



TG/81/5(proj.)
ORIGINAL : anglais
DATE : 2000-02-18

F

INTERNATIONAL UNION
FOR THE PROTECTION
OF NEW VARIETIES OF
PLANTS

UNION INTERNATIONALE
POUR LA PROTECTION
DES OBTENTIONS
VÉGÉTALES

INTERNATIONALER
VERBAND ZUM SCHUTZ
VON PFLANZEN-
ZÜCHTUNGEN

UNIÓN INTERNACIONAL
PARA LA PROTECCIÓN
DE LAS OBTENCIONES
VEGETALES

PROJET

PRINCIPES DIRECTEURS

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

TOURNESOL

(Helianthus annuus L.)

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

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

ANNEXE

I. Objet de ces principes directeurs d'examen

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

II. Matériel requis

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

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

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

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

III. Conduite de l'examen

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

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

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

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

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

IV. Méthodes et observations

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

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

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

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

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

d) évaluation des possibilités de distinction, au niveau des hybrides, des variétés présentant une formule similaire.

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

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

5. Toutes les observations relatives à la feuille doivent être effectuées sur les feuilles complètement développées situées au 2/3 de la tige à partir du sol, avant le stade du bouton mais après l'époque de la floraison. La taille du bouton doit être comprise entre 4 et 5 cm.

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

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

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

	Plantes aberrantes	Nombre de plantes observées	Nombre de plantes aberrantes toléré
<u>Lignée endogame stérile mâle¹</u> (norme de population : 2%, probabilité d'acceptation : 95%)	Plantes allogames et plantes isogéniques fertiles	19 - 41	2
		42 - 69	3
		70 - 99	4
		100 - 131	5
	Autres plantes aberrantes	19 - 41	2
		42 - 69	3
		70 - 99	4
		100 - 131	5
<u>Lignée endogame fertile mâle</u> (norme de population : 2%, probabilité d'acceptation : 95%)	Tous types de plantes aberrantes confondus	19 - 41	2
		42 - 69	3
		70 - 99	4
		100 - 131	5
<u>Hybrides simples</u> (norme de population : 5%, probabilité d'acceptation : 95%)	Tous types de plantes aberrantes confondus	17 - 28	3
		29 - 40	4
		41 - 53	5
		54 - 67	6
		68 - 81	7
		82 - 95	8
		96 - 110	9
		111- 125	10

7. Si l'électrophorèse des enzymes est utilisée aux fins de l'examen de la distinction, il convient d'appliquer la même norme de population et la même probabilité d'acceptation que pour les autres caractères. Toutes les plantes dans une lignée endogame où deux ou plus loci sont hétérozygoux, avec un allèle provenant de la femelle sur tous les loci, la plante est considérée comme allogame (ex. : Ax). Dans tous les autres cas où deux allèles étrangers sont présents sur un locus, la plante doit être considérée comme aberrante.

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

V. Groupement des variétés

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

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

- a) Feuille : couleur verte (caractère 6)
- b) Feuille : gaufure (caractère 7)
- c) Époque de floraison (caractère 14)
- d) Plante : hauteur (caractère 27)
- e) Plante : ramification (à l'exclusion de la ramification causée par l'environnement) (caractère 29)
- f) Grain : stries sur le bord (caractère 39)
- g) Grain : stries entre les bords (caractère 40)

VI. Caractères et symboles

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

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

3. Légende

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

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

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

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

Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielsorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
1. A2	Hypocotyl: anthocyanin coloration	Hypocotyle: pigmentation anthocyanique	Hypokotyl: Anthocyanfärbung	Hipocotilo: pigmentación antocianica		
	absent	absente	fehlend	ausente	HA 850	1
	present	présente	vorhanden	presente	RHA 271	9
2. A2	Hypocotyl: intensity of anthocyanin coloration	Hypocotyle: intensité de la pigmentation anthocyanique	Hypokotyl: Intensität der Anthocyanfärbung	Hipocotilo: intensidad de la pigmentación antocianica		
	weak	faible	gering	débil	H 52.6.3	3
	medium	moyenne	mittel	media	HA 290	5
	strong	forte	stark	fuerte	RHA 271	7
3. E4 (*)	Leaf: size	Feuille: taille	Blatt: Größe	Hoja: tamaño		
	small	petite	klein	pequeña	HA 124	3
	medium	moyenne	mittel	media	HA 821	5
	large	grande	groß	grande	DK 3790	7
4. E4 (+)	Leaf: shape of distal part	Feuille: forme de la partie distale	Blatt: Form des distalen Teiles	Hoja: forma de la parte distal		
	lanceolate	lancéolée	lanzettlich	lanceolada		1
	lanceolate to narrow triangular	lancéolée à triangulaire étroite	lanzettlich bis schmal dreieckig	lanceolada a triangular estrecha		2
	narrow triangular	triangulaire étroite	schmal dreieckig	triangular estrecha	RHA 855	3
	narrow triangular to broad triangular	triangulaire étroite à triangulaire large	schmal dreieckig bis breit dreieckig	triangular estrecha a triangular ancha		4
	broad triangular	triangulaire large	breit dreieckig	triangular ancha	HA 821	5
	broad triangular to acuminate	triangulaire large à acuminée	breit dreieckig bis zugespitzt	triangular ancha a acuminada		6
	broad triangular to rounded	triangulaire large à arrondie	breit dreieckig bis rundlich	triangular ancha a redondeada	HA 303	7
	acuminate	acuminée	zugespitzt	acuminada	HA 124	8
rounded	arrondie	rundlich	redondeada	HA 234	9	

