

**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 UNTERSCHIEDBARKEIT, HOMOGENITAET UND BESTAENDIGKEIT

MAIZE
MAIS
MAIS
(Zea mays L.)

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]

<u>TABLE OF CONTENTS</u>	<u>PAGE</u>
I. Subject of these Guidelines	3
II. Material Required	3
III. Conduct of Tests	3
IV. Methods and Observations	4
V. Grouping of Varieties	5
VI. Characteristics and Symbols	5
VII. Table of Characteristics	13
VIII. Explanations on the Table of Characteristics	21
IX. Literature	24
X. Technical Questionnaire	25
Annex	

[français]

<u>SOMMAIRE</u>	<u>PAGE</u>
I. Objet de ces principes directeurs	6
II. Matériel requis	6
III. Conduite de l'examen	6
IV. Méthodes et observations	7
V. Groupement des variétés	8
VI. Caractères et symboles	8
VII. Tableau des caractères	13
VIII. Explications du tableau des caractères	21
IX. Littérature	24
X. Questionnaire technique	25
Annexe	

[deutsch]

<u>INHALT</u>	<u>SEITE</u>
I. Anwendung dieser Richtlinien	10
II. Anforderungen an das Vermehrungsmaterial	10
III. Durchführung der Prüfung	10
IV. Methoden und Erfassungen	11
V. Gruppierung der Sorten	12
VI. Merkmale und Symbole	12
VII. Merkmalstabelle	13
VIII. Erklärungen zu der Merkmalstabelle	21
IX. Literatur	24
X. Technischer Fragebogen	25
Anlage	

[English]

I. Subject of these Guidelines

These Test Guidelines apply to the following types of varieties of Zea mays L.: inbred lines, hybrids and open-pollinated varieties, excluding ornamental varieties.

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 more samples should be:

1,500 grains for inbred lines
1 kg for hybrid and open-pollinated varieties

In the case of hybrid varieties, an additional 1,500 grains of each component (e.g. inbred line, single-cross hybrid) should be submitted. 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. 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 be conducted in at least one place. Depending on the range of earliness in a given country, two places may be preferable.

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. As a minimum, each test at each testing place should include per growing period:

40 plants for inbred lines and single-cross hybrids
80 plants for other hybrids and open-pollinated varieties

In each testing place, the test should be divided between two or more replicates. 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, e.g. ear-row tests in the event of the competent authority accepting the results carried out by the applicant before the date of application.

5. In the event of the formula of hybrids being checked with the help of electrophoresis of enzymes, a test should be carried out on four coleoptiles from each inbred line. In case of doubt, 16 additional coleoptiles should be analysed. For single-cross hybrids two coleoptiles should be analysed and for three-way cross hybrids six coleoptiles. In case of doubt, additional coleoptiles should be analysed.

6. If enzyme electrophoresis is used for testing distinctness, at least 20 coleoptiles should be analysed.

IV. Methods and Observations

1. The characteristics described in Chapter VII should be used for the testing of distinctness of inbred lines, hybrids and open-pollinated varieties.

2. However, to assess distinctness of hybrids, a prescreening system on the basis of the parental lines and the formula may be established according to the following recommendations:

- (i) description of parental lines according to the Test Guidelines;
- (ii) check of the originality of those parental lines in comparison with the reference collection, based on the characteristics in Chapter VII in order to screen the closest inbred lines;
- (iii) check of the originality of the hybrid formula in comparison with those of the hybrids in common knowledge, taking into account the closest inbred lines;
- (iv) assessment of the distinctness at the hybrid level of varieties with a similar formula.

3. All observations for the assessment of distinctness and uniformity should be made on at least 40 plants or parts of plants (excluding outcrossed plants in inbred lines and excluding plants obviously resulting from the selfing of a parent line in single-cross hybrids).

4. All observations on the ear should be made on the upper well-developed ear.

5. For the assessment of uniformity of inbred lines and single-cross hybrids a population standard of 3 per cent with an acceptance probability of 95 per cent should be applied. In the case of a sample of 40 plants, the maximum number of off-types allowed would be 3. In addition, the same population standard and acceptance probability should apply to clear cases of out-crossed plants in inbred lines as well as plants obviously resulting from the selfing of a parent line in single-cross hybrids (clear difference in plant height, size of ear or earliness as well as proof through electrophoresis of enzymes). For those countries which foresee difficulties with too large a change to adjust their system to the newly adopted rules, a possible interim period of two years from the adoption of the Test Guidelines would be acceptable before they change to the new rules. For three-way cross hybrids, double-cross hybrids and open-pollinated varieties, the variability within the variety should not exceed the variability of comparable varieties already known.

6. In three-way cross hybrids and double-cross hybrids, characteristics may segregate with the effect that several states of expression occur side by side in a variety. Certain characteristics which from experience are known to give rise to such segregations in three-way cross hybrids and double-cross hybrids are identified with an "S."

7. If enzyme electrophoresis is used for testing distinctness, the same population standard and the same acceptance probability as for other characteristics should be applied. However, a sequential analysis approach could be applied to reduce the workload. All inbred lines should be considered out-crosses where two or more loci are heterozygous with one allele of the locus of the inbred line (e.g. AX). All cases where one locus is heterozygous or where two foreign alleles are present should be considered off-types.

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) Tassel: time of anthesis (characteristic 7)
- (ii) Ear: anthocyanin coloration of silks (characteristic 16)
- (iii) Plant: length (characteristic 22.1/22.2)
- (iv) Ear: type of grain (characteristic 30)
- (v) Ear: anthocyanin coloration of glumes of cob (characteristic 33)

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.

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.

(S) See explanations on possible segregation in Chapter IV, paragraph 6.

* * * * *

[français]

I. Objet de ces principes directeurs

Ces principes directeurs d'examen s'appliquent aux catégories ci-après de variétés de Zea mays L. : lignées endogames, hybrides et variétés à fécondation libre, à l'exclusion des variétés ornementales.

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 :

1 500 grains pour les lignées endogames
1 kg pour les variétés hybrides et les variétés à
fécondation libre

Dans le cas de variétés hybrides, 1 500 grains supplémentaires doivent être fournis pour chaque composant (lignée endogame, hybride simple). 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. Le matériel végétal ne doit pas avoir subi de traitement, sauf autorisation ou demande expresse des autorités compétentes. S'il a été traité, le traitement appliqué doit être indiqué en détail.

III. Conduite de l'examen

1. La durée minimale d'examen est en règle générale de deux cycles de végétation similaires.

2. Les essais doivent être conduits en un lieu au moins. En fonction des écarts de précocité dans un pays déterminé, il peut être préférable de réaliser ces essais en deux endroits.

3. Les essais en plein 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 période de végétation. Chaque essai réalisé en un lieu doit porter au minimum, par période de végétation, sur un nombre de plantes établi comme suit :

40 plantes pour les lignées endogames et les hybrides simples
80 plantes pour les autres hybrides et les variétés à
fécondation libre

A chaque lieu d'examen, les plantes doivent être réparties en deux ou plusieurs répétitions. 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. Il est possible d'établir des essais supplémentaires pour certaines déterminations (par exemple, des essais avec épis-lignes si l'autorité compétente accepte les résultats obtenus par le demandeur avant la date de la demande).

5. Dans l'éventualité d'une vérification de la formule des hybrides à l'aide de l'électrophorèse des enzymes, le test doit être effectué sur quatre coléoptiles de chaque lignée parentale. En cas de doute, 16 coléoptiles supplémentaires doivent être analysés. Pour les hybrides simples, il faut analyser deux coléoptiles et pour les hybrides trois voies, six coléoptiles. En cas de doute, des coléoptiles supplémentaires doivent être analysés.

6. Lorsque l'électrophorèse des enzymes est utilisée pour l'examen de la distinction, au moins 20 coléoptiles doivent être analysés.

IV. Méthodes et observations

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

2. Cependant, pour établir la distinction des hybrides, il est possible d'établir un système de criblage préalable sur la base des lignées parentales et de la formule, en observant les recommandations suivantes :

- i) description des lignées parentales conformément aux principes directeurs d'examen;
- ii) vérification de l'originalité de ces lignées parentales par rapport à la collection de référence, sur la base des caractères décrits au chapitre VII afin de réaliser un criblage des lignées endogames les plus proches;
- iii) vérification de l'originalité de la formule des hybrides par rapport à celle des hybrides notoirement connus, compte tenu des lignées endogames les plus proches;
- iv) établissement de la distinction au niveau des hybrides pour les variétés à formule semblable.

3. Toutes les observations pour la détermination de la distinction et de la homogénéité doivent porter sur au minimum 40 plantes ou parties de plantes (à l'exclusion des plantes manifestement issues d'allofécondation dans le cas d'une lignée endogame et des plantes issues d'autofécondation dans le cas des hybrides simples).

4. Toutes les observations relatives à l'épi doivent être effectuées sur l'épi le plus élevé bien développé.

5. Pour l'évaluation de l'homogénéité des lignées endogames et des hybrides simples, une norme de population de 3 pour cent doit être appliquée, avec une probabilité d'acceptation de 95 pour cent. Pour un échantillon de 40 plantes, le nombre maximal de plantes aberrantes toléré sera 3. De plus, la même norme de population avec la même probabilité d'acceptation est appliquée aux plantes manifestement issues d'une allofécondation dans le cas d'une lignée endogame ou d'autofécondation dans le cas d'un hybride simple (cas de différence nette de hauteur de plante, de taille de l'épi ou de précocité ainsi que toute preuve basée sur l'utilisation de l'électrophorèse des enzymes). Dans le cas des pays qui entrevoient des difficultés liées à un changement trop marqué occasionné par adaptation de leur système aux règles nouvellement adoptées, une période transitoire éventuelle de deux ans à compter de l'adoption des principes directeurs est acceptable avant l'application définitive des nouvelles règles. Pour les hybrides trois voies, les hybrides doubles et les variétés à fécondation libre, la variabilité à

l'intérieur de la variété ne doit pas dépasser celle des variétés comparables déjà connues.

6. Dans les hybrides multiples, il peut arriver que des caractères ségrègent, induisant l'apparition de plusieurs niveaux d'expression au sein d'une même variété. Certains caractères qui, d'expérience, sont connus pour donner lieu à de telles disjonctions dans les hybrides multiples sont signalés au moyen de la lettre "S".

7. En cas de pratique de l'électrophorèse des enzymes pour l'examen de la distinction, il y a lieu d'appliquer les mêmes normes de population et les mêmes probabilités d'acceptation que pour les autres caractères. Il est cependant possible, pour réduire la charge de travail, de suivre une démarche analytique séquentielle. Pour les résultats issus d'une électrophorèse, tous les individus d'une lignée endogame pour lesquels deux loci ou plus sont hétérozygotes avec un allèle du locus de la lignée endogame (par exemple AX) doivent être considérés comme des plantes issues d'une allofécondation. Tous les individus pour lesquels un locus est hétérozygote ou deux allèles sont différents de celui de la lignée doivent être considérés comme des plantes aberrantes.

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) panicule : époque de floraison mâle (caractère 7)
- ii) épi : pigmentation anthocyanique des soies (caractère 16)
- iii) plante : longueur (caractère 22.1/22.2)
- iv) épi : type de grain (caractère 30)
- v) épi : pigmentation anthocyanique des glumes de la rafle (caractère 33)

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.

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.

(S) Voir les explications sur la disjonction possible au paragraphe 6 du chapitre IV.

* * * * *

[deutsch]

I. Anwendung dieser Richtlinien

Diese Richtlinien gelten für folgende Sortentypen von Zea mays L.: Inzuchtlinien, Hybriden und freiabblühende Sorten, außer Ziersorten.

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 ein oder mehreren Proben einzusendende Mindestmenge an Vermehrungsmaterial sollte betragen:

- 1 500 Körner für Inzuchtlinien
- 1 kg für Hybriden und freiabblühende Sorten

Im Fall von Hybridsorten sollten außerdem von jeder Komponente (z. B. Inzuchtlinie, Einfachhybride) 1 500 Körner eingereicht werden. 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. 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 mindestens an einem Ort durchgeführt werden. Je nach Reifezeit in einem bestimmten Land könnten zwei Orte empfehlenswert sein.

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 pro Prüfort umfassen:

- 40 Pflanzen für Inzuchtlinien und Einfachhybriden
- 80 Pflanzen für andere Hybriden oder freiabblühende Sorten.

An jedem Prüfort sollte die Prüfung auf zwei oder mehr Wiederholungen verteilt 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, z. B. Kolbenreihenprüfungen, sofern die zuständige Behörde Ergebnisse aus vom Anmelder vor dem Datum der Anmeldung durchgeführten Prüfungen annimmt.

5. Im Fall der Prüfung der Hybridformel mit Hilfe der Elektrophorese von Enzymen sollte eine Prüfung an vier Keimscheiden von Inzuchtlinien durchgeführt werden. In Zweifelsfällen sollten 16 zusätzliche Keimscheiden analysiert werden. Von Einfachhybriden sollten zwei Keimscheiden analysiert werden, von Dreiweghybriden sechs. In Zweifelsfällen sollten zusätzliche Keimscheiden analysiert werden.

6. Im Falle, daß Enzymelektrophorese für die Prüfung auf Unterscheidbarkeit verwendet wird, sollten mindestens 20 Keimscheiden untersucht werden.

IV. Methoden und Erfassungen

1. Die in Kapitel VII beschriebenen Merkmale sollten für die Prüfung auf Unterscheidbarkeit von Inzuchtlinien, Hybriden und freiabblühenden Sorten verwendet werden.

2. Zur Bestimmung der Unterscheidbarkeit von Hybriden kann jedoch ein Vorprüfungssystem auf Grundlage der Elternlinien und der Formel gemäß den folgenden Empfehlungen eingerichtet werden:

(i) Beschreibung der Elterlinien gemäß den Prüfungsrichtlinien;

(ii) Prüfung der Eigenständigkeit der Elterlinien im Vergleich zu der Vergleichssammlung auf der Grundlage der in Kapitel VII beschriebenen Merkmale, um die ähnlichsten Inzuchtlinien zu ermitteln;

(iii) Prüfung der Eigenständigkeit der Hybridformel im Vergleich mit denen der allgemein bekannten Hybriden unter Berücksichtigung der ähnlichsten Inzuchtlinien;

(iv) Bestimmung der Unterscheidbarkeit an der Hybride bei Sorten mit ähnlicher Formel.

3. Alle Erfassungen zur Bestimmung der Unterscheidbarkeit und Homogenität sollten an mindestens 40 Pflanzen oder Pflanzenteilen erfolgen (bei Inzuchtlinien ohne Pflanzen, die durch Fremdbestäubung entstanden sind, sowie bei Einfachhybriden ohne Pflanzen, die offensichtlich einer Selbstung der Mutterlinie entstammen).

4. Alle Erfassungen am Kolben sollten am obersten gut entwickelten Kolben erfolgen.

5. Für die Bestimmung der Homogenität von Inzuchtlinien und Einfachhybriden sollte ein Populationsstandard von 3 Prozent mit einer Akzeptanzwahrscheinlichkeit von 95 Prozent verwendet werden. Bei einer Probengröße von 40 Pflanzen ist die höchstzulässige Anzahl Abweicher 3. Zusätzlich gelten derselbe Populationsstandard und dieselbe Akzeptanzwahrscheinlichkeit für offensichtlich aus einer Fremdbestäubung herrührende Pflanzen in Inzuchtlinien sowie für Pflanzen in einer Einfachhybride, die offensichtlich einer Selbstung der Mutterlinie entstammen (deutlicher Unterschied in Pflanzenhöhe, Kolbengröße oder Reifezeitpunkt, sowie Nachweis durch Elektrophorese von Enzymen). Für Staaten, die bei einer Anpassung ihres Systems an diese Regeln Schwierigkeiten voraussehen, besteht die Möglichkeit einer Übergangszeit von zwei Jahren für die Annahme der Prüfungsrichtlinien, bevor sie die neuen Regeln übernehmen. Für Dreiweghybriden, Doppelhybriden und freiabblühende Sorten sollte die Variabilität innerhalb der Sorte nicht die Variabilität vergleichbarer bekannter Sorten übersteigen.

6. In Mehrfachhybriden können Merkmale aufspalten, mit der Wirkung, dass in einer Sorte mehrere Ausprägungsstufen nebeneinander auftreten. Einige Merkmale, die erfahrungsgemäß in Mehrfachhybriden zu solchen Aufspaltungen führen können, sind mit dem Zeichen "(S)" versehen.

7. Bei Verwendung der Elektrophorese von Enzymen für die Prüfung der Unterscheidbarkeit sollten die gleichen Populationsstandards und die gleiche Akzeptanzwahrscheinlichkeit wie für andere Merkmale verwendet werden. Um den Arbeitsaufwand zu reduzieren, kann jedoch eine sequentielle Analyse durchgeführt werden. Bei der Auswertung von Inzuchtlinien sollten die Fälle, bei denen in zwei oder mehr Loci Heterozygote mit dem Allel der Inzuchtlinie nachweisbar sind (= AX), als Fremdbestäubung betrachtet werden. Alle Fälle, bei denen nur ein Locus heterozygot ist oder zwei fremde Allele aufweist, sollten als Abweicher betrachtet werden.

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) Rispe: Zeitpunkt der männlichen Blüte (Merkmal 7)
- ii) Kolben: Anthocyanfärbung der Narbenfäden (Merkmal 16)
- iii) Pflanze: Länge (Merkmal 22.1/22.2)
- iv) Kolben: Korntyp (Merkmal 30)
- v) Kolben: Anthocyanfärbung der Spelzen der Spindel (Merkmal 33)

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-Arbeits Sprachen aufgeführt sind, verwendet werden.

2. Hinter den Ausprägungsstufen für jedes Merkmal stehen Noten (von 1 bis 9) für eine elektronische Datenverarbeitung.

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.

(S) Siehe Erklärungen zu möglichen Aufspaltungen in Kapitel IV, Absatz 6.

