

NORME
INTERNATIONALE

ISO
8981

Première édition
1993-11-15

**Blé — Identification des variétés par
électrophorèse**

iTeh STANDARD PREVIEW
Wheat — Identification of varieties by electrophoresis
(standards.iteh.ai)

[ISO 8981:1993](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85b4adac-3b15-46db-91f5-d6522dfbb39b/iso-8981-1993>



Numéro de référence
ISO 8981:1993(F)

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 8981 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 4, *Céréales et légumineuses*.

L'annexe A fait partie intégrante de la présente Norme internationale. L'annexe B est donnée uniquement à titre d'information.

Introduction

La composition protéique du blé est directement contrôlée par les gènes et généralement indépendante des conditions d'environnement (lieu et année de croissance). Par ailleurs, dans le cas du blé, la fécondation s'effectue essentiellement par autopolinisation et la composition protéique est donc stable sur plusieurs générations. Elle peut par conséquent servir à la caractérisation et donc à l'identification variétale, à partir des diagrammes protéiques qui peuvent être obtenus en séparant les gliadines par électrophorèse en gel de polyacrylamide. La séparation est suivie d'une coloration des gels qui permet de révéler les différents composants protéiques, et les schémas protéiques obtenus sont rapportés aux différentes variétés de blé. Il convient de déterminer les schémas types de toutes les variétés susceptibles d'être rencontrées dans une situation donnée (établissement d'un catalogue variétal). La comparaison de l'électrophorégramme obtenu pour une variété inconnue avec les schémas types du catalogue permet l'identification variétale. Cette technique est totalement définie et couramment utilisée dans de nombreux pays.

[ISO 8981:1993](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85b4adac-3b15-46db-91f5-d6522dfbb39b/iso-8981-1993)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85b4adac-3b15-46db-91f5-d6522dfbb39b/iso-8981-1993>

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 8981:1993

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85b4adac-3b15-46db-91f5-d6522dfbb39b/iso-8981-1993>

Blé — Identification des variétés par électrophorèse

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode d'identification de la variété d'un lot donné de blé tendre ou de blé dur, sous la forme de grains broyés pris isolément, de farine, féculé ou semoule, par séparation des protéines de gliadine.

2 Principe

Séparation des gliadines du blé par électrophorèse en gel de polyacrylamide, dans des plaques de gel contenant un tampon lactate d'aluminium de pH 3,1.

3 Réactifs

Sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée doit être de l'eau déionisée ayant une résistance supérieure à 10 M Ω .

3.1 Solution d'extraction, éthanol, solution à 70 % (V/V).

Diluer 700 ml d'éthanol (absolu) avec 300 ml d'eau.

3.2 Solution tampon, lactate d'aluminium, solution à 2,5 g/l.

Dissoudre 15,0 g de lactate d'aluminium dans 5,5 litres d'eau. Ajuster le pH à 3,1 avec de l'acide lactique. Compléter à 6 litres avec de l'eau. Filtrer sous vide sur filtre de porosité 0,45 μ m.

Conserver à 4 °C.

NOTE 1 La conductivité de la solution se situe approximativement à 950 μ S/m.

3.3 Tampon de dilution des échantillons

Dissoudre 60,0 g de saccharose dans 50 ml de solution tampon (3.2).

Conserver à 4 °C.

3.4 Acrylamide, solution à 60,0 g/l de gel.

AVERTISSEMENT — Le monomère acrylamide est une substance neurotoxique pouvant être absorbée par voie transcutanée. Il convient de le manipuler avec précaution, qu'il soit en poudre ou en solution.

Dissoudre, dans une fiole jaugée de 100 ml, 6,0 g d'acrylamide (qualité pour électrophorèse), 0,300 g de *N,N*-méthylène biacrylamide (qualité pour électrophorèse) et 0,020 g d'acide ascorbique dans la solution tampon (3.2).

Compléter au volume avec la solution tampon.

Conserver à 4 °C.