	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielsorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
5.	E4	Leaf: auricles	Feuille: oreillettes	Blatt: Auricula	Hoja: aurículas		
(*)		none or very small	absentes ou très petites	fehlend oder sehr klein	ausentes o muy pequeñas	H 52.9.1.1	1
(+)		small	petites	klein	pequeñas	HA 821	3
		medium	moyennes	mittel	medias		5
		large	grandes	groß	grandes		7
		very large	très grandes	sehr groß	muy grandes	HA 303	9
6.	E4	Leaf: green color	Feuille: couleur verte	Blatt: Grünfärbung	Hoja: color verde		
(*)		light	claire	hell	claro	H 52.9.1.1	3
		medium	moyenne	mittel	medio	HA 821	5
		dark	foncée	dunkel	oscuro	HA 303	7
7.	E4	Leaf: blistering	Feuille: gaufrure	Blatt: Blasigkeit	Hoja: abullonado		
(*)		absent or very weak	absente ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil		1
		weak	faible	gering	débil	HA 342, RHA 273	3
		medium	moyenne	mittel	medio	HA 291	5
		strong	forte	stark	fuerte	HA 303, RHA 361	7
		very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte		9
8.	E4	Leaf: serration	Feuille: denture	Blatt: Zähnung	Hoja: dentado		
(*)		very fine or isolated	très fine ou isolée	sehr fein oder vereinzelt	muy fino o aislado	HA 393	1
(+)		fine	fine	fein	fino	HA 124	3
		medium	moyenne	mittel	medio	RHA 271	5
		coarse	grossière	grob	grosero	RHA 299	7
		very coarse	très grossière	sehr grob	muy grosero		9

Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota	
9. (+)	E4	Leaf: shape of cross section	Feuille: forme de la section transversale	Blatt: Form des Querschnitts	Hoja: forma de la sección transversal		
		strongly concave	fortement concave	stark konkav	fuertemente cóncava		1
		weakly concave	faiblement concave	schwach konkav	débilmente cóncava	RHA 273	2
		flat	droite	gerade	plana	H 55.9.2.1.1	3
		weakly convex	faiblement convexe	schwach konvex	débilmente convexa	HA 303	4
		strongly convex	fortement convexe	stark konvex	fuertemente convexa	5	
10. (+)	E4	Leaf: wings	Feuille: ailes	Blatt: Flügel	Hoja: alas		
		none or very weakly expressed	absentes ou très faiblement marquées	keine oder sehr schwach ausgeprägt	ninguna o muy débilmente definidas	HA 89	1
		weakly expressed	faiblement marquées	schwach ausgeprägt	débilmente definidas		2
		strongly expressed	fortement marquées	stark ausgeprägt	fuertemente definidas	RHA 274, RHA 348 style="text-align: center;">3	
11. (* (+)	E4	Leaf: angle of lowest lateral veins	Feuille: angle des nervures latérales les plus basses	Blatt: Winkel der untersten Seitennerven	Hoja: ángulo de los nervios laterales		
		acute	aigu	spitz	agudo	HA 290, RHA 295	1
		right angle or nearly right angle	droit ou presque droit	rechtwinklig oder fast rechtwinklig	ángulo recto o casi ángulo recto	HA 89	2
		obtuse	obtus	stumpf	obtuso	HA 303 style="text-align: center;">3	

Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota	
12. (+)	E4	Leaf: height of the tip of the blade compared to insertion of petiole (at 2/3 height of plants)	Feuille: hauteur de l'extrémité du limbe par rapport à l'insertion du pétiole (aux 2/3 de la tige à partir du sol)	Blatt: Höhe der Blattspitze im Verhältnis zur Ansatzstelle des Stieles (in 2/3 der Pflanzhöhe)	Hoja: altura de la punta del limbo en relación con la inserción del pecíolo (a 2/3 de la altura de la planta)		
		low	basse	niedrig	baja	RHA 275	3
		medium	moyenne	mittel	media	RHA 274	5
		high	haute	hoch	alta	RHA 400	7
13.	F1	Stem: hairiness at the top (last 5 cm)	Tige: pilosité au sommet (5 derniers cm)	Stengel: Behaarung an der Spitze (obere 5 cm)	Tallo: velloso en el extremo (últimos 5 cm)		
		absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil		1
		weak	faible	gering	débil	RHA 271	3
		medium	moyenne	mittel	media	RHA 273	5
		strong	forte	stark	fuerte	HA 303	7
		very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte		9
14. (* (+)		Time of flowering	Époque de floraison	Zeitpunkt der Blüte	Época de la floración		
		very early	très précoce	sehr früh	muy temprana	HA 302, RHA 381	1
		early	précoce	früh	temprana	RHA 273	3
		medium	moyenne	mittel	media	RHA 274	5
		late	tardive	spät	tardía	RHA 271	7
		very late	très tardive	sehr spät	muy tardía	RHA 361	9
15.	F.3.2	Ray flowers: density	Fleurs ligulées: densité	Zungenblüten: Dichte	Flores liguladas: densidad		
		sparse	faible	locker	laxas	HA 385	3
		medium	moyenne	mittel	medias	HA 89	5
		dense	forte	dicht	densas		7

	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielsorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
16.	F.3.2	Ray flower: shape	Fleur ligulée: forme	Zungenblüte: Form	Flor ligulada: forma		
(+)		fusiform	allongée	spindelförmig	fusiforme	H 52.9.1.1	1
		narrow ovate	ovoïde étroite	schmal eiförmig	oval estrecha	RHA 274	2
		broad ovate	ovoïde large	breit eiförmig	oval ancha	HA 821	3
		rounded	arrondie	rundlich	redondeada		4
17.	F.3.2	Ray flower: disposition	Fleur ligulée: disposition	Zungenblüte: Anordnung	Flor ligulada: disposición		
		flat	plane	eben	plana	HA 89	1
		longitudinal recurved	recourbée longitudinalement	längsseits nach außen gebogen	recurvada longitudinalmente	HA 850	2
		undulated	ondulée	gewellt	ondulada	HA 234	3
		strongly recurved to back of head	fortement recourbée vers le dos du capitule	stark gebogen zur Korbrückseite	fuertemente recurvada hacia la espalda del capítulo	CM 592	4
18.	R.3.2	Ray flower: length	Fleur ligulée: longueur	Zungenblüte: Länge	Flor ligulada: longitud		
		short	courte	kurz	corta	RHA 361	3
		medium	moyenne	mittel	media	HA 89	5
		long	longue	lang	larga	H 52.6.3	7
19.	F.3.2	Ray flower: color	Fleur ligulée: couleur	Zungenblüte: Farbe	Flor ligulada: color		
(*)		ivory	ivoire	elfenbein	marfil		1
		light yellow	jaune pâle	hellgelb	amarillo pálido		2
		medium yellow	jaune moyen	mittelgelb	amarillo medio	HA 89	3
		orange yellow	jaune orange	orangegelb	amarillo naranja	RHA 361	4
		orange	orangée	orange	naranja	CM 587, RHA 295	5
		purple	pourpre	purpur	púrpura		6
		reddish brown	brun rougeâtre	rotbraun	marrón rojizo		7
		multicolored	multicolore	mehrfärbig	multicolor		8