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. First leaf: anthocyanin coloration of sheath Première feuille: pigmentation anthocyanique de la gaine Primärblatt: Anthocyanfärbung der Blattscheide	12 (S)	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering		1
		weak	faible	gering	F113	3
		medium	moyenne	mittel	F2	5
		strong	forte	stark	F244	7
		very strong	très forte	sehr stark		9
2. First leaf: shape of tip (+) Première feuille: forme du sommet Primärblatt: Form der Spitze	14	pointed	pointu	spitz	W117	1
		pointed to round	pointu à arrondi	spitz bis abgerundet		2
		round	arrondi	abgerundet	F2	3
		round to spatulate	arrondi à spatulé	abgerundet bis stumpf		4
		spatulate	spatulé	stumpf	EP1	5
3. Leaf: angle between blade and stem (on leaf just above upper ear) (+) Feuille: angle entre le limbe et la tige (sur la feuille juste au-dessus de l'épi le plus haut) Blatt: Winkel zwischen Blattspreite und Stengel (am Blatt unmittelbar oberhalb des obersten Kolbens)	61	very small	très petit	sehr klein		1
		small	petit	klein		3
		medium	moyen	mittel	W117	5
		large	grand	gross	F252	7
		very large	très grand	sehr gross		9
4. Leaf: attitude of blade (as for 3) (+) Feuille: port du limbe (comme pour 3) Blatt: Haltung der Spreite (wie unter 3)	61	straight	droit	gerade	F252	1
		slightly recurved	légèrement incurvé	gering gebogen	F1444	3
		recurved	incurvé	gebogen	F186	5
		strongly recurved	fortement incurvé	stark gebogen	CM7	7
		very strongly recurved	très fortement incurvé	sehr stark gebogen		9
5. Stem: degree of zig-zag Tige: degré du zig-zag Stengel: Zickzackausprägung	65	absent or very slight	nul ou très faible	fehlend oder sehr mässig	Eva, Ivana	1
		slight	faible	mässig	Sabrina	2
		strong	fort	deutlich	Dea, F252	3

	Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
6.	Stem: anthocyanin coloration of brace roots Tige: pigmentation anthocyanique des racines d'ancrage Stengel: Anthocyanfärbung der Stelzwurzeln	65-75 (S)	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	W182E	1
			weak	faible	gering	F7	3
			medium	moyenne	mittel	F2	5
			strong	forte	stark	A632	7
			very strong	très forte	sehr stark		9
(*) 7.	Tassel: time of anthesis (on middle third of main axis, 50% of plants) Panicule: époque de floraison mâle (au tiers moyen du maître brin, 50% des plantes) Rispe: Zeitpunkt der männlichen Blüte (im mittleren Drittel der Mittelachse, 50% der Pflanzen)	65	very early	très précoce	sehr früh		1
			very early to early	très précoce à précoce	sehr früh bis früh	KW1069	2
			early	précoce	früh	F7	3
			early to medium	précoce à moyenne	früh bis mittel	F259	4
			medium	moyenne	mittel	W117	5
			medium to late	moyenne à tardive	mittel bis spät	A632	6
			late	tardive	spät	M017	7
late to very late	tardive à très tardive	spät bis sehr spät	B73	8			
	very late	très tardive	sehr spät		9		
8. (+)	Tassel: anthocyanin coloration at base of glume (in middle third of main axis) Panicule: bourrelet (anneau anthocyanique) juste en-dessous de la glume (au tiers moyen du brin maître) Rispe: Anthocyanfärbung an der Basis der Hüllspelze (im mittleren Drittel der Mittelachse)	65 (S)	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	W117	1
			weak	faible	gering	F2	3
			medium	moyenne	mittel	F107	5
			strong	forte	stark	EP1	7
			very strong	très forte	sehr stark		9
9.	Tassel: anthocyanin coloration of glumes excluding base (as for 8) Panicule: pigmentation anthocyanique des glumes à l'exclusion de la base (comme pour 8) Rispe: Anthocyanfärbung der Hüllspelze ohne Basis (wie unter 8)	65 (S)	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	F16	1
			weak	faible	gering	F2	3
			medium	moyenne	mittel	EP1	5
			strong	forte	stark	W79A	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
10.	Tassel: anthocyanin coloration of anthers (as for 8; on fresh anthers)	65 (S)	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	F244	1
			weak	faible	gering	F2	3
	Panicule: pigmentation anthocyanique des anthères (comme pour 8; sur anthères fraîches)		medium	moyenne	mittel	W182E	5
			strong	forte	stark	F195	7
Rispe: Anthocyanfärbung der Antheren (wie unter 8; an frischen Antheren)		very strong	très forte	sehr stark		9	
11.	Tassel: density of spikelets (as for 8)	65	lax	lâche	locker	F16	3
			medium	moyenne	mittel	W401	5
	Panicule: densité des épillets (comme pour 8)		dense	compacte	dicht	EP1	7
	Rispe: Dichte der Aehrchen (wie unter 8)						
(*)12. (+)	Tassel: angle between main axis and lateral branches (in lower third of tassel)	65	very small	très petit	sehr klein		1
			small	petit	klein	F257	3
			medium	moyen	mittel	EP1	5
	Panicule: angle entre l'axe central et les ramifications (au tiers inférieur de la panicule)		large	grand	gross	W117	7
Rispe: Winkel zwischen der Mittelachse und den Seitenästen (im unteren Rispendrittel)		very large	très grand	sehr gross		9	
(*)13. (+)	Tassel: attitude of lateral branches (as for 12)	65 (S)	straight	droit	gerade	F257	1
			slightly recurved	légèrement incurvé	gering gebogen	A619	3
	Panicule: port des ramifications (comme pour 12)		recurved	incurvé	gebogen	CM7	5
	Rispe: Haltung der Seitenäste (wie unter 12)		strongly recurved	fortement incurvé	stark gebogen	W117	7
			very strongly recurved	très fortement incurvé	sehr stark gebogen		9
(*)14.	Tassel: number of primary lateral branches	65	absent or very few	nul ou très petit	fehlend oder sehr gering	F7	1
			few	petit	gering	F252	3
	Panicule: nombre de ramifications primaires		medium	moyen	mittel	F244	5
	Rispe: Anzahl der Seitenäste erster Ordnung		many	grand	gross		7
			very many	très grand	sehr gross		9

	Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
15.	Ear: time of silk emergence (50% of plants)	65	very early	très précoce	sehr früh		1
			very early to early	très précoce à précoce	sehr früh bis früh		2
	Epi: époque d'apparition des soies (50% des plantes)		early	précoce	früh	F7	3
	Kolben: Zeitpunkt des Erscheinens der Narbenfäden (50% der Pflanzen)		early to medium	précoce à moyenne	früh bis mittel	F259	4
	medium		moyenne	mittel	W117	5	
	medium to late		moyenne à tardive	mittel bis spät	A632	6	
	late		tardive	spät	M017	7	
	late to very late		tardive à très tardive	spät bis sehr spät	B73	8	
	very late	très tardive	sehr spät		9		
(*)16.	Ear: anthocyanin coloration of silks	65 (S)	absent	absente	fehlend	F7	1
			present	présente	vorhanden	F2	9
	Epi: pigmentation anthocyanique des soies						
	Kolben: Anthocyanfärbung der Narbenfäden						
(*)17.	Ear: intensity of anthocyanin coloration of silks	65 (S)	very weak	très faible	sehr gering	CM105	1
			weak	faible	gering	F186	3
	Epi: intensité de la pigmentation anthocyanique des soies		medium	moyenne	mittel	W401	5
	strong		forte	stark		7	
	Kolben: Intensität der Anthocyanfärbung der Narbenfäden		very strong	très forte	sehr stark		9
18.	Leaf: anthocyanin coloration of sheath (in middle of plant)	71 (S)	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	F7	1
			weak	faible	gering	F186	3
	Feuille: pigmentation anthocyanique de la gaine (au milieu de la plante)		medium	moyenne	mittel	F195	5
	strong		forte	stark	EP1	7	
	Blatt: Anthocyanfärbung der Blattscheide (in der Mitte der Pflanze)		very strong	très forte	sehr stark		9
19.	Tassel: length of main axis above <u>lowest</u> side branch	71	very short	très court	sehr kurz		1
			short	court	kurz	EP1	3
	Panicule: longueur de l'axe central au-dessus du rameau <u>inférieur</u>		medium	moyen	mittel	F244	5
	long		long	lang	F16	7	
	Rispe: Länge der Mittelachse oberhalb des <u>untersten</u> Seitenastes		very long	très long	sehr lang		9

	Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
(*)20.	Tassel: length of main 71 axis above <u>upper</u> side branch	71	very short	très court	sehr kurz		1
			short	court	kurz	EP1	3
	Panicule: longueur de l'axe central au-dessus du rameau <u>supérieur</u>	71	medium	moyen	mittel	F259	5
			long	long	lang	F16	7
Rispe: Länge der Mittel- achse oberhalb des <u>obersten</u> Seitenastes	71	very long	très long	sehr lang		9	
21.	Tassel: length of side 71 branches (as for 16)	71	very short	très court	sehr kurz	KW 1332	1
			short	court	kurz	F2	3
	Panicule: longueur des rameaux (comme pour 16)	71	medium	moyen	mittel	Rantzo	5
			long	long	lang	Diamant	7
Rispe: Länge der Seitenäste (wie unter 16)	71	very long	très long	sehr lang		9	
(*)22.1	<u>In-bred lines only:</u> Plant: length (tassel included)	75	very short	très courte	sehr kurz	F7	1
			short	courte	kurz	W117	3
	<u>Seulement lignées:</u> Plante: longueur (panicule comprise)	75	medium	moyenne	mittel	W182E	5
			long	longue	lang	M017	7
<u>Nur Inzuchtlinien:</u> Pflanze: Länge (einschliesslich Rispe)	75	very long	très longue	sehr lang		9	
(*)22.2	<u>Hybrids and open pollinated varieties only:</u> Plant: length (tassel included)	75	very short	très courte	sehr kurz	Nano-Dos	1
			short	courte	kurz	DK232	3
	<u>Seulement hybrides et variétés à fécondation libre:</u> Plante: longueur (panicule comprise)	75	medium	moyenne	mittel	Magister	5
			long	longue	lang	Cecilia	7
<u>Nur Hybriden und frei- abblühende Sorten:</u> Pflanze: Länge (einschliesslich Rispe)	75	very long	très longue	sehr lang	Alimare	9	
23.	Plant: ratio height of insertion of upper ear to plant length	75	very small	très petit	sehr klein		1
			small	petit	klein	F259	3
	Plante: hauteur d'in- sertion de l'épi par rapport à la longueur de la plante	75	medium	moyen	mittel	F522	5
			large	grand	gross	A632	7
Pflanze: Verhältnis der Ansatzhöhe des Kolbens zur Pflanzenlänge	75	very large	très grand	sehr gross		9	

	Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
24.	Leaf: width of blade (leaf of upper ear) Feuille: largeur du limbe (feuille de l'épi le plus haut) Blatt: Breite der Spreite (Blatt des obersten Kolbens)	75	very narrow	très étroit	sehr schmal		1
			narrow	étroit	schmal	F16	3
			medium	moyen	mittel	A632	5
			wide	large	breit	W182E	7
			very wide	très large	sehr breit		9
25.	Ear: length of peduncle Epi: longueur du pédoncule Kolben: Stiellänge	85	very short	très court	sehr kurz		1
			short	court	kurz	F7	3
			medium	moyen	mittel	W182E	5
			long	long	lang	F492	7
			very long	très long	sehr lang		9
(*)26.	Ear: length (without husk) Epi: longueur (sans spathes) Kolben: Länge (ohne Lieschen)	92	very short	très court	sehr kurz		1
			short	court	kurz	F2	3
			medium	moyen	mittel	A654	5
			long	long	lang	CM7	7
			very long	très long	sehr lang		9
27.	Ear: diameter (in middle) Epi: diamètre (au milieu) Kolben: Dicke (in der Kolben- mitte)	92	very small	très petit	sehr dünn		1
			small	petit	dünn	F7	3
			medium	moyen	mittel	W401	5
			large	grand	dick	B73	7
			very large	très grand	sehr dick		9
28.	Ear: shape Epi: forme Kolben: Form	92	conical	conique	konisch	F16	1
			conico- cylindrical	cylindro- conique	konisch- zylindrisch	F7	2
			cylindrical	cylindrique	zylindrisch	F66	3
29.	Ear: number of rows of grain Epi: nombre de rangs Kolben: Kornreihenzahl	92	very few	très petit	sehr gering		1
			few	petit	gering	F2	3
			medium	moyen	mittel	EP1	5
			many	grand	gross	B73	7
			very many	très grand	sehr gross		9

Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
(*)30. Ear: type of grain (in middle third of ear) Epi: type de grain (au tiers moyen de l'épi) Kolben: Korntyp (im mittleren Drittel des Kolbens)	92 (S)	flint	corné	Hartmais	F2	1
		flint-like	corné à corné-denté	hartmais-ähnlich	F252	2
		intermediate	corné-denté	Zwischentyp	C0125	3
		dent-like	corné-denté à denté	zahnmais-ähnlich	F259	4
		dent	denté	Zahnmais	W401	5
		sweet	sucré	Zuckermais	Jubilee	6
		pop	pop	Popcorn	Iowa Pop	7
(*)31. Ear: color of top of grain Epi: couleur du sommet du grain Kolben: Farbe der Kornkrone	92 (S)	white	blanc	weiss	A188	1
		yellowish white	blanc jaunâtre	gelblich weiss		2
		yellow	jaune	gelb	W401	3
		yellow orange	jaune orangé	gelborange	F2	4
		orange	orange	orange	F257	5
		red orange	rouge orangé	rotorange		6
		red	rouge	rot		7
		dark red	rouge foncé	dunkelrot		8
		blue black	noir-bleu	blauschwarz		9
32. Ear: color of dorsal side of grain Epi: couleur de la face dorsale du grain Kolben: Farbe der Kornrückseite	92 (S)	white	blanc	weiss	F481	1
		yellowish white	blanc jaunâtre	gelblich weiss	A188	2
		yellow	jaune	gelb	A654	3
		yellow orange	jaune orangé	gelborange	F2	4
		orange	orange	orange	F7	5
		red orange	rouge orangé	rotorange		6
		red	rouge	rot		7
		dark red	rouge foncé	dunkelrot		8
		blue black	noir-bleu	blauschwarz		9
(*)33. Ear: anthocyanin coloration of glumes of cob Epi: pigmentation anthocyanique des glumes de la rafle Kolben: Anthocyanfärbung der Spelzen der Spindel	93 (S)	absent	absente	fehlend	F2	1
		present	présente	vorhanden	W117	9

Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
34. Ear: intensity of anthocyanin coloration (S) of glumes of cob	93	very weak	très faible	sehr gering		1
		weak	faible	gering		3
		medium	moyenne	mittel	Dea, Prisma	5
		strong	forte	stark	Pianosa	7
Epi: intensité de la pigmentation antho- cyanique des glumes de la rafle		very strong	très forte	sehr stark	Alios	9
Kolben: Intensität der Anthocyanfärbung der Spelzen der Spindel						

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

Ad/Add./Zu 2

First leaf: shape of tip

Première feuille: forme du sommet

Primärblatt: Form der Spitze



1

pointed
pointu
spitz



2

pointed to round
pointu à arrondi
spitz bis abgerundet



3

round
arrondi
abgerundet



4

round to spatulate
arrondi à spatulé
abgerundet bis stumpf



5

spatulate
spatulé
stumpf

Ad/Add./Zu 3 + 12

Leaf and tassel: angle

Feuille et panicule: angle

Blatt und Rispe: Winkel



1

very small
très petit
sehr klein
($< 5^\circ$)



3

small
petit
klein
($\pm 25^\circ$)



5

medium
moyen
mittel
($\pm 50^\circ$)



7

large
grand
gross
($\pm 75^\circ$)



9

very large
très grand
sehr gross
($> 90^\circ$)

Ad/Add./Zu 4 + 13

Leaf and tassel: attitude of blade and of lateral branches

Feuille et panicule: port du limbe et des ramifications

Blatt und Rispe: Haltung der Spreite und der Seitenäste



1

straight
droit
gerade



3

slightly recurved
légèrement incurvé
gering gebogen



5

recurved
incurvé
gebogen



7

strongly recurved
fortement incurvé
stark gebogen



9

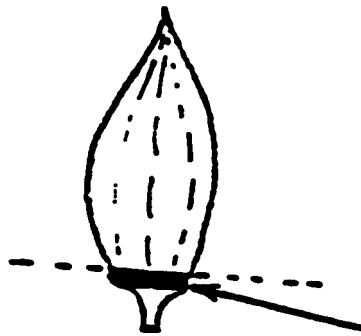
very strongly recurved
très fortement incurvé
sehr stark gebogen

Ad/Add./Zu 8

Tassel: anthocyanin coloration at base of glume

Panicule: bourrelet (anneau anthocyanique) juste en-dessous de la glume

Rispe: Anthocyanfärbung an der Basis der Hüllspelze



Decimal Code for the Growth Stages*
Code décimal pour les stades de croissance*
Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien*

CODE	GENERAL DESCRIPTION	DESCRIPTION GENERALE	ALLGEMEINE BESCHREIBUNG
00	<u>Germination</u> Dry seed	<u>Germination</u> Grain sec	<u>Keimung</u> Trockene Saat
12	<u>Seedling growth</u> 2 leaves unfolded	<u>Croissance de la plantule</u> 2 feuilles étalées	<u>Wachstum des Keimlings</u> 2 Blätter entfaltet
14	4 leaves unfolded	4 feuilles étalées	4 Blätter entfaltet
	<u>Tillering</u>	<u>Tallage</u>	<u>Bestockung</u>
	<u>Stem elongation</u>	<u>Elongation de la tige</u> (montaison)	<u>Schossen</u>
	<u>Booting</u>	<u>Gonflement</u>	<u>Schwellstadium</u>
	<u>Inflorescence emergence</u>	<u>Epiaison</u>	<u>Erscheinen des</u> <u>Blütenstands</u>
51 (♂,♀)	Inflorescence just visible	Inflorescence à peine visible	Blütenstand gerade sichtbar
	<u>Anthesis</u>	<u>Anthèse</u>	<u>Blüte</u>
61 (♂,♀)	Beginning of anthesis	Début de l'anthèse	Beginn der Blüte
65 (♂,♀)	Anthesis halfway	Mi-floraison	Mitte der Blüte
	<u>Milk development</u>	<u>Stade laiteux</u>	<u>Entwicklung der Milchreife</u>
71	Caryopsis watery ripe	State aqueux de la maturation du caryopse	Karyopse wasserreif
75	Medium milk	Mi-laiteux	Mitte der Milchreife
85	<u>Dough development</u> Soft dough	<u>Stade pâteux</u> Pâteux tendre	<u>Entwicklung der Teigreife</u> weich teigreif
92	<u>Ripening</u> Caryopsis hard (can no longer be dented by thumbnail)	<u>Maturation</u> Le caryopse est dur (ne peut plus du tout être entamé par l'ongle)	<u>Das Reifen</u> Karyopse hart (nicht mehr mit dem Daumnagel einzudellen)
93	Caryopsis loosening in daytime	Caryopse se détachant dans la journée	Karyopse tagsüber lockernd

* Extracted from J.C. Zadoks, T.T. Chang and C.F. Konzak, Decimal Code for the Growth States of Cereals, 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.

* Extrait de J.C. Zadoks, T.T. Chang et C.F. Konzak, Decimal Code for the Growth States of Cereals, EUCARPIA Bulletin 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.

* Auszug von J.C. Zadoks, T.T. Chang und C.F. Konzak, Decimal Code for the Growth States of Cereals, EUCARPIA Bulletin No. 7, 1974, pp. 42-52. Die französische Uebersetzung wurde freundlicherweise von Frau R. Cassini, Herrn R. Cassini und Herrn R. Marie überlassen. Die deutsche Uebersetzung wurde freundlicherweise von Herrn A.O. Klomp und Frau I. Volk überlassen.

IX. Literature/Littérature/Literatur

- Bourgoïn-Greneche, M., and Lallemand, J., 1993: Electrophoresis and its application to the description of varieties. A presentation of techniques used by GEVES, Ed. GEVES, Guyancourt
- Bourgoïn-Greneche, M., and Giraud, G., 1994: Technical reference manual for the isoenzymatic analysis of maize. Presentation of the method for scoring the gels and interpretation of the zymogrammes. Ed. GEVES, Guyancourt
- Cardy, B.J., and Kanneberg, L.W., 1982: Allozymic variability among maize inbred lines and hybrids: applications for cultivar identification, Crop Sci., 22, 1016-1020
- Coe, E., Hoisington, D., and Chao, S., 1990: Gene list and working maps. Maize Genet. Coop. Newsl., 64, 134-163
- Goodman, M.M., Stuber C.W., 1983 (c): In isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part B, 472 pp., Ed. par Tanksley, S.D., and Orton, T.J., Elsevier, Amsterdam
- Newton, K.J., and Schwartz, D., 1980: Genetic basis of the major malate dehydrogenase isozyme in maize. Genetics, 95, 425-442
- Physiologie du Maïs, Communications au colloque physiologie du maïs organisé par l'INRA, le CNRS et l'AGPM, Royan 15-17 mars 1983, 574 pages
- Smith, J.S.C., and Weissinger, H., 1984: Rapid monitoring of purity in seed lots of hybrid maize: modifications of current technologies. Maize Genet. Coop. Newsl., 58, 103-105
- Stuber, C.W., Wendel, J.F., Goodman, M.M., and Smith, J.S.C., 1988: Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (Zea mays L). North Carolina Agricultural Research Service - North Carolina State University, Raleigh
- Wendel, J.F., Goodman, M.M., and Stuber, C.W., 1986: Additional mapping of isozyme loci: localization of Acp 4, Dia 2, Adk 1, Tpi 3, and Sad 1. Maize Genet. Coop. Newsl. 60, 109-110X.

X. Technical Questionnaire/Questionnaire technique/Technischer Fragebogen

Reference Number
(not to be filled in by the applicant)
Référéncé
(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 Zea mays L.

