENITAET UND BESTAENDIGKEIT

BARLEY

ORGE

GERSTE

(*Hordeum vulgare* L. *sensu lato*)

These Guidelines should be read in conjunction with document UPOV/TG/1/2, which contains explanatory notes on the general principles on which the Guidelines have been established.

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

Diese Richtlinien sind in Verbindung mit dem Dokument UPOV/TG/1/2 zu sehen, das Erklärungen über die allgemeinen Grundsätze enthält, nach denen die Richtlinien aufgestellt wurden.

[English]

TABLE OF CONTENTS PAGE

I.	Subject of these Guidelines	3
II.	Material Required	3
III.	Conduct of Tests	3
IV.	Methods and Observations	3
V.	Grouping of Varieties	4
VI.	Characteristics and Symbols	4
VII.	Table of Characteristics	11
VIII.	Explanations on the Table of Characteristics	16
IX.	Literature	29
X.	Technical Questionnaire	30
	Annex	

[français]

SOMMAIRE PAGE

I.	Objet de ces principes directeurs	5
II.	Matériel requis	5
III.	Conduite de l'examen	5
IV.	Méthodes et observations	6
V.	Groupement des variétés	6
VI.	Caractères et symboles	6
VII.	Tableau des caractères	11
VIII.	Explications du tableau des caractères	16
IX.	Littérature	29
X.	Questionnaire technique	30
	Annexe	

[deutsch]

INHALT SEITE

I.	Anwendung dieser Richtlinien	8
II.	Anforderungen an das Vermehrungsmaterial	8
III.	Durchführung der Prüfung	8
IV.	Methoden und Erfassungen	9
V.	Gruppierung der Sorten	9
VI.	Merkmale und Symbole	9
VII.	Merkmalstabelle	11
VIII.	Erklärungen zu der Merkmalstabelle	16
IX.	Literatur	29
X.	Technischer Fragebogen	30
	Anlage	

[English]

I. Subject of these Guidelines

These Test Guidelines apply to all varieties of Hordeum vulgare L. sensu lato.

II. Material Required

1. The competent authorities decide when, where and in what quantity and quality the plant material required for testing the variety is to be delivered. Applicants submitting material from a State other than that in which the testing takes place must make sure that all customs formalities are complied with. The minimum quantity of seed to be supplied by the applicant in one or several samples should be:

3 kg.

The seed should at least meet the minimum requirements for germination capacity, moisture content and purity for marketing certified seed in the country in which the application is made. The germination capacity should be as high as possible.

2. If requested by the competent authority, at least 150 ears for winter barley and 100 ears for spring barley should also be submitted. The ears should be well developed and not obviously affected by any pest or disease. They should contain a sufficient number of viable seeds to establish a satisfactory row of plants for observation.

3. The plant material must not have undergone any treatment unless the competent authorities allow or request such treatment. If it has been treated, full details of the treatment must be given.

III. Conduct of Tests

1. The minimum duration of tests should normally be two similar growing periods.

2. The tests should normally be conducted at one place. If any important characteristics of the variety cannot be seen at that place, the variety may be tested at an additional place.

3. The field tests should be carried out under conditions ensuring normal growth. The size of the plots should be such that plants or parts of plants may be removed for measurement and counting without prejudice to the observations which must be made up to the end of the growing period. Each test should include about 2,000 plants which should be divided between two or more replicates. If tests on ear-rows are conducted, at least 100 ear-rows should be observed. Separate plots for observation and for measuring can only be used if they have been subject to similar environmental conditions.

4. Additional tests for special purposes may be established.

IV. Methods and Observations

1. All observations for assessment of distinctness and stability should be made on 20 plants or parts of 20 plants.

2. For the assessment of uniformity of characteristics on the plot as a whole (visual assessment by a single observation of a group of plants or parts of plants), the number of aberrant plants or parts of plants should not exceed 5 in 2,000.

3. For the assessment of uniformity of characteristics on single ear-rows, plants or parts of plants (visual assessment by observations of a number of individual ear-rows, plants or parts of plants) the number of aberrant ear- rows, plants or parts of plants should not exceed 3 in 100.

V. Grouping of Varieties

1. The collection of varieties to be grown should be divided into groups to facilitate the assessment of distinctness. Characteristics which are suitable for grouping purposes are those which are known from experience not to vary, or to vary only slightly, within a variety. Their various states of expression should be fairly evenly distributed throughout the collection.

2. It is recommended that the competent authorities use the following characteristics for grouping varieties:

(i) Lower leaves: hairiness of leaf sheaths (characteristic 2)
(ii) Awns: anthocyanin coloration of tips (characteristic 8)
(iii) Ear: number of rows (characteristic 13)
(iv) Grain: rachilla hair type (characteristic 22)
(v) Grain: hairiness of ventral furrow (characteristic 26)
(vi) Seasonal type (characteristic 29)

VI. Characteristics and Symbols

1. To assess distinctness, uniformity and stability, the characteristics and their states as given in the three UPOV working languages in the Table of Characteristics should be used.

2. Notes (1 to 9), for the purposes of electronic data processing, are given opposite the states of expression for each characteristic. For certain characteristics, different example varieties, separated by a semicolon, are indicated for winter barley and spring barley. Where spring varieties are indicated they follow the semicolon.

3. Legend:

(*) Characteristics that should be used on all varieties in every growing period over which examinations are made and always be included in the variety descriptions, except when the state of expression of a preceding characteristic or regional environmental conditions render this impossible.

(+) See Explanations on the Table of Characteristics in chapter VIII.

1) The optimum stage of development for the assessment of each characteristic is indicated by a number in the second column. The stages of development denoted by each number are described at the end of chapter VIII. The letters indicate the following:

M : actual measurement
VG: visual assessment by a single observation of a group of plants or parts of plants
VS: visual assessment by observations of a number of individual ear-rows, plants or plant parts.

* * * * * * *

[français]

I. Objet de ces principes directeurs

Ces principes directeurs d'examen s'appliquent à toutes les variétés de Hordeum vulgare L. sensu lato.

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 en un ou plusieurs échantillons sera de :

3 kg.

Les semences doivent au moins satisfaire les conditions minimales exigées pour la faculté germinative, la teneur en eau et la pureté pour la commercialisation des semences certifiées dans le pays dans lequel la demande est faite. La faculté germinative doit être aussi élevée que possible.

2. Si l'autorité compétente le demande, au moins 150 épis pour l'orge d'hiver et 100 épis pour l'orge de printemps doivent aussi être fournis. Les épis doivent être bien développés et indemnes de tous parasites ou maladies. Ils doivent contenir un nombre de semences viables suffisant pour l'établissement d'un épi-ligne permettant d'effectuer les observations.

3. Le matériel végétal ne doit pas avoir subi de traitement sauf autorisa- tion 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 en règle générale de deux cycles similaires de végétation.

2. 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 aussi être étudiée dans un autre lieu.

3. Les essais au champ 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 environ 2000 plantes, qui doivent être réparties en deux ou plusieurs répétitions. Si des essais avec épis-lignes sont implantés, au moins 100 épis-lignes doivent être observés. On ne peut utiliser de parcelles séparées, destinées l'une aux observations et l'autre aux mesures, que si elles sont soumises à des conditions de milieu similaires.
4. Des essais additionnels peuvent être établis pour certaines détermina- tions.

IV. Méthodes et observations

1. Toutes les observations pour la détermination de la distinction et la stabilité doivent porter sur 20 plantes ou parties de 20 plantes.

2. Pour évaluer l'homogénéité des caractères sur la base de l'ensemble de la parcelle (une évaluation visuelle fondée sur une seule observation faite sur un ensemble de plantes ou parties de plantes), le nombre de plantes ou parties de plantes aberrantes ne doit pas dépasser 5 sur 2000.

3. Pour évaluer l'homogénéité des caractères sur la base des épis-lignes, de plantes ou parties de plantes individuelles (une évaluation visuelle fondée sur des observations faites individuellement sur un certain nombre d'épis- lignes, de plantes ou parties de plantes), le nombre d'épis-lignes, de plantes ou parties de plantes aberrantes ne doit pas dépasser 3 sur 100.

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 est recommandé aux autorités compétentes d'utiliser les caractères ci-après pour le groupement des variétés :

(i) Feuilles de la base: pilosité des gaines (caractère 2)
(ii) Barbes: pigmentation anthocyanique des pointes (caractère 8)
(iii) Epi: nombre de rangs (caractère 13)
(iv) Grain: type de pilosité de la baguette (caractère 22)
(v) Grain: pilosité du sillon (caractère 26)
(vi) Type de développement (caractère 29)

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, dans les trois langues de travail de l'UPOV.

2. En regard des différents niveaux d'expression des caractères, sont indiquées des notes (1 à 9) destinées au traitement électronique des données. Pour certains caractères, des variétés différentes, séparées par un point- virgule, ont été indiquées à titre d'exemples pour l'orge d'hiver et pour l'orge de printemps. Lorsque des variétés de printemps sont indiquées elles suivent le point-virgule.

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'observation de chaque caractère est indiqué par un nombre dans la deuxième colonne. Les stades de développement correspondant à chaque nombre sont décrits à la fin du chapitre VIII. Les lettres ont les significations suivantes :

M : des mensurations effectives
VG : une évaluation visuelle fondée sur une seule observation faite sur un ensemble de plantes ou parties de plantes
VS : une évaluation visuelle fondée sur des observations faites individuellement sur un certain nombre d'épis-lignes, de plantes ou parties de plantes.

* * * * * * *

[deutsch]

I. Anwendung dieser Richtlinien

Diese Richtlinien gelten für alle Sorten von Hordeum vulgare L. sensu lato.

II. Anforderungen an das Vermehrungsmaterial

1. Die zuständigen Behörden bestimmen, wann, wohin und in welcher Menge und Beschaffenheit das für die Prüfung der Sorte erforderliche Vermehrungsmaterial zu liefern ist. Anmelder, die Material von außerhalb des Staates, in dem die Prüfung vorgenommen wird, einreichen, müssen sicherstellen, daß alle Zollvorschriften erfüllt sind. Die vom Anmelder in einer oder mehreren Proben einzusendende Mindestmenge an Vermehrungsmaterial sollte betragen:

3 kg.

Das Saatgut sollte wenigstens die Mindestanforderungen an die Keimfähigkeit, den Feuchtigkeitsgehalt und die Reinheit für die Vermarktung von zertifiziertem Saatgut des Landes erfüllen, in dem die Anmeldung eingereicht wurde. Die tatsächliche Keimfähigkeit sollte so hoch wie möglich sein.

2. Sofern von den zuständigen Behörden verlangt, sollten zusätzlich mindestens 150 Ähren für Wintergerste und 100 Ähren für Sommergerste eingereicht werden. Die Ähren sollten gut entwickelt und, soweit sichtbar, von keinem Schädling und von keiner Krankheit befallen sein. Sie sollten eine aus- reichende Anzahl keimfähiger Samen für die Aussaat einer für die Beobachtung ausreichenden Reihe enthalten.

3. Das Vermehrungsmaterial darf keiner Behandlung unterzogen worden sein, es sei denn, daß die zuständigen Behörden eine solche Behandlung gestatten oder vorschreiben. Soweit es behandelt worden ist, müssen die Einzelheiten der Behandlung angegeben werden.

III. Durchführung der Prüfung

1. Die Mindestprüfungsdauer sollte in der Regel zwei gleichartige Wachstumsperioden betragen.

2. Die Prüfungen sollten in der Regel an einer Stelle durchgeführt werden. Wenn einige wichtige Merkmale an diesem Ort nicht festgestellt werden können, kann die Sorte an einem weiteren Ort geprüft werden.

3. Die Feldprüfungen sollten unter Bedingungen durchgeführt werden, die eine normale Pflanzenentwicklung sicherstellen. Die Parzellengrösse ist so zu bemessen, daß den Beständen die für Messungen und Zählungen benötigten Pflanzen oder Pflanzenteile entnommen werden können, ohne daß dadurch die Beobachtungen, die bis zum Abschluß der Vegetationsperiode durchzuführen sind, beeinträchtigt werden. Jede Prüfung sollte insgesamt etwa 2 000 Pflanzen umfassen, die auf zwei oder mehrere Wiederholungen verteilt werden sollten. Sofern Prüfungen mit Aehrenreihen durchgeführt werden, sollten wenigstens 100 Ährenreihen erfaßt werden. Getrennte Parzellen für Beobachtungen einerseits und Messungen andererseits können nur bei Vorliegen ähnlicher Umweltbedingungen verwendet werden.

4. Zusätzliche Prüfungen für besondere Erfordernisse können durchgeführt werden.

IV. Methoden und Erfassungen

1. Alle Erfassungen für die Feststellung der Unterscheidbarkeit und Beständigkeit sollten an 20 Pflanzen oder Teilen von 20 Pflanzen erfolgen.

2. Für die Erfassung der Homogenität von Merkmalen auf der gesamten Parzelle (visuelle Feststellung durch eine einzige Beobachtung einer Gruppe von Pflanzen oder Pflanzenteilen), sollte die Anzahl Abweicher-Pflanzen oder -Pflanzenteile 5 aus 2 000 nicht übersteigen.

3. Für die Erfassung der Homogenität von Merkmalen an einzelnen Ährenreihen, Pflanzen oder Pflanzenteilen (visuelle Erfassungen durch Beobachtung einer Anzahl individueller Ährenreihen, Pflanzen oder Pflanzenteile) sollte die Anzahl Abweicher-Ährenreihen, -Pflanzen oder -Pflanzenteile 3 aus 100 nicht übersteigen.

V. Gruppierung der Sorten

1. Das Prüfsortiment sollte zur leichteren Herausarbeitung der Unterscheidbarkeit in Gruppen unterteilt werden. Für die Gruppierung sind solche Merkmale geeignet, die erfahrungsgemäß innerhalb einer Sorte nicht oder nur wenig variieren. Die verschiedenen Ausprägungsstufen sollten in der Vergleichssammlung ziemlich gleichmäßig verteilt sein.

2. Den zuständigen Behörden wird empfohlen, die nachstehenden Merkmale für die Gruppierung der Sorten heranzuziehen:

(i) Basalblätter: Behaarung der Blattscheiden (Merkmal 2)
(ii) Grannen: Anthocyanfärbung der Spitzen (Merkmal 8)
(iii) Ähre: Zeiligkeit (Merkmal 13)
(iv) Korn: Behaarung der Basalborste (Merkmal 22)
(v) Korn: Behaarung der Bauchfurche (Merkmal 26)
(vi) Wechselverhalten (Merkmal 29)

VI. Merkmale und Symbole

1. Zur Beurteilung der Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit sollten die Merkmale mit ihren Ausprägungsstufen, wie sie in der Merkmalstabelle in den drei UPOV-Arbeitssprachen aufgeführt sind, verwendet werden.

2. Hinter den Ausprägungsstufen für jedes Merkmal stehen Noten (von 1 bis 9) für eine elektronische Datenverarbeitung. Für einige Merkmale sind, durch ein Semikolon voneinander getrennt, unterschiedliche Beispielssorten für Wintergerste und Sommergerste angegeben. Wenn Sommergerstensorten angegeben sind, stehen sie hinter dem Semikolon.

3. Legende:

(*) Merkmale, die für alle Sorten in jedem Prüfungsjahr, in dem Prüfungen vorgenommen werden, herangezogen werden und in jeder Sortenbeschreibung enthalten sein sollten, sofern die Ausprägungsstufe eines vorausgehenden Merkmals oder regionale Umweltbedingungen dies nicht ausschließen.

(+) Siehe Erklärungen zu der Merkmalstabelle in Kapitel VIII.

1) Das optimale Entwicklungsstadium für die Erfassung eines jeden Merkmals ist durch eine Ziffer in der zweiten Spalte angegeben. Die durch die einzelnen Ziffern angegebenen Entwicklungsstadien sind am Ende des Kapitels VIII beschrieben. Die Buchstaben bedeuten folgendes:

M : tatsächliche Messungen
VG: visuelle Erfassung durch eine einzige Beobachtung einer Gruppe von Pflanzen oder Pflanzenteilen
VS: visuelle Erfassungen durch Beobachtung einer Anzahl einzelner Aehrenreihen, Pflanzen oder Pflanzenteile.