3.5 Solution d'initiation, solution de fer(II) heptahydraté à 10 g/l

Dissoudre, dans une fiole jaugée de 10 ml, 0,1 g de sulfate de fer(II) heptahydraté dans de l'eau et compléter au volume avec de l'eau.

Préparer cette solution extemporanément.

3.6 Solution de catalyse, peroxyde d'hydrogène solution à 0,99 % (m/m).

Dissoudre, dans une fiole jaugée de 10 ml, 0,33 ml de peroxyde d'hydrogène [30 % (m/m)] dans de l'eau. Compléter au volume avec de l'eau.

Préparer une nouvelle solution chaque jour et conserver à 4 °C.

3.7 Acide trichloroacétique, solution à 9,6 % (m/m).

Dissoudre, dans une fiole jaugée de 1 000 ml, 96 g d'acide trichloroacétique dans de l'eau.

Compléter au volume avec de l'eau.

3.8 Bleu brillant R250, solution mère à 5,0 g/l.

Dissoudre 5,0 g de Bleu brillant dans 1 litre d'éthanol, agiter pendant 1 h, puis filtrer sur papier filtre pour éliminer toute trace de sels inorganiques.

3.9 Solution de coloration: Bleu brillant, solution à 0,25 g/l.

Mélanger 5,0 ml de solution mère (3.8) avec 95 ml de solution d'acide trichloroacétique (3.7).

3.10 Marqueur ou traceur coloré, par exemple, pyronine G, vert de méthyle.

4 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et en particulier ce qui suit.

4.1 Unité d'électrophorèse verticale¹⁾

4.2 Peignes, appropriés à l'équipement utilisé.

4.3 Alimentation stabilisée

Générateur de courant continu pouvant délivrer des tensions stables et constantes jusqu'à 1 000 V et une intensité constante jusqu'à 300 mA (min. 300 W).

4.4 Bain de réfrigération, thermorégulé.

Bain d'eau circulant permettant le maintien à 20 °C ± 1 °C de la cuve à électrophorèse.

4.5 Système de purification de l'eau

Système de déionisation produisant de l'eau de haute pureté de résistance supérieure à 10 MΩ.

4.6 Balance analytique

4.7 pH-mètre, permettant de mesurer le pH avec une précision de ± 0,05.

4.8 Conductimètre (facultatif).

4.9 Appareil de filtration sous vide, avec filtres en nitrocellulose, d'une porosité de 0,45 µm.

4.10 Papier filtre, Whatman n° 1, 15,0 cm.

4.11 Agitateur magnétique, avec barreaux magnétiques revêtus de PTFE²⁾, de 2,5 cm et 5 cm de longueur.

4.12 Marteau et plaque en acier, pour écraser les grains pris isolément.

4.13 Broyeur d'échantillons, permettant d'obtenir des particules d'une taille de 500 µm.

4.14 Tubes à échantillons, avec capuchons.

4.15 Micropipettes

Pipettes automatiques avec cônes jetables de 2,5 ml, permettant de délivrer des volumes de 50 µl à 250 µl. Micropipettes à volume ajustable à 10 µl à 100 µl et 100 µl à 1 000 µl.

4.16 Microcentrifugeuse, pouvant produire une force centrifuge de 10 000 g minimum.

4.17 Tubes à centrifuger, de capacité 1,5 ml à 2,0 ml.

4.18 Homogénéiseur vortex

4.19 Micro-seringues, de capacité 25 µl.

4.20 Récipients rigides en polyéthylène, de 6 cm × 17 cm × 17 cm approximativement.

4.21 Bacs en pyrex, de 33 cm × 23 cm × 5 cm, pour le lavage, l'observation et la photographie des gels.

4.22 Agitateur à vitesse variable, permettant de fournir une vitesse d'agitation d'environ 50 rpm.

4.23 Négatoscope, avec source de lumière fluorescente, et surface utile de 30 cm × 60 cm minimum pour l'examen et la photographie des gels.