MAIZE
MAIS
MAIS

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

4.1 Method of breeding/Méthode d'obtention/Züchtungsverfahren

(i)	inbred line/lignée/Inzuchtlinie	[]
(ii)	single-cross hybrid/hybride simple/Einfachkreuzung	[]
(iii)	three-way cross hybrid/hybride trois voies/Dreiweghybride	[]
(iv)	double-cross hybrid/hybride double/Doppelhybride	[]
(v)	open-pollinated variety/variété à fécondation libre/Freiabblühende Sorte	[]
(vi)	other (indicate formula)/autre (préciser la formule)/Andere (Formel angeben)	[]

4.2 Other information/Autres renseignements/Andere Informationen

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 (7)	Tassel: time of anthesis (on middle third of main axis, 50% of plants)	65	very early	très précoce	sehr früh		1[]
			very early to early	très précoce à précoce	sehr früh bis früh	KW1069	2[]
	Panicule: époque de floraison mâle (au tiers moyen du maître brin, 50% des plantes)		early	précoce	früh	F7	3[]
			early to medium	précoce à moyenne	früh bis mittel	F259	4[]
	Rispe: Zeitpunkt der männlichen Blüte (im mittleren Drittel der Mittelachse, 50% der Pflanzen)		medium	moyenne	mittel	W117	5[]
			medium to late	moyenne à tardive	mittel bis spät	A632	6[]
			late	tardive	spät	M017	7[]
	late to very late	tardive à très tardive	spät bis sehr spät	B73	8[]		
	very late	très tardive	sehr spät		9[]		
5.2 (16)	Ear: anthocyanin coloration of silks	65 (S)	absent	absente	fehlend	F7	1[]
	Epi: pigmentation anthocyanique des soies		present	présente	vorhanden	F2	9[]
	Kolben: Anthocyanfärbung der Narbenfäden						
5.3i (22.1)	<u>In-bred lines only:</u> Plant: length (tassel included)	75	very short	très courte	sehr kurz	F7	1[]
			short	courte	kurz	W117	3[]
	<u>Seulement lignées:</u> Plante: longueur (panicule comprise)		medium	moyenne	mittel	W182E	5[]
			long	longue	lang	M017	7[]
	<u>Nur Inzuchtlinien:</u> Pflanze: Länge (einschliesslich Rispe)		very long	très longue	sehr lang		9[]
5.3.ii (22.2)	<u>Hybrids and open pollinated varieties only:</u> Plant: length (tassel included)	75	very short	très courte	sehr kurz	Nano-Dos	1[]
			short	courte	kurz	DK232	3[]
	<u>Seulement hybrides et variétés à fécondation libre:</u> Plante: longueur (panicule comprise)		medium	moyenne	mittel	Magister	5[]
			long	longue	lang	Cecilia	7[]
	<u>Nur Hybriden und frei-abblühende Sorten:</u> Pflanze: Länge (einschliesslich Rispe)		very long	très longue	sehr lang	Alimare	9[]

Characteristics Caractères Merkmale	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
5.4 Ear: type of grain (30) (in middle third of ear) Epi: type de grain (au tiers moyen de l'épi) Kolben: Korntyp (im mittleren Drittel des Kolbens)	92 (S)	flint	corné	Hartmais	F2	1[]
		flint-like	corné à corné-denté	hartmais-ähnlich	F252	2[]
		intermediate	corné-denté	Zwischentyp	CO125	3[]
		dent-like	corné-denté à denté	zahnmais-ähnlich	F259	4[]
		dent	denté	Zahnmais	W401	5[]
		sweet	sucré	Zuckermais	Jubilee	6[]
5.5 Ear: anthocyanin (33) coloration of glumes of cob Epi: pigmentation anthocyanique des glumes de la rafle Kolben: Anthocyanfärbung der Spelzen der Spindel	93 (S)	absent	absente	fehlend	F2	1[]
		present	présente	vorhanden	W117	9[]

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 ^{o)}	State of expression of similar variety	State of expression of candidate variety
Dénomination de la variété voisine	Caractère par lequel la variété voisine diffère ^{o)}	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 ^{o)}	Ausprägungsstufe der ähnlichen Sorte	Ausprägungsstufe der Kandidatensorte

^{o)} 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/
L'annex suit/
Anlage folgt]

Additional Useful Explanations
Explications additionnelles utiles
Zusätzliche nützliche Erklärungen

[English]

	<u>TABLE OF CONTENTS</u>	<u>PAGE</u>
Part I.	Introduction	2
Part II.	Characteristics Derived by Using Electrophoresis	3
Part III.	Description of the SGE Method for the Analysis of Isoenzymes from <u>Zea mays</u> L.	7

[français]

	<u>SOMMAIRE</u>	<u>PAGE</u>
Partie I.	Introduction	17
Partie II.	Caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse	18
Partie III.	Description de la méthode pour l'analyse des isoenzymes de <u>Zea mays</u> L.	22

[deutsch]

	<u>INHALT</u>	<u>SEITE</u>
Teil I.	Einführung	32
Teil II.	Merkmale, die sich bei Verwendung der Elektrophorese ergeben	33
Teil III.	Beschreibung der SGE-Methode für die Analyse von Isoenzymen von <u>Zea mays</u> L.	37

* * *

Description of the example inbred lines and hybrids Description des lignées endogames et hybrides témoins Beschreibung der Beispielsinzuchtlinien und -hybriden	46
---	----

[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 distinctness. 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 enzymes, starch gel electrophoresis is recommended. Polymorphism of enzymes (i.e. 16 enzyme loci) can be detected. Genetic control is known for each enzyme locus. For the description of the method and the genetic interpretation of the zymograms, reference is made to the technical bulletin by Stuber, Wendel, Goodman and Smith, 1988, and the technical handbook by Grenèche and Giraud, 1994. The alleles are described by band numbers according to the definition given by Cardy, Stuber, Goodman, 1980, (see Chapter IX, Literature).

Part II

Characteristics Derived by Using Electrophoresis

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
35. Allele expression at locus Mdh 1 Expression de l'allèle occupant le locus Mdh 1 Allel-Ausprägung in Locus Mdh 1	genotype 1/1 genotype 1/6 in interaction with allele 6 of Mdh 2	génotype 1/1 génotype 1/6 en interaction avec allele 6 de Mdh 2	Genotyp 1/1 Genotyp 1/6 in Interaktion mit Allel 6 von Mdh 2	F252 Tau	1
	genotype 6/6	génotype 6/6	Genotyp 6/6	A239	2
	genotype 1/6 but not in interaction with allele 6 of Mdh 2	génotype 1/6 mais sans interaction avec allèle 6 de Mdh 2	Genotyp 1/6 jedoch ohne Interaktion mit Allel 6 von Mdh 2	Marshall	3
36. Allele expression at locus Mdh 2 Expression de l'allèle occupant le locus Mdh 2 Allel-Ausprägung in Locus Mdh 2	Genotype 3/3 Genotype 3/4.5	Génotype 3/3 Génotype 3/4.5	Genotyp 3/3 Genotyp 3/4.5	F252 Robin	1
	Genotype 4.5/4.5	Génotype 4.5/4.5	Genotyp 4.5/4.5	W 401	2
	Genotype 6/6	Génotype 6/6	Genotyp 6/6	A 239	3
	Genotype 3/6 Genotype 4.5/6	Génotype 3/6 Génotype 4.5/6	Genotyp 3/6 Genotyp 4.5/6	Azur	4 5
37. Allele expression at locus Mdh 3 Expression de l'allèle occupant le locus Mdh 3 Allel-Ausprägung in Locus Mdh 3	Genotype 16/16	Génotype 16/16	Genotyp 16/16	F252	1
	Genotype 18/18	Génotype 18/18	Genotyp 18/18	Co 158	2
	Genotype 16/18	Génotype 16/18	Genotyp 16/18	Figaro	3
38. Allele expression at locus Mmm Expression de l'allèle occupent le locus Mmm Allel-Ausprägung in Locus Mmm	Genotype M/M Genotype M/m	Génotype M/M Génotype M/m	Genotyp M/M Genotyp M/m	F 252	1
	Genotype m/m	Génotype m/m	Genotyp m/m		2
39. Allele expression at loci Mdh 4 + Mdh 5 Expression de l'allèle occupant les loci Mdh 4 + Mdh 5 Allel-Ausprägung in Loci Mdh 4 + Mdh 5	Genotype 12/12 + 12/12	Génotype 12/12 + 12/12	Genotyp 12/12 + 12/12	F 252	1
	Genotype 12/12 + 15/15 Genotype 12/12 + 12/15	Génotype 12/12 + 15/15 Génotype 12/12 + 12/15	Genotyp 12/12 + 15/15 Genotyp 12/12 + 12/15	F 2 Robin	2

TG/2/6
Maize/Mais/Mais, 94-11-04
Annex/Annexe/Anlage/page 4/Seite 4

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
40. Allele expression at loci Idh 1 + Idh 2 Expression de l'allèle occupant les loci Idh 1 + Idh 2 Allel-Ausprägung in Loci Idh 1 + Idh 2	Genotype 4/4 + 4/4	Génotype 4/4 + 4/4	Genotyp 4/4 + 4/4	A 239	1
	Genotype 4/6 + 4/4	Génotype 4/6 + 4/4	Genotyp 4/6 + 4/4		
	Genotype 4/4 + 6/6	Génotype 4/4 + 6/6	Genotyp 4/4 + 6/6	CM 7	2
	Genotype 6/6 + 4/4	Génotype 6/6 + 4/4	Genotyp 6/6 + 4/4	F 1110	3
	Genotype 6/6 + 6/6	Génotype 6/6 + 6/6	Genotyp 6/6 + 6/6	Co 158	4
	Genotype 4/6 + 6/6	Génotype 4/6 + 6/6	Genotyp 4/6 + 6/6	Bonny	
41. Allele expression at loci Pgd 1 + Pgd 2 Expression de l'allèle occupant les loci Pgd 1 + Pgd 2 Allel-Ausprägung in Loci Pgd 1 + Pgd 2	Genotype 2/2 + 5/5	Génotype 2/2 + 5/5	Genotyp 2/2 + 5/5	W 401	1
	Genotype 2/2 + 2.8/2.8	Génotype 2/2 + 2.8/2.8	Genotyp 2/2 + 2.8/2.8		2
	Genotype 3.8/ 3.8 + 2.8/2.8	Génotype 3.8/ 3.8 + 2.8/2.8	Genotyp 3.8/ 3.8 + 2.8/2.8	A 632	3
	Genotype 3.8/3.8 + 5/5	Génotype 3.8/3.8 + 5/5	Genotyp 3.8/3.8 + 5/5	F 252	4
	Genotype 3.8/ 3.8 + 2.8/5	Génotype 3.8/ 3.8 + 2.8/5	Genotyp 3.8/ 3.8 + 2.8/5	Tekila	
	Genotype n/n + 5/5	Génotype n/n + 5/5	Genotyp n/n + 5/5	H 108	5
42.1 <u>Inbred lines only:</u> allele expression at loci Pgm 1 + Pgm 2 <u>Seulement lignées:</u> expression de l'allèle occupant les loci Pgm 1 + Pgm 2 <u>Nur Inzuchtlinien:</u> Allel-Ausprägung in Loci Pgm 1 + Pgm 2	Genotype 9/9 + 1/1	Génotype 9/9 + 1/1	Genotyp 9/9 + 1/1	F 2	1
	Genotype 9/9 + 3/3	Génotype 9/9 + 3/3	Genotyp 9/9 + 3/3	F 16	2
	Genotype 16/16 + 4/4	Génotype 16/16 + 4/4	Genotyp 16/16 + 4/4		
	Genotype 9/9 + 4/4	Génotype 9/9 + 4/4	Genotyp 9/9 + 4/4	A 632	3
	Genotype 9/9 + 8/8	Génotype 9/9 + 8/8	Genotyp 9/9 + 8/8	Mo 17	4
	Genotype 16/16 + 1/1	Génotype 16/16 + 1/1	Genotyp 16/16 + 1/1		5
Genotype 16/16 + 3/3	Génotype 16/16 + 3/3	Genotyp 16/16 + 3/3			
Genotype 16/16 + 8/8	Génotype 16/16 + 8/8	Genotyp 16/16 + 8/8		6	

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
42.2 <u>Hybrids and open-pollinated varieties only</u> : allele expression at loci Pgm 1 + Pgm 2 <u>Seulement hybrides et variétés à fécondation libre</u> : expression de l'allèle occupant les loci Pgm 1 + Pgm 2 <u>Nur Hybriden und frei-abblühende Sorten</u> : Allel-Ausprägung in Loci Pgm 1 + Pgm 2	Genotype 9/9 + 1/1	Génotype 9/9 + 1/1	Genotyp 9/9 + 1/1	Robin	1
	Genotype 9/9 + 1/3	Génotype 9/9 + 1/3	Genotyp 9/9 + 1/3		
	Genotype 9/9 + 3/3	Génotype 9/9 + 3/3	Genotyp 9/9 + 3/3		
	Genotype 9/9 + 3/4	Génotype 9/9 + 3/4	Genotyp 9/9 + 3/4	Figaro	
	Genotype 9/9 + 4/4	Génotype 9/9 + 4/4	Genotyp 9/9 + 4/4		
	Genotype 9/9 + 1/4	Génotype 9/9 + 1/4	Genotyp 9/9 + 1/4		
	Genotype 16/16 + 4/4	Génotype 16/16 + 4/4	Genotyp 16/16 + 4/4	Axon	
	Genotype 9/9 + 8/8	Génotype 9/9 + 8/8	Genotyp 9/9 + 8/8	Occitan	2
	Genotype 9/9 + 3/8	Génotype 9/9 + 3/8	Genotyp 9/9 + 3/8		
	Genotype 9/9 + 4/8	Génotype 9/9 + 4/8	Genotyp 9/9 + 4/8		
	Genotype 9/9 + 1/8	Génotype 9/9 + 1/8	Genotyp 9/9 + 1/8		3
	Genotype 16/16 + 1/1	Génotype 16/16 + 1/1	Genotyp 16/16 + 1/1		4
	Genotype 16/16 + 1/3	Génotype 16/16 + 1/3	Genotyp 16/16 + 1/3		
	Genotype 16/16+ 3/3	Génotype 16/16 + 3/3	Genotyp 16/16 + 3/3		
	Genotype 16/16 + 8/8	Génotype 16/16+ 8/8	Genotyp 16/16 + 8/8		5
43. Allele expression at locus Pgi 1 Expression de l'allèle occupant le locus Pgi 1 Allel-Ausprägung in Locus Pgi 1	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	A 239	1
	Genotype 5/5	Génotype 5/5	Genotyp 5/5	A 632	2
	Genotype 4/5	Génotype 4/5	Genotyp 4/5	Artist	3
44.1 <u>Inbred lines only</u> : Allele expression at locus Acp 1 <u>Seulement lignées</u> : expression de l'allèle occupant le locus Acp 1 <u>Nur Inzuchtlinien</u> : Allel-Ausprägung in Locus Acp 1	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	F 2	1
	Genotype 3/3	Génotype 3/3	Genotyp 3/3	A 239	2
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	A 632	3
	Genotype 6/6	Génotype 6/6	Genotyp 6/6	F 1444	4

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
44.2 <u>For hybrids and open-pollinated varieties only:</u> Allele expression at locus Acp 1 <u>Seulement pour les hybrides et les variétés à fécondation libre:</u> expression de l'allèle occupant le locus Acp 1 <u>Nur für Hybriden und freiabblühende Sorten:</u> Allel-Ausprägung in Locus Acp 1	Genotype 2/3	Génotype 2/3	Genotyp 2/3	Azur	1
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2		
	Genotype 3/3	Génotype 3/3	Genotyp 3/3		
	Genotype 4/6	Génotype 4/6	Genotyp 4/6	Contessa	2
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4		
	Genotype 6/6	Génotype 6/6	Genotyp 6/6		
	Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Occitan	3
	Genotype 2/6	Génotype 2/6	Genotyp 2/6		4
	Genotype 3/4	Génotype 3/4	Genotyp 3/4	Marshall	5
	Genotype 3/6	Génotype 3/6	Genotyp 3/6		6
45. Allele expression at locus Dia 1 Expression de l'allèle occupant le locus Dia 1 Allel-Ausprägung in Locus Dia 1	Genotype 8/8	Génotype 8/8	Genotyp 8/8	F 2	1
	Genotype 12/12	Génotype 12/12	Genotyp 12/12	Co 158	2
	Genotype 8/12	Génotype 8/12	Genotyp 8/12	Bastion	3
46. Allele expression at locus Adh 1 Expression d'allèle occupant le locus Adh 1 Allel-Ausprägung in Locus Adh 1	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	F 1444	1
	Genotype 6/6	Génotype 6/6	Genotyp 6/6	F 2	2
	Genotype 4/6	Génotype 4/6	Genotyp 4/6	Bristol	3

Part III

Description of the SGE Method for the
Analysis of Isoenzymes from Zea mays L.

1. Number of coleoptiles per test

- for checking formula: 20 coleoptiles each of inbred lines
2 coleoptiles of single-cross hybrids
6 coleoptiles of three-way cross hybrids
- for distinctness, uniformity and stability test: at least 20 coleoptiles for inbred lines, hybrids and open-pollinated varieties.

2. Apparatus and equipment

Any suitable horizontal electrophoresis system can be used, provided that the gels can be kept at 4°C. A gel thickness of 10 mm is recommended. The power supply used should be capable of delivering constant voltage output.

3. Chemicals

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

3.1 Chemicals for enzyme extraction

L-Ascorbic acid
L-Ascorbic acid Na salt
Sucrose

3.2 Chemicals for electrophoresis

Bromophenol blue
Citric acid monohydrate
L-Histidine
Starch hydrolyzed, for electrophoresis, (Sigma s-4501 or equivalent)

3.3 Chemicals for staining enzymes

Acetic acid glacial
2,6-Dichlorophenol-indophenol Na salt
Echanol
Echylenediamine tetra-acetic acid Na₂ Salt (EDTA)
Fast Garnet GBC salt
D-Fructose 6-phosphate Na₂ salt
Glucose 1-phosphate dehydrogenase (Serva 22820 or 22822 or Sigma G5885)
Hydrochloric acid (HCl)
DL-Isocitric acid Na₃ salt
Magnesium chloride hexahydrate
DL-Malic acid
Dimethylthiazol diphenyl tetrazolium (MTT)
β -Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)
β -Nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH)
β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)
Nitro-blue tetrazolium (NBT)
Sodium hydroxide (NaOH)
1-Naphtyl acid phosphate
6-phosphogluconic acid Na₃ salt dihydrate
Phenazine methosulfate (PMS)
Polyvinylpyrrolidone 40 (PVP-40)
Sodium acetate trihydrate
Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (Tris)

4. Solutions

4.1 Extraction solution

16.7 g Sucrose
8.3 g sodium ascorbate
made up to 100 ml with de-ionised water and adjusted to pH 7.4 with L-ascorbic acid.

4.2 Electrophoresis buffers

4.2.1 Buffers for SGE pH 6.5

4.2.1.1 Stock solution : 0.364 M L-histidine-citrate
50.44 g L-histidine
8.20 g Citric acid monohydrate
made up to 1 l with de-ionised water

4.2.1.2 Running buffer: 0.072 M L-histidine-citrate pH 6.5
(Stock solution diluted 1 in 5)
400 ml stock solution (4.2.1.1) made up to 2 l with de-ionised water

4.2.1.3 Gel buffer: 0.024 M L-histidine-citrate
(Stock solution diluted 1 in 15)
80 ml stock solution (4.2.1.1) made up to 1200 ml with de-ionised water

4.2.2 Buffers for SGE pH 5.0

4.2.2.1 Running buffer: 0.074 M L-histidine-citrate pH 5.0
15.5g L-histidine
10.0g Citric acid monohydrate
made up to 2 liters with de-ionised water

4.2.2.2 Gel buffer: 0.006 M L-histidine-citrate
(Running buffer diluted 1 in 12)
100 ml running buffer (4.2.2.1) made up to 1200 ml with de-ionised water

4.2.2.3 Bromophenol blue solution
50 mg bromophenol blue dissolved in 100 ml de-ionised water

4.3 Staining solutions

4.3.1 Stock solutions

4.3.1.1 1 M Tris-HCl pH 8.0
121.1g Tris, made up to 1 liter with de-ionised water and adjusted to pH 8.0 with 50% HCl

4.3.1.2 1 M Tris-HCl pH 9.1
121.1 g Tris, made up to 1 liter with de-ionised water and adjusted to pH 9.1 with 50% HCl

4.3.1.3 1 M Sodium acetate pH 5.0
136.08 g Sodium acetate trihydrate, made up to 1 liter with de-ionised water adjusted to pH 5.0 with acetic acid glacial

4.3.1.4 MTT solution
1.0 g MIT made up to 100 ml with de-ionised water

4.3.1.5 NBT solution
1.0 g NBT made up to 100 ml with de-ionised water

4.3.1.6 PMS solution
200 mg PMS, made up to 100 ml with de-ionised water

4.3.1.7 MgCl₂ solution
21.35 g Magnesium chloride hexahydrate
made up to 100 ml with de-ionised water

4.3.1.8 Malic acid solution
5 g LL-Malic acid, made up to 100 ml with de-ionised water and adjusted to pH 8.0 with 1 M NaOH

4.3.2 Staining solutions (volume: 200 ml)

4.3.2.1 MDH + ADH staining solution
20 ml Tris-HCl pH 9.1 (4.3.1.2.)
+ 180 ml de-ionised water
+ 8 ml Malic acid solution (4.3.1.8.)
+ 10 ml Ethanol
+ 80 mg NAD
+ 4 ml NBT solution (4.3.1.5.)
+ 3 ml PMS solution (4.3.1.6.)

4.3.2.2 IDH staining solution
20 ml Tris-HCl pH 8.0 (4.3.1.5.)
+ 180 ml de-ionised water
+ 500 mg DL-Isocitric acid Na₃ salt
+ 10 ml MgCl₂ solution (4.3.1.7.)
+ 6 mg NADP
+ 4 ml MTT solution (4.3.1.4.)
+ 3 ml PMS solution (4.3.1.6.)