	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielsorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
20.	F.3.2	Disk flower: color	Fleuron: couleur	Röhrenblüte: Farbe	Flósculo (flor del disco): color		
		yellow	jaune	gelb	amarillo		1
		orange	orange	orange	naranja		2
		purple	pourpre	purpurn	púrpura		3
21.	F.3.2 (+)	Disk flower: anthocyanin coloration of stigma	Fleuron: pigmentation anthocyanique du stigmaté	Röhrenblüte: Anthocyanfärbung der Narbe	Flósculo (flor del disco): pigmentación antocianica del estigma		
		absent	absente	fehlend	ausente	HA 89	1
		present	présente	vorhanden	presente	H 55.9.2.1.1, HA 348	9
22.	F.3.2 (+)	Disk flower: intensity of anthocyanin coloration of stigma	Fleuron: intensité de la pigmentation anthocyanique du stigmaté	Röhrenblüte: Intensität der Anthocyanfärbung der Narbe	Flósculo (flor del disco): intensidad de la pigmentación antocianica del estigma		
		weak	faible	gering	débil	HA 290, HA 394	3
		medium	moyenne	mittel	media	HA 60, HA 291	5
		strong	forte	stark	fuerte	RHA 348	7
23.	F.3.2	Disk flower: production of pollen	Fleuron: production de pollen	Röhrenblüte: Pollenproduktion	Flósculo (flor del disco): producción de polen		
		absent	absente	fehlend	ausente		1
		present	présente	vorhanden	presente		9
24.	F.3.2 (+)	Bract: shape	Bractée: forme	Hüllblatt: Form	Bráctea: forma		
		clearly elongated	nettement allongée	deutlich länglich	claramente elongada	HA 379	1
		neither clearly elongated nor clearly rounded	ni nettement allongée ni nettement arrondie	weder deutlich länglich noch deutlich rundlich	ni claramente elongada ni claramente redondeada	HA 292	2
		clearly rounded	nettement arrondie	deutlich rundlich	claramente redondeada	RHA 801	3

	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielsorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
25.	F.3.2	Bract: length of tip	Bractée: longueur du sommet	Hüllblatt: Länge der Spitze	Bráctea: longitud de la punta		
(+)		very short	très court	sehr kurz	muy corta		1
		short	court	kurz	corta	RHA 273, RHA 361	3
		medium	moyen	mittel	media	HA 302	5
		long	long	lang	larga	HA 292, HA 55.9.2.1.1	7
		very long	très long	sehr lang	muy larga	H 52.6.3	9
26.	F.3.2	Bract: green color of outer side	Bractée: couleur verte de la face externe	Hüllblatt: Grünfärbung der Außenseite	Bráctea: color verde de la cara externa		
		light	claire	hell	claro	H 52.9.1.1	3
		medium	moyenne	mittel	medio	HA 850	5
		dark	foncée	dunkel	oscuro	HA 303	7
27	M0	Plant: natural height	Plante: hauteur	Pflanze: natürliche Höhe	Planta: altura natural		
(*)							
(+)		very short	très courte	sehr kurz	muy baja	HA 379	1
		short	courte	kurz	baja	HA 291	3
		medium	moyenne	mittel	media	RHA 801	5
		tall	haute	lang	alta	H 52.9.1.1	7
		very tall	très haute	sehr lang	muy alta		9
28.	M0	Bract: attitude in relation to head	Bractée: port par rapport au capitule	Hüllblatt: Haltung zum Korb	Bráctea: porte en relación con el capítulo		
		not embracing or very slightly embracing	non enveloppante ou très faiblement enveloppante	nicht umfassend oder sehr gering umfassend	no envolvente o muy ligeramente envolvente	H 52.9.1.1	1
		slightly embracing	faiblement enveloppante	gering umfassend	ligeramente envolvente	HA 337, HA 343	2
		strongly embracing	fortement enveloppante	stark umfassend	fuertemente envolvente	RHA 234	3

Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielsorten Variedades ejemplo	Note/ Nota	
29. (* (+)	M0 - M2	Plant: branching (excluding environmental branching)	Plante: ramification (à l'exclusion de la ramification causée par l'environnement)	Pflanze: Verzweigung (ohne umweltbedingte Verzweigung)	Planta: ramificación (excluyendo la causada por el medio ambiente)		
		absent	absente	fehlend	ausente	HA89	1
		present	présente	vorhanden	presente	RHA 271	9
30. (* (+)	M0 - M2	Plant: type of branching (as for 29)	Plante: type de ramification (comme pour 29)	Pflanze: Art der Verzweigung (wie unter 29)	Planta: tipo de ramificación (como para 29)		
		only basal	uniquement basale	nur basal	sólo basal	RHA 295	1
		predominantly basal	prédominance basale	überwiegend basal	predominantemente basal		2
		overall	totale	vollständig	total	RHA 273	3
		predominantly apical	prédominance apicale	überwiegend apikal	predominantemente apical	RHA 271	4
	only apical	uniquement apicale	nur apikal	solo apical	RHA 294	5	
31.	M3 - M2	Plant: natural position of highest lateral head to the central head	Plante: position naturelle du capitule le plus haut par rapport au capitule central	Pflanze: natürliche Position des höchsten Seitenkorbes zum Hauptkorb	Planta: posición natural del capítulo lateral más alto en relación con el capítulo central		
		below	au-dessous	unterhalb	debajo	RHA 361	1
		same level	au même niveau	gleiche Höhe	al mismo nivel	RHA 857	2
	above	au-dessus	oberhalb	encima	RHA 274	3	