4.24 Appareil photographique

Appareil type reflex mono-objectif de 35 mm, avec film noir et blanc ou de couleur à grain fin.

4.25 Statif

Tout pied stable permettant la prise de vues à faible vitesse d'obturation.

1) Il existe de nombreux appareils d'électrophorèse verticale dans le commerce.

2) PTFE = polytétrafluoroéthylène

5 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transfert et de l'entreposage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Des méthodes d'échantillonnage recommandées sont données dans l'ISO 950, l'ISO 2170 et l'ISO 6644.

6 Mode opératoire

6.1 Préparation des échantillons pour essai et extraction

6.1.1 Échantillons de graines isolées

NOTE 2 Le nombre de graines isolées à analyser, pour une identification, dépend de la précision recherchée. Les limites de l'intervalle de confiance, en fonction du nombre de grains examinés, sont données dans l'annexe A. L'analyse de sous-échantillons d'effectifs plus élevés permet d'obtenir des estimations de proportion plus précises.

Placer les grains dans une feuille de papier pliée (5 cm × 5 cm) sur une plaque métallique et les réduire en poudre avec le marteau (4.12). Transférer les grains écrasés dans un tube à échantillons (4.14). Ajouter 200 µl de solution d'extraction (3.1) à l'aide du distributeur (4.15), homogénéiser pendant 10 s dans le vortex (4.18) puis laisser reposer à température ambiante (20 °C) pendant 1 h au moins. Ajouter 100 µl du tampon de dilution de l'échantillon (3.3) et homogénéiser à nouveau. Laisser reposer le mélange pendant 10 min avant de prélever l'échantillon pour analyse.

Si l'extrait des grains doit être conservé pendant plus de 24 h, le transvaser dans un tube à centrifuger (4.17) et passer pendant 3 min dans la microcentrifugeuse (4.16) à 10 000 g. Décanter le surnageant dans un tube à échantillons, puis fermer celui-ci avec le capuchon.

Conserver à 4 °C pendant 10 jours maximum.

NOTE 3 Les volumes indiqués sont adaptés à une masse moyenne de graines de 30 mg. En général, les laboratoires ne pèsent pas les graines individuelles, mais ceci peut être réalisé en pesant les graines, puis en ajoutant ensuite des volumes correspondant globalement à 10 µl par milligramme de blé. L'utilisation d'une pesée des graines permet d'obtenir de meilleurs électrophorégrammes, mais augmente les temps de préparation des échantillons.

6.1.2 Échantillons en vrac

Moudre l'échantillon dans le broyeur électrique (4.13). Peser 0,2 g de la mouture dans un tube à centrifuger (4.17) et ajouter 600 µl de solution d'extraction. Homogénéiser pendant 10 s dans le vortex (4.18) et laisser reposer à température ambiante (20 °C) pendant 1 h au moins, ou pendant toute une nuit. Centrifuger pendant 5 min à 10 000 g. Transvaser 200 µl du surnageant dans un tube à échantillons contenant 400 µl de tampon de dilution de l'échantillon (3.3) et fermer le tube. Homogénéiser pendant 10 s.

Conserver à 4 °C pendant 10 jours maximum.

6.2 Préparation de référence

Procéder comme décrit en 6.1, mais en utilisant des graines de la variété de référence pure (Neepawa)³.

6.3 Préparation du gel

Assembler les moules avec des intercalaires de 1,5 mm d'épaisseur, conformément aux instructions du fabricant.

NOTE 4 Pour faciliter le coulage du gel et l'insertion du peigne, fixe, avec du papier adhésif, une bande de plastique (par exemple Plexiglas⁴), 140 mm × 25 mm × 3 mm) au bord supérieur de l'une des plaques en verre de chaque moule.