- 4.3.2.3 PGI + PGD staining solution
10 ml Tris-HCl pH 8.0 (4.3.1.1.)
+ 190 ml de-ionised water
+ 200 mg Fructose 6-phosphate Na₂ salt
+ 80 mg 6-Phosphogluconic acid Na₃ salt trihydrate
+ 2 ml MgCl₂ solution (4.3.1.7.)
+ 20 mg NADP
+ 2 ml MTT solution (4.3.1.4.)
+ 3 ml PMS solution (4.3.1.6.)
+ 50 units Glucose 6-phosphate dehydrogenase
- 4.3.2.4 PGM staining solution
20 ml Tris-HCl pH 8.0 (4.3.1.1.)
+ 180 ml de-ionised water
+ 1 g Glucose 1-phosphate
+ 200 mg EDTA Na₂ salt
+ 4 ml MgCl₂ solution (4.3.1.7.)
+ 20 mg NADP
+ 3 ml MTT solution (4.3.1.4.)
+ 2 ml PMS solution (4.3.1.6.)
+ 100 units Glucose 6-phosphate dehydrogenase
- 4.3.2.5 ACP staining solution
4 ml Sodium acetate p.H 5.0 (4.3.1.3.)
+ 196 ml de-ionised water
+ 200 mg Fast Garnet GBC salt
+ 492 mg 1-Naphthylphosphate Na₃ salt dihydrate
+ 2 ml MgCl₂ solution (4.3.1.7.)
- 4.3.2.6 DIA staining solution
20 ml Tris-HCl pH 9.1 (4.3.1.2.)
+ 180 ml de-ionised water
+ 2 g PVP-40
+ 20 mg NADH
+ 16 ml MTT solution (4.3.1.4.)
+ 16 mg 2,6-Dichlorophenol-indophenol Na salt

5. Procedure

5.1 Enzyme extraction

Maize seedlings are grown on moistened germination paper, at 25°C, in darkness. After six days, individual coleoptiles are harvested and homogenized at 4°C, with a pestle in micro-tubes containing 0.060 ml extraction solution (3.1). The extracts can be stored at - 30°C.

5.2 Preparation of the gel

To make two 12.5 % starch gels (18 x 18 x 1 cm) the following is required: 128 g starch are mixed in 1020 ml gel buffer (4.2.1.3. or 4.2.2.2.) in a 1000 ml Buchner flask at 80°C. The mixture is degassed for 40 seconds. The gels are poured into gel moulds as described in the user's manual of the equipment used. The formation of air bubbles should be avoided. The gels are allowed to cool at room temperature, for at least two hours, and wrapped with polyethylene film for overnight storage. Before electrophoresis, the gels are cooled at 4°C for at least one hour.

5.3 Electrophoresis

5.3.1 The tanks are filled with the appropriate volume of running buffer (4.2.1.2. or 4.2.2.1.) pre-cooled to 4°C. A slit is cut in the gel at 1 cm from the cathode. The enzyme extracts from 5.1 (30 extracts for on 18 x 18 x 1 cm gel) are absorbed onto 15 x 2 x 1 mm wicks at from Whatman N° 3 chromatography paper. The wicks are placed into the slit. At 1 cm of each edge of the gels, a wick soaked with bromophenol blue solution (4.2.2.3.) is inserted. The electrophoresis is carried out at 4°C. A constant voltage of 200 V (maximum current of 150 mA for two 18 x 18 x 1 cm gels is applied for 20 minutes). The wicks are then removed and the electrophoresis is continued at a constant voltage of 280 V (maximum current of 180 mA for two 18 x 18 x 1 cm gels), until the bromophenol blue marker has migrated 14 cm (4 hours).

5.4 Enzyme staining

After electrophoresis the gel is cut horizontally in 1 mm thick slices. The upper slice is discarded. Individual gel slices are stained by incubation in the following solutions at 37°C in darkness.

for MDH and ADH:	solution 4.3.2.1.,	for IDH:	solution 4.3.2.2.
for PGI and PGD:	solution 4.3.2.3.,	for PGM:	solution 4.3.2.4.
for ACP:	solution 4.3.2.5.,	for DIA:	solution 4.3.2.6

The ACPs migrate in the first 4 cm of the gel; the PGMs go further; therefore, it is possible to stain these two enzymes on the same gel after having cut it transversally.

The staining times range between 30 and 120 minutes. After staining the gel slices are rinsed in distilled water before being stored. The following procedure for long time storing can be successfully used: e.g. drying the gels between two cellophane sheets or storing in sealed polythene bags.

6. Recognition of the alleles encoding isoenzymes

6.1 Recognition of the alleles encoding MDH

6.1.1 Genetic interpretation of the zymogrammes

Enzyme	Quaternary structure	Chromosomal location	Locus	Alleles	
		8	Mdh1	1, 6	
		6L	Mdh2	3+3,5*, 4,5, 6	intergenic
Malate dehydrogenase (MDH)	Dimetric	3L	Mdh3	16, 18	interactions
		1L	Mmm	M, m	
		1L	Mdh4	12	intergenic
		5S	Mdh5	12, 15	interactions

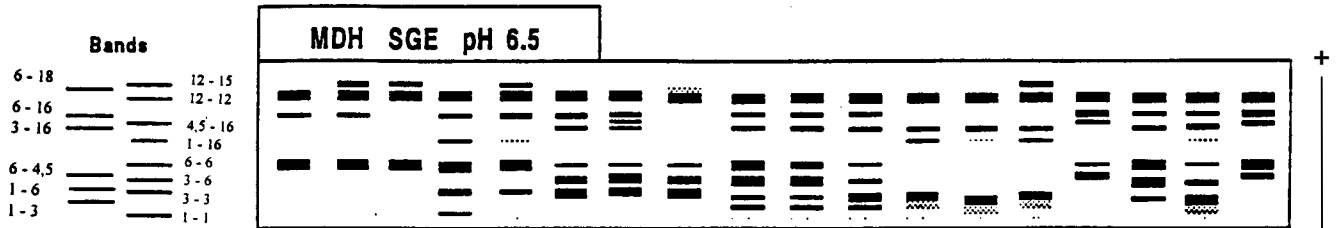
* The enzymes encoded by the alleles 3 and 3,5 have a very proximal electrophoretic mobility; so, they are not scored as different.

There are interactions between the products of the genes (polypeptide subunits) on the one hand, encoded by Mdh1, Mdh2, Mdh3, and on the other hand, encoded by Mdh4 and Mdh5.

Mdh1	Genotype					Example inbred lines
	Mdh2	Mdh3	Mmm	Mdh4	Mdh5	
6/6	6/6	16	M	12	12	A239
6/6	3/3	16	M	12	12	CM7
6/6	6/6	16	M	12	15	F2
6/6	6/6	18	M	12	12	F1444
6/6	3/3	18	M	12	12	CO158
1/1	3/3	16	M	12	12	F252
6/6	4,5/4,5	16	M	12	12	W401

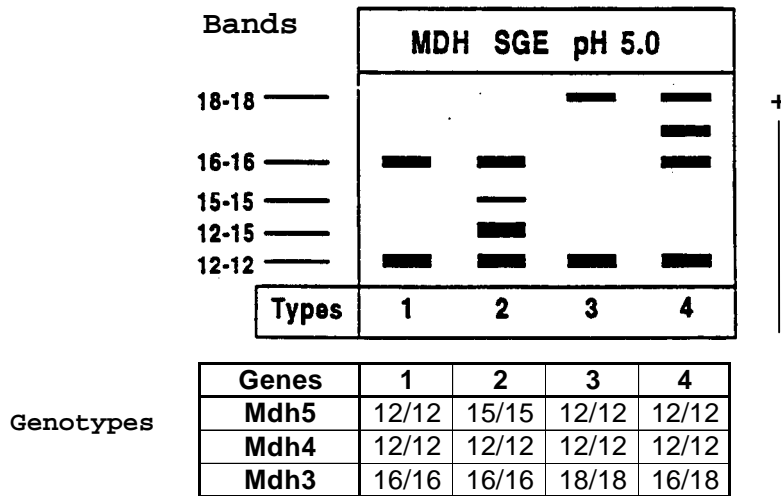
6.1.2 Schematization of the zymogrammes

For the recognition of the alleles at the loci Mdh1, Mdh2 and Mdh4 the SGE at pH 6.5 should be used. For the recognition of the alleles at the loci Mdh3 and Mdh5, a second electrophoresis system should be used : SGE at pH 5.0.



Types	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Genes																		
Mdh5	12/12	15/15	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	15/15	12/12	12/12	12/12
Mdh4	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
Mdh3	16/16	16/16	18/18	16/16	16/16	16/16	18/18	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16
Mdh2	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	3/3	3/4,5	3/3	3/6	3/6	3/3	3/3	3/4,5	3/3	4,5/4,5	3/6	3/4,5	4,5/6
Mdh1	6/6	6/6	6/6	1/1	1/6	6/6	6/6	6/6	1/6	1/1	1/6	1/1	1/1	1/1	6/6	6/6	1/6	6/6

Some bands which are very faint are drawn in dotted lines. Some bands overlap and cannot be drawn in distinct bands.



6.2 Recognition of the alleles encoding IDH

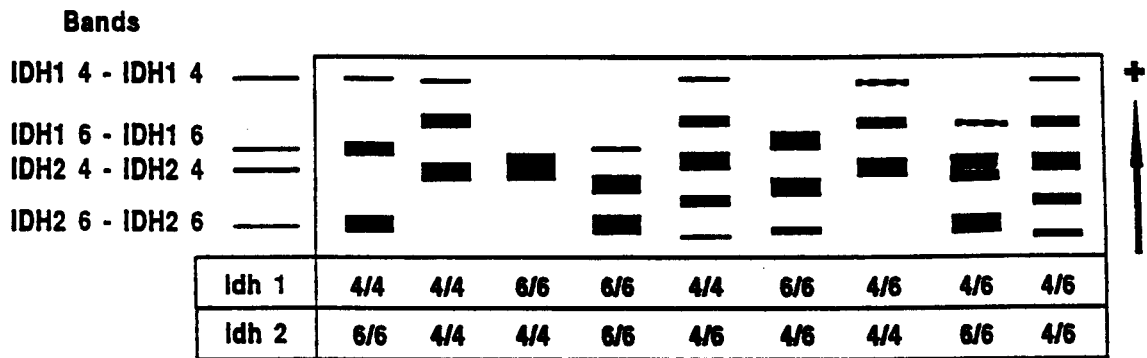
6.2.1 Genetic interpretation of the zymogrammes

Enzyme	Quaternary structure	Chromosomal location	Locus	Alleles	
Isocitrate dehydrogenase	Dimeric	8	Idh1	4, 6	intergenic interactions
(IDH)		6	Idh2	4, 6	

There are interactions between the products of the genes (polypeptide subunits) encoded by Idh1 and Idh2.

Genotype		Example inbred lines
Idh1	Idh2	
4/4	4/4	F16
4/4	6/6	A632
6/6	4/4	F1110
6/6	6/6	CO158

6.2.2 Schematization of the zymogrammes



Some bands which are very faint are drawn in dotted lines. Some bands overlap and cannot be drawn as distinct bands.

6.3 Recognition of the alleles encoding PGD

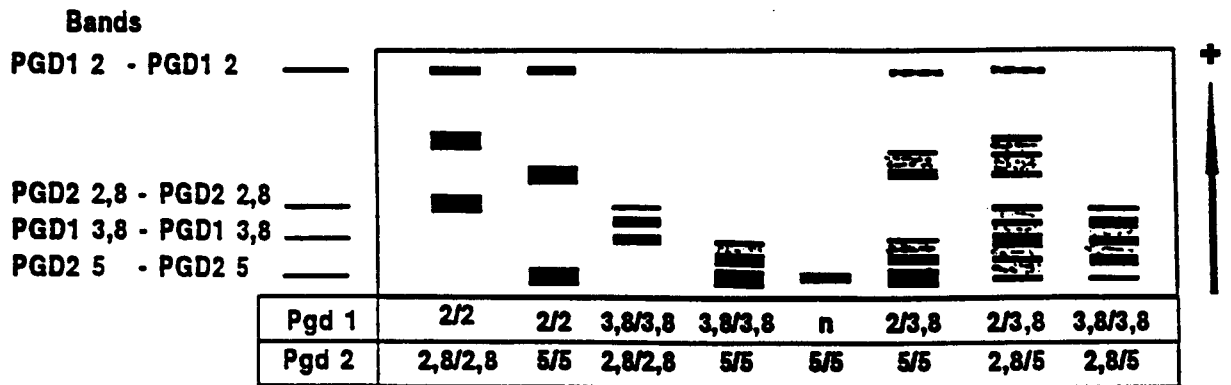
6.3.1 Genetic interpretation of the zymogrammes

Enzyme	Quaternary structure	Chromosomal location	Locus	Alleles	
6-phosphogluconate dehydrogenase	Dimeric	6	Pgd1	2, 3, 8, n	
(PGD)		3L	Pgd2	2, 8, 5	intergenic interactions

There are interactions between the products of the genes (polypeptide subunits) encoded by Pgd1 and Pgd2.

Genotype		Example inbred lines
Pgd1	Pgd2	
2/2	5/5	A239
3,8/3,8	2,8/2,8	A632
3,8/3,8	5/5	F2
n/n	5/5	H108

6.3.2 Schematization of the zymogrammes



Some bands which are very faint are drawn in dotted lines. Some bands overlap and cannot be drawn in distinct bands.

6.4 Recognition of the alleles encoding PGM

6.4.1 Genetic interpretation of the zymogrammes

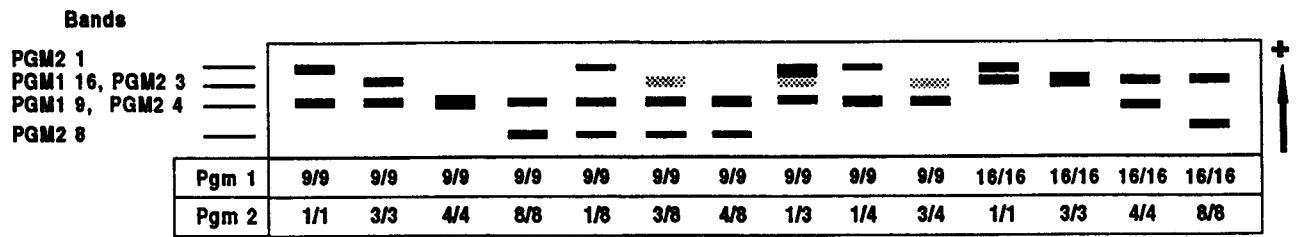
Enzyme	Quaternary structure	Chromosomal location	Locus	Alleles
Phosphoglucomutase (PGM)	Monomeric	1L	Pgm1	9, 16
	Monomeric	5S	Pgm2	3, 4, 8

Genotype		Example inbred lines
Pgm1	Pgm2	
9/9	1/1	F2
9/9	3/3	F16
9/9	4/4	A632
9/9	8/8	MO17

Footnote to PGM

The allele combinations 9/9+1/1, 9/9+1/4 and 9/9+1/3, the allele combinations 9/9+3/3, 9/9+1/3 and 9/9+3/4, 16/16+4/4 and 9/16+4/4 and 9/16+3/4, The allele combinations 9/9+1/1, 9/9+4/4 and 9/9+3/4 and the allele combinations 9/9+8/8, 9/9+3/8 and 9/9+4/8 respectively produce identical or closely related zymogrammes. Therefore in characteristic 42.1 the note 1 can be 9/9+1/4 or 9/9+1/3 too, the note 2 can be 9/9+1/3 or 9/9+3/4 or 9/16+3/4 too, the note 3 can be 9/9+3/4 too and the note 4 can be 9/9+3/8 or 9/9+4/8.

6.4.2 Schematization of the zymogrammes



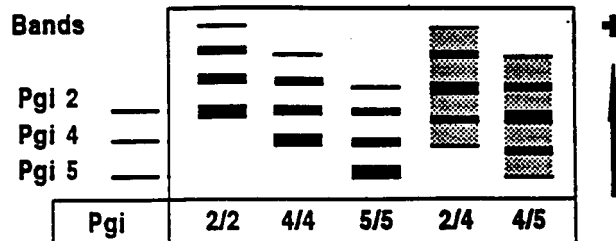
6.5 Recognition of the alleles encoding PGI

6.5.1 Genetic interpretation of the zymogrammes

Enzyme	Quaternary structure	Chromosomal location	Locus	Alleles
Phosphoglucosomerase (PGI)	Dimetric	1L	Pgi1	4 5

Genotype	Example inbred lines
Pgi1	
4/4	A239
5/5	A632

6.5.2 Schematization of the zymogrammes



6.6 Recognition of the alleles encoding ACP

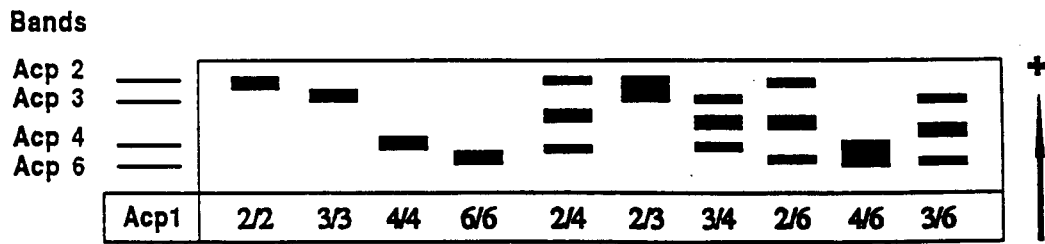
6.6.1 Genetic interpretation of the zymogrammes

Enzyme	Quaternary structure	Chromosomal location	Locus	Alleles
Acid phosphatase	Dimeric	9L	Acp1	2 3 4 6
(ACP)				

Genotype	Example inbred lines
Acp1	
2/2	F2
3/3	A239
4/4	A632
6/6	F1444

(Footnote to ACP on next page)

6.6.2 Schematization of the zymogrammes



Some bands overlap and cannot be drawn as distinct bands.

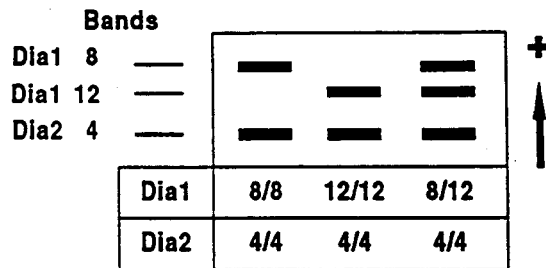
6.7 Recognition of the alleles encoding DIA

6.7.1 Genetic interpretation of the zymogrammes

Enzyme	Quaternary structure	Chromosomal location	Locus	Alleles
Diaphorase	Monomeric	2	Dia1	8
				12
(DIA)	Dimetric	1L	Dia2	4

Genotype		Example inbred lines
Dia1	Dia2	
8/8	4/4	F2
12/12	4/4	CO158

6.7.2 Schematization of the zymogrammes



2. Footnote to ACP

The alleles 3/3 and 2/3 and the alleles 2/2 and 3/3 respectively produce very similar zymogrammes. Therefore in characteristic 44.1 the note 1 can be 2/2 or 2/3 and the note 2 can be 3/3 or 2/3. The alleles 4/4 and 4/6 and the alleles 6/6 and 4/6 respectively produce very similar zymogrammes. Therefore in characteristic 44.1 the note can be 4/4 or 4/6 and the note 4 can be 6/6 or 4/6.

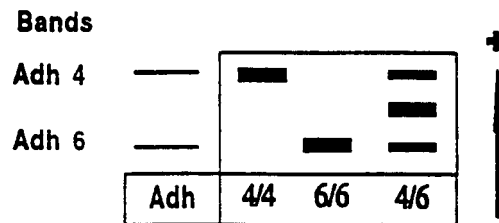
6.8 Recognition of the alleles encoding ADH

6.8.1 Genetic interpretation of the zymogrammes

Enzyme	Quaternary structure	Chromosomal location	Locus	Alleles
Alcohol dehydrogenase (ADH)	Dimetric	1L	Adh1	4 6

Genotype	Example inbred lines
Adh1	
4/4	F1444
6/6	F2

6.8.2 Schematization of the zymogrammes



6.9 Description of the example inbred lines and hybrids

See pages 46 and 47 at the end of the Annex.

[français]

Partie I

Introduction

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

Pour l'analyse enzymatique, l'électrophorèse sur gel d'amidon est recommandée. Elle permet la description du polymorphisme des enzymes (soit 16 loci enzymatiques). Le déterminisme génétique est connu pour chaque locus enzymatique. Pour la description de la méthode et l'interprétation génétique des zymogrammes, on se reportera au bulletin technique de Stuber, Wendel, Goodman et Smith, de 1994, et au manuel technique de Grenèche et Giraud, de 1994. Les allèles sont décrits au moyen de numéros de bandes conformément à la définition donnée par Cardy, Stuber et Goodman, en 1980 (voir le chapitre IX, Littérature).