* * * * * * *

VII. Table of Characteristics/Tableau des caractères/Merkmalstabelle

	Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1)] Stade[1)] Stadium[1)]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
(*) (+)	1. Plant: growth habit Plante: port au tallage Pflanze: Wuchsform	25-29 VG	erect	dressé	aufrecht	-; -	1
			semi-erect	demi-dressé	halbaufrecht	Marinka; Klaxon	3
			intermediate	demi-dressé à demi-étalé	mittel	Plaisant; Alexis	5
			semi prostrate	demi-étalé	halbliegend	Pastoral; Digger	7
			prostrate	étalé	liegend	Celtic; Grit	9
(*)	2. Lowest leaves: hairiness of leaf sheaths Feuilles de la base: pilosité des gaines Basalblätter: Behaarung der Blattscheiden	25-29 VS	absent	absente	fehlend	Marylin; Alexis	1
			present	présente	vorhanden	Pastoral; Ceres	9
(*)	3. Flag leaf: anthocyanin coloration of auricles Dernière feuille: pigmentation anthocyanique des oreillettes Oberstes Blatt: Anthocyanfärbung der Auricula	45-49 VG	absent	absente	fehlend	Flika; Comtesse	1
			present	présente	vorhanden	Barberousse; Alexis	9
(*)	4. Flag leaf: intensity of anthocyanin coloration of auricles Dernière feuille: intensité de la pigmentation anthocyanique des oreillettes Oberstes Blatt: Stärke der Anthocyanfärbung der Auricula	45-49 VG	very weak	très faible	sehr gering	Noveta; -	1
			weak	faible	gering	Reinette; Auto	3
			medium	moyenne	mittel	Catania; Atem	5
			strong	forte	stark	Barberousse; Prisma	7
			very strong	très forte	sehr stark	Melusine; -	9
(+)	5. Plant: frequency of plants with recurved flag leaves Plante: fréquence de plantes avec la dernière feuille retombante Pflanze: Häufigkeit von Pflanzen mit gebogenen obersten Blättern	47-51 VG	absent or very low	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	-; Icare	1
			low	faible	gering	Rebelle; Atem	3
			medium	moyenne	mittel	Pastoral; Alexis	5
			high	forte	stark	Krimhild; Grit	7
			very high	très forte	sehr stark	-; -	9

	Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1)] Stade[1)] Stadium[1)]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
6.	Flag leaf: glaucosity of sheath Dernière feuille: glaucescence de la gaine Oberstes Blatt: Bereifung der Blattscheide	50-60 VG	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	-; -	1
			weak	faible	gering	-; -	3
			medium	moyenne	mittel	Brunhild; Marielle	5
			strong	forte	stark	Marylin; Alexis	7
			very strong	très forte	sehr stark	Sereia; Pompadour	9
(*) 7.	Time of ear emergence (first spikelet visible on 50% of ears) Epoque d'épiaison (premier épillet visible sur 50% des épis) Zeitpunkt des Aehrenschiebens (erstes Aehrchen sichtbar an 50% der Aehren)	50-52 VG	very early	très précoce	sehr früh	Sereia; -	1
			early	précoce	früh	Barberousse; Sewa	3
			medium	moyenne	mittel	Venus; Alexis	5
			late	tardive	spät	Borwina; Canut	7
			very late	très tardive	sehr spät	Brunhild; -	9
(*) 8.	Awns: anthocyanin coloration of tips Barbes: pigmentation anthocyanique des pointes Grannen: Anthocyanfärbung der Spitzen	60-65 VG	absent	absente	fehlend	Pastoral; Dobla	1
			present	présente	vorhanden	Barberousse; Alexis	9
(*) 9.	Awns: intensity of anthocyanin coloration of tips Barbes: intensité de la pigmentation anthocyanique des pointes Grannen: Stärke der Anthocyanfärbung der Spitzen	60-65 VG	very weak	très faible	sehr gering	Monika; -	1
			weak	faible	gering	Rebelle; Berenice	3
			medium	moyenne	mittel	Fedora; Alexis	5
			strong	forte	stark	Susi; Atem	7
			very strong	très forte	sehr stark	Frolic; Beate	9
(*) 10.	Ear: glaucosity Epi: glaucescence Aehre: Bereifung	65-75 VG	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	Caline; Auto	1
			weak	faible	gering	Brunhild; Grit	3
			medium	moyenne	mittel	Clarine; Alexis	5
			strong	forte	stark	Puffin; Volga	7
			very strong	très forte	sehr stark	Sereia; Mette	9
ll. (+)	Ear: attitude Epi: port Aehre: Haltung	70 VG	erect	dressé	aufrecht	Sigra; Volga	1
			semi-erect	demi-dressé	geneigt	Jana; Digger	3
			horizontal	horizontal	waagerecht	Jaidor; Nomad	5
			semi-recurved	retombant	überhängend	Melusine; Sissi	7
			recurved	très retombant	stark überhängend	-; -	9

		Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1)] Stade[1)] Stadium[1)]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
(*)	12.	Plant: length (stem, ear and awns) Plante: longueur (tige, épi et barbes) Pflanze: Länge (Halm, Aehre und Grannen)	80-92 M	very short	très courte	sehr kurz	Fedora; Meltan	1
				short	courte	kurz	Pastoral; Triumph	3
				medium	moyenne	mittel	Rebelle; Omega	5
				long	longue	lang	Frances; Ida	7
				very long	très longue	sehr lang	-; Aura	9
(*)	13.	Ear: number of rows Epi: nombre de rangs Aehre: Zeiligkeit	80-92 VS	two	deux	zweizeilig	Pastoral; Aramir	1
				more than two	plus de deux	mehrzeilig	Rebelle; Dobla	2
	14. (+)	Ear: shape Epi: forme Aehre: Form	80-92 VS	tapering	pyramidal	pyramiden-förmig	Intro; Prisma	3
				parallel	à bords parallèles	parallel	Rebelle; Nomad	5
				fusiform	fusiforme	spindel-förmig	Criter; Pamela	7
(*)	15.	Ear: density Epi: compacité Aehre: Dichte	80-92 VS or M	very lax	très lâche	sehr locker	-; -	1
				lax	lâche	locker	Express; Teo	3
				medium	demi-lâche à demi-compact	mittel	Susi; Alexis	5
				dense	compact	dicht	Catinka; Pompadeur	7
				very dense	très compact	sehr dicht	Criter; Dobla	9
	16.	Ear: length (excluding awns) Epi: longueur (à l'exclusion des barbes) Aehre: Länge (ohne Grannen)	80-92 M	very short	très court	sehr kurz	-; -	1
				short	court	kurz	Krimhild; Nancy	3
				medium	moyen	mittel	Barberousse; Alexis	5
				long	long	lang	Pastoral; Nomad	7
				very long	très long	sehr lang	-; -	9
(*)	17. (+)	Awn: length (compared to ear) Barbes: longueur (par rapport à l'épi) Granne: Länge (im Verhältnis zur Aehre)	80-92 VS or M	short	courtes	kurz	Puffin; Menuet	3
				medium	moyennes	mittel	Fiction; Nomad	5
				long	longues	lang	Jana; Troubadour	7
	l8.	Rachis: length of first segment Rachis: longueur du premier article Spindel: Länge des untersten Gliedes	92 VS	short	court	kurz	Barberousse; Triumph	3
				medium	moyen	mittel	Marinka; Volga	5
				long	long	lang	Jaidor; Michka	7

	Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1)] Stade[1)] Stadium[1)]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
19. (+)	Rachis: curvature of first segment Rachis: incurvation du premier article Spindel: Krümmung des untersten Gliedes	92 VS	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend sehr gering	Sigra; Prisma	1
			weak	faible	gering	Barberousse; Alexis	3
			medium	moyenne	mittel	Pastoral; Aramir	5
			strong	forte	stark	Giga; Berenice	7
			very strong	très forte	sehr stark	-; Cameo	9
(*) 20. (+)	Sterile spikelet: attitude (in mid-third of ear) Epillets stériles: disposition (au tiers moyen de l'épi) Steriles Seitenährchen: Anordnung (im mittleren Drittel der Aehre)	92 VS	parallel	non divergents	parallel	Target; Baronesse	1
			parallel to weakly divergent	non divergents à faiblement divergents	parallel bis schwach V-förmig	Susi; Libelle	2
			divergent	divergents	V-förmig	Pastoral; Alexis	3
21. (+)	Median spikelet: length of glume and its awn relative to grain Epillet médian: longueur de la glume et de sa barbe par rapport au grain Mittleres Aehrchen: Länge der Hüllspelze und ihrer Granne im Verhältnis zum Korn	92 VS	shorter	plus courtes	kürzer	Alpha; Ceres	1
			equal	de même longueur	gleich lang	Rebelle; Alexis	2
			longer	plus longues	länger	Manitou; Steffi	3
(*) 22. (+)	Grain: rachilla hair type Grain: type de pilosité de la baguette Korn: Behaarung der Basalborste	80-92 VS	short	courte	kurz	Barberousse; Atem	1
			long	longue	lang	Pastoral; Alexis	2
(*) 23.	Grain: husk Grain: glumelles Korn: Bespelzung	92 VS	absent	absentes	fehlend	Rondo; Taiga	1
			present	présentes	vorhanden	Marinka; Alexis	9
24.	Grain: anthocyanin coloration of nerves of lemma Grain: pigmentation anthocyanique des nervures de la glumelle inférieure Korn: Anthocyanfärbung der Nerven der Deckspelze	80-85 VS	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	Express; Troubadour	1
			weak	faible	gering	Rebelle; Prisma	3
			medium	moyenne	mittel	Baraka; Lenka	5
			strong	forte	stark	Susi; Teo	7
			very strong	très forte	sehr stark	-; -	9

	Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1)] Stade[1)] Stadium[1)]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
25. (+)	Grain: spiculation of inner lateral nerves of dorsal side of lemma Grain: denticulation des nervures latérales internes de la face dorsale de la glumelle inférieure Korn: Bezahnung der inneren seitlichen Rückennerven der Deckspelze	92 VS	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	Sonja; Alexis	1
			weak	faible	gering	Colombo; Nomad	3
			medium	moyenne	mittel	Venus; Perun	5
			strong	forte	stark	Barberousse; Volga	7
			very strong	très forte	sehr stark	Noveta; -	9
(*) 26. (+)	Grain: hairiness of ventral furrow Grain: pilosité du sillon Korn: Behaarung der Bauchfurche	92 VS	absent	absente	fehlend	Pastoral; Alexis	1
			present	présente	vorhanden	Plaisant; Cheri	9
27. (+)	Grain: disposition of lodicules Grain: disposition des lodicules Korn: Lage der Schüppchen	92 VS	frontal	frontales	frontal	Reinette; Prisma	1
			clasping	latérales	lateral	Rebelle; Nomad	2
28. (+)	Kernel: color of aleurone layer Grain nu: couleur de la couche d'aleurone Nacktes Korn: Farbe der Aleuronschicht	85-87 VG or/ou/oder 92 VS	whitish	blanchâtre	weisslich	Express; Alexis	1
			weakly colored	faiblement colorée	leicht gefärbt	Angora; -	2
			strongly colored	fortement colorée	stark gefärbt	Pastoral; -	3
(*) 29. (+)	Seasonal type Type de développement Wechselverhalten	 VG	winter type	type hiver	Winterform	Target; -	1
			alternative type	type alternatif	Wechselform	Novetta; -	2
			spring type	type printemps	Sommerform	-; Alexis	3

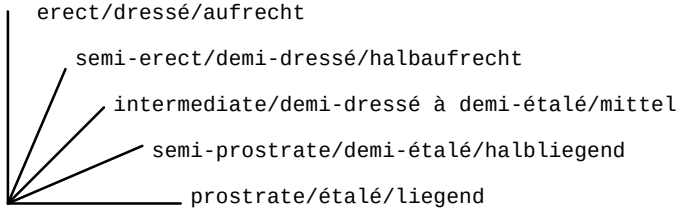
VIII. Explanations on the Table of Characteristics/Explications du tableau des caractères/Erklärungen zu der Merkmalstabelle

Ad/Add./Zu 1

Plant: growth habit

Plante: port au tallage

Pflanze: Wuchsform



The growth habit should be assessed visually from the attitude of the leaves and tillers. The angle formed by the outer leaves and the tillers with an imaginary vertical axis should be used.

Le port doit être déterminé visuellement d'après le port des feuilles et des talles. On utilisera l'angle formé par les feuilles externes et les talles avec un axe vertical imaginaire.

Die Wuchsform sollte auf Grund der Haltung der Blätter und Triebe visuell erfaßt werden. Der von den äusseren Blättern und Trieben mit einer imaginären vertikalen Achse gebildete Winkel sollte verwendet werden.

Ad/Add./Zu 5

Plant: frequency of plants with recurved flag leaves

Plante: fréquence de plantes avec la dernière feuille retombante

Pflanze: Häufigkeit von Pflanzen mit gebogenen obersten Blättern

1. all flag leaves are rectilinear/toutes les plantes ont la dernière feuille dressée/alle obersten Blätter sind gerade

3. about 1/4 of the plants with recurved flag leaves/environ 1/4 des plantes ont la dernière feuille retombante/etwa 1/4 der Pflanzen mit gebogenen obersten Blättern

5. about 1/2 of the plants with recurved flag leaves/environ 1/2 des plantes ont la dernière feuille retombante/etwa die Hälfte der Pflanzen mit gebogenen obersten Blättern

7. about 3/4 of the plants with recurved flag leaves/environ 3/4 des plantes ont la dernière feuille retombante/etwa drei Viertel der Pflanzen mit gebogenen obersten Blättern

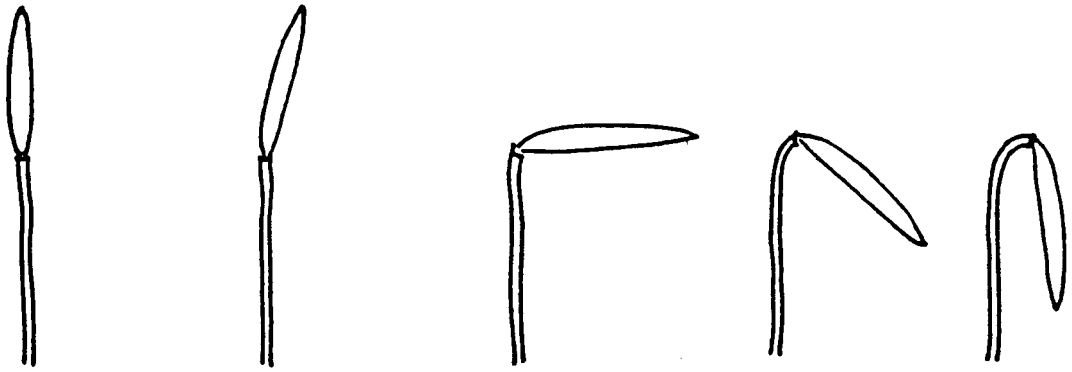
9. all flag leaves are recurved/toutes les plantes ont la dernière feuille retombante/alle obersten Blätter sind gebogen.

Ad/Add./Zu 11

Ear: attitude

Epi: port

Aehre: Haltung



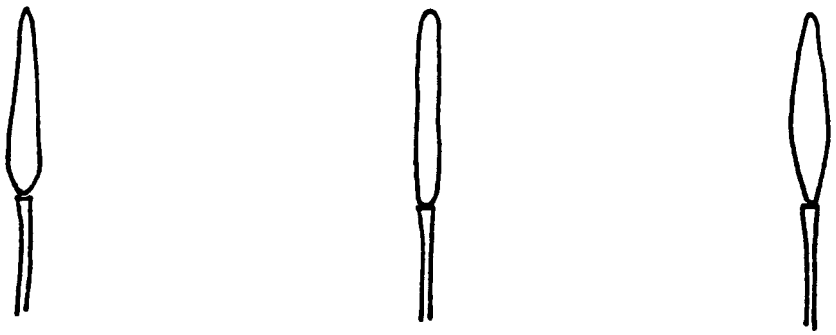
1	3	5	7	9
erect dressé aufrecht	semi-erect demi-dressé geneigt	horizontal horizontal waagerecht	semi-recurved retombant überhängend	recurved très retombant stark überhängend

Ad/Add./Zu 14

Ear: shape

Epi: forme

Aehre: Form



3	5	7
tapering pyramidal pyramidenförmig	parallel à bords parallèles parallel	fusiform fusiforme spindelförmig

Ad/Add./Zu 17

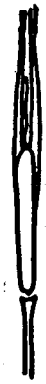
Awn: length compared to ear

Barbes: longueur par rapport à l'épi

Granne: Länge im Verhältnis zur Aehre

3

short
courtes
kurz



5

medium
moyennes
mittel

7

long
longues
lang

The state "medium" means that the length of the awns is equal to that of the ear.

Le stade "moyen" signifie que la longueur des barbes est égal à la longueur de l'épi.

Die Stufe "mittel" bedeutet, dass die Länge der Grannen der Länge der Aehre entspricht.

Ad/Add./Zu 19

Rachis: curvature of first segment

Rachis: incurvation du premier article

Spindel: Krümmung des untersten Gliedes

3

weak
faible
gering

5

medium
moyenne
mittel

7

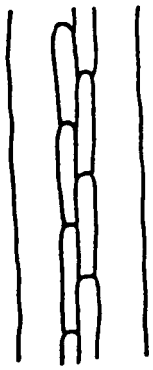
strong
forte
stark

Ad/Add./Zu 20

Sterile spikelet: attitude (in mid-third of ear)

Epillet stérile: disposition (au tiers moyen de l'épi)

Steriles Seitenährchen: Anordnung (im mittleren Drittel der Aehre)

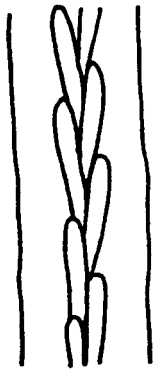


1

parallel

non divergents

parallel

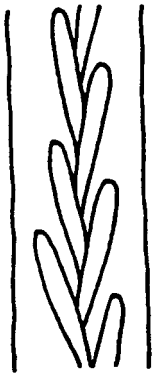


2

parallel to weakly divergents

non divergents à faiblement divergents

parallel bis schwach V-förmig



3

divergent

divergents

V-förmig

Ad/Add./Zu 21

Median spikelet: length of glume and its awn relative to grain

Epillet médian: longueur de la glume et de sa barbe par rapport au grain

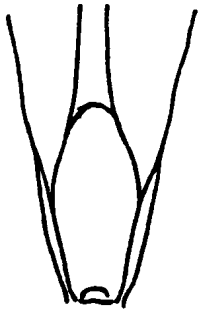
Mittleres Aehrchen: Länge der Hüllspelze und ihrer Granne im Verhältnis zum Korn

1

shorter
plus courtes
kürzer

2

equal
de même longueur
gleichlang



3

longer
plus longues
länger

Ad/Add./Zu 22

Grain: rachilla hair type

Grain: type de pilosité de la baguette

Korn: Behaarung der Basalborste

1

short
courte
kurz

2

long
longue
lang

Ad/Add./Zu 25

Grain: spiculation of inner lateral nerves of dorsal side at lemma

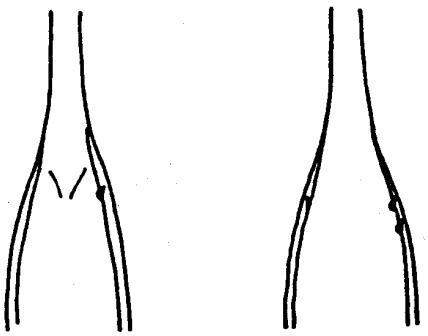
Grain: denticulation des nervures latérales internes de la face dorsale de la glumelle inférieure

Korn: Bezahnung der inneren seitlichen Rückennerven der Deckspelze

none or occasionally 1 or 2 small spicules

pas d'épines ou occasionnellement une ou deux petites

keine oder gelegentlich 1 oder 2 kleine Zähne

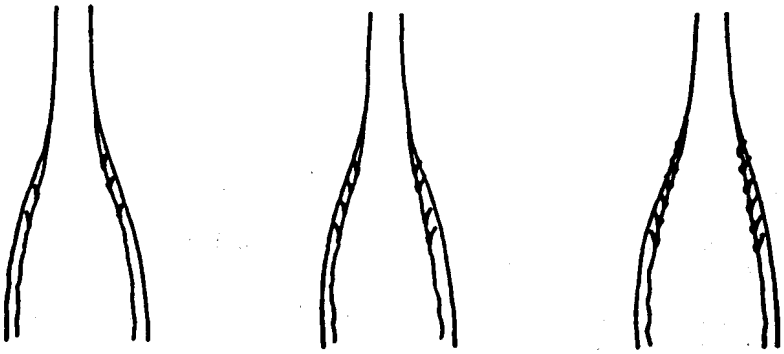


1

absent or very weak
nulle ou très faible
fehlend oder sehr gering

3

weak
faible
gering



5

medium
moyenne
mittel

7

strong
forte
stark

9

very strong
très forte
sehr stark

10 or more large regular spicules

10 épines larges et régulières ou plus

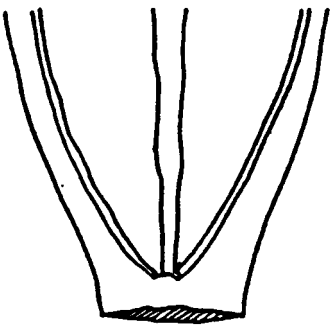
10 oder mehr grosse regelmässige Zähne

Ad/Add./Zu 26

Grain: hairiness of ventral furrow

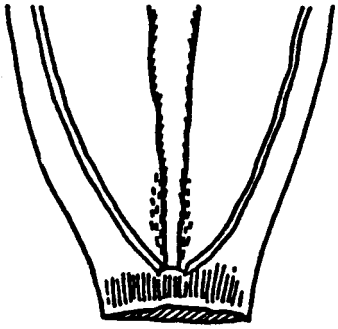
Grain: pilosité du sillon

Korn: Behaarung der Bauchfurche



1

absent
absente
fehlend



9

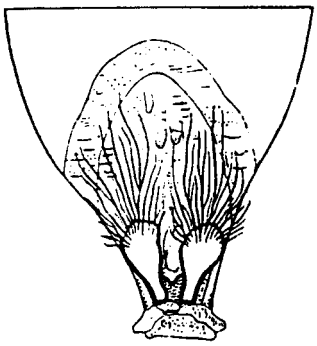
present
présente
vorhanden

Ad/Add./Zu 27

Grain: disposition of lodicules

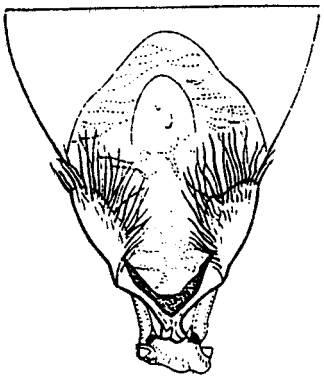
Grain: disposition des lodicules

Korn: Lage der Schüppchen



1

frontal
frontales
frontal



2

clasping
latérales
lateral

Ad/Add./Zu 28

Kernel: color of aleuron layer

Grain nu: couleur de la couche d'aleurone

Nacktes Korn: Farbe der Aleuronschicht

The color of the aleuron layer should be assessed visually after the kernel is put in the water for 12 hours. If necessary, a magnifying glass may be used.