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

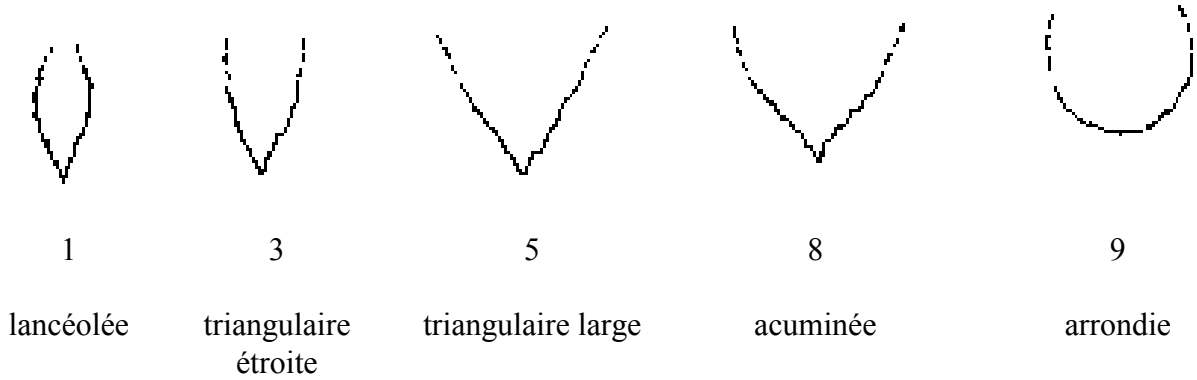
	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
34. (* (+)	M3	Head: shape of grain side	Capitule: forme de la partie du grain	Korb: Form der Kornseite	Capítulo: forma de la parte del grano		
		strongly concave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

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

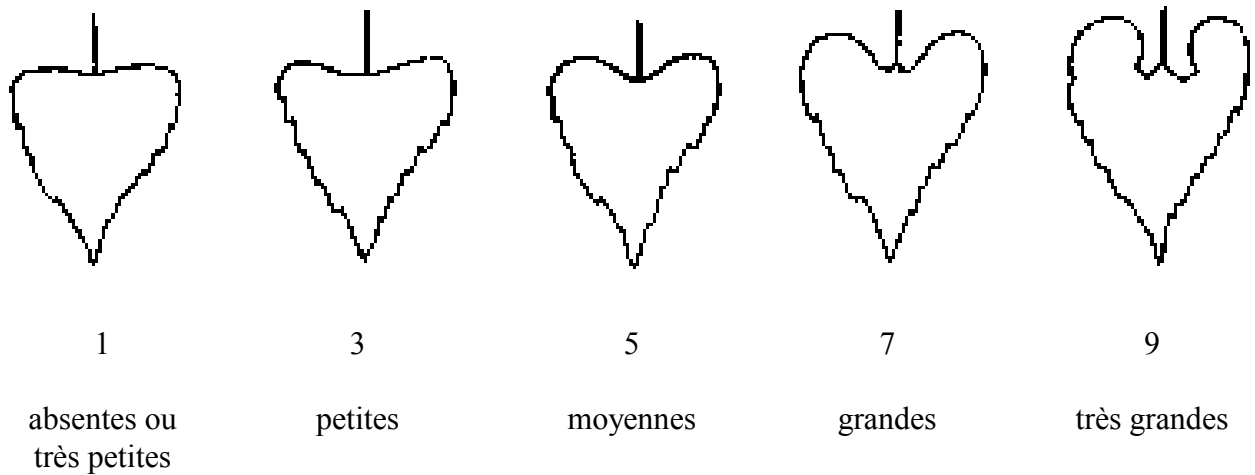
Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
41. M4	Seed: color of stripes	Grain: couleur des stries	Korn: Farbe der Streifen	Semilla: color de las estrías		
	white	blanches	weiß	blanco	RHA 295	1
	grey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

VIII. Explications du tableau des caractères

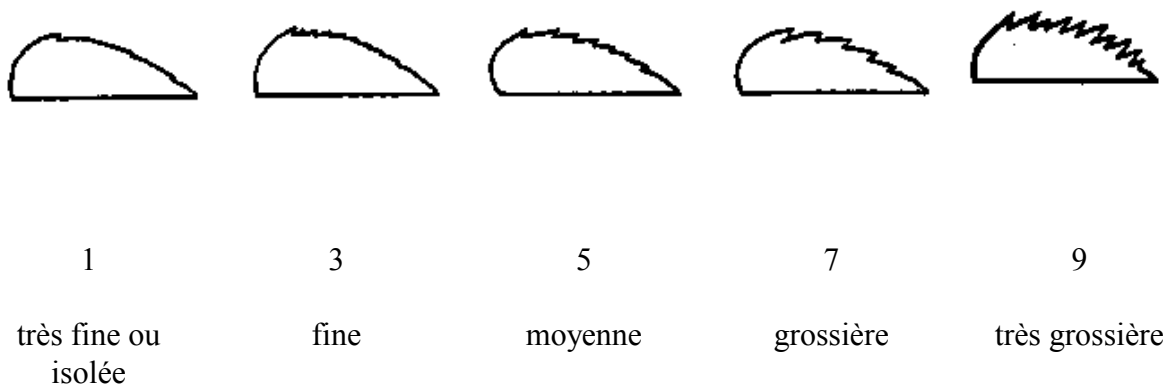
Add. 4 : Feuille : forme de la partie distale