Partie II

Caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
35. Allele expression at locus Mdh 1 Expression de l'allèle occupant le locus Mdh 1 Allel-Ausprägung in Locus Mdh 1	genotype 1/1 genotype 1/6 in interaction with allele 6 of Mdh 2	génotype 1/1 génotype 1/6 en interaction avec allele 6 de Mdh 2	Genotyp 1/1 Genotyp 1/6 in Interaktion mit Allel 6 von Mdh 2	F252 Tau	1
	genotype 6/6	génotype 6/6	Genotyp 6/6	A239	2
	genotype 1/6 but not in interaction with allele 6 of Mdh 2	génotype 1/6 mais sans interaction avec allèle 6 de Mdh 2	Genotyp 1/6 jedoch ohne Interaktion mit Allel 6 von Mdh 2	Marshall	3
36. Allele expression at locus Mdh 2 Expression de l'allèle occupant le locus Mdh 2 Allel-Ausprägung in Locus Mdh 2	Genotype 3/3 Genotype 3/4.5	Génotype 3/3 Génotype 3/4.5	Genotyp 3/3 Genotyp 3/4.5	F252 Robin	1
	Genotype 4.5/4.5	Génotype 4.5/4.5	Genotyp 4.5/4.5	W 401	2
	Genotype 6/6	Génotype 6/6	Genotyp 6/6	A 239	3
	Genotype 3/6	Génotype 3/6	Genotyp 3/6	Azur	4
	Genotype 4.5/6	Génotype 4.5/6	Genotyp 4.5/6		5
37. Allele expression at locus Mdh 3 Expression de l'allèle occupant le locus Mdh 3 Allel-Ausprägung in Locus Mdh 3	Genotype 16/16 Genotype 18/18	Génotype 16/16 Génotype 18/18	Genotyp 16/16 Genotyp 18/18	F252 Co 158	1 2
	Genotype 16/18	Génotype 16/18	Genotyp 16/18	Figaro	3
38. Allele expression at locus Mmm Expression de l'allèle occupent le locus Mmm Allel-Ausprägung in Locus Mmm	Genotype M/M Genotype M/m	Génotype M/M Génotype M/m	Genotyp M/M Genotyp M/m	F 252	1
	Genotype m/m	Génotype m/m	Genotyp m/m		2
39. Allele expression at loci Mdh 4 + Mdh 5 Expression de l'allèle occupant les loci Mdh 4 + Mdh 5 Allel-Ausprägung in Loci Mdh 4 + Mdh 5	Genotype 12/12 + 12/12	Génotype 12/12 + 12/12	Genotyp 12/12 + 12/12	F 252	1
	Genotype 12/12 + 15/15 Genotype 12/12 + 12/15	Génotype 12/12 + 15/15 Génotype 12/12 + 12/15	Genotyp 12/12 + 15/15 Genotyp 12/12 + 12/15	F 2 Robin	2

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
40. Allele expression at loci Idh 1 + Idh 2 Expression de l'allèle occupant les loci Idh 1 + Idh 2 Allel-Ausprägung in Loci Idh 1 + Idh 2	Genotype 4/4 + 4/4	Génotype 4/4 + 4/4	Genotyp 4/4 + 4/4	A 239	1
	Genotype 4/6 + 4/4	Génotype 4/6 + 4/4	Genotyp 4/6 + 4/4		
	Genotype 4/4 + 6/6	Génotype 4/4 + 6/6	Genotyp 4/4 + 6/6	CM 7	2
	Genotype 6/6 + 4/4	Génotype 6/6 + 4/4	Genotyp 6/6 + 4/4	F 1110	3
	Genotype 6/6 + 6/6	Génotype 6/6 + 6/6	Genotyp 6/6 + 6/6	Co 158	4
	Genotype 4/6 + 6/6	Génotype 4/6 + 6/6	Genotyp 4/6 + 6/6	Bonny	
	Genotype 4/4 + 4/6	Génotype 4/4 + 4/6	Genotyp 4/4 + 4/6	Axon	5
	Genotype 4/6 + 4/6	Génotype 4/6 + 4/6	Genotyp 4/6 + 4/6	Loft	
41. Allele expression at loci Pgd 1 + Pgd 2 Expression de l'allèle occupant les loci Pgd 1 + Pgd 2 Allel-Ausprägung in Loci Pgd 1 + Pgd 2	Genotype 2/2 + 5/5	Génotype 2/2 + 5/5	Genotyp 2/2 + 5/5	W 401	1
	Genotype 2/2 + 2.8/2.8	Génotype 2/2 + 2.8/2.8	Genotyp 2/2 + 2.8/2.8		2
	Genotype 3.8/ 3.8 + 2.8/2.8	Génotype 3.8/ 3.8 + 2.8/2.8	Genotyp 3.8/ 3.8 + 2.8/2.8	A 632	3
	Genotype 3.8/3.8 + 5/5	Génotype 3.8/3.8 + 5/5	Genotyp 3.8/3.8 + 5/5	F 252	4
	Genotype 3.8/ 3.8 + 2.8/5	Génotype 3.8/ 3.8 + 2.8/5	Genotyp 3.8/ 3.8 + 2.8/5	Tekila	
	Genotype n/n + 5/5	Génotype n/n + 5/5	Genotyp n/n + 5/5	H 108	5
	Genotype 2/3.8 + 5/5	Génotype 2/3.8 + 5/5	Genotyp 2/3.8 + 5/5	Bekefix	6
	Genotype 2/3.8 + 2.8/5	Génotype 2/3.8 + 2.8/5	Genotyp 2/3.8 + 2.8/5	Furio	
42.1 <u>Inbred lines only:</u> allele expression at loci Pgm 1 + Pgm 2 <u>Seulement lignées:</u> expression de l'allèle occupant les loci Pgm 1 + Pgm 2 <u>Nur Inzuchtlinien:</u> Allel-Ausprägung in Loci Pgm 1 + Pgm 2	Genotype 9/9 + 1/1	Génotype 9/9 + 1/1	Genotyp 9/9 + 1/1	F 2	1
	Genotype 9/9 + 3/3	Génotype 9/9 + 3/3	Genotyp 9/9 + 3/3	F 16	2
	Genotype 16/16 + 4/4	Génotype 16/16 + 4/4	Genotyp 16/16 + 4/4		
	Genotype 9/9 + 4/4	Génotype 9/9 + 4/4	Genotyp 9/9 + 4/4	A 632	3
	Genotype 9/9 + 8/8	Génotype 9/9 + 8/8	Genotyp 9/9 + 8/8	Mo 17	4
	Genotype 16/16 + 1/1	Génotype 16/16 + 1/1	Genotyp 16/16 + 1/1		5
	Genotype 16/16 + 3/3	Génotype 16/16 + 3/3	Genotyp 16/16 + 3/3		
	Genotype 16/16 + 8/8	Génotype 16/16 + 8/8	Genotyp 16/16 + 8/8		6

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
42.2 <u>Hybrids and open-pollinated varieties only</u> : allele expression at loci Pgm 1 + Pgm 2 <u>Seulement hybrides et variétés à fécondation libre</u> : expression de l'allèle occupant les loci Pgm 1 + Pgm 2 <u>Nur Hybriden und frei-abblühende Sorten</u> : Allel-Ausprägung in Loci Pgm 1 + Pgm 2	Genotype 9/9 + 1/1	Génotype 9/9 + 1/1	Genotyp 9/9 + 1/1	Robin	1
	Genotype 9/9 + 1/3	Génotype 9/9 + 1/3	Genotyp 9/9 + 1/3		
	Genotype 9/9 + 3/3	Génotype 9/9 + 3/3	Genotyp 9/9 + 3/3	Figaro	
	Genotype 9/9 + 3/4	Génotype 9/9 + 3/4	Genotyp 9/9 + 3/4		
	Genotype 9/9 + 4/4	Génotype 9/9 + 4/4	Genotyp 9/9 + 4/4	Axon	
	Genotype 9/9 + 1/4	Génotype 9/9 + 1/4	Genotyp 9/9 + 1/4		
	Genotype 16/16 + 4/4	Génotype 16/16 + 4/4	Genotyp 16/16 + 4/4		
	Genotype 9/9 + 8/8	Génotype 9/9 + 8/8	Genotyp 9/9 + 8/8		
	Genotype 9/9 + 3/8	Génotype 9/9 + 3/8	Genotyp 9/9 + 3/8	Occitan	
	Genotype 9/9 + 4/8	Génotype 9/9 + 4/8	Genotyp 9/9 + 4/8		
	Genotype 9/9 + 1/8	Génotype 9/9 + 1/8	Genotyp 9/9 + 1/8		3
	Genotype 16/16 + 1/1	Génotype 16/16 + 1/1	Genotyp 16/16 + 1/1		4
	Genotype 16/16 + 1/3	Génotype 16/16 + 1/3	Genotyp 16/16 + 1/3		
	Genotype 16/16+ 3/3	Génotype 16/16 + 3/3	Genotyp 16/16 + 3/3		
Genotype 16/16 + 8/8	Génotype 16/16+ 8/8	Genotyp 16/16 + 8/8		5	
43. Allele expression at locus Pgi 1 Expression de l'allèle occupant le locus Pgi 1 Allel-Ausprägung in Locus Pgi 1	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	A 239	1
	Genotype 5/5	Génotype 5/5	Genotyp 5/5	A 632	2
	Genotype 4/5	Génotype 4/5	Genotyp 4/5	Artist	3
44.1 <u>Inbred lines only</u> : Allele expression at locus Acp 1 <u>Seulement lignées</u> : expression de l'allèle occupant le locus Acp 1 <u>Nur Inzuchtlinien</u> : Allel-Ausprägung in Locus Acp 1	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	F 2	1
	Genotype 3/3	Génotype 3/3	Genotyp 3/3	A 239	2
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	A 632	3
	Genotype 6/6	Génotype 6/6	Genotyp 6/6	F 1444	4

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
44.2 <u>For hybrids and open-pollinated varieties only:</u> Allele expression at locus Acp 1	Genotype 2/3	Génotype 2/3	Genotyp 2/3	Azur	1
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2		
	Genotype 3/3	Génotype 3/3	Genotyp 3/3		
	Genotype 4/6	Génotype 4/6	Genotyp 4/6	Contessa	2
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4		
	Genotype 6/6	Génotype 6/6	Genotyp 6/6		
<u>Seulement pour les hybrides et les variétés à fécondation libre:</u> expression de l'allèle occupant le locus Acp 1	Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Occitan	3
	Genotype 2/6	Génotype 2/6	Genotyp 2/6		4
<u>Nur für Hybriden und freiabblühende Sorten:</u> Allel-Ausprägung in Locus Acp 1	Genotype 3/4	Génotype 3/4	Genotyp 3/4	Marshall	5
	Genotype 3/6	Génotype 3/6	Genotyp 3/6		6
45. Allele expression at locus Dia 1	Genotype 8/8	Génotype 8/8	Genotyp 8/8	F 2	1
	Genotype 12/12	Génotype 12/12	Genotyp 12/12	Co 158	2
	Genotype 8/12	Génotype 8/12	Genotyp 8/12	Bastion	3
Allel-Ausprägung in Locus Dia 1					
46. Allele expression at locus Adh 1	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	F 1444	1
	Genotype 6/6	Génotype 6/6	Genotyp 6/6	F 2	2
	Genotype 4/6	Génotype 4/6	Genotyp 4/6	Bristol	3
Expression d'allèle occupant le locus Adh 1					
Allel-Ausprägung in Locus Adh 1					

Partie III

Description de la méthode pour l'analyse des
Isoenzymes de Zea mays L.

1. Nombre de coléoptiles par test

- pour la vérification de la formule : 20 coléoptiles pour les lignées
2 coléoptiles pour les hybrides simples
6 coléoptiles pour les hybrides trois voies
- pour l'examen de la distinction, de l'homogénéité et de la stabilité : 20 coléoptiles au minimum pour les lignées, les hybrides et les variétés à fécondation libre.

2. Matériel et équipement

Tout système d'électrophorèse horizontal peut être utilisé à condition que les gels puissent être maintenus à 4°C. Une épaisseur de gel de 10mm est recommandée. Le générateur utilisé doit pouvoir fournir un courant de tension constante.

3. Produits chimiques

Tous les produits chimiques doivent être de qualité "Réactif analytique," voire mieux.

3.1 Produits chimiques pour l'extraction des enzymes

Acide L-ascorbique
Acide L-ascorbique sel du sodium Na
Saccharose

3.2 Produits chimiques pour l'électrophorèse

Bleu de bromophénol
Acide citrique monohydraté
L-histidine
Amidon hydrolysé, pour électrophorèse (Sigma s-4501 ou équivalent)

3.3 Produits chimiques pour la coloration des enzymes

Acide acétique glacial
2,6-Dichlorophénol indophénol (Na)
Ethanol
Acide éthylènediamine tétracétique (Na₂) (EDTA - Na₂)
Sel GBC de Fast Garnet
D-fructose 6-phosphate (sel du sodium)
Glucose 1-phosphate déshydrogénase (Serva 22820 ou 22822 ou sigma G5885)
Acide chlorhydrique (HCl)
Acide DL isocitrique (Na₃)
Chlorure de magnésium, 6 H₂O
Acide DL-malique
Diméthylthiazol diphényl tétrazolium (MTT)
β -nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)
β -nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH)
β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP)
Nitro-bleu de tétrazolium (NBT)
Hydroxyde de sodium (NaOH)
Acide 1-naphtyl phosphate
Acide 6-phospho gluconique, 2 H₂O (Na₃)
Méthosulfate de phénazine (PMS)
Polyvinylpyrrolidone 40 (PVP-40)
Acétate de sodium trihydraté
Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane (Tris)

4. Solutions

4.1 Solutions d'extraction

Saccharose : 16,7 g
Ascorbate de sodium : 8,3 g
Ajuster à 100 ml avec de l'eau désionisée et à un pH 7,4 avec de l'acide L-ascorbique

4.2 Tampons d'électrophorèse

4.2.1 Tampons pour SGE, pH 6,5

4.2.1.1 Solution-mère : Histidine - citrate 0,364 M
L-histidine : 50,44 g
Acide citrique, 1 H₂O : 8,20 g
Ajuster à 1 litre avec de l'eau désionisée.

- 4.2.1.2 Tampon de migration : Histidine - citrate 0,072 M, pH 6,5
(solution-mère diluée au 1/5)
400 ml de solution-mère (4.2.1.1), ajustés à 2 litres avec de l'eau désionisée
- 4.2.1.3 Tampon de gel : Histidine-citrate 0,024 M
(solution-mère diluée au 1/15)
80 ml de solution-mère (4.2.1.1), ajustés à 1200 ml avec de l'eau désionisée
- 4.2.2 Tampons pour SGE, pH 5,0
- 4.2.2.1 Tampon de migration : Histidine-citrate 0,074 M, pH 5,0
L-histidine : 15,5 g
Acide citrique, 1 H₂O : 10, 0 g
Ajuster à 2 litres avec de l'eau désionisée
- 4.2.2.2 Tampon de gel : Histidine-citrate 0,006 M
(Tampon de migration dilué au 1/12)
100 ml de tampon de migration (4.2.2.1), ajustés à 1200 ml avec de l'eau désionisée
- 4.2.2.3 Solution de bleu de bromophénol
50 mg de bleu de bromophénol dissous dans 100 ml d'eau désionisée
- 4.3 Solutions de révélation
- 4.3.1 Solutions-mères
- 4.3.1.1 Tris-HCl 1 M, pH 8,0
Tris : 121,1 g
Eau désionisée qsp : 1 litre
Ajuster à pH 8,0 avec HCl à 50%
- 4.3.1.2 Tris-HCl 1 M, pH 9,1
Tris : 121,1 g
Eau désionisée qsp : 1 litre
Ajuster à pH 9,1 avec HCl à 50%
- 4.3.1.3 1 M d'acétate de sodium, pH 5,0
136,08 g d'acétate de sodium trihydrate, ajusté à 1 litre avec de l'eau désionisée et à pH 5,0 avec de l'acide acétique glacial
- 4.3.1.4 Solution de MTT
MTT : 1,0 g
Eau désionisée qsp : 100 ml
- 4.3.1.5 Solution de NBT
NBT : 1,0 g
Eau désionisée qsp : 100 ml
- 4.3.1.6 Solution de PMS
PMS : 200 mg
Eau désionisée qsp : 100 ml
- 4.3.1.7 Solution de MgCl₂
Chlorure de magnésium, 6H₂O : 21,35 g
Eau désionisée qsp : 100 ml
- 4.3.1.8 Solution d'acide malique
Acide DL-malique : 5 g
Eau désionisée qsp : 100 ml
Ajuster à pH 8,0 avec NaOH 1 M
- 4.3.2 Solutions de révélation (volume : 200 ml)
- 4.3.2.1 Solution de révélation des MDH et ADH
20 ml de Tris-HCl, pH 9,1 (4.3.1.2)
+ 180 ml d'eau désionisée
+ 8 ml de solution d'acide malique (4.3.1.8)
+ 10 ml d'éthanol
+ 80 mg de NAD
+ 4 ml de solution de NBT (4.3.1.5)
+ 3 ml de solution de PMS (4.3.1.6)
- 4.3.2.2 Solution de révélation des IDH
20 ml de Tris-HCl, pH 8,0 (4.3.1.1)
+ 180 ml d'eau désionisée
+ 500 mg d'acide DL-isocitrique-sodium Na₃
+ 10 ml de solution de MgCl₂ (4.3.1.7)
+ 6 mg de NADP
+ 4 ml de solution de MTT (4.3.1.4)
+ 3 ml de solution de PMS (4.3.1.6)

- 4.3.2.3 Solution de révélation des PGI et PGD
10 ml de Tris-HCL, pH 8,0 (4.3.1.1)
+ 190 ml d'eau désionisée
+ 200 mg de fructose 6-phosphate (Na₂)
+ 80 mg d'acide 6-phospho gluconique, 3 H₂O (Na₃)
+ 2 ml de solution de MgCl₂ (4.3.1.7)
+ 20 mg de NADP
+ 2 ml de solution de MTT (4.3.1.4)
+ 3 ml de solution de PMS (4.3.1.6)
+ 50 unités de glucose 6-phosphate déshydrogénase
- 4.3.2.4 Solution de révélation des PGM
20 ml de Tris-HCL, pH 8,0 (4.3.1.1)
+ 180 ml d'eau désionisée
+ 1 g de phosphate de glucose
+ 200 mg d'EDTA (Na₂)
+ 4 ml de solution de MgCl₂ (4.3.1.7)
+ 20 mg de NADP
+ 3 ml de solution de MTT (4.3.1.4)
+ 2 ml de solution de PMS (4.3.1.6)
+ 100 unités de glucose 6-phosphate déshydrogénase
- 4.3.2.5 Solution de révélation des ACP
4 ml d'acétate de sodium, pH 5,0 (4.3.1.3)
+ 196 ml d'eau désionisée
+ 200 mg de sel GBC de Fast Garnet
+ 492 mg de 1-naphthylphosphate, 2 H₂O (Na₂)
+ 2 ml de solution de MgCl₂ (4.3.1.7)
- 4.3.2.6 Solution de révélation des DIA
20 ml de Tris-HCL, pH 9,1 (4.3.1.2)
+ 180 ml d'eau désionisée
+ 2 g de PVP-40
+ 20 mg de NADH
+ 16 ml de solution de MTT (4.3.1.4)
+ 16 mg de 2,6-dichlorophénol-indophénol-sodium Na

5. Protocole

5.1 Extraction des enzymes

Les plantules de maïs sont cultivées sur du papier de germination humidifié, à 25°C et dans l'obscurité. Au bout de six jours, les coléoptiles sont récoltés et homogénéisés à 4°C à l'aide d'un pilon, dans des micro-tubes renfermant 0,060 ml de solution d'extraction (3.1). Les extraits peuvent être conservés à -30°C.

5.2 Préparation du gel

Pour obtenir deux gels d'amidon à 12,5% (18 x 18 x 1 cm), la méthode à suivre est la suivante : mélanger 128 g d'amidon dans 1020 ml de tampon (4.2.1.3 ou 4.2.2.2) dans un flacon de Buchner de 1000 ml. Chauffer à 80°C. Dégazer le mélange pendant 40 secondes. Verser les gels dans des moules spécifiques du type décrit dans le manuel d'utilisation du matériel. La formation de bulles d'air doit être évitée. Laisser les gels refroidir à température ambiante pendant au moins deux heures et les envelopper d'un film de polyéthylène pour la conservation jusqu'au lendemain. Avant l'électrophorèse, refroidir les gels à 4°C pendant au moins une heure.

5.3 Electrophorèse

Remplir les bacs avec le volume approprié de tampon de migration (4.2.1.2 ou 4.2.2.1) préalablement refroidi à 4°C. Pratiquer une fente transversale dans le gel à 1 cm de la cathode. Imbibé de chaque extrait enzymatique (cf paragraphe 5), une mèche de papier Whatman N°3, de dimensions 15 x 2 x 1 cm. Placer ensuite les mèches dans la fente; il est possible de déposer 30 extraits pour un gel de 18 x 18 x 1 cm. A 1 cm de chaque bord du gel, insérer une mèche imbibée de solution de bleu de bromophénol (4.2.2.3). La migration électrophorétique se fait à 4°C. Appliquer une tension constante de 200 V (intensité maximale de 150 mA pour deux gels de 18 x 18 x 1 cm), pendant 20 minutes. Oter les mèches et laisser l'électrophorèse se poursuivre sous tension constante de 280 V (intensité maximale de 180 mA pour deux gels de 18 x 18 x 1 cm), jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait parcouru 14 cm (4 heures).