La couleur de la couche d'aleurone doit être observée après avois mis le grain nu dans l'eau pour 12 heures. Si nécessaire, une loupe peut être utilisée.

Die Farbe der Aleuronschicht sollte visuell erfasst werden, nachdem das nackte Korn für 12 Stunden in Wasser getaucht war. Sofern erforderlich, darf ein Vergrösserungsglass verwendet werden.

Ad/Add./Zu 29

Seasonal type

Type de développement

Wechselverhalten

[English]

The seasonal type should be assessed on one or several plots sown in springtime. Example varieties should always be included in the plots. When the example varieties behave according to this description, the varieties under study can be described. At the time when the latest springtype variety is fully mature (stage 91/92 of the Eucarpia decimal code), the growth stage reached by the respective variety should be assessed. The states of expression are defined as follows:

Winter type:	The plants have reached stage 45 of the Eucarpia decimal code (boots swollen) at maximum
Alternative type:	The plants have exceeded stage 45 of the Eucarpia decimal code--as a rule they have exceeded stage 75--and have reached stage 90 at maximum
Spring type:	The plants have exceeded stage 90 of the Eucarpia decimal code.

[français]

Le type de développement doit être observé sur une ou plusieurs parcelles ensemencées au printemps. Les variétés exemples doivent toujours être inclues dans les parcelles. Si elles se comportent comme indiqué dans le tableau de caractères, les variétés en étude peuvent être décrites. Le stade de développement atteint par les variétés doit être observé au stade de pleine maturité (stade 91/92 du code décimal d'Eucarpia) de la variété de printemps la plus tardive. Les stades d'expression sont définis comme suit:

Type hiver:	Les plantes ont atteint au maximum le stade 45 du code décimal d'Eucarpia (gonflement)
Type alternatif:	Les plantes ont excédé le stade 45 du code décimal d'Eucarpia - en règle générale elles ont excédé le stade 75 - et ont atteint au maximum le stade 90
Type printemps:	Les plantes ont excédé le stage 90 du code décimal d'Eucarpia.

[deutsch]

Das Wechselverhalten sollte in einer Frühjahrsaussaat an einer oder mehreren Parzellen erfasst werden. In die Parzellen, sollten immer Beispielssorten einbezogen werden. Wenn die Beispielssorten sich entsprechend ihrer Beschreibung verhalten, können die in der Prüfung stehenden Sorten beschrieben werden. Zu dem Zeitpunkt, an dem die späteste Sommersorte vollreif ist (Stadium 91/92 des Eucarpia Dezimal-Codes), sollte das jeweils erreichte Entwicklungsstadium festgehalten werden. Die Ausprägungssufen sind folgendermassen bestimmt:

Winterform:	Die Pflanzen haben maximal das Stadium 45 des Eucarpia Dezimal-Codes erreicht (Blattscheide der Fahne geschwollen)
Wechselform:	Die Pflanzen haben das Stadium 45 des Eucarpia Dezimal-Codes überschritten - in der Regel haben sie das Stadium 75 überschritten - und das Stadium 90 maximal erreicht.
Sommerform:	Die Pflanzen haben das Stadium 90 des Eucarpia Dezimal-Codes überschritten.

Code décimal pour les stades de croissance des céréales*
Decimal Code for the Growth Stages of Cereals*
Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides*

2-digit Code Code à 2 chiffres 2-stelliger Code	General Description	Description générale	Allgemeine Beschreibung	Feekes' Scale Echelle de Feekes Feekes-Skala	Additional Remarks on Wheat, Barley, Rye, Oats and Rice Remarques complémentaires pour le blé, l'orge, le seigle, l'avoine et le riz Ergänzende Bemerkungen für Weizen, Gerste, Roggen, Hafer und Reis
	Germination	Germination	Keimung		
00	Dry seed	Grain sec	Trockene Saat		
01	Start of imbibition	Début de l'imbibition	Beginn der Quellung (Samen normale Grösse, aber weich)		
02	-	-	-		
03	Imbibition complete	Imbibition complète	Ende Quellung (Samen gequollen, aber noch nicht gekeimt)		
04	-	-	-		
05	Radicle emerged from caryopsis	Sortie de la racine	Austritt der Keimwurzel aus der Karyopse		
06	-	-	-		
07	Coleoptile emerged from caryopsis	Sortie du coléoptile	Austritt des Koleoptils aus der Karyopse		
08	-	-	-		
09	Leaf just at coleoptile tip	Feuille juste au sommet du coléoptile	Blatt gerade an der Spitze des Koleoptils erkennbar		
	Seedling growth	Croissance de la plantule	Wachstum des Keimlings		
10	First leaf through coleoptile	1ère feuille traversant le coléoptile	Austritt des ersten Blattes aus dem Koleoptil	1	Second leaf visible (less than 1 cm) 2e feuille visible (moins d'1 cm) Zweites Blatt sichtbar (weniger als 1 cm)
11	First leaf unfolded (1)	1ère feuille étalée (1)	erstes Blatt entfaltet (1)		
12	2 leaves unfolded	2 feuilles étalées	2 Blätter entfaltet		
13	3 leaves unfolded	3 feuilles étalées	3 Blätter entfaltet		
14	4 leaves unfolded	4 feuilles étalées	4 Blätter entfaltet		
15	5 leaves unfolded	5 feuilles étalées	5 Blätter entfaltet		50 per cent of laminae unfolded 50% des limbes étalés 50% der Blattspreiten entfaltet
16	6 leaves unfolded	6 feuilles étalées	6 Blätter entfaltet		
17	7 leaves unfolded	7 feuilles étalées	7 Blätter entfaltet		
18	8 leaves unfolded	8 feuilles étalées	8 Blätter entfaltet		
19	9 or more leaves unfolded	9 feuilles étalées ou plus	9 oder mehr Blätter entfaltet		

* Reproduced from EUCARPIA Bulletin No. 7, 1974, pp.49 - 52, with the kind permission of the authors. For further information, see J.C. Zadoks, T.T. Chang and C.F. Konzak, EUCARPIA Bulletin No. 7, 1974, pp. 42 - 52. The French translation has been kindly furnished by Mrs. R. Cassini, Mr. R. Cassini and Mr. R. Marie. The German translation has been kindly furnished by Mr. A.O. Klomp and Mrs. I. Volk.

* Reproduit du Bulletin EUCARPIA No. 7, 1974, pp. 49 - 52, avec l'aimable autorisation des auteurs. Pour plus de détails, voir J.C. Zadoks, T.T. Chang et C.F. Konzak, Bulletin EUCARPIA No. 7, 1974, pp. 42 - 52. La traduction française a été aimablement fournie par Mme R. Cassini, M. R. Cassini et M. R. Marie. La traduction allemande a été aimablement fournie par M. A.O. Klomp et Mme I. Volk.

* Mit freundlicher Erlaubnis der Autoren entnommen aus EUCARPIA Bulletin Nr. 7, 1974, 49 - 52. Zwecks weiterer Information siehe J.C. Zadoks, T.T. Chang und C.F. Konzak, EUCARPIA Bulletin Nr. 7, 1974, 42 - 52. Die französische Uebersetzung wurde freundlicherweise überlassen von Frau R. Cassini, Herrn R. Cassini und Herrn R. Marie. Die deutsche Uebersetzung wurde freundlicherweise überlassen von Herrn A.O. Klomp und Frau I. Volk.

Code décimal pour les stades de croissance des céréales*
Decimal Code for the Growth Stages of Cereals*
Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides*

2-digit Code Code à 2 chiffres 2-stelliger Code	General Description	Description générale	Allgemeine Beschreibung	Feekes' Scale Echelle de Feekes Feekes-Skala	Additional Remarks on Wheat, Barley, Rye, Oats and Rice Remarques complémentaires pour le blé, l'orge, le seigle, l'avoine et le riz Ergänzende Bemerkungen für Weizen, Gerste, Roggen, Hafer und Reis
	<u>Tillering</u>	<u>Tallage</u>	<u>Bestockung</u>		
20	Main shoot only	Maître-brin seulement	Nur der Hauptspross entwickelt		
21	Main shoot and 1 tiller	Maître-brin et 1 talle	Spross und 1 Seitentrieb	2	This section to be used to supplement records from other sections of the table: "concurrent codes". Cette section est destinée aux notes supplémentaires venant des autres sections du tableau "codes parallèles" Dieser Abschnitt kann zur Ergänzung der Beobachtungen aus den folgenden Abschnitten verwendet werden: "Mehrfache Codierung".
22	Main shoot and 2 tillers	Maître-brin et 2 talles	Spross und 2 Seitentriebe		
23	Main shoot and 3 tillers	Maître-brin et 3 talles	Spross und 3 Seitentriebe		
24	Main shoot and 4 tillers	Maître-brin et 4 talles	Spross und 4 Seitentriebe		
25	Main shoot and 5 tillers	Maître-brin et 5 talles	Spross und 5 Seitentriebe	3	
26	Main shoot and 6 tillers	Maître-brin et 6 talles	Spross und 6 Seitentriebe		
27	Main shoot and 7 tillers	Maître-brin et 7 talles	Spross und 7 Seitentriebe		
28	Main shoot and 8 tillers	Maître-brin et 8 talles	Spross und 8 Seitentriebe		
29	Main shoot and 9 or more tillers	Maître-brin et 9 talles et plus	Spross und 9 oder mehr Seitentriebe		
	<u>Stem elongation</u>	<u>Elongation de la tige (Montaison)</u>	<u>Schossen</u>		
30	Pseudo stem erection (2)	Redressement (de la partie aérienne) (2)	Aufrichten des Scheinstamms (beginnendes Streckungswachstum) (2)	4-5	In rice: vegetative lag phase Chez le riz: phase végétative décalée Bei Reis: Phase der Verzögerung des vegetativen Wachstums
31	1st node detectable	1er noeud décelable	1. Knoten wahrnehmbar	6	Jointing stage Stade unique Aufrichtungsstadium
32	2nd node detectable	2e noeud décelable	2. Knoten wahrnehmbar	7	
33	3rd node detectable	3e noeud décelable	3. Knoten wahrnehmbar		Above crown nodes Noeuds apparents Knoten oberhalb der Halmbasis
34	4th node detectable	4e noeud décelable	4. Knoten wahrnehmbar		
35	5th node detectable	5e noeud décelable	5. Knoten wahrnehmbar		
36	6th node detectable	6e noeud décelable	6. Knoten wahrnehmbar		
37	Flag leaf just visible	dernière feuille visible	Fahnenblatt gerade sichtbar	8	
38	-	-	-		Pre-boot stage In rice: Opposite auricle stage Pré-gonflement Chez le riz: stade oreillettes opposées Vorstadium des Aehrenschwellens Bei Reis: Blatthäutchen des letzten und vorletzten Blattes gegenüberstehend
39	Flag leaf ligule/ collar just visible	Ligule ou collerette de la dernière feuille juste visible	Ligula/Kragen des Fahnenblatts gerade sichtbar	9	

Code décimal pour les stades de croissance des céréales*
Decimal Code for the Growth Stages of Cereals*
Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides*

2-digit Code Code à 2 chiffres 2-stelliger Code	General Description	Description générale	Allgemeine Beschreibung	Feekes' Scale Echelle de Feekes Feekes-Skala	Additional Remarks on Wheat, Barley, Rye, Oats and Rice Remarques complémentaires pour le blé, l'orge, le seigle, l'avoine et le riz Ergänzende Bemerkungen für Weizen, Gerste, Roggen, Hafer und Reis
	Booting	Gonflement	Schwellen der Aehren		
40	-	-	-		Little enlargement of the inflorescence, early-boot stage
41	Flag leaf sheath extending	Extension de la gaine de la dernière feuille	Blattscheide der Fahne länger werdend		Faible accroissement de l'inflorescence, début du gonflement
42	-	-	-		Geringe Vergrösserung des Blütenstandes, frühes Stadium des Aehren-schwellens
43	Boots just visibly swollen	Gonflement à peine visible	Blattscheide der Fahne sichtbar geschwollen		Mid-boot stage Mi-gonflement Mittleres Stadium des Aehrenschwellens
44	-	-	-	10	
45	Boots swollen	Gonflement	Blattscheide der Fahne geschwollen		Late-boot stage Fin du gonflement Spätes Stadium des Aehrenschwellens
46	-	-	-		
47	Flag leaf sheath opening	Ouverture de la gaine de la dernière feuille	Oeffnen der letzten Blattscheide		
48	-	-	-		In awned forms only Chez les formes barbues seulement Nur bei grannigen Formen
49	First awns visible	Premières barbes visibles	Erste Grannen sichtbar	10.1	
	Inflorescence emergence	Epiaison	Aehrenschieben		
50	First spikelet of inflorescence just visible	1er épillet de l'inflorescence à peine visible	Erstes Aehrchen des Blütenstandes gerade sichtbar	N	
51				S	
52	1/4 of inflorescence emerged	1/4 de l'inflores-cence dégagé	1/4 des Blütenstandes herausgeschoben	N	N = non-synchronous crops cultures non synchrones Getreidebestände, die sich ungleichmässig
53				S	10.2
54	1/2 of inflorescence emerged	1/2 de l'inflores-cence dégagée entwickeln	1/2 des Blütenstandes herausgeschoben	N	S = synchronous crops cultures synchrones Getreidebestände, die sich gleichmässig entwickeln
55				S	10.3
56	3/4 of inflorescence emerged	3/4 de l'inflores-cence dégagés	3/4 des Blütenstandes herausgeschoben	N	
57				S	10.4
58	Emergence of inflor-escence completed	Inflorescence com-plètement dégagée	Herausschieben des Blü-tenstandes abgeschlossen	N	
59				S	10.5

Code décimal pour les stades de croissance des céréales*
Decimal Code for the Growth Stages of Cereals*
Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides*

2-digit Code Code à 2 chiffres 2-stelliger Code	General Description	Description générale	Allgemeine Beschreibung	Feekes' Scale Echelle de Feekes Feekes-Skala	Additional Remarks on Wheat, Barley, Rye, Oats and Rice Remarques complémentaires pour le blé, l'orge, le seigle, l'avoine et le riz Ergänzende Bemerkungen für Weizen, Gerste, Roggen, Hafer und Reis
	<u>Anthesis</u>	<u>Anthèse</u>	<u>Blüte</u>		
60	Beginning of anthesis	Début de l'anthèse	Beginn der Blüte	N 10.51 S	Not easily detectable in barley. In rice: Usually immediately following heading.
61					
62	-	-	-		
63	-	-	-		
64	Anthesis half-way	Mi-anthèse	Mitte der Blüte	N 10.52 S	Pas facilement décelable chez l'orge. Pour le riz: en général suit immédiatement l'épiaison.
65					
66	-	-	-		
67	-	-	-		Bei Gerste nicht leicht festzustellen. Bei Reis: Im allgemeinen sofort nach dem Herausschieben der einzelnen Aehrchen.
68	Anthesis complete	Anthèse complète	Ende der Blüte	N 10.53 S	
69					
	<u>Milk development</u>	<u>Stade laiteux</u>	<u>Entwicklung der Milchreife</u>		
70	-	-	-		
71	Caryopsis watery ripe	Stade aqueux de la maturation du caryopse	Karyopse wasserreif	10.54	Increase in solids of liquid endosperm notable when crushing the caryopsis between fingers.
72	-	-	-		
73	Early milk	Début laiteux	Frühe Milchreife	11.1	L'endosperme liquide commence à devenir solide quand on écrase le caryopse entre les doigts. Beim Zerdrücken der Frucht zwischen den Fingern ist die Zunahme der festen Bestandteile im flüssigen Endosperm wahrnehmbar.
74	-	-	-		
75	Medium milk	Mi-laiteux	Mitte der Milchreife		
76	-	-	-		
77	Late milk	Fin laiteux	Späte Milchreife		
78	-	-	-		
79	-	-	-		
	<u>Dough development</u>	<u>Stade pâteux</u>	<u>Entwicklung der Teigreife</u>		
80	-	-	-		
81	-	-	-		
82	-	-	-		Fingernail impression not held. La marque de l'ongle ne tient pas. Zerdrücken der Frucht mit dem Fingernagel möglich.
83	Early dough	Début pâteux	Frühe Teigreife		
84	-	-	-		
85	Soft dough	Pâteux tendre	Weich teigreif	11.2	Fingernail impression held, inflorescence losing chlorophyll. La marque de l'ongle persiste, l'inflorescence perd sa chlorophylle. Zerdrücken mit dem Fingernagel nicht möglich; Abnahme des Chlorophyllgehaltes des Blütenstandes.
86	-	-	-		
87	Hard dough	Pâteux dur	Hart teigreif		
88	-	-	-		
89	-	-	-		