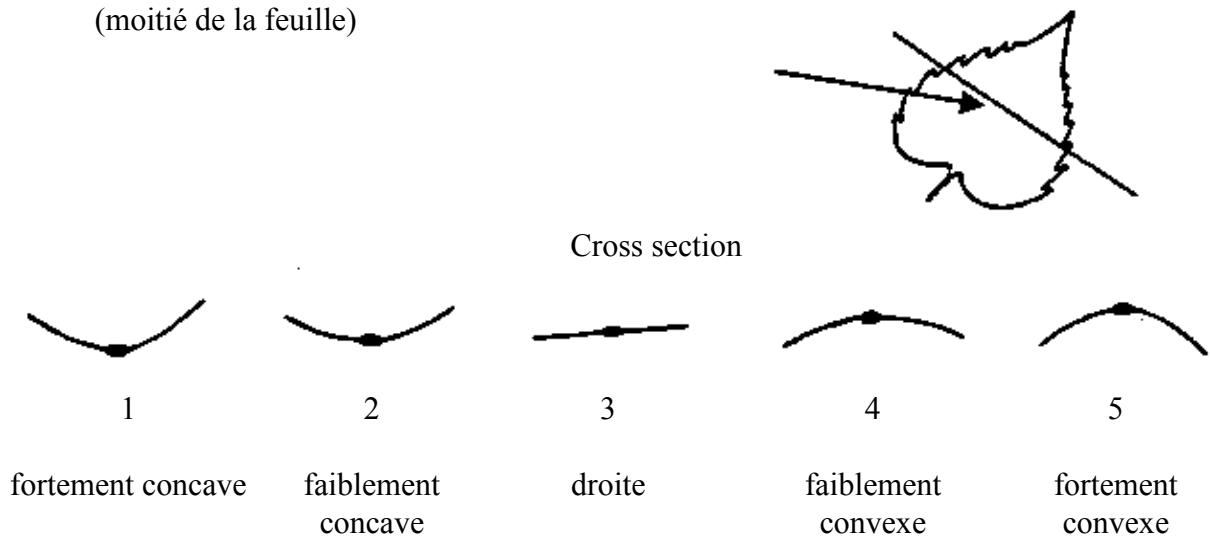
Add. 5 : Feuille : oreillettes



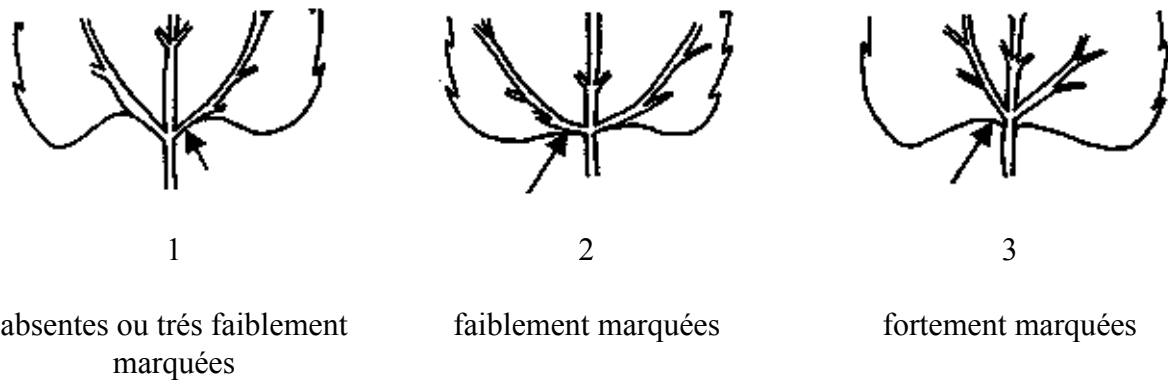
Add. 8 : Feuille : denture



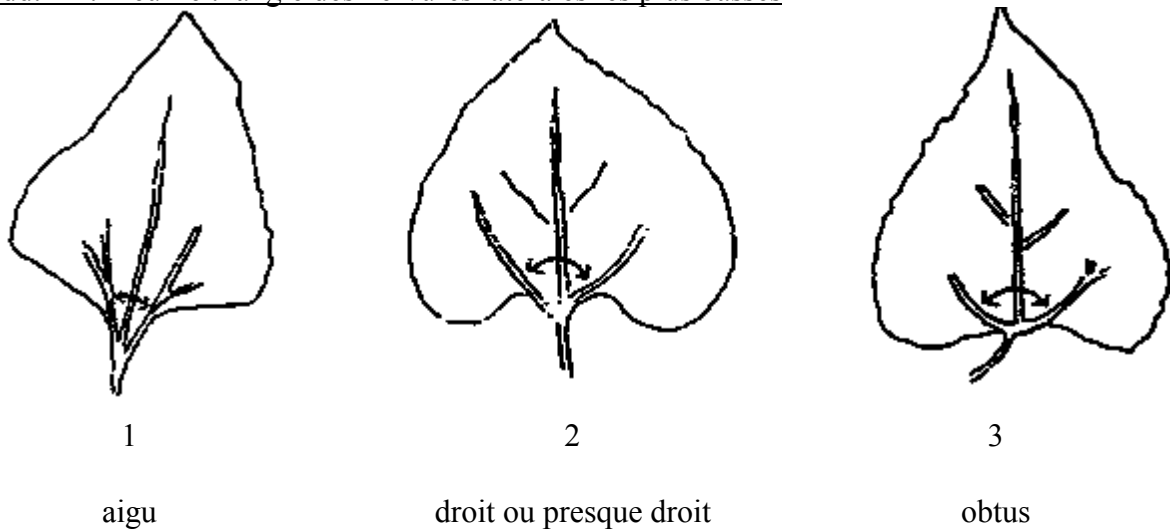
Add. 9 : Feuille : forme de la section transversale
(moitié de la feuille)



Add. 10 : Feuille : ailes
(parenchyme à la base des nervure latérales)