Pour préparer chaque gel, mélanger 30 g de solution de gel (3.4) et 75 µl de solution d'initiation (3.5) dans une fiole à filtrer de 125 ml avec tubulure latérale. Dégazer le mélange pendant 2 min sous pression inférieure ou égale à 50 mm Hg en mélangeant constamment. Ajouter 120 µl de solution de catalyse (3.6). Homogénéiser manuellement la solution pendant 10 s en la faisant tourner avec précaution pour éviter la formation de bulles d'air. Verser rapidement la solution dans le moule en veillant à maintenir un écoulement continu de façon à réduire au minimum l'introduction d'air. Une fois le moule rempli, placer immédiatement le peigne (4.2) entre les plaques. Le temps de polymérisation est de 5 min à 10 min.

NOTE 5 Une température de coulage de 20 °C à 22 °C a donné des résultats satisfaisants.

6.4 Dépôt de l'échantillon

Retirer le peigne avec précaution et remplir les puits de solution tampon (3.2) pour empêcher la déshydratation du gel. Avec une micro-seringue (4.19), déposer

3) Des graines de la variété de référence pure (Neepawa) peuvent être obtenues au Canadian Grain Commission, Grain Research Laboratory, 1404-303 Main Street, Winnipeg, Manitoba, R3C 3G8 Canada.

4) Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

l'extrait protéique (6.1.1 ou 6.1.2) à la base des puits. Le dépôt de l'échantillon doit être en rapport avec l'équipement utilisé. (En raison de sa densité, l'extrait protéique reste au fond, sous la solution tampon.) Placer la préparation de référence (6.2) dans n'importe quel puits sauf dans les deux puits extrêmes.

NOTE 6 Par exemple, déposer un échantillon de 2 μ l dans chaque puits de la plaque de gel à 30 puits et de 1,5 mm d'épaisseur.

6.5 Assemblage de l'unité d'électrophorèse

Fixer le haut des moules à la cuve supérieure. Assembler les éléments composants de la cuve inférieure suivant les instructions du fabricant. Placer l'ensemble cuve supérieure et moules dans la cuve inférieure préalablement remplie de solution tampon (3.2) (ou un volume suffisant pour assurer l'immersion des moules). Remplir la cuve supérieure de solution tampon, mettre le couvercle en place et brancher les électrodes aux bornes du générateur (4.3). Vérifier que l'électrode de la cuve supérieure est bien l'anode et qu'elle est connectée à la borne positive (+) du générateur, et que l'électrode de la cuve inférieure est bien la cathode et qu'elle est connectée à la borne négative (–) du générateur.

6.6 Électrophorèse

Régler le bain d'eau (4.4) de façon à maintenir l'unité d'électrophorèse à 20 °C pendant toute la durée de la migration. Conduire l'électrophorèse sous courant d'intensité constante égale à 90 mA. Utiliser un marqueur ou traceur (3.10) pour déterminer le temps de migration optimal pour les différents types d'équipements et épaisseurs de gels. Lorsque la migration est terminée, arrêter le générateur, retirer le couvercle, sortir la cuve supérieure avec les moules et vider la solution tampon qu'elle contient.

AVERTISSEMENT — Les hautes tensions employées peuvent être mortelles. Vérifier que l'unité d'électrophorèse est utilisée conformément aux règles de sécurité et aux instructions du fabricant, et contrôler l'absence de fuites électriques.

6.7 Coloration

Détacher les moules de l'unité d'électrophorèse. Les ouvrir, démouler les gels et les placer chacun dans un récipient en plastique (4.20) contenant 100 ml de solution de coloration (3.9). Placer les récipients fermés sur l'agitateur (4.22) et maintenir pendant 4 h à 18 h une agitation magnétique modérée, à 50 rpm. Il n'est pas nécessaire de procéder à une décoloration, mais placer les gels dans des bacs en verre contenant de l'eau et les essuyer soigneusement avec un tampon d'ouate pour éliminer le colorant précipité.