Code décimal pour les stades de croissance des céréales*
Decimal Code for the Growth Stages of Cereals*
Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides*

2-digit Code Code à 2 chiffres 2-stelliger Code	General Description	Description générale	Allgemeine Beschreibung	Feekes' Scale Echelle de Feekes Feekes-Skala	Additional Remarks on Wheat, Barley, Rye, Oats and Rice Remarques complémentaires pour le blé, l'orge, le seigle, l'avoine et le riz Ergänzende Bemerkungen für Weizen, Gerste, Roggen, Hafer und Reis
	Ripening	Maturation	Das Reifen		
90	-	-	-		In rice: Terminal spikelets ripened. Chez le riz: maturité des épillets terminaux. Bei Reis: Die Körner an der Spitze der Rispe sind reif.
91	Caryopsis hard (difficult to divide by thumb-nail) (3)	Le caryopse est dur (difficile à couper à l'ongle) (3)	Karyopse hart (nur schwer mit dem Daumennagel zu teilen) (3)	11.3	
92	Caryopsis hard (can no longer be dented by thumb-nail) (4)	Le caryopse est dur (ne peut plus du tout être entamé par l'ongle) (4)	Karyopse hart (nicht mehr mit dem Daumennagel einzudellen) (4)	11.4	In rice: 50% of spikelets ripened. Chez le riz: 50% des épillets mûrs. Bei Reis: 50% der Körner sind reif.
93	Caryopsis loosening in daytime	Caryopse se détachant dans la journée	Karyopse tagsüber lockernd		In rice: Over 90% of spikelets ripened. (5) Chez le riz: plus de 90% des épillets mûrs. (5) Bei Reis: mehr als 90% der Körner sind reif. (5)
94	Over-ripe, straw dead and collapsing	Surmaturité, la paille est morte et s'affaisse	Ueberreif, Stroh tot und zusammenbrechend		
95	Seed dormant	Semence dormante	Samen in Keimruhe		Risk of grain loss by shedding. Risque de perte par égrenage. Kornverlust durch Ausfall möglich.
96	Viable seed giving 50% germination	Semence viable donnant 50% de germination	Keimfähige Samen (50 % Keimung)		
97	Seed not dormant	Semence non dormante	Samen nicht in Keimruhe		
98	Secondary dormancy induced	Dormance secondaire induite	Sekundäre Keimruhe induziert		
99	Secondary dormancy lost	Dormance secondaire levée	Sekundäre Keimruhe verloren		
	Transplanting and recovery (rice only)	Repiquage et reprise (riz seulement)	Auspflanzen und Anwachsen (nur für Reis)		
T1	Uprooting of seedlings	Arrachage des plantules	Ausziehen der Jungpflanzen		
T2	-	-	-		
T3	Rooting	Enracinement	Bewurzelung		
T4	-	-	-		
T5	-	-	-		
T6	-	-	-		
T7	Recovery of shoots	Reprise des plantules	Wiederergrünen		
T8	-	-	-		
T9	Resumption of vegetative growth	Reprise de la croissance végétative	Neubeginn des vegetativen Wachstums		

[English]

Notes on the Table of the Decimal Code for the Growth Stages of Cereals

(1) Stage of seedling inoculation with rust in the greenhouse.

(2) Only applicable to cereals with a prostrate or semi-prostrate early growth habit.

(3) Ripeness for binder (ca. 16% water content). Chlorophyll of inflorescence largely lost.

(4) Ripeness for combine harvester (less than 16% water content).

(5) Optimum harvest time.

[français]

Notes pour le tableau du Code décimal pour les stades de croissance des céréales

(1) Stade d'inoculation des plantules avec la rouille en serre.

(2) Application seulement aux céréales dont le port est étalé ou demi-étalé aux stades précoces.

(3) Maturité pour la moissonneuse-lieuse (environ 16% d'eau). Chlorophylle de l'inflorescence presque totalement disparue.

(4) Maturité pour la moissonneuse-batteuse (moins de 16% d'eau).

(5) Moment optimum pour la moisson.

[deutsch]

Bemerkungen zu der Tabelle des Dezimal-Codes für die Entwicklungsstadien des Getreides

(1) Stadium für die künstliche Infektion von Keimpflanzen mit Getreiderost im Gewächshaus.

(2) Nur anwendbar für Getreide mit liegendem oder halbliegendem Habitus zu Beginn der Vegetationsperiode.

(3) Reif für die Ernte mit Binder (ca. 16 % Wassergehalt). Chlorophyll des Blütenstandes grösstenteils verloren.

(4) Reif für die Ernte mit Mähdrescher (weniger als 16 % Wassergehalt).

(5) Optimale Erntezeit.

IX. Literature/Littérature/Literatur

- BERGAL, P., FRIEDBERG, L., 1940: "Essai d'identification des orges cultivées en France", Ann. des Epiphyties et de Phytogénétique, VI fasc. 2, 3, 4, 306 pp, Paris, FR

- COOKE, R.J., 1988: "Electrophoresis in Plant Testing and Breeding", Advances in Electrophoresis 2, pp. 171-261, GB

- COOPER, S.R., 1987: "Report of the Rules Committee 1983-1986", Seed Science and Technology 15, pp. 555-575, GB

- DAY, K.L., 1977: "A Method For the Evolution of Pigmentation of the Aleurone Layer of Barley", Journal Nat. Inst. Agr. Bot., 14, pp. 215-220, GB

- HERVEY-MURRAY, C.G., 1980: "The Identification of Cereal Varieties", Cambridge University Press, 187 pp, GB

- MILATZ, R., 1970: "Kriterien der Getreidearten einschliesslich Mais und ihre Bewertung zur Sortenidentifizierung", Verband Deutscher Pflanzenzüchter, Bonn, 236 pp, DE

- MONTEMBAULT, A., AUTRAN, J.C. and JOUDRIER, P., 1983: "Varietal Identification of Barley and Malt", Journal of the Institute of Brewing 89, pp. 299-302

- SIMON, M., 1972: "Identification et classification des variétés d'orge cultivées en France", Institut national de la recherche agronomique, S.E.I., FR

- WHITE, J. and COOKE, R.J., 1992: "A Standard Classification System For the Identification of Barley Varieties by Electrophoresis", Seed Science and Technology 20, pp. 663-676, GB

X. Technical Questionnaire/Questionnaire technique/Technischer Fragebogen

Reference Number
(not to be filled in by the applicant)
Référence (réservé aux administrations)
Referenznummer
(nicht vom Anmelder auszufüllen)

TECHNICAL QUESTIONNAIRE
to be completed in connection with an application for plant breeders' rights

QUESTIONNAIRE TECHNIQUE
à remplir en relation avec une demande de certificat d'obtention végétale

TECHNISCHER FRAGEBOGEN
in Verbindung mit der Anmeldung zum Sortenschutz auszufüllen

1. Species/Espèce/Art — Hordeum vulgare L. sensu lato

BARLEY
ORGE
GERSTE

2. Applicant (Name and address)/Demandeur (nom et adresse)/Anmelder (Name und Adresse)

3. Proposed denomination or breeder's reference
Dénomination proposée ou référence de l'obtenteur
Vorgeschlagene Sortenbezeichnung oder Anmeldebezeichnung

4. Information on origin, maintenance and reproduction of the variety
Renseignements sur l'origine, le maintien et la reproduction de la variété
Information über Ursprung, Erhaltung und Vermehrung der Sorte

5. Characteristics of the variety to be given (the number in brackets refers to the corresponding characteristic in the Test Guidelines; please mark the state of expression which best corresponds)

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)

Anzugebende Merkmale der Sorte (die in Klammern angegebene Zahl verweist auf das entsprechende Merkmal in den Prüfungsrichtlinien; die Ausprägungsstufe, die der der Sorte am nächsten kommt, bitte ankreuzen)

	Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1)] Stade[1)] Stadium[1)]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
5.1 (29)	Seasonal type Type de développement Wechselverhalten	VG	winter type alternative type spring type	type hiver type alternatif type printemps	Winterform Wechselform Sommerform	Target; - Noveta; - -; Alexis	1[ ] 2[ ] 3[ ]
5.2 (2)	Lowest leaves: hairiness of leaf sheaths Feuilles de la base: pilosité des gaines Basalblätter: Behaarung der Blattscheiden	25-29 VS	absent present	absente présente	fehlend vorhanden	Marylin; Alexis Pastoral; Ceres	1[ ] 9[ ]
5.3 (7)	Time of ear emergence (first spikelet visible on 50% of ears; quote mean date of heading of variety as well as of two well-known comparable varieties) Epoque d'épiaison (premier épillet visible sur 50% des épis; indiquer la date moyenne d'épiaison de la variété et de deux variétés comparables bien connues) Zeitpunkt des Aehrenschiebens (erstes Aehrchen sichtbar an 50% der Aehren; mittleres Datum des Aehrenschiebens der Sorte sowie von zwei bekannten vergleichbaren Sorten angeben)		.....	.....	.....		
5.4 (8)	Awns: anthocyanin coloration of tips Barbes: pigmentation anthocyanique des pointes Grannen: Anthocyanfärbung der Spitzen	60-65 VG	absent present	absente présente	fehlend vorhanden	Pastoral; Dobla Barberousse; Alexis	1[ ] 9[ ]
5.5. (12)	Plant: length (stem, ear and awns; quote length of variety as well as of two well-known comparable varieties) Plante: longueur (tige, épi et barbes; indiquer la longueur de la variété et de deux variétés comparables bien connues) Pflanze: Länge (Halm, Aehre und Grannen; Länge der Sorte sowie von zwei bekannten vergleichbaren Sorten angeben)		.....	.....	.....		

	Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1)] Stade[1)] Stadium[1)]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
5.6 (13)	Ear: number of rows	80-92	two	deux	zweizeilig	Pastoral; Aramir	1[ ]
	Epi: nombre de rangs	VS	more than two	plus de deux	mehrzeilig	Rebelle; Dobla	2[ ]
	Aehre: Zeiligkeit						
5.7 (22)	Grain: rachilla hair type	80-92	short	courte	kurz	Barberousse; Atem	1[ ]
	Grain: type de pilosité de la baguette	VS	long	longue	lang	Pastoral; Alexis	2[ ]
	Korn: Behaarung der Basalborste						
5.8 (26)	Grain: hairiness of ventral furrow	92	absent	absente	fehlend	Pastoral; Alexis	1[ ]
	Grain: pilosité du sillon	VS	present	présente	vorhanden	Plaisant; Cheri	9[ ]
	Korn: Behaarung der Bauchfurche						

6. Similar varieties and differences from these varieties
Variétés voisines et différences par rapport à ces variétés
Aehnliche Sorten und Unterschiede zu diesen Sorten

Denomination of similar variety	Characteristic in which the similar variety is different°)	State of expression of similar variety	State of expression of candidate variety
Dénomination de la variété voisine	Caractère par lequel la variété voisine diffère°)	Niveau d'expression pour la variété voisine	Niveau d'expression pour la variété candidate
Bezeichnung der ähnlichen Sorte	Merkmal, in dem die ähnliche Sorte unterschiedlich ist°)	Ausprägungsstufe der ähnlichen Sorte	Ausprägungsstufe der Kandidatensorte

°) In the case of identical states of expression of both varieties, please indicate the size of the difference/Au cas où les niveaux d'expression des deux variétés seraient identiques, prière d'indiquer l'amplitude de la différence/Sofern die Ausprägungsstufen der beiden Sorten identisch sind, bitte die Grösse des Unterschieds angeben.

7. Additional information which may help to distinguish the variety
Renseignements complémentaires pouvant faciliter la détermination des caractères distinctifs de la variété
Zusätzliche Information zur Erleichterung der Unterscheidung der Sorte

7.1 Resistance to pests and diseases
Résistance aux parasites et aux maladies
Resistenzen gegenüber Schadorganismen

7.2 Special conditions for the examination of the variety
Conditions particulières pour l'examen de la variété
Besondere Bedingungen für die Prüfung der Sorte

7.3 Other information
Autres renseignements
Andere Informationen

[Annex follows/
Annexe suit/
Anlage folgt]

ANNEX/ANNEXE/ANLAGE

Additional Useful Explanations
Explications additionnelles utiles
Zusätzliche nützliche Erklärungen

[English]

TABLE OF CONTENTS PAGE

Part I.	Introduction	2
Part II.	Characteristics derived by using electrophoresis	3
Part III.	Description of the method to be used	5

[français]

SOMMAIRE PAGE

Partie I.	Introduction	13
Partie II.	Caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse	14
Partie III.	Description de la méthode à utiliser	16

[deutsch]

INHALT SEITE

Teil I.	Einführung	24
Teil II.	Merkmale, die sich bei Verwendung der Elektrophorese ergeben	25
Teil III.	Beschreibung der zu verwendenden Methode	27

[English]

Part I

Introduction

The following Annex contains a list of characteristics derived by using electrophoresis and a description of the method to be used. UPOV decided to place these characteristics in an Annex to the Test Guidelines, thereby creating a special category of characteristic, because the majority of the UPOV member States is of the view that it is not possible to establish distinctness solely on the basis of a difference found in a characteristic derived by using electrophoresis. Such characteristics should therefore only be used as a complement to other differences in morphological or physiological characteristics. UPOV reconfirms that these characteristics are considered useful but that they might not be sufficient on their own to establish dis- tinctness. They should not be used as a routine characteristic but at the request or with the agreement of the applicant of the candidate variety.

For the analysis of hordeins, polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS PAGE) is recommended. Hordeins are encoded by three compound loci, known as Hor-1, Hor-2 and Hor-3 on the short (Hor-1 and -2) or long (Hor-3) arm of chromosome 5. There are a number of alleles at each locus and the analysis of hordeins is based on the recognition of these alleles from proteins, which appear on gels as a series of well defined bands or patterns of bands. The loci encode different groups of electrophoretically separable proteins, known as B-, C- and D-hordeins in decreasing order of mobility. The alleles at each locus can be designated by letters or numbers, or a combination of both. The relative electrophoretic mobilities (REMs) of each of the bands can also be determined.

If only C-(Hor-1) and B-(Hor-2) hordeins are of interest, then the standard reference acid PAGE method of the International Seed Testing Association (ISTA) could be used.

Part II

Characteristics Derived by Using Electrophoresis

	Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1)] Stade[1)] Stadium[1)]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
30. (+)	D-Hordein composition: allele expression at locus Hor-3 Composition de l'hordéine D: expression de l'allèle occupant le locus Hor-3 D-Hordein-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in Locus Hor-3		band 34	bande 34	Bande 34	Atem	1
			band 33	bande 33	Bande 33	Natalie	2
			band 35	bande 35	Bande 35	Franka	3
			band 32.5	bande 32,5	Bande 32,5	Iris	4
			band 32	bande 32	Bande 32	Princesse	5
31. (+)	C-Hordein composition: allele expression at locus Hor-1 Composition de l'hordéine C: expression de l'allèle occupant le locus Hor-1 C-Hordein-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in Locus Hor-1		bands 62+65+68	bandes 62+65+68	Banden 62+65+68	Atem	1
			bands 62+65+66+68	bandes 62+65+66+68	Banden 62+65+66+68	Regatta	2
			bands 65+68	bandes 65+68	Banden 65+68	Pirate	3
			bands 66.5+71	bandes 66,5+71	Banden 66,5+71	Athos	4
			bands 61.5+66.5+71	bandes 61,5+66,5+71	Banden 61,5+66,5+71	Norka	5
			band 65	bande 65	Bande 65	Birka	6
			bands 60+67.5+68.5	bandes 60+67,5+68,5	Banden 60+67,5+68,5	Pamela	7
			bands 61+65+68+73	bandes 61+65+68+73	Banden 61+65+68+73	Igri	8
			bands 69+72	bandes 69+72	Banden 69+72	Goelette	9
			bands 64+66.5	bandes 64+66,5	Banden 64+66,5	Catinka	10
			bands 67+71	bandes 67+71	Banden 67+71	Ombelle	11
			bands 65+68+69+70	bandes 65+68+69+70	Banden 65+68+69+70	Albacete	12
			bands 61.5+68+71	bandes 61,5+68+71	Banden 61,5+68+71	Borwina	13
			bands 65+67.5	bandes 65+67,5	Banden 65+67,5	Kendo	14

Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1] Stade[1] Stadium[1]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
32. (+) B-Hordein composition: allele expression at locus Hor-2 Composition de l'hordéine B: expression de l'allèle occupant le locus Hor-2 B-Hordein-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in Locus Hor-2		bands 79+86+88+100	bandes 79+86+88+100	Banden 79+86+88+100	Atem	1
		bands 79+88+91+95+97+101	bandes 79+88+91+95+97+101	Banden 79+88+91+95+97+101	Aramir	2
		bands 79+91+92+95+97+101	bandes 79+91+92+95+97+101	Banden 79+91+92+95+97+101	Valerie	3
		bands 75+82+87+91+97	bandes 75+82+87+91+97	Banden 75+82+87+91+97	Carina	4
		bands 79+86+88+97+101	bandes 79+86+88+97+101	Banden 79+86+88+97+101	Piroline	5
		bands 78+84+95+101	bandes 78+84+95+101	Banden 78+84+95+101	Catinka	6
		bands 79+90+91+94+100	bandes 79+90+91+94+100	Banden 79+90+91+94+100	Regatta	7
		bands 78+86+91+95+100	bandes 78+86+91+95+100	Banden 78+86+91+95+100	Igri	8
		bands 79+82+88+91+92+101	bandes 79+82+88+91+92+101	Banden 79+82+88+91+92+101	Grit	9
		bands 76+79+86+88+100	bandes 76+79+86+88+100	Banden 76+79+86+88+100	Birka	10
		bands 79+86+89+92+95+101	bandes 79+86+89+92+95+101	Banden 79+86+89+92+95+101	Sigma	11
		bands 79+95+101	bandes 79+95+101	Banden 79+95+101	Midas	12
		bands 78+89+92+101	bandes 78+89+92+101	Banden 78+89+92+101	Criter	13
		bands 75+78+79+81+89+101	bandes 75+78+79+81+89+101	Banden 75+78+79+81+89+101	Ditta	14
		bands 75+78+79+81+83+86+88+94+95+100	bandes 75+78+79+81+83+86+88+94+95+100	Banden 75+78+79+81+83+86+88+94+95+100	Caresse	15
		bands 81+84+88+90+101	bandes 81+84+88+90+101	Banden 81+84+88+90+101	Reseda	16
		bands 75+78+79+81+83+86	bandes 75+78+79+81+83+86	Banden 75+78+79+81+83+86	Baronesse	17
		bands 82+88+100	bandes 82+88+100	Banden 82+88+100	Albacete	18
		bands 81+100	bandes 81+100	Banden 81+100	Digger	19
		bands 75+79+83+89+91	bandes 75+79+83+89+91	Banden 75+79+83+89+91	Camargue	20
		bands 79+84+92	bandes 79+84+92	Banden 79+84+92	Marko	21

Part III

Description of the Method to be Used

Hordein composition: allele expression at loci Hor-3(30), Hor-1(31) and Hor-2(32)

SDS PAGE Method for Analysis of Hordeins from Hordeum vulgare

1. Apparatus and equipment

Any suitable vertical electrophoresis system can be used, provided that the gels can be kept at a constant temperature. A gel thickness of no more than 1.5 mm is recommended. The power supply used should be capable of delivering both constant current and constant voltage output.