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



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



3

5

7

basse

moyenne

haute

Add. 14 : Époque de floraison

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

Add. 16 : Fleur ligulée : forme



1

2

3

4

allongée

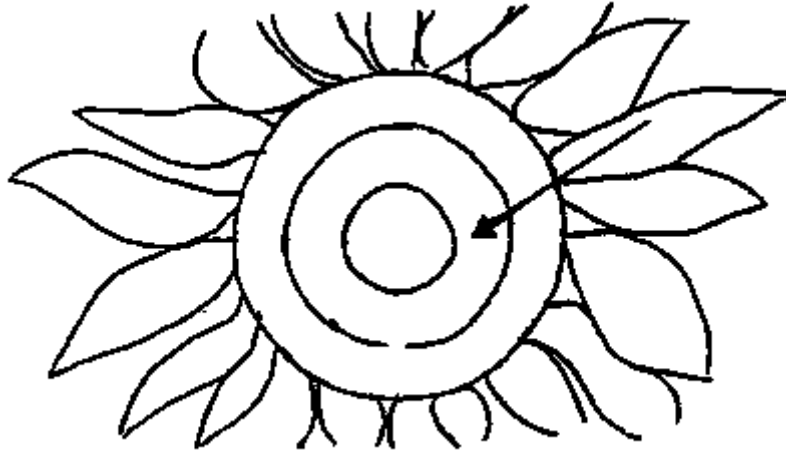
ovoïde allongée

ovoïde arrondie

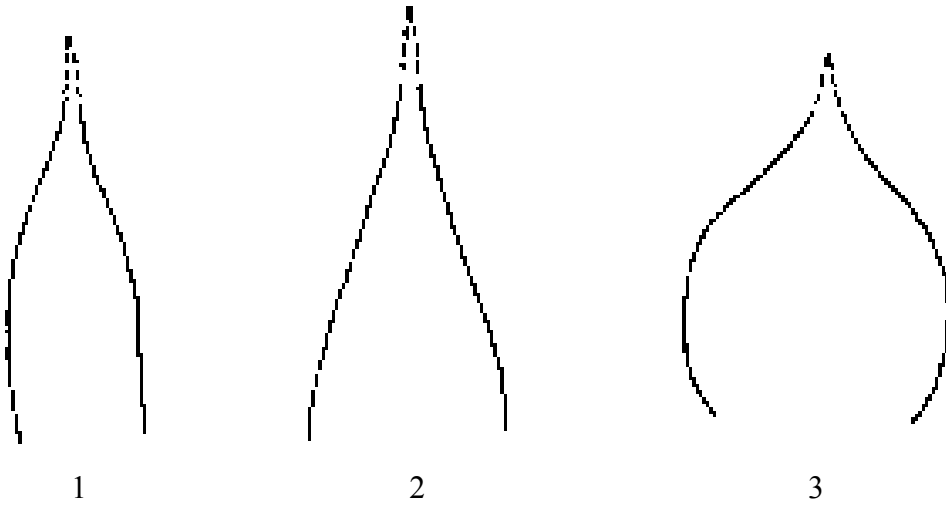
arrondie

Add. 21 et 22 : Fleuron : pigmentation anthocyanique du stigmate

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



Add. 24 : Bractée : forme



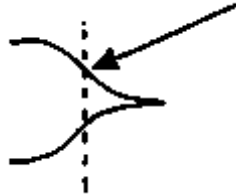
1
nettement allongée

2
ni nettement allongée
ni nettement arrondie

3
nettement arrondie

Add. 25 : Bractée : longueur du sommet

Le sommet commence à l'endroit où
la courbure change de direction

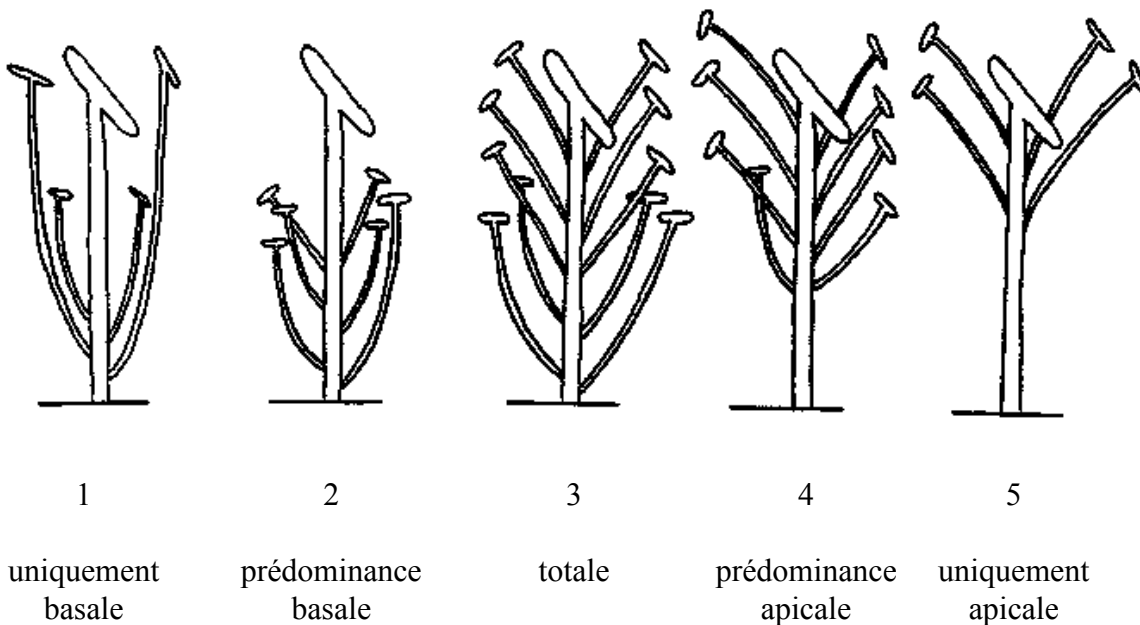


Add. 27 : Plante : hauteur

Different environmental conditions may require separate scales for lines, hybrids and open pollinated varieties

Add. 30 : Plante : type de ramification

(à l'exclusion de la ramification causée par l'environnement)

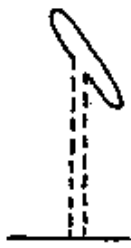


Add. 32 : Capitule : port



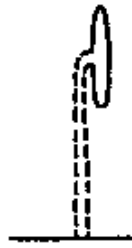
1

horizontal



2

incliné



3

vertical



4

demi-renversé
avec tige droite



5

demi-renversé
avec tige arquée



6

renversé avec tige
droite



7

renversé avec tige
légèrement arquée



8

renversé avec tige
fortement arquée



9

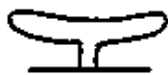
retourné

Add. 34 : Capitule : forme de la partie du grain



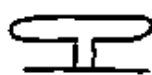
1

fortement
concave



2

faiblement
concave



3

plan



4

faiblement
convexe



5

fortement
convexe



6

difforme

Add. 36 : Grain : forme



1

allongé



2

ovoïde allongé



3

ovoïde arrondi



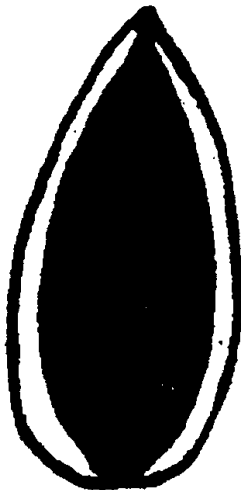
4

arrondi

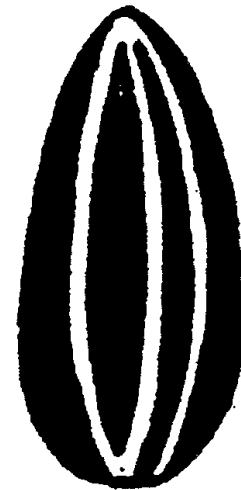
Add. 38 : Grain : couleur principale

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

Add. 39 et 40 : Grain : stries



sur le bord



entre les bords

STADES REPÈRES DU TOURNESOL¹

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

Germination - levée (A)



A 1

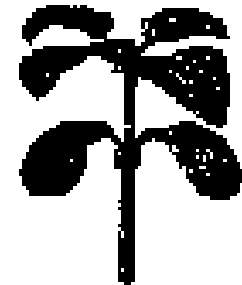
Apparition des hypocotyles en crosse.