5.4 Révélation des enzymes

Après électrophorèse, couper le gel en tranches horizontales d'1 mm d'épaisseur. Jeter la tranche supérieure. Colorer chaque tranche de gel par incubation dans les solutions ci-après, à 37°C et dans l'obscurité :

pour les MDH et les ADH : solution 4.3.2.1,
 pour les IDH : solution 4.3.2.2,
 pour les PGI et la PGD : solution 4.3.2.3,
 pour les PGM : solution 4.3.2.4.
 pour les ACP : solution 4.3.2.5
 pour les DIA : solution 4.3.2.6

Les ACP migrent dans les quatre premiers centimètres du gel, les PGM au-dessus; il est donc possible de révéler ces deux enzymes sur la même tranche de gel, après l'avoir coupée en deux transversalement.

Les temps de révélation vont de 30 à 120 minutes. Après coloration, rincer les tranches de gel dans de l'eau distillé avant de les stocker. Pour une conservation longue, il est possible soit de sécher les gels entre deux feuilles de cellophane, soit de les stocker dans des sacs de polyéthylène scellés.

6. Reconnaissance des allèles codant des isoenzymes

6.1 Reconnaissance des allèles codant pour les MDH

6.1.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Localisation chromosomique	Locus	Allèles	
		8	Mdh1	1, 6	
		6L	Mdh2	3+3,5*, 4,5, 6	interactions
Malate déshydrogénase (MDH)	Dimère	3L	Mdh3	16, 18	intergéniques
		1L	Mmm	M, m	
		1L	Mdh4	12	interactions
		5S	Mdh5	12, 15	intergéniques

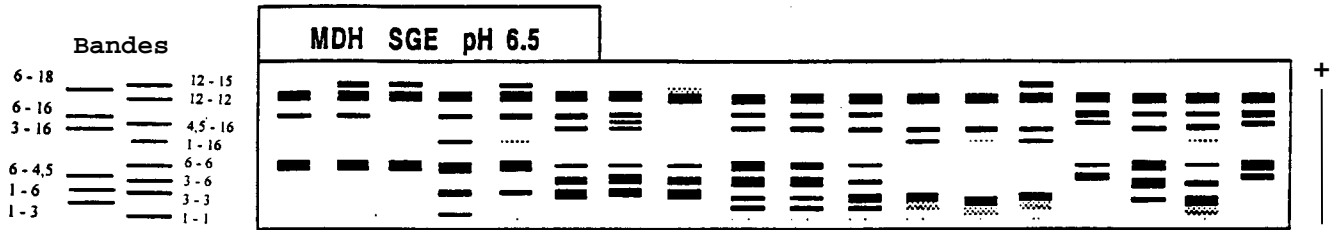
* Les enzymes codées par les allèles 3 et 3,5 présentent une mobilité électrophorétique très proches; elles ne sont donc pas considérées comme différentes.

Il existe des interactions entre les produits des gènes (sous-unités polypeptidiques) codés par Mdh1, Mdh2 et Mdh3, d'une part, et entre ceux codés par Mdh4 et Mdh5, d'autre part.

Mdh1	Génotype					Lignées témoins
	Mdh2	Mdh3	Mmm	Mdh4	Mdh5	
6/6	6/6	16	M	12	12	A239
6/6	3/3	16	M	12	12	CM7
6/6	6/6	16	M	12	15	F2
6/6	6/6	18	M	12	12	F1444
6/6	3/3	18	M	12	12	CO158
1/1	3/3	16	M	12	12	F252
6/6	4,5/4,5	16	M	12	12	W401

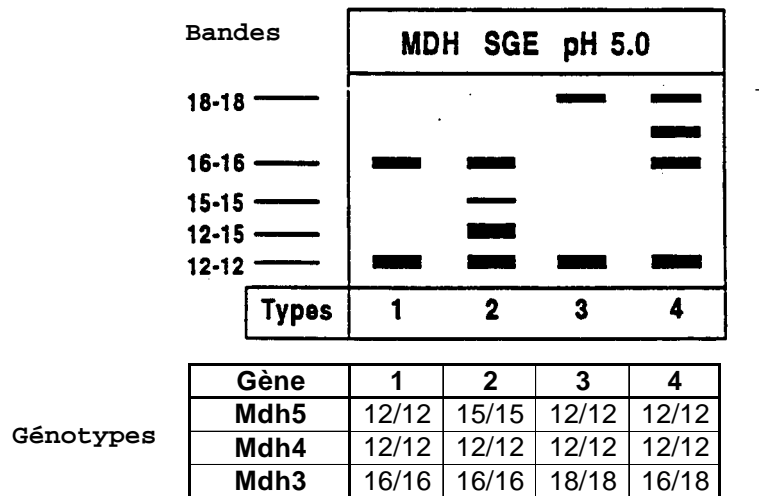
6.1.2 Schématisation des zymogrammes

Pour la reconnaissance des allèles aux loci Mdh1, Mdh2 et Mdh4, il y a lieu de recourir à la SGE, à pH 6,5. Pour la reconnaissance des allèles aux loci Mdh3 et Mdh5, il y a lieu de pratiquer une deuxième SGE, à pH 5,0.



Types	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Gènes																		
Mdh5	12/12	15/15	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	15/15	12/12	12/12	12/12
Mdh4	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
Mdh3	16/16	16/16	18/18	16/16	16/16	16/16	18/18	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16
Mdh2	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	4,5/4,5	3/6	3/6	3/6
Mdh1	6/6	6/6	6/6	1/1	1/6	6/6	6/6	6/6	6/6	1/6	1/1	1/6	1/1	1/1	6/6	6/6	1/6	6/6

En raison de leur faible intensité, certaines bandes sont dessinées en pointillés. D'autres se chevauchent et ne peuvent donc pas être figurées en tant que bandes distinctes.



6.2 Reconnaissance des allèles codant pour les IDH

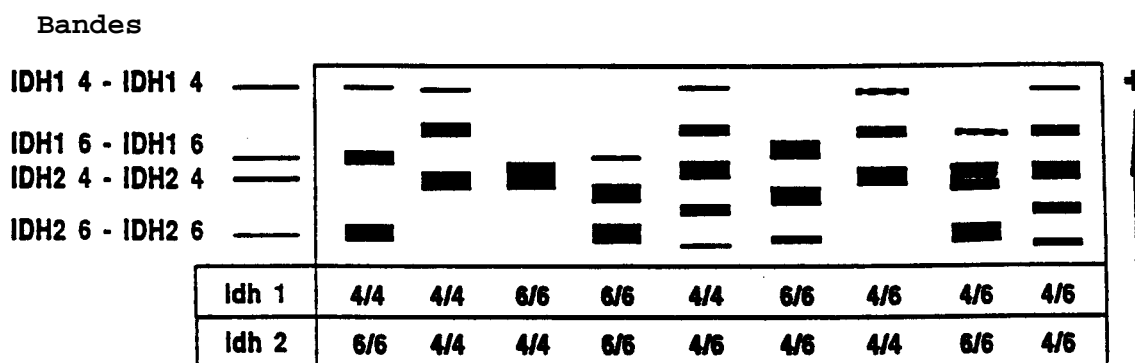
6.2.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Localisation chromosomique	Locus	Allèles	
Isocitrate		8	ldh1	4, 6	interactions
déshydrogénase	Dimeric				intergéniques
		6	ldh2	4, 6	
(IDH)					

Il existe des interactions entre les produits des gènes (sous-unités polypeptiques) codés par Idh 1 et Idh 2.

Génotype		Lignées témoins
Idh1	Idh2	
4/4	4/4	F16
4/4	6/6	A632
6/6	4/4	F1110
6/6	6/6	CO158

6.2.2 Schématisation des zymogrammes



En raison de leur faible intensité, certaines bandes sont dessinées en pointillés. D'autres se chevauchent et ne peuvent donc pas être figurées en tant que bandes distinctes.

6.3 Reconnaissance des allèles codant pour les PGD

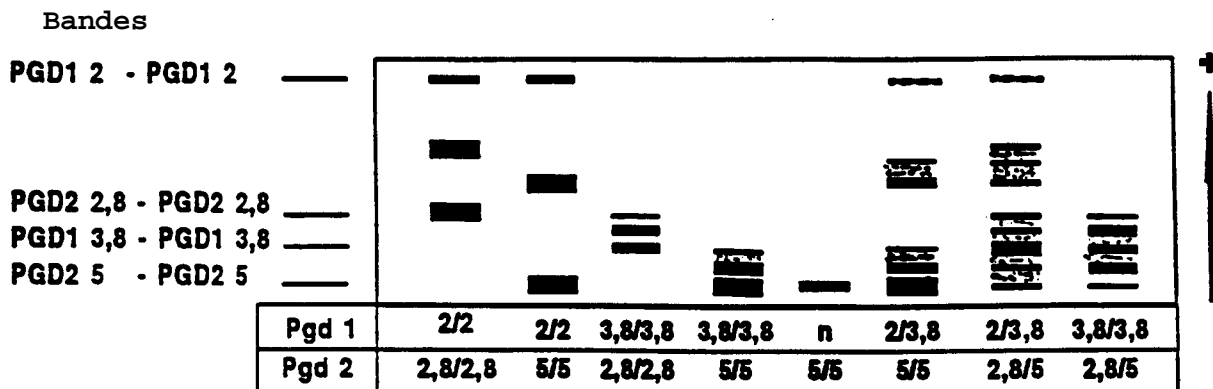
6.3.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Localisation chromosomique	Locus	Alèles	
6-phosphogluconate déshydrogénase	Dimère	6	Pgd1	2, 3, 8, n	
(PGD)		3L	Pgd2	2, 8, 5	interactions intergéniques

Il existe des interactions entre les produits des gènes (sous-unités polypeptidiques) codés par Pgd 1 et Pgd 2.

Génotype		Lignées témoins
Pgd1	Pgd2	
2/2	5/5	A239
3,8/3,8	2,8/2,8	A632
3,8/3,8	5/5	F2
n/n	5/5	H108

6.3.2 Schématisation des zymogrammes



En raison de leur faible intensité, certaines bandes sont dessinées en pointillés. D'autres se chevauchent et ne peuvent donc pas être figurées en tant que bandes distinctes.

6.4 Reconnaissance des allèles pour les PGM

6.4.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Localisation chromosomique	Locus	Allèles
	Monomère	1L	Pgm1	9, 16
Phosphoglucomutase				1
	Monomère	5S	Pgm2	3
(PGM)				4
				8

Génotype		Lignées témoins
Pgm1	Pgm2	
9/9	1/1	F2
9/9	3/3	F16
9/9	4/4	A632
9/9	8/8	MO17

1. Note relative aux PGM

Les combinaisons d'allèles - 9/9+1/1, 9/9+1/4 et 9/9+1/3,
- 9/9+3/3, 9/9+1/3 et 9/9+3/4, 16/16+4/4 et 9/16+4/4 et 9/16+3/4,
- 9/9+1/1, 9/9+4/4 et 9/9+3/4 et
- 9/9+8/8, 9/9+3/8 et 9/9+4/8

produisent respectivement des zymogrammes identiques ou étroitement apparentés. Par conséquent, pour le caractère 42.1

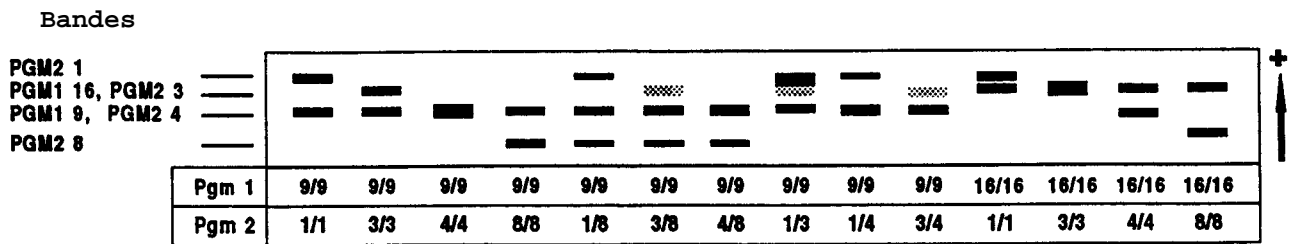
la note 1 peut être 9/9+1/4 ou 9/9+1/3

la note 2 peut être 9/9+1/3 ou 9/9+3/4 ou 9/16+3/4,

la note 3 peut être 9/9+3/4 et

la note 4 peut être 9/9+3/8 ou 9/9+4/8.

6.4.2 Schématisation des zymogrammes



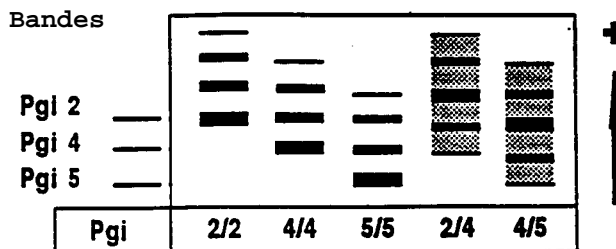
6.5 Reconnaissance des allèles codant pour les PGI

6.5.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Localisation chromosomique	Locus	Allèles
Phosphoglucoisomérase (PGI)	Dimère	1L	Pgi1	4
				5

Génotype	Lignées témoins
Pgi1	
4/4	A239
5/5	A632

6.5.2 Schématisation des zymogrammes



6.6 Reconnaissance des allèles codant pour les ACP

6.6.1 Interprétation génétique des zymogrammes

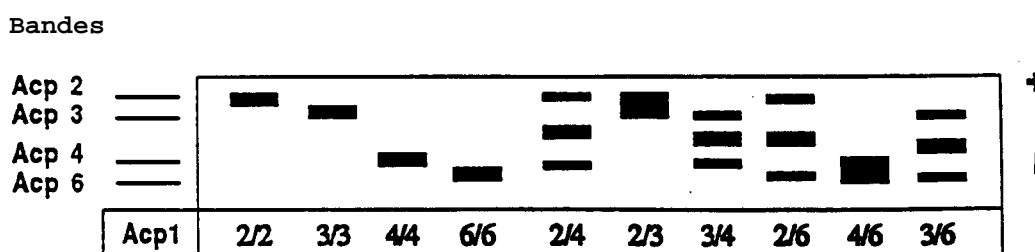
Enzyme	Structure quaternaire	Localisation chromosomique	Locus	Allèles
Acido phosphatase	Dimère	9L	Acp1	2
				3
				4
(ACP)				6

Génotype	Lignées témoins
Acp1	
2/2	F2
3/3	A239
4/4	A632
6/6	F1444

2. Note relative aux ACP

Les allèles 3/3 et 2/3 ainsi que les allèles 2/2 et 3/3 produisent respectivement des zymogrammes très proches. Par conséquent, pour le caractère 44.1, la note 1 peut être 2/2 ou 2/3 et la note 2 peut être 3/3 ou 2/3. Les allèles 4/4 et 4/6 et les allèles 6/6 et 4/6 produisent respectivement des zymogrammes très proches. Par conséquent, pour le caractère 44.1, la note 3 peut être 4/4 ou 4/6 et la note 4 peut être 6/6 ou 4/6.

6.6.2 Schématisation des zymogrammes



Etant donné que certaines bandes se chevauchent, il n'est pas possible de les figurer en tant que bandes distinctes.

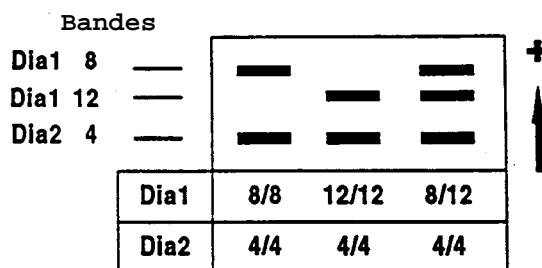
6.7 Reconnaissance des allèles pour les DIA

6.7.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Localisation chromosomique	Locus	Allèles
Diaphorase	Monomère	2	Dia1	8
				12
(DIA)	Dimère	1L	Dia2	4

Génotype		Lignées témoins
Dia1	Dia2	
8/8	4/4	F2
12/12	4/4	CO158

6.7.2 Schématisation des zymogrammes



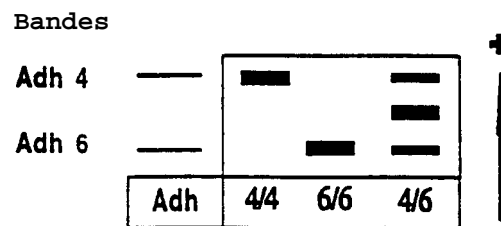
6.8 Reconnaissance des allèles pour les ADH

6.8.1 Intérpretation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Localisation chromosomique	Locus	Allèles
Alcool déshydrogénase (ADH)	Dimère	1L	Adh1	4 6

Génotype	Exemple de Lignées
Adh1	
4/4	F1444
6/6	F2

6.8.2 Schématisation des zymogrammes



6.9 Description des lignées et hybrides témoins

Voir pages 46 et 47 à la fin de l'annexe.

[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 Routinemerkmale verwendet werden, sondern nur auf Antrag oder mit Zustimmung des Anmelders der Kandidatensorte.

Für die Analyse von Enzymen wird die Stärke-Gel-Elektrophorese empfohlen. Damit lässt sich Polymorphismus von Enzymen (d.h. 16 Enzymloci) nachweisen. Die genetische Kontrolle ist für jeden Enzymlocus bekannt. Zur Beschreibung der Methode und für die genetische Interpretation der Zymogramme wird auf das technische Bulletin von Stuber, Wendel, Goodman und Smith (1988) und das Technische Handbuch von Grenèche und Giraud (1994) verwiesen. Die Allele sind mit Bandnummern gemäss der von Cardy, Stuber und Goodman (1980) gegebenen Definition (siehe Kapitel IX, Literatur) bezeichnet.