2. Chemicals

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

Acrylamide (specially purified for electrophoresis)
Bisacrylamide (specially purified for electrophoresis)
Tris (hydroxymethyl) methylamine (TRIS)
Sodium dodecyl sulphate (SDS)
Ammonium persulphate (APS)
2-mercaptoethanol
TEMED (NNN'N'-tetramethylethylenediamine)
Trichloroacetic acid (TCA)
Hydrochloric acid
Glacial acetic acid
Glycine
n-Butanol
Pyronin
Glycerol (d = 1.256)
Methanol
Dimethylformanide (DMF)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (or equivalent)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (or equivalent)

3. Solutions

3.1 Extraction solution

Stock solution:

6.25 ml 1M TRIS HCl buffer, PH 6.8 (see 3.3.2)
12.05 ml distilled water
2g SDS
10 mg Pyronin
10 ml glycerol
This solution can be stored for 2 months at 4°C.

Immediately before use, extraction solution is prepared as follows:

28.33 ml stock buffer solution plus 7.91 ml 2-mercaptoethanol plus 15 ml DMF made up to 100 ml with distilled water. This solution must be prepared immediately prior to use and cannot be stored.

3.2 Electrophoresis (running) buffer

Stock solution:

141.1 g glycine
30.0 g TRIS
10.0 g SDS
made up to 1 liter with distilled water.

Immediately before use, the stock solution is diluted 1:10 with distilled water.

The stock buffer solution can be stored for 2 months at room temperature. Do not store the diluted buffer more than one week. The pH of the buffer must be close to 8.3.

3.3 Gel preparation solutions

3.3.1 Stock resolving gel buffer (1M TRIS HCl, pH 8.8)

121.14 g TRIS plus approximately 20 ml HCl (d = 1.19) made up to 1 liter with distilled water. This buffer can be stored at 4°C for 2 months.

3.3.2 Stock stacking gel buffer (1M TRIS HCl, pH 6.8)

121.14 g TRIS plus approximately 78 ml HC1 (d = 1.19) made up to 1 liter with distilled water. This buffer can be stored at 4°C for 2 months.

3.3.3 10% (w/v) SDS solution

10g of SDS dissolved in distilled water and made up to 100 ml. This solution can be stored at 4°C for 2 months. Prior to use, stir and heat gently to re-dissolve the SDS, if it comes out of solution.

3.3.4 1% (w/v) ammonium persulphate solution

1 g of APS dissolved in distilled water and made up to 10 ml. This solution must be prepared immediately prior to use.

3.3.5 Stock acrylamide solution

51.98g acrylamide made up to 100 ml with distilled water.

3.3.6 Stock bisacrylamide solution

0.3185g bisacrylamide made up to 130 ml with distilled water.

3.4 Staining solutions

3.4.1 0.25g Coomassie Brilliant Blue G-250 plus 0.75g Coomassie Brilliant Blue R-250, made up to 100 ml with water.

3.4.2 55g TCA, 65 ml glacial acetic acid, 180 ml methanol plus 25 ml solution 3.4.1, made up to 1 liter with distilled water.

4. Procedure

4.1 Protein extraction

Individual seeds are ground using a hammer (or other device). Ground seed meal is mixed with diluted sample extraction buffer (3.1) in a 3 ml polypropylene hemolyse or similar tube with a screw-on cap. The ratio of meal/extraction buffer is 50 mg/0.75 ml. The samples are extracted for 2 hours at room temperature, mixed several times using a vortex mixer, heated in a boiling water bath for 10 minutes and then allowed to cool. The tubes are centrifuged at 18,000 g for 5 minutes.

According to the gel thickness and the size of the wells, the volume of extract loaded can vary. Between 10 and 25 µl is usually sufficient.

4.2 Preparation of the gel

Clean and dry gel cassettes are assembled, according to the design of the equipment used. If tape is used to seal the cassettes, it is advisable to assemble them at least one day in advance of use, to enable the tape to 'age' and adhere better.

4.2.1 Resolving (main) gel (10% acrylamide, pH 8.8)

To make two slab gels of 180 x 160 x 1.5 mm, the following is required:

20 ml stock acrylamide solution (3.3.5)
26 ml stock bisacrylamide solution (3.3.6),
30 ml stock gel buffer (3.3.1).

These should be at 4°C. The mixture is de-gassed in a 100 ml Buchner flask for 10 minutes. To this is added:

2 ml APS (3.3.4),
0.8 ml SDS (3.3.3),
40 µl TEMED (use straight from bottle).

The gels are then carefully poured, avoiding the formation of air bubbles, and polymerisation allowed to take place at room temperature.

The gel cassettes should not be filled entirely, in order to leave room for a 3-4 cm layer of stacking gel. The gel surface is carefully overlayed with n-butanol (or distilled water) using a syringe. When polymerisation is finished (about 30 min), the gel surface is carefully rinsed with distilled water and dried with filter paper.

4.2.2 Stacking gel (3.5% acrylamide, pH 6.8)

In a 50 ml Buchner flask, mix:

1.35 ml stock acrylamide solution (3.3.5),
3.17 ml stock bisacrylamide solution (3.3.6)
2.50 ml stock gel buffer (3.3.2) and
12.30 ml distilled water.

Following de-gassing add:

0.875 ml APS (3.3.4),
0.233 ml SDS (3.3.3),
17.5 µl TEMED (straight from bottle)

Mix carefully and immediately pour the stacking gels to the top of the gel cassettes. Insert the well-forming "comb", avoiding air bubbles. Allow to polymerise for about 2 hours. The "combs" are then removed carefully from the gel cassettes and the wells rinsed using diluted electrophoresis running buffer (3.2).

4.3 Electrophoresis

The tank is filled with the appropriate volume of running buffer (3.2), cooled to 15°C. Following sample loading, electrophoresis is carried out at a constant current of 8 mA/sq cm (cross-sectional area) of gel until the pyronin G has moved through the stacking gel, and then at 16 mA/sq cm of gel (maximum voltage 300V) until the marker is at the bottom of the gel. The temperature should be maintained at 15°C.

4.4 Fixing and staining

The gel cassettes are removed from the tank, opened and the gels fixed in 250 ml of 15% (w/v) TCA for at least 30 minutes. The gels are rinsed in distilled water and stained overnight in 250 ml of staining solution (3.4.2) at room temperature. Destaining is not usually necessary but gels should be washed in distilled water before being stored in sealed polythene bags.

Other staining procedures can be successfully used (e.g. Coomassie Brilliant Blue G or equivalent in TCA alone). The final quality control criterion, both for gel preparation and gel staining, is to analyse the suggested example varieties on each batch of gels. The separation of the suggested bands, and their relative electrophoretic mobilities (molecular weights) must be clear in order for the procedures to be judged satisfactory.

Recognition of Hordein Alleles

The band pattern presented in the tables for B-, C- and D-hordeins are schematic and differences in band intensity have been ignored in the presentation.

B-, C- and D-hordeins: nomenclature of the individual bands and recognition of the corresponding alleles (SDS-PAGE)

Characteristic 30: **Locus Hor-3** **D-Hordeins**

Example variety (Atem)	Note				
	1	2	3	4	5
32					--
32.5				--	
33		--			
34	--	--			
35			--		

Characteristic 31: **Locus Hor-1** **C-Hordeins**

Example variety (Atem)	Note														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
60							--								60
61								--							61
61.5					--								--		61.5
62	--		--	--											62
64										--					64
65	--		--	--	--		--		--			--		--	65
66				--											66
66.5					--	--				--					66.5
67											--				67
67.5							--							--	67.5
68	--		--	--	--			--				--	--		68
68.5							--								68.5
69									--			--			69
70												--			70
71					--	--					--		--		71
72									--						72
73								--							73

Characteristic 32: **Locus Hor-2** **B-Hordeins**

Example variety (Atem)	Note																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
75				--										--	--		--			--	
76										--											
78						--		--					--	--	--		--				
79	--	--	--	--		--		--		--	--	--		--	--		--			--	--
81														--	--	--	--		--		
82				--					--									--			
83															--		--			--	
84						--										--					--
86	--	--			--			--		--	--				--		--				
87				--																	
88	--	--	--		--				--	--					--	--		--			
89											--		--	--						--	
90							--									--					
91			--	--	--		--	--	--											--	
92				--					--		--		--								--
94							--								--						
95			--	--		--		--			--	--			--						
97			--	--	--	--															
100	--	--					--	--		--					--			--	--		
101			--	--		--	--		--		--	--	--	--		--					

Acid PAGE Method for Analysis of B- and C-Hordeins from Hordeum vulgare

If only B- and C-hordeins are of interest, then acid PAGE can be used. The following method is the standard reference method recommended by the International Seed Testing Association.

1. Apparatus and Equipment

Various designs of vertical electrophoresis equipment have been used successfully, including those available from Biometra, Bio-Rad, Desaga and Pharmacia-LKB. The power supply used should be capable of operating at constant voltage and constant current.

2. Chemicals

All chemicals should be of "Analytical Reagent" grade or better.

Acrylamide ("specially purified for electrophoresis")
Bisacrylamide ("specially purified for electrophoresis")
Urea
Glacial acetic acid
Glycine
Ferrous sulphate
Ascorbic acid
Hydrogen peroxide
Monothioglycerol
Pyronin G
Trichloroacetic acid (TCA)
Methanol
2-chloroethanol
Coomassie Brilliant Blue G-250 (or equivalent)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (or equivalent)

3. Solutions

3.1 Extraction solution: pyronin G (0.05%) (w/v) in 2-chloroethanol (20%) (v/v) containing urea (18% w/v) and monothioglycerol (1% v/v) (keep cold or prepare fresh).

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

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

3.4 Staining solutions:

3.4.1 0.25g Coomasie Brilliant Blue G-250 + 0.75g Coomassie Brilliant Blue R-250 in 100 ml water.

3.4.2 55g TCA, 65 ml glacial acetic acid, 180 ml methanol, plus 25 ml solution 3.4.1, made up to 1 liter with distilled water.

4. Procedure

4.1 Protein extraction

Single seeds are crushed with pliers or by similar means and transferred to 1.5 ml polypropylene centrifuge tubes or to micro-titer plates. Extraction solution (3.1) (0.3 ml) is added and the tubes or plates are allowed to stand overnight at room temperature. If necessary, the tubes are centrifuged at 18,000xg and the supernatants used for electrophoresis.

4.2 Preparation of the gel

Clean and dry gel cassettes are assembled, according to the design of the equipment. Treating the glass plates with silicon prior to assembly can facilitate subsequent removal of the gel. The gel cassettes can incorporate a plastic backing sheet (e.g. "Gel Bond PAG", FMC Corporation). This supports the gel during subsequent operations. To make 100 ml of gel medium, gel buffer at 4°C (3.3) (approximately 60 ml) 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 100 ml with cold (4°C) stock gel buffer solution (3.3). Freshly prepared 0.6% (v/v) hydrogen peroxide solution (0.35 ml per 100 ml of gel medium) is added, mixed quickly and the gel poured. An acrylic "comb" is placed in the top of the cassette, to make wells in the gel. Polymerisation is carried out at room temperature and should be complete in five to 15 minutes. If not, it may be necessary to adjust the volume of hydrogen peroxide added. The gel mixture should over-fill the cassette, or be over-layed with water, to ensure satisfactory polymerisation of the upper surface.

4.3 Electrophoresis

The acrylic comb is removed from the gel and the sample wells washed with tank buffer (3.2). The tank is filled with an appropriate volume of buffer (3.2) (depending on the equipment used). Samples (10-20 ul) are loaded into the wells and the gel placed in the tank, ensuring that the sample wells are completely filled. The temperature of the lower buffer chamber should be kept at 15°C. Electrophoresis is carried out at a constant voltage of not more than 60V/cm^2 (cross-sectional area) of gel (which corresponds to a voltage of 500V for two gels 16 cm wide and 0.15 cm thick) for twice the time taken for the pyronin G marker to leave the gel. It must be remembered that the anode (positive electrode) is at the origin (top of the gel) in this system.

4.4 Fixing and staining

The gel cassette is removed from the tank, opened and the gel placed in a plastic box containing 200 ml of staining solution (3.4.2). Staining is carried out overnight at room temperature. Destaining if necessary is carried out by placing gels in water for about two to 3 hours at room temperature. Gels can then be dried or stored in sealed polythene bags at 4°C.

It should be noted that other procedures, such as the use of increased temperatures or the use of mixtures of TCA and Coomassie Brilliant Blue G, will give satisfactory staining of gels. The final quality control criterion, both for gel preparation and gel staining, is to analyse the suggested example varieties on each batch of gels. The separation of the designated bands, and their relative electrophoretic mobilities, must be clear and correct in order for the procedures to be satisfactory.

States of Expression of the Alleles in the Example Varieties following Acid PAGE

The following Table indicates the REM values of the main bands present in the B- and C-hordein alleles of the example varieties from the Table of Characteristics, following acid PAGE. In comparing the Acid PAGE and SDS PAGE methods, it should be noted that the example varieties and Notes given for the individual states of expression are identical in both methods.

Characteristic	State of Expression	Example Varieties	Note
31. (+) C-hordein composition: allele expression at locus Hor-1	bands 27+30+32+37+39	Atem	1
	bands 27+30+32+34+37+39	Regatta	2
	bands 27+30+32+37	Pirate	3
	bands 32+37+41	Athos	4
	bands 27+30+32+37+39+41	Norka	5
	bands 32+37+38	Birka	6
	bands 35+38	Pamela	7
	bands 32+37+39+41	Igri	8
	bands 38+41+42	Goelette	9
	bands 30+32+37	Catinka	10
	bands 34+37	Ombelle	11
	bands 34+39+41+42	Albacete	12
	bands 31+34+37+38+41	Borwina	13
	bands 32+37+41+43	Kendo	14

Characteristic		State of Expression	Example Varieties	Note
32. (+)	B-hordein composition: allele expression at locus Hor-2	bands 71+79+83+86+94+100	Atem	1
		bands 71+82+89+100	Aramir	2
		bands 76+82+83+86+100	Valerie	3
		bands 66+71+76+86+93+100	Carina	4
		bands 71+78+79+90+94	Piroline	5
		bands 76+81+94	Catinka	6
		bands 71+72+75+82+85+86+100	Regatta	7
		bands 72+76+79+90+94	Igri	8
		bands 71+76+79+86	Grit	9
		bands 71+78+83+86+94+100	Birka	10
		bands 71+79+83+86+90	Sigma	11
		bands 71+76+79	Midas	12
		bands 71+89	Criter	13
		bands 79+83+86+90	Ditta	14
		bands 67+69+71+72+78+79+85+89+94	Caresse	15
		bands 71+79+83+88+94	Reseda	16
		bands 69+76+79+83+93	Baronesse	17
		bands 71+72+79+85+86+91+100	Albacete	18
		bands 72+76+100	Digger	19
		bands 61+71+76+79+83	Camargue	20
		bands 76+81+94+100	Marko	21

Recognition of Hordein Alleles
B- and C-Hordeins: nomenclature of the individual bands and recognition of the corresponding alleles: acid PAGE

C-Hordeins

Example variety (Atem)	Note														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
25															25
27	--	--	--	--		--									27
30	--	--	--	--		--				--					30
31													--		31
32	--	--	--	--	--	--	--		--		--			--	32
34		--										--	--	--	34
35							--								35
37	--	--	--	--	--	--	--		--		--	--		--	37
38							--	--		--				--	38
39	--	--	--			--			--				--		39
41				--	--				--		--		--	--	41
42										--			--		42
43														--	43
	10	10A	1	11	17	6	19	2	4	5	18	14	8	3	

B-Hordeins

Example variety (Atem)	Note																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
61																				--	
66				--																	
67															--						
69															--		--				
71	--	--	--		--	--		--		--	--	--	--	--		--	--		--		--	
72								--	--							--			--	--		
75								--														
76				--	--		--		--	--			--					--		--	--	--
78						--					--				--							
79	--	--				--			--	--		--		--	--	--	--	--			--	
81							--															--
82			--	--				--														
83	--	--								--	--			--		--	--				--	
85								--							--			--				
86	--	--		--	--			--		--	--			--				--				
88																--						
89			--										--		--							
90					--			--			--			--								
91																		--				
93				--													--					
94	--	--			--	--		--		--					--	--						--
100	--	--	--	--	--		--			--								--	--			--
104																						
	3	4	13	14	-	9	1	7	6	-	-	11	16	-	18	-	19	8	15	12	10	

[français]

Partie I

Introduction

L'annexe suivante comprend une liste des caractères obtenus par l'utili- sation 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 Etats membres de l'UPOV sont d'avis qu'il n'est pas possible d'établir la distinction uniquement sur la base d'une differénce 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.

Pour analyser les hordéines, il est recommandé de pratiquer l'électro- phorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS PAGE). Les hordéines sont codées par trois loci complexes, connus sous le nom de Hor-1, Hor-2 sur le bras court du chromosome 5 et Hort-3 sur le bras long de ce même du chromosome 5. A chaque locus, plusieurs allèles peuvent être identifiés et l'analyse des hordéines est fondée sur la reconnaissance de ces allèles à partir des protéines qui apparaissent sur des gels sous la forme de bandes ou de configurations de bandes bien définies. Différents groupes de protéines identifiables au moyen de l'électrophorèse sont connus sous le nom d'hordéines B, C et D, par ordre décroissant de mobilité. Les allèles occupant chaque locus peuvent être désignés au moyen de lettres ou de numéros, ou d'une combinaison des deux. La mobilité électrophorétique relative (MER) de chacune des bandes peut aussi être déterminée.