A 2

Émergence des cotylédons et premières feuilles visibles.

Phase végétative (B)



B 3 – B 4

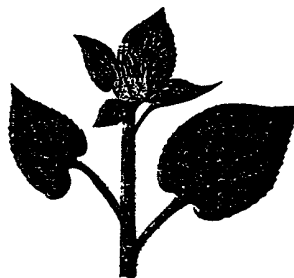
La seconde paire de feuilles opposées apparaît et a environ 4 cm de long; les pétioles sont visibles du dessus.

Phase bouton floral (E)



E 1

Apparition du bouton florale étroitement inséré au milieu des jeunes feuilles : stade bouton étoile.



E 2

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



E 4

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

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

Floraison (F)

Maturation (M)



F 1

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



F 3.2

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



M 0

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

Maturation (M)



M 2

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



M 3

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



M 4

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

IX. Littérature

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

X. Questionnaire technique

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

4. Renseignement sur l'origine, le maintien et la reproduction ou la multiplication de la variété

4.1 Type de matériel

- a) lignée endogame
– lignée stérile mâle []
– lignée fertile mâle []
- b) hybride
– hybride stérile mâle []
– hybride simple fertile mâle []
– hybride trois voies []
- c) variété à fécondation libre []
- d) autres (veuillez préciser) []

.....

4.2 Formule (le cas échéant, il convient d'ajouter pour chaque composant, sur une feuille distincte, l'information demandée aux points 5 à 7).

Hybride simple

(.....) x (.....)
lignée femelle lignée mâle

Hybride trois voies

(.....) x (.....)
lignée parentale femelle lignée parentale mâle

d'un hybride simple utilisé comme femelle x (.....)
lignée parentale mâle d'un hybride 3 voies

NB : Si vous utilisez le système de stérilité mâle, donnez le nom du mainteneur de la lignée parentale femelle :

.....

4.3 Origine génétique (à remplir pour chaque composant dans le cas d'une variété hybride)

Nom du composant	Origine génétique	Parenté avec l'un des autres composants connus
------------------	-------------------	--

...
...

4.4 Autres renseignements

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

Caractères	Exemples	Note
5.1 Feuille : couleur verte (6)		
claire	H 52.9.1.1	3[]
moyenne	HA 821	5[]
foncée	HA 303	7[]
5.2 Feuille : cloûre (7)		
absente ou très faible		1[]
faible	HA 342, RHA 273	3[]
moyenne	HA 291	5[]
forte	HA 303, RHA 361	7[]
très forte		9[]
5.3 Époque de floraison (14) (indiquer la date moyenne de floraison de la variété et de deux variétés bien connues)		
très précoce	HA 302, RHA 381	1[]
précoce	RHA 273	3[]
moyenne	RHA 274	5[]
tardive	RHA 271	7[]
très tardive	RHA 361	9[]

Caractères	Exemples	Note
5.4 Fleur ligulée : couleur (19)		
ivoire		1[]
jaune pâle		2[]
jaune moyen	HA 89	3[]
jaune orange	RHA 361	4[]
orange	CM 587, RHA 295	5[]
pourpre		6[]
brun rougeâtre		7[]
multicolore		8[]
5.5 Plante : hauteur (27)		
très courte	HA 379	1[]
courte	HA 291	3[]
moyenne	RHA 801	5[]
haute	H 52.9.1.1	7[]
très haute		9[]
5.6 Plante : ramification (à l'exclusion de la ramification causée par l'environnement) (29)		
absente	HA89	1[]
présente	RHA 271	9[]
5.7 Grain : stries sur le bord (39)		
aucune ou très faiblement marquées	RHA 273	1[]
faiblement marquées	H 52.9.1.1	2[]
fortement marquées	HA 89	3[]

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

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

7.1 Résistance aux parasites et aux maladies

a) Mildiou []
(indiquer les souches)

.....
.....

b) Rouille []

c) Autres parasites ou maladies []
(préciser)

.....

7.2 Utilisation

a) huile et tourteau []

b) oiseaux et "bouche" []

c) ornementale []

d) autre utilisation []

.....

7.3 Conditions particulières pour l'examen de la variété

7.4 Autres renseignements

8. Autorisation de dissémination

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

oui [] non []

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

oui [] non []

[L'annexe suit]

ANNEXE

Explications additionnelles utiles

	<u>SOMMAIRE</u>	<u>PAGE</u>
Partie I :	Introduction	2
Partie II :	Caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse	3
Partie III :	Description de la méthode à utiliser	4

Partie I

Introduction

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

Partie II

Caractères obtenus par l'utilisation de l'électrophorèse

	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielsorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
43. (+)	Allele expression at locus Me1	Expression allélique au locus Me1	Allel-Ausprägung im Genlocus Me1	Expression alélica del locus Me 1		
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	Genotipo 2/2	HA89	1
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	Genotipo 4/4	RHA274	2
	Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Genotipo 2/4	Florence	3
44. (+)	Allele expression at locus Pgd1	Expression allélique au locus Pgd1	Allel-Ausprägung im Genlocus Pgd1	Expression alélica del locus Pgd1		
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	Genotipo 2/2	RHA274	1
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	Genotipo 4/4	HA850	2
	Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Genotipo 2/4	Santafe	3
45. (+)	Allele expression at locus Pgi2	Expression allélique au locus Pgi2	Allel-Ausprägung im Genlocus Pgi2	Expression alélica del locus Pgi2		
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	Genotipo 2/2	RHA274	1
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	Genotipo 4/4	H559211	2
	Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Genotipo 2/4	Santafe	3
46. (+)	Allele expression at locus Shdh1	Expression allélique au locus Shdh1	Allel-Ausprägung im Genlocus Shdh1	Expression alélica del locus Shdh 1		
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	Genotipo 2/2	HA89	1
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	Genotipo 4/4	RHA856	2
	Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Genotipo 2/4	Florence	3

	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
47. (+)	Allele expression at locus Pgm4	Expression allélique au locus Pgm4	Allel-Ausprägung im Genlocus Pgm4	Expression alélica del locus Pgm4		
	Genotype 2/2	Génotype 2/2	Genotyp 2/2	Genotipo 2/2	RHA274	1
	Genotype 4/4	Génotype 4/4	Genotyp 4/4	Genotipo 4/4	HA89	2
	Genotype 2/4	Génotype 2/4	Genotyp 2/4	Genotipo 2/4	Florence	3