7 Photographie

Monter l'appareil photographique (4.24) sur le statif (4.25) au-dessus du négatoscope (4.23). Placer le gel nettoyé dans une cuve en verre (4.21) et l'installer sous l'appareil. Photographier le gel en l'éclairant par-dessous uniquement.

8 Interprétation des électrophorégrammes

8.1 Caractérisation des diagrammes protéiques

Il est possible de caractériser visuellement le diagramme protéique d'une variété (voir figure 1) à partir de la mobilité relative des composants et de l'intensité des bandes, suivant la méthode décrite dans la référence^[4]. Le schéma type (ou les schémas types dans le cas de biotypes) obtenu pour chaque variété à partir de l'analyse de 100 grains est porté sous cette forme, ainsi que sous celle de répliques photographiques, dans le catalogue variétal. À partir de ces données caractéristiques, on établit une clé d'identification fondée sur la présence ou l'absence des bandes correspondant à des mobilités relatives et/ou des intensités données.

8.2 Identification variétale

Pour identifier une variété inconnue à partir de son électrophorégramme, procéder comme suit.

- Examiner visuellement le gel ou sa réplique photographique et noter la position et l'intensité des bandes par comparaison avec celles de l'électrophorégramme réalisé simultanément pour la variété de référence.
- Consulter la clé comme préparée en 8.1 pour procéder à l'identification.
- Vérifier le résultat de l'identification en comparant le diagramme examiné avec celui qui figure dans le catalogue.

9 Expression des résultats

Lorsque l'interprétation de la composition protéique est réalisée à partir de l'analyse de grains pris isolément, il est nécessaire de recourir à l'analyse statistique.

Les intervalles de confiance sont donnés en annexe A.

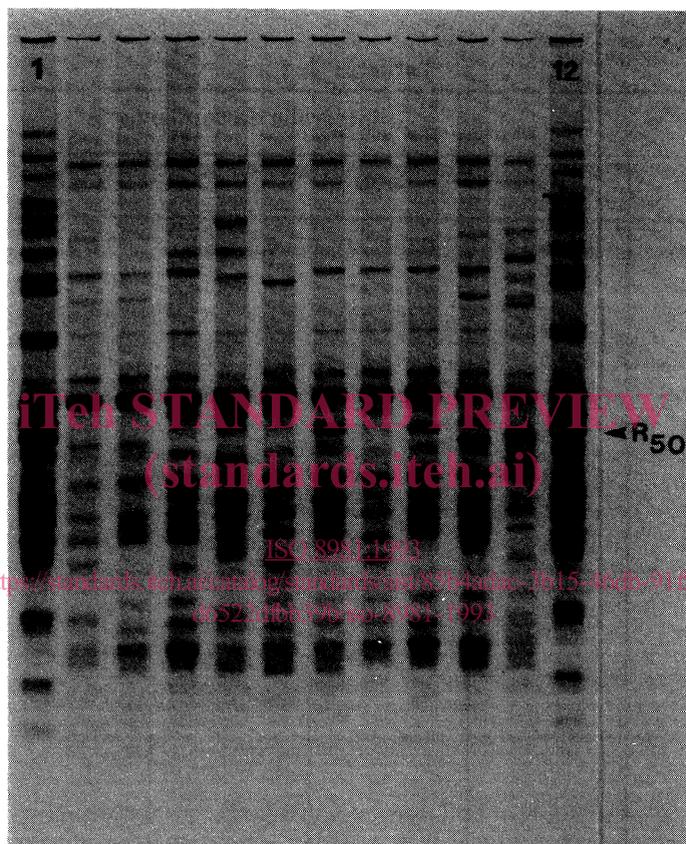


Figure 1 — Électrophorégrammes des gliadines des variétés suivantes: Neepawa (1 et 12), Slejpner (2), Rektor (3), Prinqual (4), Mercia (5), Maris Huntsman (6), Galahad (7), Champlain (8), Camp Rémy (9), Beauchamp (10) et Avalon (11) (R_{50} est un marqueur servant à déterminer les mobilités relatives)