Si seules les hordéines C (Hor-1) et B (Hor-2) présentent de l'intérêt, la méthode de référence acide PAGE décrite par l'Association Internationale d'Essais de Semences (ISTA) peut être appliquée.

Partie II

Caractères Obtenus par l'Utilisation de l'Electrophorèse

Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1)] Stade[1)] Stadium[1)]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
30. (+) D-Hordein composition: allele expression at locus Hor-3 Composition de l'hordéine D: expression de l'allèle occupant le locus Hor-3 D-Hordein-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in Locus Hor-3		band 34	bande 34	Bande 34	Atem	1
		band 33	bande 33	Bande 33	Natalie	2
		band 35	bande 35	Bande 35	Franka	3
		band 32.5	bande 32,5	Bande 32,5	Iris	4
		band 32	bande 32	Bande 32	Princesse	5
31. (+) C-Hordein composition: allele expression at locus Hor-1 Composition de l'hordéine C: expression de l'allèle occupant le locus Hor-1 C-Hordein-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in Locus Hor-1		bands 62+65+68	bandes 62+65+68	Banden 62+65+68	Atem	1
		bands 62+65+66+68	bandes 62+65+66+68	Banden 62+65+66+68	Regatta	2
		bands 65+68	bandes 65+68	Banden 65+68	Pirate	3
		bands 66.5+71	bandes 66,5+71	Banden 66,5+71	Athos	4
		bands 61.5+66.5+71	bandes 61,5+66,5+71	Banden 61,5+66,5+71	Norka	5
		band 65	bande 65	Bande 65	Birka	6
		bands 60+67.5+68.5	bandes 60+67,5+68,5	Banden 60+67,5+68,5	Pamela	7
		bands 61+65+68+73	bandes 61+65+68+73	Banden 61+65+68+73	Igri	8
		bands 69+72	bandes 69+72	Banden 69+72	Goelette	9
		bands 64+66.5	bandes 64+66,5	Banden 64+66,5	Catinka	10
		bands 67+71	bandes 67+71	Banden 67+71	Ombelle	11
		bands 65+68+69+70	bandes 65+68+69+70	Banden 65+68+69+70	Albacete	12
		bands 61.5+68+71	bandes 61,5+68+71	Banden 61,5+68+71	Borwina	13
		bands 65+67.5	bandes 65+67,5	Banden 65+67,5	Kendo	14

Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1)] Stade[1)] Stadium[1)]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
32. (+) B-Hordein composition: allele expression at locus Hor-2 Composition de l'hordéine B: expression de l'allèle occupant le locus Hor-2 B-Hordein-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in Locus Hor-2		bands 79+86+88+100	bandes 79+86+88+100	Banden 79+86+88+100	Atem	1
		bands 79+88+91+95+97+101	bandes 79+88+91+95+97+101	Banden 79+88+91+95+97+101	Aramir	2
		bands 79+91+92+95+97+101	bandes 79+91+92+95+97+101	Banden 79+91+92+95+97+101	Valerie	3
		bands 75+82+87+91+97	bandes 75+82+87+91+97	Banden 75+82+87+91+97	Carina	4
		bands 79+86+88+97+101	bandes 79+86+88+97+101	Banden 79+86+88+97+101	Piroline	5
		bands 78+84+95+101	bandes 78+84+95+101	Banden 78+84+95+101	Catinka	6
		bands 79+90+91+94+100	bandes 79+90+91+94+100	Banden 79+90+91+94+100	Regatta	7
		bands 78+86+91+95+100	bandes 78+86+91+95+100	Banden 78+86+91+95+100	Igri	8
		bands 79+82+88+91+92+101	bandes 79+82+88+91+92+101	Banden 79+82+88+91+92+101	Grit	9
		bands 76+79+86+88+100	bandes 76+79+86+88+100	Banden 76+79+86+88+100	Birka	10
		bands 79+86+89+92+95+101	bandes 79+86+89+92+95+101	Banden 79+86+89+92+95+101	Sigma	11
		bands 79+95+101	bandes 79+95+101	Banden 79+95+101	Midas	12
		bands 78+89+92+101	bandes 78+89+92+101	Banden 78+89+92+101	Criter	13
		bands 75+78+79+81+89+101	bandes 75+78+79+81+89+101	Banden 75+78+79+81+89+101	Ditta	14
		bands 75+78+79+81+83+86+88+94+95+100	bandes 75+78+79+81+83+86+88+94+95+100	Banden 75+78+79+81+83+86+88+94+95+100	Caresse	15
		bands 81+84+88+90+101	bandes 81+84+88+90+101	Banden 81+84+88+90+101	Reseda	16
		bands 75+78+79+81+83+86	bandes 75+78+79+81+83+86	Banden 75+78+79+81+83+86	Baronesse	17
		bands 82+88+100	bandes 82+88+100	Banden 82+88+100	Albacete	18
		bands 81+100	bandes 81+100	Banden 81+100	Digger	19
		bands 75+79+83+89+91	bandes 75+79+83+89+91	Banden 75+79+83+89+91	Camargue	20
		bands 79+84+92	bandes 79+84+92	Banden 79+84+92	Marko	21

Partie III

Description de la Méthode à Utiliser

Composition de l'hordéine : expression de l'allèle occupant les loci Hor-3(30), Hor-1(31) et Hor-2(32)

Méthode SDS PAGE pour l'analyse des hordéines de Hordeum vulgare

1. Matériel et équipement

Tout système d'électrophorèse vertical approprié peut être utilisé à condition que les gels puissent être maintenus à température constante. Il est recommandé d'employer un gel d'au plus 1,5 mm d'épaisseur. La source d'énergie utilisée doit pouvoir fournir un courant et une tension d'alimentation constants.

2. Substances chimiques

Toutes les substances chimiques doivent être de la qualité d'un "réactif analytique", voire mieux:

acrylamide (spécialement purifié pour l'électrophorèse)
bisacrylamide (spécialement purifié pour l'électrophorèse)
tris (hydroxyméthyle) méthylamine (TRIS)
dodécylsulfate de sodium (sodium dodecyl sulphate - SDS)
persulfate d'ammonium (ammonium persulphate - APS)
2-mercaptoéthanol
NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED)
acide trichloroacétique (trichloroacetic acid - TCA)
acide chlorydrique
acide acétique glacial
glycine
n-Butanol
pyronine G
glycérol (d = 1,256)
méthanol
diméthylformamide (DMF)
bleu de Coomassie R-250 (ou équivalent)
bleu de Coomassie G-250 (ou équivalent)

3. Solutions

3.1 Solution extractive

Solution de base :

tampon : 1M TRIS HCl, pH 6,8 (voir 3.3.2) : 6,25 ml
eau distillée : 12,05 ml
SDS : 2 g
pyronine G : 10 mg
glycérol : 10 ml
Cette solution peut être conservée pendant 2 mois à 4°C.

Juste avant d'être utilisée, la solution extractive est préparée comme suit :

28,33 ml de solution tampon de base plus 7,91 ml de 2-mercaptoéthanol plus 15 ml de DMF et appoint d'eau distillée jusqu'à l'obtention de 100 ml de solution. Celle-ci doit être préparée juste avant d'être utilisée et ne peut pas être stockée.

3.2 Tampon de migration

Solution de base :

glycine : 141,1 g
TRIS : 30,0 g
SDS : 10,0 g
appoint d'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un litre de solution.

Juste avant d'être utilisée, la solution de base est diluée avec de l'eau distillée dans la proportion de 1 pour 10.

La solution tampon de base peut être conservée pendant 2 mois à température ambiante. Ne pas stocker la solution tampon diluée plus d'une semaine. Le pH du tampon doit être voisin de 8,3.

3.3 Solutions pour la préparation des gels

3.3.1 Tampon du gel de séparation (1M TRIS HCl, pH 8,8)

121,14 g de TRIS plus environ 20 ml de HC1 (d = 1,19) et appoint d'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un litre de tampon. Celui-ci peut être conservé pendant 2 mois à 4°C.

3.3.2 Tampon du gel de concentration (1M TRIS HCl, pH 6,8)

121,14 g de TRIS plus environ 78 ml de HCl (d = 1,19) et appoint d'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un litre de tampon. Celui-ci peut être conservé pendant 2 mois à 4°C.

3.3.3 Solution de SDS à 10% (pds/v)

10 g de SDS dissous dans de l'eau distillée jusqu'à l'obtention de 100 ml de solution. Celle-ci peut être conservée pendant 2 mois à 4°C. Avant de l'utiliser, agiter et, au besoin, chauffer légèrement le mélange pour dissoudre à nouveau le SDS.

3.3.4 Solution de persulfate d'ammonium à 1% (pds/v)

1 g de APS dissous dans de l'eau distillée jusqu'à l'obtention de 10 ml de solution. Celle-ci doit être préparée juste avant d'être utilisée.

3.3.5 Solution mère d'acrylamide

51,98 g d'acrylamide et appoint d'eau distillée jusqu'à l'obtention de 100 ml de solution.

3.3.6 Solution mère de bisacrylamide

0,3185 g de bisacrylamide et appoint d'eau distillée jusqu'à l'obtention de 130 ml de solution.

3.4 Solutions de coloration

3.4.1 0,25 g de bleu de Coomassie G-250 plus 0,75 g de bleu de Coomassie R-250 et appoint d'eau distillée jusqu'à l'obtention de 100 ml de solution.

3.4.2 55 g de TCA, 65 ml d'acide acétique glacial, 180 ml de méthanol, plus 25 ml de la solution ci-dessus (3.4.1) et appoint d'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un litre de solution.

4. Manipulation

4.1 Extraction des protéines

Les grains sont broyés au moyen d'un marteau (ou de tout autre instrument). La farine ainsi obtenue est mélangée au tampon d'extraction dilué (3.1) dans un tube à hémolyse de 3 ml en polypropylène (ou dans un tube analogue) muni d'un couvercle vissé. La proportion est de 50 mg de farine pour 0,75 ml de tampon d'extraction. Les échantillons sont extraits pendant 2 heures à température ambiante, mélangés plusieurs fois au moyen d'un mélangeur à turbulence, chauffés pendant 10 minutes dans un bain d'eau bouillante, puis mis à refroidir. Les tubes sont centrifugés à 18 000 g pendant 5 minutes.

Selon l'épaisseur du gel et la dimension des puits, le volume d'extrait chargé peut varier. Généralement, 10 à 25 µl suffisent.

4.2 Préparation du gel

Les cassettes propres et sèches sont assemblées en fonction de la configuration du matériel utilisé. Si l'on se sert de ruban adhésif pour les fermer, il est judicieux de les assembler au moins le jour précédant leur utilisation, afin que le ruban adhésif puisse "vieillir" et mieux adhérer.

4.2.1 Gel de séparation (principal) (13% d'acrylamide - pH 8,8)

Pour obtenir deux plaques de gel de 180 x 160 x 1,5 mm, il faut :

20 ml de solution mère d'acrylamide (3.3.5),
26 ml de solution mère de bisacrylamide (3.3.6),
30 ml de tampon du gel de séparation (3.3.1).

Le mélange, qui doit être à une température de 4°C, est dégazé pendant 10 minutes dans un flacon de Büchner de 100 ml. On y ajoute :

2 ml de APS (3.3.4),
0,8 ml de SDS (3.3.3),
40 µl de TEMED (versé directement de la bouteille).

Ensuite, le gel est coulé entre les deux plaques avec précaution, en évitant la formation de bulles d'air. Laisser polymériser à température ambiante.

Les cassettes ne doivent pas être remplies complètement, afin qu'une couche de gel d'étagement, d'une épaisseur de 3 à 4 cm, puisse se former. La surface du gel est minutieusement recouverte de n-butanol (ou d'eau distillée) au moyen d'une seringue. Lorsque la polymérisation est terminée (au bout d'une trentaine de minutes), la surface du gel est soigneusement rincée avec de l'eau distillée et séchée avec du papier filtre.

4.2.2 Gel de concentration (3,5% d'acrylamide - pH 6,8)

Dans un flacon de Büchner de 50 ml, mélanger :

1,35 ml de solution mère d'acrylamide (3.3.5),
3,17 ml de solution mère de bisacrylamide (3.3.6),
2,50 ml de tampon du gel de concentration (3.3.2), et
12,30 ml d'eau distillée.

Après dégazement, ajouter :

0,875 ml de APS (3.3.4),
0,233 ml de SDS (3.3.3),
17,5 µl de TEMED (versé directement de la bouteille).

Mélanger soigneusement le tout et verser immédiatement les gels de concentration de manière à remplir les cassettes. Introduire le "peigne" servant à former des puits, en évitant la constitution de bulles d'air. Laisser polymériser pendant 2 heures environ. Ensuite, retirer avec précaution les "peignes" des cassettes de gel et rincer les puits au moyen du tampon de migration dilué (3.2).

4.3 Electrophorèse

La cuve (3.2) est remplie avec un volume suffisant de tampon de migration et refroidie à 15°C. Après avoir introduit l'échantillon, l'électrophorèse est effectuée en utilisant un courant constant de 8 mA/cm^2 (surface de la section transversale du gel) jusqu'à ce que la pyronine G ait pénétré dans le gel de concentration, puis de 16 mA/cm^2 (maximum 300V) jusqu'à ce que le marqueur se trouve à l'extrémité du gel. La température doit être maintenue à 15°C.

4.4 Fixation et coloration

Les cassettes sont retirées de la cuve et ouvertes. Les gels sont fixés pendant 30 minutes au moins dans 250 ml de TCA à 15% (pds/v) puis rincés dans de l'eau distillée et placés jusqu'au lendemain dans 250 ml de solution de coloration (3.4.2) à température ambiante. Il n'est généralement pas nécessaire de les décolorer, mais il faut les laver dans de l'eau distillée avant de les stocker dans des sachets de polyéthylène hermétiquement fermés.

D'autres méthodes de coloration peuvent être appliquées avec succès (bleu de Coomassie G dans du TCA uniquement). Pour contrôler la qualité finale du gel, du point de vue à la fois de sa préparation et de sa coloration, les variétés exemples proposées sont examinées dans chaque série de gels. La séparation des bandes désignées et leur mobilité électrophorétique relative (poids moléculaires) doivent être nettes pour que la manipulation soit jugée satisfaisante.

Reconnaissance des allèles des hordéines

Les configurations de bandes pour les hordéines B, C et D sont schématiques et des différences de l'intensité ont été ignorées dans la présentation.

Hordéines B, C et D : nomenclature des diverses bandes et reconnaissance des allèles correspondants : SDS PAGE

Caractère 30 : **Locus Hor-3** **Hordéine D**

Exemple (Atem)	Note 1	2	3	4	5
32					--
32.5				--	
33		--			
34	--	--			
35			--		

Caractère 31 : **Locus Hor-1** **Hordéine C**

Exemple (Atem)	Note 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
60							--								60
61								--							61
61.5					--								--		61.5
62	--	--	--												62
64										--					64
65	--	--	--	--		--		--				--		--	65
66			--												66
66.5				--	--					--					66.5
67											--				67
67.5							--							--	67.5
68	--	--	--	--				--				--	--		686
68.5							--								68.5
69									--			--			69
70												--			70
71				--	--						--		--		71
72									--						72
73								--							73

Caractère 32 : **Locus Hor-2** **Hordéine B**

Exemple (Atem)	Note 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
75				--										--	--		--			--	
76										--											
78						--		--					--	--	--		--				
79	--	--	--	--		--		--		--	--	--		--	--		--			--	--
81														--	--	--	--		--		
82				--				--										--			
83															--		--			--	
84						--										--					--
86	--	--			--			--		--	--				--		--				
87				--																	
88	--	--	--		--				--	--					--	--		--			
89											--		--	--						--	
90							--									--					
91			--	--	--		--	--	--											--	
92				--					--		--		--								--
94							--								--						
95			--	--		--		--			--	--			--						
97			--	--	--	--															
100	--	--					--	--		--					--			--	--		
101			--	--		--	--		--		--	--	--	--		--					

Méthode acide - PAGE pour l'analyse des hordéines B et C de Hordeum vulgare

Si seules les hordéines B et C présentent de l'intérêt, la méthode acide PAGE peut être appliquée. La méthode ci-après est la méthode de référence recommandée par l'Association internationale d'essais de semences.

1. Matériel et équipement

Diverses configurations de matériel d'électrophorèse verticale ont été utilisées avec succès, notamment le matériel de Biométra, BioRad, Desaga et Pharmacia-LKB. La source d'énergie utilisée doit pouvoir fournir une tension d'alimentation et un courant constants.

2. Substances chimiques

Toutes les substances chimiques doivent être de la qualité d'un "réactif analytique", voire mieux:

acrylamide ("spécialement purifié pour l'électrophorèse")
bisacrylamide ("spécialement purifié pour l'électrophorèse")
urée
acide acétique glacial
glycine
sulfate ferreux
acide ascorbique
peroxyde d'hydrogène
monothioglycérol
pyronine G
acide trichloroacétique (trichloroacetic acid - TCA)
méthanol
chlorhydrine d'éthylène
bleu de Coomassie G-250 (ou équivalent)
bleu de Coomassie R-250 (ou équivalent)

3. Solutions

3.1 Solution d'extraction : pyronine G (0,05% - pds/v) dans de la chlorhydrine d'éthylène (20% - v/v) contenant de l'urée (18% - pds/v) et du monothioglycérol (1% - v/v) (conserver la solution au froid ou la préparer juste avant de l'utiliser).

3.2 Solution tampon : acide acétique glacial (4 ml) et glycine (0,4 g) et appoint d'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un litre de solution; conserver au froid.

3.3 Tampon du gel : acide acétique glacial (20 ml) et glycine (1,0 g) et appoint d'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un litre de tampon; conserver au froid.

3.4 Solutions de coloration :

3.4.1 0,25 g de bleu de Coomassie G-250 + 0,75 g de bleu de Coomassie R-250 dans 100 ml d'eau.

3.4.2 55 g de TCA, 65 ml d'acide acétique glacial, 180 ml de méthanol, plus 25 ml de la solution ci-dessus (3.4.1) et appoint d'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un litre de solution.