Partie III

Description de la méthode à utiliser

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

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

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

2. **Equipement**

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

3. **Produits chimiques**

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

3.1 Produits chimiques pour l'extraction des enzymes :

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

3.2 Produits chimiques pour l'électrophorèse

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

3.3 Produits chimiques pour la révélation des enzymes

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

D-Fructose 6-phosphate sel disodique
 α -D Glucose 1-phosphate, sel disodique monohydraté
Glucose 6-phosphate déshydrogénase (Sigma G5885)
HCl : Acide chlorhydrique
 $MgCl_2$: Chlorure de magnésium, $6H_2O$
MTT : Diméthylthiazol diphényltétrazolium
 β -NADP : β -Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, sel disodique
NaOH : Hydroxyde de sodium (soude)
NBT : Nitro blue tétrazolium
PMS : Phénazine méthosulfate
Tris : Tris- (hydroxyméthyl) aminométhane

4. Solutions

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

4.2 Tampons d'électrophorèse

4.2.1 Tampons pour l'électrophorèse à pH 6,5

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

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

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

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

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

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

4.2.2 Tampons pour l'électrophorèse à pH 5,7

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

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

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

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

4.2.2.3 Solution de Bleu de bromophénol :

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

4.3 Solutions de révélation

4.3.1 Solutions - mères

4.3.1.1 Tris-HCl 1 M, pH 7,5

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

4.3.1.2 Tris-HCl 1 M pH 8,5

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

4.3.1.3 Solution de MTT

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

4.3.1.4 Solution de NBT

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

4.3.1.5 Solution de PMS

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

4.3.1.6 Solution de MgCl₂

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

4.3.1.7 Solution de malate de sodium

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

4.3.2 Solutions des révélations enzymatiques

4.3.2.1 Solution de révélation des EM

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

4.3.2.2 Solution de révélation des PGI et des PGD

Les PGI migrent dans les deux premiers centimètres du gel.

Les PGD migrent au-dessus des PGI.

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

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

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

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

4.3.2.3 Solution de révélation des PGM

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

4.3.2.4 Solution de révélation des ShDH

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

5. **Manipulation**

5.1 Extraction des enzymes

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

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

5.2 Préparation du gel d'amidon

Préparer les gels, la veille de la migration

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

5.3 Electrophorèse

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Après 15 mn de migration au 1^{er} voltage, retirer les mèches et augmenter le voltage.

Le voltage est maintenu constant pendant chaque phase.

Les conditions électrophorétiques sont indiquées dans le tableau suivant.

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

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

5.4 Révélation enzymatiques

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

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

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

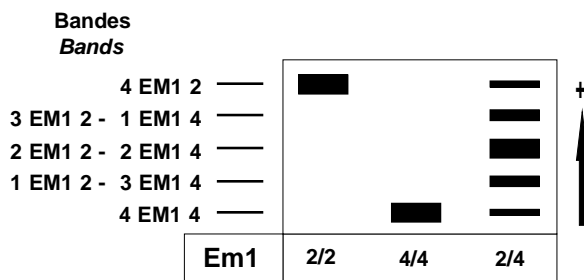
6. Description des allèles codant pour les isoenzymes

6.1 Description des allèles codant pour les EM

6.1.1 Interprétation génétique des zymogrammes

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

6.1.2 Schématisation des zymogrammes

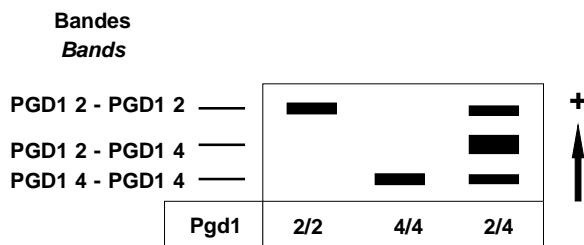


6.2 Description des allèles codant pour les PGD

6.2.1 Interprétation génétique des zymogrammes

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

6.2.2 Schématisation des zymogrammes



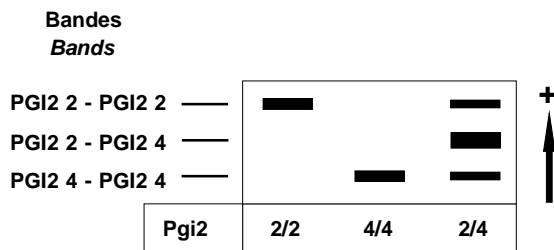
On observe deux zones de migration ; seules les bandes de migration plus lente sont polymorphes.

6.3 Description des allèles codant pour les PGI

6.3.1 Interprétation génétique des zymogrammes

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

6.3.2 Schématisation des zymogrammes



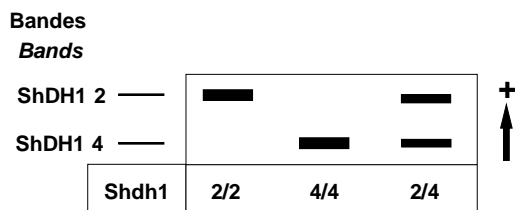
On observe deux zones de migration ; seules les bandes les plus lentes sont interprétées.

6.4 Description des allèles codant pour les ShDH

6.4.1 Interprétation génétique des zymogrammes

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

6.4.2 Schématisation des zymogrammes

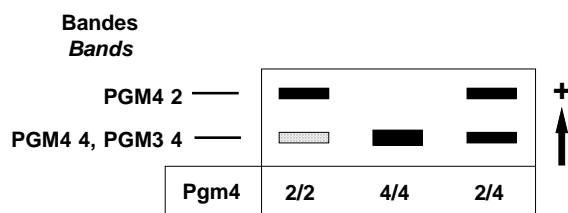


6.5 Description des allèles codant pour les PGM

6.5.1 Interprétation génétique des zymogrammes

Enzyme	Structure quaternaire	Locus	Allèles
Phosphoglucomutase	Monomérique	Pgm4	2 4

6.5.2 Schématisation des zymogrammes



On observe plusieurs zones de migration ; seule la zone rapide est polymorphe. Il y a un autre gène que nous avons désigné Pgm3, mais qui n'a pas été étudié, qui code pour une enzyme qui co-migre avec PGM4 4

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

[Fin du document]