Teil II

Merkmale, die sich bei Verwendung der Elektrophorese ergeben

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
35. Allele expression at locus Mdh 1 Expression de l'allèle occupant le locus Mdh 1 Allel-Ausprägung in Locus Mdh 1	genotype 1/1 genotype 1/6 in interaction with allele 6 of Mdh 2	génotype 1/1 génotype 1/6 en interaction avec allele 6 de Mdh 2	Genotyp 1/1 Genotyp 1/6 in Interaktion mit Allel 6 von Mdh 2	F252 Tau	1
	genotype 6/6	génotype 6/6	Genotyp 6/6	A239	2
	genotype 1/6 but not in interaction with allele 6 of Mdh 2	génotype 1/6 mais sans interaction avec allèle 6 de Mdh 2	Genotyp 1/6 jedoch ohne Interaktion mit Allel 6 von Mdh 2	Marshall	3
36. Allele expression at locus Mdh 2 Expression de l'allèle occupant le locus Mdh 2 Allel-Ausprägung in Locus Mdh 2	Genotype 3/3 Genotype 3/4.5	Génotype 3/3 Génotype 3/4.5	Genotyp 3/3 Genotyp 3/4.5	F252 Robin	1
	Genotype 4.5/4.5	Génotype 4.5/4.5	Genotyp 4.5/4.5	W 401	2
	Genotype 6/6	Génotype 6/6	Genotyp 6/6	A 239	3
	Genotype 3/6 Genotype 4.5/6	Génotype 3/6 Génotype 4.5/6	Genotyp 3/6 Genotyp 4.5/6	Azur	4 5
37. Allele expression at locus Mdh 3 Expression de l'allèle occupant le locus Mdh 3 Allel-Ausprägung in Locus Mdh 3	Genotype 16/16 Genotype 18/18	Génotype 16/16 Génotype 18/18	Genotyp 16/16 Genotyp 18/18	F252 Co 158	1 2
	Genotype 16/18	Génotype 16/18	Genotyp 16/18	Figaro	3
38. Allele expression at locus Mmm Expression de l'allèle occupent le locus Mmm Allel-Ausprägung in Locus Mmm	Genotype M/M Genotype M/m	Génotype M/M Génotype M/m	Genotyp M/M Genotyp M/m	F 252	1
	Genotype m/m	Génotype m/m	Genotyp m/m		2
39. Allele expression at loci Mdh 4 + Mdh 5 Expression de l'allèle occupant les loci Mdh 4 + Mdh 5 Allel-Ausprägung in Loci Mdh 4 + Mdh 5	Genotype 12/12 + 12/12	Génotype 12/12 + 12/12	Genotyp 12/12 + 12/12	F 252	1
	Genotype 12/12 + 15/15 Genotype 12/12 + 12/15	Génotype 12/12 + 15/15 Génotype 12/12 + 12/15	Genotyp 12/12 + 15/15 Genotyp 12/12 + 12/15	F 2 Robin	2

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note	
40. Allele expression at loci Idh 1 + Idh 2	Genotype 4/4 + 4/4	Génotype 4/4 + 4/4	Genotyp 4/4 + 4/4	A 239	1	
	Genotype 4/6 + 4/4	Génotype 4/6 + 4/4	Genotyp 4/6 + 4/4			
	Expression de l'allèle occupant les loci Idh 1 + Idh 2	Genotype 4/4 + 6/6	Génotype 4/4 + 6/6	Genotyp 4/4 + 6/6	CM 7	2
	Allel-Ausprägung in Loci Idh 1 + Idh 2	Genotype 6/6 + 4/4	Génotype 6/6 + 4/4	Genotyp 6/6 + 4/4	F 1110	3
		Genotype 6/6 + 6/6	Génotype 6/6 + 6/6	Genotyp 6/6 + 6/6	Co 158	4
		Genotype 4/6 + 6/6	Génotype 4/6 + 6/6	Genotyp 4/6 + 6/6	Bonny	
	Genotype 4/4 + 4/6	Génotype 4/4 + 4/6	Genotyp 4/4 + 4/6	Axon	5	
	Genotype 4/6 + 4/6	Génotype 4/6 + 4/6	Genotyp 4/6 + 4/6	Loft		
	41. Allele expression at loci Pgd 1 + Pgd 2	Genotype 2/2 + 5/5	Génotype 2/2 + 5/5	Genotyp 2/2 + 5/5	W 401	1
		Expression de l'allèle occupant les loci Pgd 1 + Pgd 2	Genotype 2/2 + 2.8/2.8	Génotype 2/2 + 2.8/2.8	Genotyp 2/2 + 2.8/2.8	
	Allel-Ausprägung in Loci Pgd 1 + Pgd 2	Genotype 3.8/ 3.8 + 2.8/2.8	Génotype 3.8/ 3.8 + 2.8/2.8	Genotyp 3.8/ 3.8 + 2.8/2.8	A 632	3
		Genotype 3.8/3.8 + 5/5	Génotype 3.8/3.8 + 5/5	Genotyp 3.8/3.8 + 5/5	F 252	4
	Genotype 3.8/ 3.8 + 2.8/5	Génotype 3.8/ 3.8 + 2.8/5	Genotyp 3.8/ 3.8 + 2.8/5	Tekila		
	Genotype n/n + 5/5	Génotype n/n + 5/5	Genotyp n/n + 5/5	H 108	5	
	Genotype 2/3.8 + 5/5	Génotype 2/3.8 + 5/5	Genotyp 2/3.8 + 5/5	Bekefix	6	
	Genotype 2/3.8 + 2.8/5	Génotype 2/3.8 + 2.8/5	Genotyp 2/3.8 + 2.8/5	Furio		
42.1 <u>Inbred lines only:</u> allele expression at loci Pgm 1 + Pgm 2	Genotype 9/9 + 1/1	Génotype 9/9 + 1/1	Genotyp 9/9 + 1/1	F 2	1	
	Genotype 9/9 + 3/3	Génotype 9/9 + 3/3	Genotyp 9/9 + 3/3	F 16	2	
	<u>Seulement lignées:</u> expression de l'allèle occupant les loci Pgm 1 + Pgm 2	Genotype 16/16 + 4/4	Génotype 16/16 + 4/4	Genotyp 16/16 + 4/4		
	<u>Nur Inzuchtlinien:</u> Allel-Ausprägung in Loci Pgm 1 + Pgm 2	Genotype 9/9 + 4/4	Génotype 9/9 + 4/4	Genotyp 9/9 + 4/4	A 632	3
		Genotype 9/9 + 8/8	Génotype 9/9 + 8/8	Genotyp 9/9 + 8/8	Mo 17	4
		Genotype 16/16 + 1/1	Génotype 16/16 + 1/1	Genotyp 16/16 + 1/1		5
		Genotype 16/16 + 3/3	Génotype 16/16 + 3/3	Genotyp 16/16 + 3/3		
	Genotype 16/16 + 8/8	Génotype 16/16 + 8/8	Genotyp 16/16 + 8/8		6	

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note	
42.2 <u>Hybrids and open-pollinated varieties only</u> : allele expression at loci Pgm 1 + Pgm 2 <u>Seulement hybrides et variétés à fécondation libre</u> : expression de l'allèle occupant les loci Pgm 1 + Pgm 2 <u>Nur Hybriden und frei-abblühende Sorten</u> : Allel-Ausprägung in Loci Pgm 1 + Pgm 2	Genotype 9/9 + 1/1	Génotype 9/9 + 1/1	Genotyp 9/9 + 1/1	Robin	1	
	Genotype 9/9 + 1/3	Génotype 9/9 + 1/3	Genotyp 9/9 + 1/3			
	Genotype 9/9 + 3/3	Génotype 9/9 + 3/3	Genotyp 9/9 + 3/3			
	Genotype 9/9 + 3/4	Génotype 9/9 + 3/4	Genotyp 9/9 + 3/4			Figaro
	Genotype 9/9 + 4/4	Génotype 9/9 + 4/4	Genotyp 9/9 + 4/4			
	Genotype 9/9 + 1/4	Génotype 9/9 + 1/4	Genotyp 9/9 + 1/4			
	Genotype 16/16 + 4/4	Génotype 16/16 + 4/4	Genotyp 16/16 + 4/4	Axon		
	Genotype 9/9 + 8/8	Génotype 9/9 + 8/8	Genotyp 9/9 + 8/8		Occitan	2
	Genotype 9/9 + 3/8	Génotype 9/9 + 3/8	Genotyp 9/9 + 3/8			
	Genotype 9/9 + 4/8	Génotype 9/9 + 4/8	Genotyp 9/9 + 4/8			
	Genotype 9/9 + 1/8	Génotype 9/9 + 1/8	Genotyp 9/9 + 1/8	3		
	Genotype 16/16 + 1/1	Génotype 16/16 + 1/1	Genotyp 16/16 + 1/1		4	
	Genotype 16/16 + 1/3	Génotype 16/16 + 1/3	Genotyp 16/16 + 1/3			
	Genotype 16/16+ 3/3	Génotype 16/16 + 3/3	Genotyp 16/16 + 3/3			
	Genotype 16/16 + 8/8	Génotype 16/16+ 8/8	Genotyp 16/16 + 8/8		5	
	43. Allele expression at locus Pgi 1 Expression de l'allèle occupant le locus Pgi 1 Allel-Ausprägung in Locus Pgi 1	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	A 239	1
		Genotype 5/5	Génotype 5/5	Genotyp 5/5	A 632	2
		Genotype 4/5	Génotype 4/5	Genotyp 4/5	Artist	3
	44.1 <u>Inbred lines only</u> : Allele expression at locus Acp 1 <u>Seulement lignées</u> : expression de l'allèle occupant le locus Acp 1 <u>Nur Inzuchtlinien</u> : Allel-Ausprägung in Locus Acp 1	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	F 2	1
Genotype 3/3		Génotype 3/3	Genotyp 3/3	A 239	2	
Genotype 4/4		Génotype 4/4	Genotyp 4/4	A 632	3	
Genotype 6/6		Génotype 6/6	Genotyp 6/6	F 1444	4	

Characteristics Caractères Merkmale	English	français	deutsch	Example Varieties Exemples Beispielssorten	Note
44.2 <u>For hybrids and open-pollinated varieties only:</u> Allele expression at locus Acp 1 <u>Seulement pour les hybrides et les variétés à fécondation libre:</u> expression de l'allèle occupant le locus Acp 1 <u>Nur für Hybriden und freiabblühende Sorten:</u> Allel-Ausprägung in Locus Acp 1	Genotype 2/3	Génotype 2/3	Genotyp 2/3	Azur	1
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2		
	Genotype 3/3	Génotype 3/3	Genotyp 3/3		
	Genotype 4/6	Génotype 4/6	Genotyp 4/6	Contessa	2
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4		
	Genotype 6/6	Génotype 6/6	Genotyp 6/6		
Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Occitan	3	
	Genotype 2/6	Génotype 2/6	Genotyp 2/6		4
	Genotype 3/4	Génotype 3/4	Genotyp 3/4	Marshall	5
Genotype 3/6	Génotype 3/6	Genotyp 3/6		6	
45. Allele expression at locus Dia 1 Expression de l'allèle occupant le locus Dia 1 Allel-Ausprägung in Locus Dia 1	Genotype 8/8	Génotype 8/8	Genotyp 8/8	F 2	1
	Genotype 12/12	Génotype 12/12	Genotyp 12/12	Co 158	2
	Genotype 8/12	Génotype 8/12	Genotyp 8/12	Bastion	3
46. Allele expression at locus Adh 1 Expression d'allèle occupant le locus Adh 1 Allel-Ausprägung in Locus Adh 1	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	F 1444	1
	Genotype 6/6	Génotype 6/6	Genotyp 6/6	F 2	2
	Genotype 4/6	Génotype 4/6	Genotyp 4/6	Bristol	3

Teil III

Beschreibung der SGE-Methode für die
Analyse von Isoenzymen von Zea mays L.

1. Anzahl der Keimscheiden pro Prüfung

- zur Ueberprüfung der Formel: 20 Keimscheiden jeweils von Inzuchtlinien
2 Keimscheiden von Einfachhybriden
6 Keimscheiden von 3-Weghybriden
- für die Prüfung der Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit: mindestens 20 Keimscheiden für Inzuchtlinien, Hybriden und freiabblühende Sorten.

2. Geräte und Ausrüstung

Verwendet werden kann jedes geeignete horizontale Elektrophorese-System unter der Voraussetzung, dass die Gele auf einer Temperatur von 4° C gehalten werden können. Die verwendete Energiequelle sollte sowohl konstante Stromstärke als auch eine konstante Stromspannung liefern.

3. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sollten mindestens Analysenreinheit aufweisen.

3.1 Chemikalien für Enzym-Extraktion

L-Ascorbinsäure
L-Ascorbinsäure Na-Salz
Sucrose

3.2 Chemikalien für Elektrophorese

Bromphenolblau
Zitronensäure-Monohydrat
L-Histidin
Hydrolysierte Stärke für Elektrophorese (Sigma s-4501 oder gleichwertig)

3.3 Chemikalien zur Enzymfärbung

Eisessig
2,6-Dichlorophenol-indophenol Na-Salz
Ethanol
Ethylenediamin-Tetraessigsäure Na₂-Salz (EDTA)
Fast Garnet-GBC-Salz
D-Fructose 6 Phosphat Na₂-Salz
Glucose 1-Phosphat-Dehydrogenase (Serva 22820 oder 22822 oder Sigma G5885)
Salzsäure (HCl)
DL-Isozitronensäure Na₃-Salz
Magnesium-Chlorid-Hexahydrat
DL-Aepfelsäure
Dimethylthiazol-Diphenyl-Tetrazolium (MTT)
β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD)
β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid reduziert (NADH)
β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP)
Nitro-blue-Tetrazolium (NBT)
Natriumhydroxid (NaOH)
1-Naphtylphosphorsäure Na₃-Salz
6-Phosphogluconsäure Na₃-Salz-Dihydrat
Phenazin-Methosulfat (PMS)
Polyvinylpyrrolidon 40 (PVP-40)
Natriumacetat-Trihydrat
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)

4. Lösungen

4.1 Extraktionslösung

16,7 g Sucrose
8,3 g Natrium-Ascorbat, mit entionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und mit L-Ascorbinsäure auf pH 7,4 eingestellt.

4.2 Elektrophoresepuffer

4.2.1 Puffer für SGE pH 6,5

4.2.1.1 Stammlösung: 0,364 M L-Histidin-Citrat

50,44 g L-Histidin-Citrat

8,20 g Zitronensäure-Monohydrat, mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt

4.2.1.2 Elektrophoresepuffer: 0,072 M L-Histidin-Citrat pH 6,5 (Stammlösung 1 in 5 verdünnt)

- 400 ml Stammlösung (4.2.1.1), mit entionisiertem Wasser auf 2 Liter aufgefüllt
- 4.2.1.3 Gelpuffer: 0,024 M L-Histidin-Citrat
(Stammlösung 1 in 15 verdünnt)
80 ml Stammlösung (4.2.1.1), mit entionisiertem Wasser auf 1200 ml aufgefüllt
- 4.2.2 Puffer für SGE pH 5,0
- 4.2.2.1 Elektrophoresepuffer: 0,074 M L-Histidin-Citrat pH 5,0
15,5 g L-Histidin-Citrat
10,0 g Zitronensäure-Monohydrat, mit entionisiertem Wasser auf 2 Liter aufgefüllt
- 4.2.2.2 Gelpuffer: 0,006 M L-Histidin-Citrat
(Elektrophoresepuffer 1 in 12 verdünnt)
100 ml Elektrophoresepuffer (4.2.2.1), mit entionisiertem Wasser auf 1200 ml aufgefüllt
- 4.2.2.3 Bromphenolblau-Lösung
50 mg Bromphenolblau, in 100 ml entionisiertem Wasser aufgelöst
- 4.3 Farblösungen
- 4.3.1 Stammlösungen
- 4.3.1.1 1 M Tris-HCl pH 8,0
121,1 g Tris, mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und mit 50 % HCl auf pH 8,0 eingestellt
- 4.3.1.2 1 M Tris-HCl pH 9,1
121,1 g Tris, mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und mit 50 % HCl auf pH 9,1 eingestellt
- 4.3.1.3 1 M Natriumacetat pH 5,0
136,08 Natriumacetat, mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und mit Eisessig auf pH 5,0 eingestellt
- 4.3.1.4 MTT-Lösung
1,0 g MTT, mit entionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt
- 4.3.1.5 NBT-Lösung
1,0 g NBT, mit entionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt
- 4.3.1.6 PMS-Lösung
200 mg PMS, mit entionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt
- 4.3.1.7 Magnesiumchlorid-Lösung
21,35 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat, mit entionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt
- 4.3.1.8 Aepfelsäure-Lösung
5 g DL-Aepfelsäure, mit entionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und mit 1 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt
- 4.3.2 Farblösungen (Volumen: 200 ml)
- 4.3.2.1 MDH + ADH-Farblösung
20 ml Tris-HCl pH 9,1 (4.3.1.2.)
+ 180 ml entionisiertes Wasser
+ 8 ml Aepfelsäure-Lösung (4.3.1.8.)
+ 10 ml Ethanol
+ 80 mg NAD
+ 4 ml NBT-Lösung (4.3.1.5.)
+ 3 ml PMS-Lösung (4.3.1.6.)
- 4.3.2.2 IDH-Farblösung
20 ml Tris-HCl pH 8,0 (4.3.1.1.)
+ 180 ml entionisiertes Wasser
+ 500 mg DL-Isozitonensäure Na₃-Salz
+ 10 ml Magnesiumchlorid-Lösung (4.3.1.7.)
+ 6 mg NADP
+ 4 ml MTT-Lösung (4.3.1.4.)
+ 3 ml PMS-Lösung (4.3.1.6.)
- 4.3.2.3 PGI- + PGD-Farblösung
10 ml Tris-HCl pH 8,0 (4.3.1.1.)
+ 190 ml entionisiertes Wasser
+ 200 mg Fructose 6-Phosphat Na₂-Salz
+ 80 mg 6-Phosphoglucon-Säure Na₃-Trihydrat-Salz
+ 2 ml Magnesiumchlorid-Lösung (4.3.1.7.)
+ 20 mg NADP
+ 2 ml MTT-Lösung (4.3.1.4.)
+ 3 ml PMS-Lösung (4.3.1.6.)
+ 50 Einheiten Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase
- 4.3.2.4 PGM-Farblösung
20 ml Tris-HCl pH 8,0 (4.3.1.1.)

- + 180 ml entionisiertes Wasser
- + 1 g Glucose 1-Phosphat
- + 4 ml Magnesiumchlorid-Lösung (4.3.1.7.)
- + 20 mg NADP
- + 3 ml MTT-Lösung (4.3.1.4.)
- + 2 ml PMS-Lösung (4.3.1.6.)
- + 100 Einheiten Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase

4.3.2.5 ACP-Farblösung

- 4 ml Natriumacetat pH 5,0 (4.3.1.3.)
- + 196 ml entionisiertes Wasser
- + 200 mg Fast-Garnet-GBC-Salz
- + 492 mg 1-Naphtylphosphat Na₃-Dihydrat-Salz
- + 2 ml Magnesiumchlorid-Lösung (4.3.1.7.)

4.3.2.6 DIA-Farblösung

- 20 ml Tris-HCl pH 9,1 (4.3.1.2.)
- + 180 ml entionisiertes Wasser
- + 2 g PVP-40
- + 20 mg NADH
- + 16 ml MTT-Lösung (4.3.1.4.)
- + 16 mg 2,6-Dichlorophenol-indophenol Na-Salz

5. Verfahren

5.1 Enzym-Extraktion

Maiskeimlinge werden im Dunkeln bei einer Temperatur von 25° C auf feuchtem Keimungspapier angezogen. Nach sechs Tagen werden Keimscheiden einzeln geerntet und bei 4° C, mit einem Stößel in Mikro-Röhrchen in jeweils 0,060 ml Extraktionslösung (3.1.), homogenisiert. Die Extrakte können bei -30° C aufbewahrt werden.

5.2. Herstellung des Gels

Um zwei Stärkegele (18 x 18 x 1 cm) von 12,5 % herzustellen, ist folgendes nötig: 128 g Stärke werden in 1020 ml Gelpuffer (4.2.1.3. oder 4.2.2.2.) bei 80° C in einem Buchner-Kolben gelöst. Die Lösung wird 40 Sekunden entgast. Die Gele werden, gemäss der Beschreibung in der Bedienungsanleitung für das verwendete Gerät, in Gelformen gegossen. Die Bildung von Luftbläschen ist zu vermeiden. Man lässt die Gele bei Raumtemperatur mindestens zwei Stunden lang abkühlen und lässt sie dann über Nacht lagern, wobei die Gele durch eine Polyäthylenfolie geschützt werden. Vor der Elektrophorese werden die Gele während mindestens einer Stunde auf 4° C abgekühlt.

5.3 Elektrophorese

Die Elektrophoresekammern werden mit 4° C kaltem Elektrophoresepuffer (4.2.1.2. oder 4.2.2.1.) befüllt. 1 cm von der Kathode wird ein Schlitz in das Gel geschnitten. Die Enzymextrakte von 5.1 (30 Extrakte für ein Gel von 18 x 18 x 1 cm) werden in 15 x 2 x 1 mm Dochte aus Chromatographie-Papier Whatman Nr. 3 aufgesaugt. Die Dochte werden in die Schlitz gesteckt. Ab 1 cm von jeder Gelkante wird ein mit Bromphenolblau-Lösung (4.2.2.3.) vollgesaugter Docht eingelegt. Die Elektrophorese erfolgt bei 4° C. Das System wird 20 Minuten lang auf konstanter Spannung von 200 V (maximale Stromstärke 150 mA für zwei Gele von 18 x 18 x 1 cm) gehalten. Dann werden die Dochte entfernt und die Elektrophorese wird bei konstanter Spannung von 280 V (maximale Stromstärke 180 mA für zwei Gele von 18 x 18 x 1 cm) fortgesetzt, bis der Bromphenolblau-Marker 14 cm gewandert ist (4 Stunden).

5.4. Enzym-Färbung

Nach der Elektrophorese wird das Gel horizontal in 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Die oberste Scheibe wird weggeworfen. Einzelne Gelscheiben werden im Dunkeln bei einer Temperatur von 37° C in folgenden Lösungen gefärbt:

- für MDH und ADH: Lösung 4.3.2.1.
- für IDH: Lösung 4.3.2.2
- für PGI und PGD: Lösung 4.3.2.3.
- für PGM: Lösung 4.3.2.4.
- für ACP: Lösung 4.3.2.5.
- für DIA: Lösung 4.3.2.6.

Die ACP wandert in den ersten 4 cm des Gels, die PGM darüber. Daher ist es möglich, diese beiden Enzyme auf derselben Gelscheibe zu färben, nachdem sie zuvor quer durchgeschnitten wurde.

Die Färbungen dauern 30 bis 120 Minuten. Nach der Färbung werden die Gelscheiben in destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie aufbewahrt werden. Folgende Verfahren werden für die langfristige Lagerung angewandt: die Gele werden zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet oder in versiegelten Polyäthylen-Beuteln aufbewahrt.

6. Zuordnung der Isoenzyme zu den codierenden Allelen

6.1 Zuordnung der MDH

6.1.1 Genetische Interpretation der Zymogramme

Enzym	Quartärstruktur	Chromosomale Lokalisierung	Locus	Allele	
		8	Mdh1	1, 6	
		6L	Mdh2	3+3,5*, 4,5, 6	intergenische
Malatdehydrogenase (MDH)	Dimer	3L	Mdh3	16, 18	Interaktionen
		1L	Mmm	M, m	
		1L	Mdh4	12	intergenische
		5S	Mdh5	12, 15	Interaktionen

* Die durch die Allele 3 und 3,5 codierten Enzyme haben eine sehr ähnliche elektrophoretische Mobilität; sie werden deshalb nicht als unterschiedlich benotet.