4. Procédure

4.1 Extraction des protéines

Les grains sont broyés au moyen de pinces ou d'instruments analogues et placés dans des tubes à centrifugation de 1,5 ml en polypropylène ou sur des plaques de microtitrage. Ajouter 0,3 ml de la solution d'extraction ci-dessus (3.1) et laisser les tubes ou les plaques à température ambiante jusqu'au lendemain. Au besoin, les tubes sont centrifugés à 18 000 g et les parties surnageantes sont utilisées pour l'électrophorèse.

4.2 Préparation du gel

Les cassettes propres et sèches sont assemblées en fonction de la configuration du matériel. Si l'on traite les plaques de verre au silicone avant de les assembler, le gel peut ensuite être retiré plus facilement. Les cassettes peuvent être doublées d'une feuille de matière plastique ("Gel Bond PAG" de la société FMC, par exemple). Cela a pour effet de maintenir le gel pendant les opérations ultérieures. Pour obtenir 100 ml de gel, prendre environ 60 ml de tampon du gel (3.3) à 4°C et ajouter 10 g d'acrylamide, 0,4 g de bisacrylamide, 6 g d'urée, 0,1 g d'acide ascorbique, 0,005 g de sulfate ferreux. Agiter la solution et y ajouter le tampon du gel de base (3.3) froid (4°C) jusqu'à l'obtention de 100 ml de solution. Ajouter une solution de peroxide d'hydrogène à 0,6% (v/v) (0,35 ml pour 100 ml de gel) préparée juste avant de l'utiliser et mélanger rapidement, puis verser le gel. Un "peigne" acrylique est placé sur la partie supérieure de la cassette, afin que des puits se forment dans le gel. La polymérisation, qui se fait à température ambiante, doit être achevée au bout de 5 à 15 minutes. Si tel n'est pas le cas, il peut être nécessaire d'ajuster le volume de peroxyde d'hydrogène. Le mélange doit remplir complètement la cassette, ou être recouvert d'eau, afin d'assurer une polymérisation satisfaisante de la surface.

4.3 Electrophorèse

Le peigne acrylique est retiré du gel et les puits sont rincés avec la solution tampon (3.2) dont on remplit la cuve d'un volume approprié (en fonction du matériel utilisé). Les échantillons (10 à 20 ul) sont introduits dans les puits et le gel est placé dans la cuve, en veillant à ce que les puits soient complètement remplis. La température inférieure de la cuve doit être maintenue à 15°C. L'électrophorèse est pratiquée en utilisant une tension d'alimentation constante non supérieure à 60 V/cm^2 (surface de la section transversale du gel (ce qui correspond à une tension de 500 V pour deux gels de 16 cm de largeur et de 0,15 cm d'épaisseur) pendant deux fois plus de temps qu'il ne faut au marqueur de pyronine G pour quitter le gel. Il ne faut pas oublier que l'anode (électrode positive) est à l'origine (partie supérieure du gel).

4.4 Fixation et coloration

La cassette est retirée de la cuve ouverte et le gel est placé dans une boîte en matière plastique contenant 200 ml de solution de coloration (3.4.2). La coloration se fait durant la nuit à température ambiante. Pour décolorer les gels, au besoin, les placer dans de l'eau pendant 2 à 3 heures à température ambiante. Ils peuvent ensuite être séchés ou stockés à 4°C dans des sachets de polyéthylène hermétiquement fermés.

Il convient de noter que d'autres méthodes (températures plus élevées ou utilisation de mélanges de TCA et de bleu de Coomassie G, par exemple) permettront d'obtenir une coloration satisfaisante des gels. Pour contrôler la qualité finale du gel, du point de vue à la fois de sa préparation et de sa coloration, les variétés exemples proposées sont examinées dans chaque série de gels. La séparation des bandes désignées et leur mobilité électrophorétique relative doivent être nettes et exactes pour que la manipulation soit satisfaisante.

Niveaux d'expression des allèles chez les variétés exemples avec la méthode acide PAGE

Le tableau ci-dessous indique la mobilité électrophorétique relative (MER) des principales bandes présentes pour les allèles des hordéines B et C des variétés exemples figurant dans le tableau des caractères, après application de la méthode acide PAGE. En comparant les méthodes acide PAGE et SDS PAGE, il est à noter que les variétés exemples et les notes données aux niveaux d'expression sont identiques pour les deux méthodes.

Caractère	Niveau d'expression	Exemples	Note
31. (+) Composition de l'hordéine C : expression de l'allèle occupant le locus Hor-1	bandes 27+30+32+37+39	Atem	1
	bandes 27+30+32+34+37+39	Regatta	2
	bandes 27+30+32+37	Pirate	3
	bandes 32+37+41	Athos	4
	bandes 27+30+32+37+39+41	Norka	5
	bandes 32+37+38	Birka	6
	bandes 35+38	Pamela	7
	bandes 32+37+39+41	Igri	8
	bandes 38+41+42	Goelette	9
	bandes 30+32+37	Catinka	10
	bandes 34+37	Ombelle	11
	bandes 34+39+41+42	Albacete	12
	bandes 31+34+37+38+41	Borwina	13
	bandes 32+37+41+43	Kendo	14

32. (+)	Composition de l'hordéine B : expression de l'allèle occupant le locus Hor-2	bandes	71+79+83+86+94+100	Atem 1
		bandes	71+82+89+100	Aramir 2
		bandes	76+82+83+86+100	Valerie 3
		bandes	66+71+76+86+93+100	Carina 4
		bandes	71+78+79+90+94	Piroline 5
		bandes	76+81+94	Catinka 6
		bandes	71+72+75+82+85+86+100	Regatta 7
		bandes	72+76+79+90+94	Igri 8
		bandes	71+76+79+86	Grit 9
		bandes	71+78+83+86+94+100	Birka 10
		bandes	71+79+83+86+90	Sigma 11
		bandes	71+76+79	Midas 12
		bandes	71+89	Criter 13
		bandes	79+83+86+90	Ditta 14
		bandes	67+69+71+72+78+79+85+89+94	Caresse 15
		bandes	71+79+83+88+94	Reseda 16
		bandes	69+76+79+83+93	Baronesse 17
		bandes	71+72+79+85+86+91+100	Albacete 18
		bandes	72+76+100	Digger 19
		bandes	61+71+76+79+83	Camargue 20
		bandes	76+81+94+100	Marko 21

Reconnaissance des allèles des hordéines

Hordéines B et C : nomenclature des diverses bandes et reconnaissances des allèles correspondants: acide PAGE

Hordéine C

	Exemple (Atem)	Note														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
25																25
27	--	--	--	--		--										27
30	--	--	--	--		--					--					30
31														--		31
32	--	--	--	--	--	--	--		--		--				--	32
34			--									--	--	--		34
35								--								35
37	--	--	--	--	--	--	--		--		--	--		--	--	37
38							--	--		--				--		38
39	--	--	--			--			--				--			39
41					--	--			--	--			--	--	--	41
42										--			--			42
43															--	43
		10	10A	1	11	17	6	19	2	4	5	18	14	8	3	

Hordéine B

	Exemple (Atem)	Note																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
61																					--	
66					--																	
67																--						
69																--		--				
71	--	--	--		--	--		--		--	--	--	--	--		--	--		--		--	
72								--	--							--			--	--		
75								--														
76				--	--		--		--	--			--					--		--	--	--
78						--					--					--						
79	--	--				--			--	--		--	--		--	--	--	--	--		--	
81							--															--
82			--	--				--														
83	--	--									--	--			--		--	--			--	
85								--								--			--			
86	--	--		--	--			--		--	--	--			--				--			
88																	--					
89			--											--		--						
90						--			--			--			--							
91																			--			
93					--													--				
94	--	--				--	--		--		--					--	--					--
100	--	--	--	--	--			--			--								--	--		--
104																						
		3	4	13	14	-	9	1	7	6	-	-	11	16	-	18	-	19	8	15	12	10

[deutsch]

Teil I

Einführung

Die folgende Anlage enthält eine Liste der Merkmale, die sich bei Verwendung der Elektrophorese ergeben, sowie eine Beschreibung der zu verwendenden Methode. Die UPOV hat entschieden, diese Merkmale in einer Anlage zu den Prüfungsrichtlinien aufzuführen und damit eine besondere Kategorie von Merkmalen zu bilden, da die Mehrheit der UPOV-Verbandsstaaten der Meinung ist, dass es nicht möglich ist, die Unterscheidbarkeit allein auf der Grundlage eines Unterschiedes zu begründen, der in einem mit Hilfe der Elektrophorese sich ergebenden Merkmal erfasst wurde. Solche Merkmale sollten daher nur ergänzend zu anderen Unterschieden in morphologischen oder physiologischen Merkmalen verwendet werden. Die UPOV bestätigt, dass diese Merkmale als nützlich angesehen werden; es könnte aber sein, dass sie alleine für sich genommen für die Erstellung der Unterscheidbarkeit nicht ausreichen. Sie sollten nicht als Routinemerkmal verwendet werden, sondern nur auf Antrag oder mit Zustimmung des Anmelders der Kandidatensorte.

Für die Analyse von Hordeinen wird die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in Anwesenheit von Natrium-Dodecylsufat (SDS-PAGE) empfohlen. Hordeine sind durch drei zusammengesetzte Loci kodiert, die als Hor-1, Hor-2 und Hor-3 auf dem kurzen (Hor-1 und -2) oder langem (Hor-3) Schenkel des Chromosoms 5 bekannt sind. In jedem Locus ist eine Reihe von Allelen vorhanden, und die Analyse von Hordeinen beruht auf der Erkennung dieser Allele aus den Proteinen, die in den Gelen als eine Serie gut definierter Banden oder Bandenmuster erscheinen. Die Loci kodieren verschiedene Gruppen elektrophoretisch trennbarer Proteine, bekannt als B-, C- und D-Hordeine in abnehmender Mobilitätsreihenfolge. Die Allele in jedem Locus können mit Buchstaben oder Zahlen, oder einer Kombination davon, bezeichnet werden. Die relativen elektrophoretischen Mobilitäten der einzelnen Banden können gleichfalls festgestellt werden.

Sind nur C- (Hor-1) und B- (Hor-2) Hordeine von Interesse, so kann die Standardmethode Acid-PAGE der Internationalen Vereinigung für Saatgutprüfung (ISTA) angewandt werden.

Teil II

Merkmale, die sich bei Verwendung der Elektrophorese ergeben

	Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1)] Stade[1)] Stadium[1)]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
30. (+)	D-Hordein composition: allele expression at locus Hor-3 Composition de l'hordéine D: expression de l'allèle occupant le locus Hor-3 D-Hordein-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in Locus Hor-3		band 34	bande 34	Bande 34	Atem	1
			band 33	bande 33	Bande 33	Natalie	2
			band 35	bande 35	Bande 35	Franka	3
			band 32.5	bande 32,5	Bande 32,5	Iris	4
			band 32	bande 32	Bande 32	Princesse	5
31. (+)	C-Hordein composition: allele expression at locus Hor-1 Composition de l'hordéine C: expression de l'allèle occupant le locus Hor-1 C-Hordein-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in Locus Hor-1		bands 62+65+68	bandes 62+65+68	Banden 62+65+68	Atem	1
			bands 62+65+66+68	bandes 62+65+66+68	Banden 62+65+66+68	Regatta	2
			bands 65+68	bandes 65+68	Banden 65+68	Pirate	3
			bands 66.5+71	bandes 66,5+71	Banden 66,5+71	Athos	4
			bands 61.5+66.5+71	bandes 61,5+66,5+71	Banden 61,5+66,5+71	Norka	5
			band 65	bande 65	Bande 65	Birka	6
			bands 60+67.5+68.5	bandes 60+67,5+68,5	Banden 60+67,5+68,5	Pamela	7
			bands 61+65+68+73	bandes 61+65+68+73	Banden 61+65+68+73	Igri	8
			bands 69+72	bandes 69+72	Banden 69+72	Goelette	9
			bands 64+66.5	bandes 64+66,5	Banden 64+66,5	Catinka	10
			bands 67+71	bandes 67+71	Banden 67+71	Ombelle	11
			bands 65+68+69+70	bandes 65+68+69+70	Banden 65+68+69+70	Albacete	12
			bands 61.5+68+71	bandes 61,5+68+71	Banden 61,5+68+71	Borwina	13
			bands 65+67.5	bandes 65+67,5	Banden 65+67,5	Kendo	14

Characteristics Caractères Merkmale	Stage[1] Stade[1] Stadium[1]	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
32. (+) B-Hordein composition: allele expression at locus Hor-2 Composition de l'hordéine B: expression de l'allèle occupant le locus Hor-2 B-Hordein-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in Locus Hor-2		bands 79+86+ 88+100	bandes 79+86+ 88+100	Banden 79+86+ 88+100	Atem	1
		bands 79+88+ 91+95+97+101	bandes 79+88+ 91+95+97+101	Banden 79+88+ 91+95+97+101	Aramir	2
		bands 79+91+ 92+95+97+101	bandes 79+91+ 92+95+97+101	Banden 79+91+ 92+95+97+101	Valerie	3
		bands 75+82+ 87+91+97	bandes 75+82+ 87+91+97	Banden 75+82+ 87+91+97	Carina	4
		bands 79+86+ 88+97+101	bandes 79+86+ 88+97+101	Banden 79+86+ 88+97+101	Piroline	5
		bands 78+84+ 95+101	bandes 78+84+ 95+101	Banden 78+84+ 95+101	Catinka	6
		bands 79+90+ 91+94+100	bandes 79+90+ 91+94+100	Banden 79+90+ 91+94+100	Regatta	7
		bands 78+86+ 91+95+100	bandes 78+86+ 91+95+100	Banden 78+86+ 91+95+100	Igri	8
		bands 79+82+ 88+91+92+101	bandes 79+82+ 88+91+92+101	Banden 79+82+ 88+91+92+101	Grit	9
		bands 76+79+ 86+88+100	bandes 76+79+ 86+88+100	Banden 76+79+ 86+88+100	Birka	10
		bands 79+86+ 89+92+95+101	bandes 79+86+ 89+92+95+101	Banden 79+86+ 89+92+95+101	Sigma	11
		bands 79+95+ 101	bandes 79+95+ 101	Banden 79+95+ 101	Midas	12
		bands 78+89+ 92+101	bandes 78+89+ 92+101	Banden 78+89+ 92+101	Criter	13
		bands 75+78+ 79+81+89+101	bandes 75+78+ 79+81+89+101	Banden 75+78+ 79+81+89+101	Ditta	14
		bands 75+78+ 79+81+83+86+ 88+94+95+100	bandes 75+78+ 79+81+83+86+ 88+94+95+100	Banden 75+78+ 79+81+83+86+ 88+94+95+100	Caresse	15
		bands 81+84+ 88+90+101	bandes 81+84+ 88+90+101	Banden 81+84+ 88+90+101	Reseda	16
		bands 75+78+ 79+81+83+86	bandes 75+78+ 79+81+83+86	Banden 75+78+ 79+81+83+86	Baronesse	17
		bands 82+88+ 100	bandes 82+88+ 100	Banden 82+88+ 100	Albacete	18
		bands 81+100	bandes 81+100	Banden 81+100	Digger	19
		bands 75+79+ 83+89+91	bandes 75+79+ 83+89+91	Banden 75+79+ 83+89+91	Camargue	20
		bands 79+84+ 92	bandes 79+84+ 92	Banden 79+84+ 92	Marko	21

Teil III

Beschreibung der zu verwendenden Methode

Hordein-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in den Loci Hor-3(30), Hor-1(31) und Hor-2(32)

SDS-PAGE-Methode für die Analyse von Hordeinen von Hordeum vulgare

1. Geräte und Ausrüstung

Verwendet werden kann jedes geeignete vertikale Elektrophorese-System unter der Voraussetzung, dass die Gele auf einer konstanten Temperatur gehalten werden können. Es wird eine Geldicke von nicht mehr als 1,5 mm empfohlen. Die verwendete Energiequelle sollte sowohl konstante Stromstärke als auch eine konstante Spannung liefern.

2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sollten mindestens Analysenreinheit aufweisen.

Acrylamid (Spezialqualität für Elektrophorese-Zwecke)
Bisacrylamid (Spezialqualität für Elektrophorese-Zwecke)
Tris(Hydroxymethyl) methylamin (TRIS)
Natriumdodecylsulfat (SDS)
Ammoniumpersulfat (APS)
2-Mercaptoethanol
NNN'N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)
Trichloressigsäure (TCA)
Salzsäure (HCL)
Eisessig
Glycin
n-Butanol
Pyronin G
Glycerin (d = 1.256)
Methanol
Dimethylformanid (DMF)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (oder gleichwertig)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (oder gleichwertig)

3. Lösungen

3.1 Extraktionslösung

Stammlösung:

6,25 ml Sammelgelpuffer (siehe 3.3.2)
12,05 ml destilliertes Wasser
2g SDS
10 mg Pyronin G
10 ml Glycerin
Diese Lösung kann 2 Monate bei 4 °C gelagert werden.

Die Extraktionslösung wird unmittelbar vor Verwendung wie folgt zubereitet:

28,33 ml Stammlösung, 7,91 ml 2-Mercaptoethanol und 15 ml DMF werden mit destilliertem Wasser auf 100 ml verdünnt. Diese Lösung muss unmittelbar vor der Benutzung vorbereitet werden und kann nicht gelagert werden.

3.2 Elektrophoresepuffer

Stammlösung:

141,1 g Glycin
30,0 g TRIS
10,0 g SDS
werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Unmittelbar vor Verwendung wird die Stammlösung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Die Stammlösung kann 2 Monate bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Der verdünnte Puffer darf nicht länger als eine Woche aufbewahrt werden. Der pH-Wert des Puffers muss bei knapp 8,3 liegen.

3.3 Lösungen für die Gelpräparation

3.3.1 Trenngelpuffer (1M TRIS HC1, pH 8,8)

121,14 g TRIS und etwa 20 ml HC1 (d = 1,19) werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Dieser Puffer kann 2 Monate bei 4 °C gelagert werden.

3.3.2 Sammelgelpuffer (1M TRIS HC1, pH 6,8)

121,14 g TRIS und etwa 78 ml HC1 (d = 1,19) werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Dieser Puffer kann 2 Monate bei 4 °C gelagert werden.

3.3.3 10% (w/v) SDS-Lösung

10 g SDS werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung kann 2 Monate bei 4 °C gelagert werden. Vor der Verwendung wird gegebenenfalls die Lösung behutsam gerührt und erwärmt, um SDS wieder aufzulösen.

3.3.4 1% (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung

1 g APS wird in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Diese Lösung muss unmittelbar vor der Verwendung vorbereitet werden.

3.3.5 Acrylamid-Stammlösung

51,98 g Acrylamid werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

3.3.6 Bisacrylamid-Stammlösung

0,3185 g Bisacrylamid werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 130 ml aufgefüllt.