Es bestehen Interaktionen zwischen den Genprodukten (Polypeptid-Untereinheiten) aus Mdh1, Mdh2 und Mdh3 sowie zwischen den Genprodukten Mdh4 und Mdh5.

Mdh1	Genotyp					Mdh5	Beispielsinzuchtlinien
	Mdh2	Mdh3	Mmm	Mdh4	Mdh5		
6/6	6/6	16	M	12	12	A239	
6/6	3/3	16	M	12	12	CM7	
6/6	6/6	16	M	12	15	F2	
6/6	6/6	18	M	12	12	F1444	
6/6	3/3	18	M	12	12	CO158	
1/1	3/3	16	M	12	12	F252	
6/6	4,5/4;5	16	M	12	12	W401	

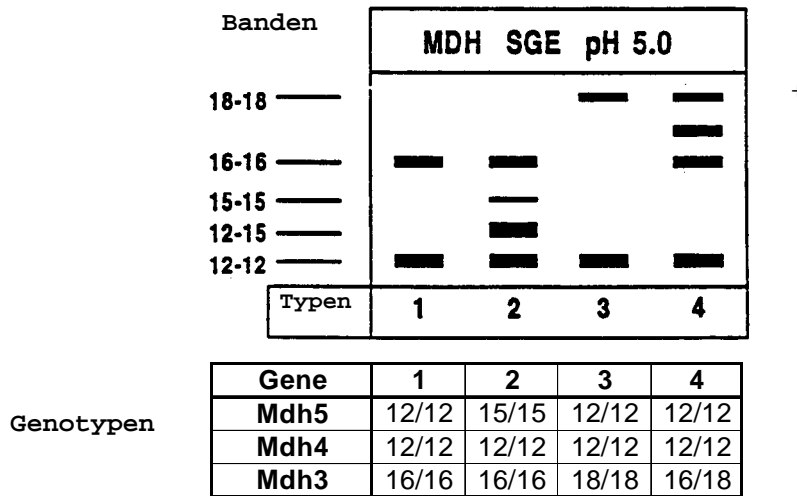
6.1.2 Schematisierung der Zymogramme

Für die Erkennung der Loci Mdh1, Mdh2 und Mdh4 sollte SGE bei pH 6,5 verwendet werden. Für die Erkennung der Loci Mdh3 und Mdh5 sollte ein zweites Elektrophorese-System verwendet werden: SGE bei pH 5,0.



Genotypen	Types	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	Genes																		
	Mdh5	12/12	15/15	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	15/15	12/12	12/12	12/12	12/12
	Mdh4	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
	Mmm	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM
	Mdh3	16/16	16/16	18/18	16/16	16/16	16/16	18/18	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16
	Mdh2	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	3/3	3/4,5	3/3	3/6	3/6	3/3	3/3	3/4,5	3/3	4,5/4,5	3/6	3/4,5	4,5/6
	Mdh1	6/6	6/6	6/6	1/1	1/6	6/6	6/6	6/6	1/6	1/1	1/6	1/1	1/1	1/1	6/6	6/6	1/6	6/6

Einige sehr schwache Banden sind als punktierte Linien gezeichnet. Einige Banden überschneiden sich und können nicht als unterschiedliche Banden gezeichnet werden.



6.2 Zuordnung der IDH

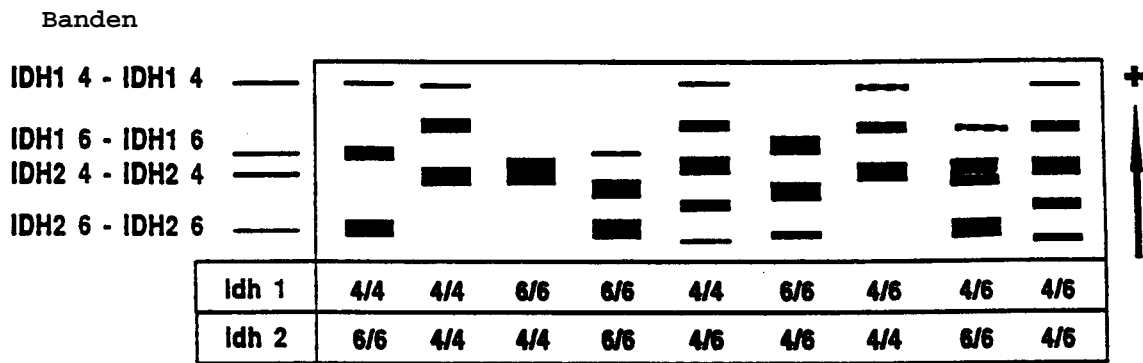
6.2.1 Genetische Interpretation der Zymogramme

Enzym	Quartärstruktur	Chromosomale Lokalisierung	Locus	Allele	
Isocitrat-dehydrogenase	Dimer	8	Idh1	4, 6	intergenische Interaktionen
(IDH)		6	Idh2	4, 6	

Es bestehen Interaktionen zwischen den Genprodukten (Polypeptid-Untereinheiten) aus Idh1 und Idh2.

Genotyp		Beispielsinzuchtlinien
Idh1	Idh2	
4/4	4/4	F16
4/4	6/6	A632
6/6	4/4	F1110
6/6	6/6	CO158

6.2.2 Schematisierung der Zymogramme



Einige sehr schwachen Banden sind als dünne Linien gezeichnet. Einige Banden überschneiden sich und können nicht als unterschiedliche Banden gezeichnet werden.

6.3 Zuordnung der PGD

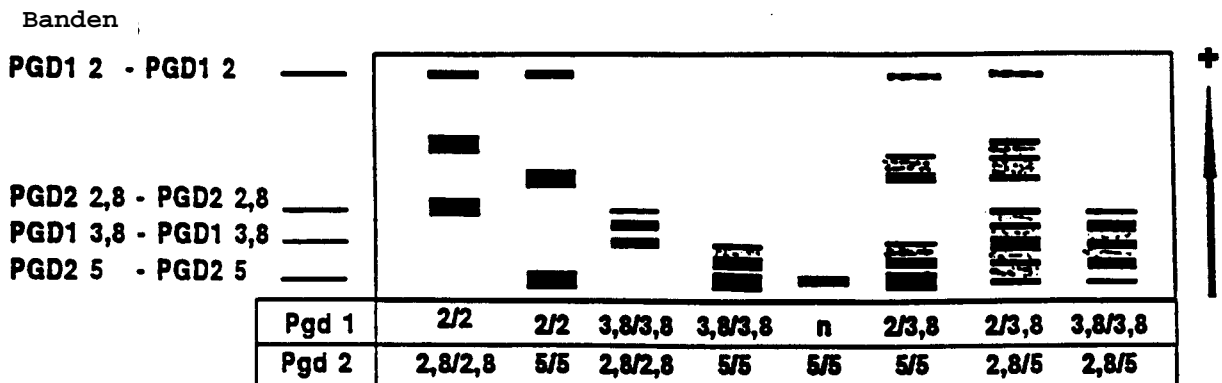
6.3.1 Genetische Interpretation der Zymogramme

Enzym	Quartärstruktur	Chromosomale Lokalisierung	Locus	Allele	
6-phosphogluconat-dehydrogenase	Dimer	6	Pgd1	2, 3, 8, n	intergenische Interaktion
(PGD)		3L	Pgd2	2, 8, 5	

Es bestehen Interaktionen zwischen den Genprodukten (Polypeptid-Untereinheiten) aus Pgd1 und Pgd2.

Genotyp		Beispielsinzuchtlinien
Pgd1	Pgd2	
2/2	5/5	A239
3,8/3,8	2,8/2,8	A632
3,8/3,8	5/5	F2
n/n	5/5	H108

6.3.2 Schematisierung der Zymogramme



Einige sehr schwache Banden sind in dünnen Linien gezeichnet. Einige Banden überschneiden sich und können nicht als unterschiedliche Banden gezeichnet werden.

6.4 Zuordnung der PGM

6.4.1 Genetische Interpretation der Zymogramme

Enzym	Quartärstruktur	Chromosomale Lokalisierung	Locus	Allele
Phosphoglucomutase (PGM)	Monomer	1L	Pgm1	9, 16
	Monomer	5S	Pgm2	1, 3, 4, 8

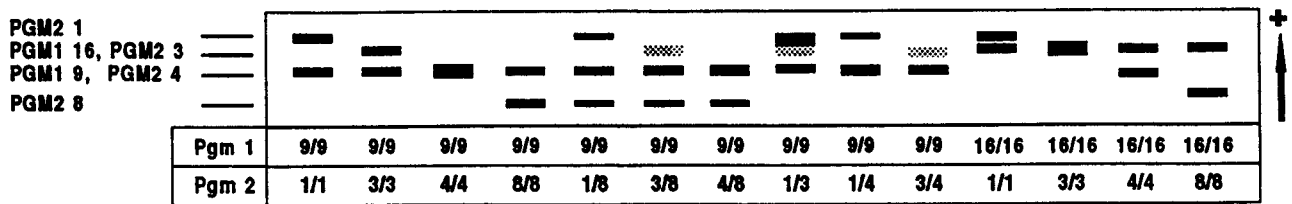
Genotyp		Beispielsinzuchtlinien
Pgm1	Pgm2	
9/9	1/1	F2
9/9	3/3	F16
9/9	4/4	A632
9/9	8/8	MO17

1. Fussnote zu PGM (Seite 45)

Die Allel-Kombinationen 9/9+1/1, 9/9+1/4 und 9/9+1/3,
 die Allel-Kombinationen 9/9+3/3, 9/9+1/3, 9/9+3/4, 16/16+4/4, 9/16+4/4 und 9/16+3/4,
 die Allel-Kombinationen 9/9+1/1, 9/9+4/4 und 9/9+3/4 bzw.
 die Allel-Kombinationen 9/9+8/8, 9/9+3/8 und 9/9+4/8
 ergeben identische oder eng verwandte Zymogramme. Deshalb können bei Merkmal 42.1
 die Note 1 gleichfalls 9/9+1/4 oder 9/9+1/3,
 die Note 2 gleichfalls 9/9+1/3, 9/9+3/4 oder 9/16+3/4,
 die Note 3 gleichfalls 9/9+3/4 und
 die Note 4 gleichfalls 9/9+3/8 oder 9/9+4/8 sein.

6.4.2 Schematisierung der Zymogramme

Banden



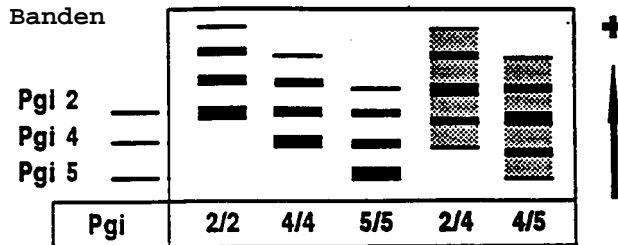
6.5 Zuordnung der PGI

6.5.1 Genetische Interpretation der Zymogramme

Enzym	Quartärstruktur	Chromosomale Lokalisierung	Locus	Allele
Phosphoglucoisomerase (PGI)	Dimer	1L	Pgi1	4, 5

Genotyp	Beispielsinzuchtlinien
Pgi1	
4/4	A239
5/5	A632

6.5.2 Schematisierung der Zymogramme



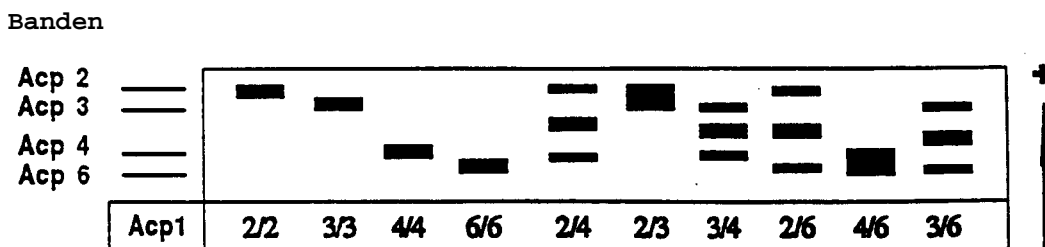
6.6 Zuordnung der ACP

6.6.1 Genetische Interpretation der Zymogramme

Enzym	Quartärstruktur	Chromosomale Lokalisierung	Locus	Allele
				2
Saure Phosphatase	Dimer	9L	Acp1	3
				4
(ACP)				6

Genotyp	Beispielsinzuchtlinien
Acp1	
2/2	F2
3/3	A239
4/4	A632
6/6	F1444

6.6.2. Schematisierung der Zymogramme



Einige Banden überschneiden sich und können nicht als unterschiedliche Banden gezeichnet werden.

2. Fussnote zu ACP

Die Allele 3/3 und 2/3 bzw. die Allele 2/2 und 3/3 ergeben sehr ähnliche Zymogramme. Deshalb kann bei Merkmal 44.1 die Note 1 2/2 oder 2/3 und die Note 2 3/3 oder 2/3 sein.
 Die Allele 4/4 und 4/6 bzw. die Allele 6/6 und 4/6 ergeben sehr ähnliche Zymogramme. Deshalb kann bei Merkmal 44.1 die Note 3 4/4 oder 4/6 und die Note 4 kann 6/6 oder 4/6 sein.

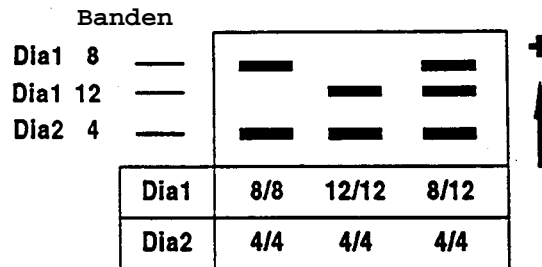
6.7 Zuordnung der DIA

6.7.1 Genetische Interpretation der Zymogramme

Enzym	Quartärstruktur	Chromosomale Lokalisierung	Locus	Allele
Diaphorase	Monomer	2	Dia1	8
				12
(DIA)	Dimer	1L	Dia2	4

Genotyp		Beispielsinzuchtlinien
Dia1	Dia2	
8/8	4/4	F2
12/12	4/4	CO158

6.7.2 Schematisierung der Zymogramme



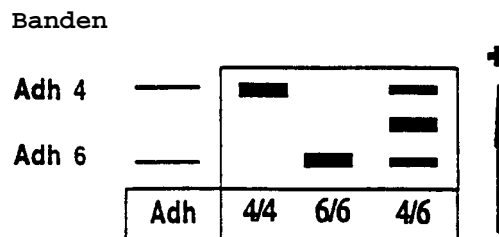
6.8 Zuordnung der ADH

6.8.1 Genetische Interpretation der Zymogramme

Enzym	Quartärstruktur	Chromosomale Lokalisierung	Locus	Allele
Alkoholdehydrogenase (ADH)	Dimer	1L	Adh1	4
				6

Genotyp	Beispielsinzuchtlinien
Adh1	
4/4	F1444
6/6	F2

6.8.2 Schematisierung der Zymogramme



6.9 Beschreibung der Beispielsinzuchtlinien und -hybriden

Siehe Seiten 46 und 47 am Ende der Anlage.

Description of the example inbred lines and hybrids
Description des lignées et hybrides témoins
Beschreibung der Beispielsinzuchtlinien und -hybriden

inbred lines	M	M	M	M	M	M	I	I	P	P	P	P	P	A	D	A
lignées endo-	d	d	d	m	d	d	d	d	g	g	g	g	g	c	i	d
games	h	h	h	m	h	h	h	h	d	d	m	m	i	p	a	h
Inzuchtlinien	1	2	3		4	5	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1
A239	6/6	6/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/4	2/2	5/5	9/9	4/4	4/4	3/3	8/8	4/4
A632	6/6	6/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	6/6	3,8/3,8	2,8/2,8	9/9	4/4	5/5	4/4	8/8	4/4
CM7	6/6	3/3	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	6/6	3,8/3,8	5/5	9/9	3/3	4/4	4/4	12/12	4/4
CO158	6/6	3/3	18/18	MM	12/12	12/12	6/6	6/6	3,8/3,8	5/5	9/9	4/4	4/4	4/4	12/12	4/4
F1110	6/6	3/3	16/16	MM	12/12	12/12	6/6	4/4	3,8/3,8	5/5	9/9	3/3	4/4	3/3	8/8	4/4
F1444	6/6	6/6	18/18	MM	12/12	12/12	4/4	6/6	3,8/3,8	5/5	9/9	3/3	4/4	6/6	8/8	4/4
F16	1/1	3/3	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/4	3,8/3,8	5/5	9/9	3/3	4/4	2/2	8/8	4/4
F2	6/6	6/6	16/16	MM	12/12	15/15	4/4	4/4	3,8/3,8	5/5	9/9	1/1	4/4	2/2	8/8	6/6
F252	1/1	3/3	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/4	3,8/3,8	5/5	9/9	4/4	4/4	3/3	12/12	4/4
H108	6/6	6/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/4	n/n	5/5	9/9	8/8	4/4	2/2	8/8	4/4
MO17	6/6	6/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/4	3,8/3,8	5/5	9/9	8/8	4/4	2/2	8/8	4/4
W401	6/6	4,5/4,5	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	6/6	2/2	5/5	9/9	3/3	4/4	2/2	8/8	4/4

Hybrids	M	M	M	M	M	M	I	I	P	P	P	P	P	A	D	A
Hybrides	d	d	d	m	d	d	d	d	g	g	g	g	g	c	i	d
Hybriden	h	h	h	m	h	h	h	h	d	d	m	m	i	p	a	h
	1	2	3		4	5	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1
ARTIST	1/1	3/6	16/16	M/M	12/12	12/12	4/4	6/6	3,8/3,8	2,8/5	9/9	4/4	4/5	4/4	8/8	4/4
AXON	6/6	6/6	16/16	M/M	12/12	12/12	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	1/4	4/4	2/2	8/8	4/6
AZUR	6/6	3/6	16/16	M/M	12/12	12/12	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	3/4	4/4	2/3	8/8	4/4
BASTION	6/6	3/6	16/16	M/M	12/12	12/12	4/4	6/6	3,8/3,8	5/5	9/9	4/4	4/4	4/4	8/12	4/6
BEKEFIX	6/6	4,5/6	16/18	M/M	12/12	12/15	4/4	6/6	2/3,8	5/5	9/9	1/3	4/4	2/4	8/8	4/6
		3/6	16/16			12/12										
BONNY	1/6	3/6	16/16	M/M	12/12	12/12	4/6	6/6	3,8/3,8	5/5	9/9	3/4	4/4	3/4	8/8	4/4
	6/6											4/4	4/5	3/3		4/6
BRISTOL	1/1	3/6	16/16	M/M	12/12	12/15	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	1/4	4/4	2/2	8/8	4/6
CONTESSA	6/6	3/6	16/16	M/M	12/12	12/12	4/4	6/6	3,8/3,8	5/5	9/9	3/4	4/4	4/6	8/12	4/4
FIGARO	6/6	3/6	16/18	M/M	12/12	12/12	4/4	4/4	3,8/3,8	5/5	9/9	3/4	4/4	3/4	8/8	4/4
FURIO	6/6	6/6	16/16	M/M	12/12	12/12	4/4	4/6	2/3,8	2,8/5	9/9	4/8	4/4	4/4	8/12	4/4
LOGT	1/6	3/6	16/16	M/M	12/12	12/12	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	4/8	4/4	2/4		
MARSHALL	1/6	3/3	16/16	M/M	12/12	12/12	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	4/4	4/4	3/4	8/8	4/4
OCCITAN	1/6	3/6	16/16	M/M	12/12	12/12	4/4	4/6	2/3,8	5/5	9/9	4/8	4/4	2/4	8/12	4/4
ROBIN	6/6	3/4,5	16/16	M/M	12/12	12/15	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	1/3	4/4	2/4	8/8	4/4
TAU	1/6	3/6	16/16	M/M	12/12	12/12	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	4/4	4/4	3/4	8/8	6/6
								6/6				1/4		2/3		
TEKILA	1/6	6/6	16/16	M/M	12/12	12/12	4/4	4/6	3,8/3,8	2,8/5	9/9	4/4	4/4	2/2	8/8	4/4

Footnote to example hybrids / Note pour les témoins hybrides / Bemerkungen zu den Beispielhybriden

For the three-way cross hybrids Bekefix, Bonny and Tau, some loci are in segregation.
 Pour les hybrides trois voies Bekefix, Bonny et Tau, certains loci sont en disjonction.
 Bei den Dreiweghybriden Bekefix, Bonny und Tau spalten einige loci auf.

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