3.4 Farblösungen

3.4.1 0,25 g Coomassie Brilliant Blue G-250 und 0,75 g Coomassie Brilliant Blue R-250 werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

3.4.2 55 g TCA, 65 ml Eisessig, 180 ml Methanol und 25 ml Lösung 3.4.1 werden mit destilliertem Wasser auf 1 Liter verdünnt.

4. Verfahren

4.1 Proteinextraktion

Die einzelnen Samen werden unter Verwendung eines Hammers oder einer anderen Einrichtung zerstossen. In einem 3 ml Polypropylen-Hämolyse- oder ähnlichem Röhrchen mit einem Schraubverschluss wird der zerstossene Samen in Extraktionslösung suspendiert (3.1). Das Verhältnis Samen/Extrak- tionslösung ist 50 mg/0,75 ml. Die Proben werden 2 Stunden bei Raumtemperatur extrahiert, dabei mehrmals unter Verwendung eines Vortex-Mixers geschüttelt und anschliessend 10 Minuten in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Danach lässt man die Proben abkühlen und zentrifugiert sie bei 18 000 g 5 Minuten lang.

Je nach Geldicke und Grösse der Geltaschen kann das Volumen des entnommenen Extrakts variieren. Für gewöhnlich reichen 10 bis 25 µl aus.

4.2 Präparation des Gels

Saubere und trockene Gel-Kassetten werden gemäss der Anleitung der verwendeten Ausrüstung zusammengebaut. Wird zur Versiegelung der Kassetten Klebeband verwendet, so ist anzuraten, die Kassetten zumindest einen Tag vor der Verwendung zusammenzubauen, damit das Klebeband 'altern' und besser haften kann.

4.2.1 Trenngel (10% Acrylamid, pH 8,8)

Um zwei Gele im Format von 180 x 160 x 1,5 mm anzufertigen, wird folgende Mischung hergestellt:

20 ml Acrylamid-Stammlösung (3.3.5)
26 ml Bisacrylamid-Stammlösung (3.3.6)
30 ml Trenngelpuffer (3.3.1).

Die Temperatur sollte 4 °C betragen. Die Mischung wird 10 Minuten lang in einer 100 ml Buchner-Flasche entgast. Alsdann wird hinzufügt:

2 ml APS-Lösung (3.3.4)
0,8 ml SDS-Lösung (3.3.3)
40 µl TEMED.

Dann werden die Gele sorgfältig gegossen, wobei die Bildung von Luftbläschen vermieden wird.

Die Gelkassetten werden nicht ganz gefüllt, damit noch Platz (3-4 cm) für das Sammelgel bleibt. Dann wird mittels einer Spritze sorgfältig n-Butanol (oder destilliertes Wasser) auf die Gel-Oberfläche aufgetragen. Ist die Polymerisierung (nach etwa 30 Minuten) beendet, wird die Gel-Oberfläche sorgfältig mit destilliertem Wasser abgespült und mit Filterpapier getrocknet.

4.2.2 Sammelgel (3,5% Acrylamid, pH 6.8)

In einer 50 ml Buchner-Flasche werden vermischt und entgast:

1,35 ml Acrylamid-Stammlösung (3.3.6)
3,17 ml Bisacrylamid-Stammlösung (3.3.6)
2,50 ml Sammelgelpuffer (3.3.2) und
12,30 ml destilliertes Wasser.

Dann wird folgendes hinzugefügt:

0,875 ml APS-Lösung (3.3.4)
0,233 ml SDS-Lösung (3.3.3)
17,5 µl TEMED.

Die Sammelgele werden sofort auf die Trenngele gegossen. Die Probenkämme zur Bildung der Geltaschen werden unter Vermeidung von Luftbläschen in die Sammelgele eingetaucht. Man lässt die Gele 2 Stunden aushärten. Dann werden die Probenkämme entfernt und die Geltaschen mit Elektrophoresepuffer (3.2) ausgespüllt.

4.3 Elektrophorese

Die Elektrophoresekammer wird mit dem passenden auf 15 °C abgekühlten Volumen des Elektrophorese- puffers (3.2) gefüllt. Die Proteinextrakte (4.1.1 oder 4.1.2) werden in die Geltaschen gefüllt und die Elektrophorese wird bei konstantem Strom von 8 mA/cm^2 Gelquerschnitt durchgeführt. Ist der Pyronin G-Marker durch das Sammelgel gewandert, wird die Stromstärke auf 16 mA/cm^2 Gelquerschnitt (bis maximal 300 V) erhöht. Die Temperatur sollte bei 15 °C gehalten werden. Erreicht der Pyronin G-Marker das untere Ende des Trenngels, wird die Elektrophorese abgestoppt.

4.4 Fixierung und Färbung

Die Gelkassetten werden aus der Elektrophoresekammer genommen und geöffnet. Die Gele werden in 250 ml 15% (w/v) Trichloressigsäure mindestens 30 Minuten lang fixiert, mit destilliertem Wasser abgespült und über Nacht in 250 ml Farblösung (3.4.2) bei Raumtemperatur gefärbt. Entfärben ist gewöhnlich nicht nötig. Die Gele sollten aber in destilliertem Wasser gewaschen werden, bevor sie in versiegelten Polyäthylen-Beuteln aufbewahrt werden.

Andere Färbungen können verwendet werden (wie z. B. Coomassie Brillant Blue G oder gleichwertig, gelöst nur in TCA). Das Kriterium für die Qualitätsendkontrolle besteht sowohl für die Gelherstellung als auch für die Gelfärbung darin, die vorgeschlagenen Beispielssorten in jeder Gel- partie zu prüfen. Die Trennung der vorgeschlagenen Banden und ihre relativen elektrophoretischen Mobilitäten (Molekulargewichte) müssen eindeutig sein, damit die Verfahren als zufriedenstellend beurteilt werden.

Erkennung von Hordein-Allelen

Die Bandenmuster in den Tabellen für B-, C- und D-Hordeine sind schematisch dargestellt und Unterschiede in der Intensität wurden in der Darstellung ausser acht gelassen.

B-, C- und D-Hordeine: Nomenklatur der einzelnen Banden und Erkennung der entsprechenden Allele (SDS-PAGE)

Merkmal 30: **Locus Hor-3** **D-Hordeine**

Beispielsorte (Atem)	Note 1	2	3	4	5
32					--
32.5				--	
33		--			
34	--	--			
35			--		

Merkmal 31: **Locus Hor-1** **C-Hordeine**

Beispielsorte (Atem)	Note 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
60							--								60
61								--							61
61.5					--								--		61.5
62	--	--	--												62
64										--					64
65	--	--	--	--		--		--				--		--	65
66			--												66
66.5				--	--					--					66.5
67											--				67
67.5							--							--	67.5
68	--	--	--	--				--				--	--		68
68.5							--								68.5
69									--			--			69
70												--			70
71				--	--						--		--		71
72									--						72
73								--							73

Merkmal 32: **Locus Hor-2** **B-Hordeine**

Beispielssorte (Atem)	Note																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
75				--										--	--		--			--	
76										--											
78						--		--					--	--	--		--				
79	--	--	--	--		--		--		--	--	--		--	--		--			--	--
81														--	--	--	--		--		
82				--					--									--			
83															--		--			--	
84						--										--					--
86	--	--			--			--		--	--				--		--				
87				--																	
88	--	--	--		--				--	--					--	--		--			
89											--		--	--						--	
90							--									--					
91		--	--	--			--	--	--											--	
92			--						--		--		--								--
94							--								--						
95		--	--			--		--			--	--			--						
97		--	--	--	--																
100	--	--					--	--		--					--			--	--		
101		--	--		--	--			--		--	--	--	--		--					

Acid-PAGE-Methode für die Analyse von B- und C-Hordeinen von Hordeum vulgare

Sind nur B- und C-Hordeine von Interesse, kann Acid-PAGE verwendet werden. Die folgende Methode ist die Referenz-Standardmethode, die die Internationale Vereinigung für Saatgutprüfung (ISTA) empfiehlt.

1. Geräte und Ausrüstung

Verschiedene Modelle vertikaler Elektrophorese-Systeme wurden mit Erfolg verwendet, so u. a. Systeme von Biometra, Bio-Rad, Desaga und Pharmacia-LKB. Die verwendete Energiequelle sollte sowohl eine konstante Stromstärke als auch eine konstante Spannung liefern.

2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sollten mindestens Analysenreinheit aufweisen.

Acrylamid (Spezialqualität für Elektrophorese-Zwecke)
Bisacrylamid (Spezialqualität für Elektrophorese-Zwecke)
Harnstoff
Eisessig
Glycin

Eisensulfat
Ascorbinsäure
Wasserstoffsuperoxid
Monothioglycerol
Pyronin G
Trichloressigsäure (TCA)
Methanol
2-Chlorethanol
Coomassie Brilliant Blue R-250 (oder gleichwertig)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (oder gleichwertig)

3. Lösungen

3.1 Extraktionslösung

Pyronin G (0,05%) (w/v) in 2-Chlorethanol (20%) v/v, welches Harnstoff (18% w/v) und Monothioglycerol (1% v/v) enthält (kalt aufbewahren oder frisch zubereiten).

3.2 Elektrophoresepuffer

Eisessig (4 ml) und Glycin (0,4g) werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter verdünnt; kalt aufbewahren.

3.3 Trenngelpuffer

Eisessig (20 ml) und Glycin (1,0 g) werden in destilliertem Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt; kalt aufbewahren.

3.4 Farblösungen

3.4.1 0,25 g Coomassie Brilliant Blue G-250 und 0,75 g Coomassie Brilliant Blue R-250 in 100 ml Wasser

3.4.2 55 g TCA, 65 ml Eisessig, 180 ml Methanol und 25 ml Lösung 3.4.1 werden in destilliertem Wasser auf 1 Liter verdünnt.

4. Verfahren

4.1 Proteinextraktion

Die einzelnen Samen werden unter Verwendung einer Zange oder eines anderen Instruments zerstossen und in ein 1,5 ml Polypropylen-Zentrifugen-Röhrchen oder in Mikro-Titrierplatten gegeben, 0,3 ml Extraktionslösung (3.1) wird hinzugefügt, und die Röhrchen oder Platten werden über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Wenn nötig, werden die Röhrchen bei 18 000xg zentrifugiert, und der Ueberstand wird für die Elektrophorese verwendet.

4.2 Präparation des Gels

Saubere und trockene Gel-Kassetten werden gemäss der Anleitung der verwendeten Ausrüstung zusammengebaut. Eine Behandlung der Glasplatten mit Silicon vor dem Zusammenbau kann die spätere Entfernung des Gels erleichtern. Die Gelkassetten können eine Trägerfolie enthalten (z. B. 'Gel Bond PAG', FMC Corporation). Hierdurch wird das Gel während der folgenden Arbeitsabläufe gestützt. Um 100 ml Gelmedium vorzubereiten, wird bei 4 °C ein Gelpuffer (3.3) (etwa 60 ml) verwendet und folgendes hinzugefügt: Acrylamid (10g), Bisacrylamid (0,4g), Urea (6g), Ascorbinsäure (0,1g), Eisensulfat (0,005g). Die Lösung wird gerührt und mit einer 4 °C kalten Trenngelpuffer (3.3) auf 100 ml aufgefüllt. Eine frisch vorbereitete Wasserstoffsuperoxidlösung von 0,6% (v/v) (0,35 ml pro 100 ml Gelmedium) wird hinzugefügt, schnell gemischt, und das Gel wird gegossen. Ein 'Probenkamm' aus Acrylic wird zur Bildung von Geltaschen im Gel oben in der Kassette eingetaucht. Die Polymerisierung erfolgt bei Raumtemperatur und sollte in 5 bis 15 Minuten abgeschlossen sein. Anderenfalls könnte es notwendig sein, das Volumen des hinzugefügten Wasserstoffsuperoxids anzupassen. Die Gelmischung sollte in der Kassette überlaufen ('over-fill') oder mit Wasser bedeckt sein, um eine zufriedenstellende Polymerisierung der Gel-Oberfläche zu gestatten.

4.3. Elektrophorese

Der Probenkamm aus Acrylic wird aus dem Gel entfernt, und die Proben-Geltaschen werden mit Elektrophoresepuffer (3.2) gewaschen. Die Gelkammer wird (je nach verwendeter Ausrüstung) mit einem geeigneten Volumen des Puffers (3.2) gefüllt. Proben (10-20 ul) werden in die Geltaschen gefüllt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingebracht, wobei sicherzustellen ist, dass die Proben-Geltaschen ganz gefüllt sind. Die Temperatur der unteren Pufferkammer ist auf 15 °C zu halten. Die Elektrophorese erfolgt bei konstantem Strom von nicht mehr als 60V/cm2 Gelquerschnitt (was einer Stromstärke von 500V für zwei Gele von 16 cm Breite und 0,15 cm Dicke entspricht) und für die doppelte Zeitspanne die nötig ist, damit der Pyrin G Marker bis zum Gelende wandert. Es sei daran erinnert, dass die Anode (positive Elektrode) bei diesem System der Ausgangspunkt (Oberfläche des Gels) ist.

4.4 Fixierung und Färbung

Die Gelkassetten werden aus der Elektrophoresekammer genommen und geöffnet. Die Gele werden in einen Plastikkasten mit 200 ml Farblösung (3.4.2) gelegt und über Nacht bei Raumtemperatur gefärbt. Sofern Entfärben notwendig ist, werden die Gele bei Raumtemperatur etwa 2 bis 3 Stunden in Wasser gelegt. Alsdann können die Gele getrocknet und bei 4 °C in versiegelten PolyäthylenBeuteln aufbewahrt werden.

Es sei erwähnt, dass auch andere Verfahren - wie die Verwendung von höheren Temperaturen oder von TCA- und Coomassie Brilliant Blue G-Mischungen - eine zufriedenstellende Färbung der Gele ermöglichen. Das Kriterium für die Qualitätsendkontrolle besteht sowohl für die Gelherstellung als auch für die Gelfärbung darin, die vorgeschlagenen Beispielssorten in jeder Gelpartie zu prüfen. Die Trennung der vorgeschlagenen Banden und ihre relativen elektrophoretischen Mobilitäten (Molekulargewichte) müssen deutlich und korrekt sein, damit die Verfahren als zufriedenstellend beurteilt werden.

Ausprägungsstufen der Allele der Beispielssorten nach der Acid-PAGE Methode

Die nachstehende Tabelle gibt die REM-Werte der wichtigsten vorhandenen Banden der B- und C-Hordein-Allele der Beispielssorten aus der Merkmalstabelle nach der Acid-PAGE Methode wieder. Beim Vergleich der Acid-PAGE- mit der SDS-PAGE-Methode sollte zur Kenntnis genommen werden, dass die Beispielssorten und Noten für die einzelnen Ausprägungsstufen in beiden Methoden identisch sind.

Merkmal	Ausprägungsstufe	Beispielssorte	Note
31. (+) C-Hordein-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in Locus Hor-1	Banden 27+30+32+37+39	Atem	1
	Banden 27+30+32+34+37+39	Regatta	2
	Banden 27+30+32+37	Pirate	3
	Banden 32+37+41	Athos	4
	Banden 27+30+32+37+39+41	Norka	5
	Banden 32+37+38	Birka	6
	Banden 35+38	Pamela	7
	Banden 32+37+39+41	Igri	8
	Banden 38+41+42	Goelette	9
	Banden 30+32+37	Catinka	10
	Banden 34+37	Ombelle	11
	Banden 34+39+41+42	Albacete	12
	Banden 31+34+37+38+41	Borwina	13
	Banden 32+37+41+43	Kendo	14

Merkmal	Ausprägungsstufe	Beispielssorte	Note
32. (+) B-Hordein-Zusammensetzung: Allel-Ausprägung in Locus Hor-2	Banden 71+79+83+86+94+100	Atem	1
	Banden 71+82+89+100	Aramir	2
	Banden 76+82+83+86+100	Valerie	3
	Banden 66+71+76+86+93+100	Carina	4
	Banden 71+78+79+90+94	Piroline	5
	Banden 76+81+94	Catinka	6
	Banden 71+72+75+82+85+86+100	Regatta	7
	Banden 72+76+79+90+94	Igri	8
	Banden 71+76+79+86	Grit	9
	Banden 71+78+83+86+94+100	Birka	10
	Banden 71+79+83+86+90	Sigma	11
	Banden 71+76+79	Midas	12
	Banden 71+89	Criter	13
	Banden 79+83+86+90	Ditta	14
	Banden 67+69+71+72+78+79+85+89+94	Caresse	15
	Banden 71+79+83+88+94	Reseda	16
	Banden 69+76+79+83+93	Baronesse	17
	Banden 71+72+79+85+86+91+100	Albacete	18
	Banden 72+76+100	Digger	19
	Banden 61+71+76+79+83	Camargue	20
	Banden 76+81+94+100	Marko	21

Erkennung von Hordein-Allelen

B- und C- Hordeine: Nomenklatur der individuellen Banden und Erkennung der entsprechenden Allele: Acid-PAGE

C-Hordeine

	Beispiels-sorte (Atem)	Note														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
25																25
27	--	--	--	--		--										27
30	--	--	--	--		--					--					30
31														--		31
32	--	--	--	--	--	--	--		--		--				--	32
34			--									--	--	--		34
35								--								35
37	--	--	--	--	--	--	--		--		--	--		--	--	37
38							--	--		--				--		38
39	--	--	--			--			--				--			39
41					--	--			--	--			--	--	--	41
42										--			--			42
43															--	43
		10	10A	1	11	17	6	19	2	4	5	18	14	8	3	

B Hordeine

	Beispielsorte (Atem)									Note											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
61																				--	
66				--																	
67															--						
69															--		--				
71	--	--	--		--	--		--		--	--	--	--		--	--		--		--	
72							--	--							--			--	--		
75							--														
76			--	--		--		--	--			--					--		--	--	--
78					--					--					--						
79	--	--			--			--	--		--	--		--	--	--	--	--		--	
81						--															--
82			--	--			--														
83	--	--								--	--			--		--	--			--	
85							--								--			--			
86	--	--		--	--		--		--	--	--			--				--			
88																--					
89		--											--		--						
90					--			--			--			--							
91																		--			
93				--													--				
94	--	--			--	--		--		--					--	--					--
100	--	--	--	--	--		--			--								--	--		--
104																					
	3	4	13	14	-	9	1	7	6	-	-	11	16	-	18	-	19	8	15	12	10

[End of document/
Fin du document/
Ende des Dokuments]