



TG/19/11(proj.3)

ORIGINAL: English

FECHA: 2018-02-15

UNIÓN INTERNACIONAL PARA LA PROTECCIÓN DE LAS OBTENCIONES VEGETALES

Ginebra

PROYECTO

CEBADA

UPOV Code(s):

HORDE_VUL

Hordeum vulgare L. sensu lato

DIRECTRICES

PARA LA EJECUCIÓN DEL EXAMEN

DE LA DISTINCIÓN, LA HOMOGENEIDAD Y LA ESTABILIDAD

*preparadas por un experto de Alemania
para su examen por el
Comité de Redacción Ampliado en su reunión,
que se celebrará en Ginebra los días 26 y 27 de marzo de 2018*

Descargo de responsabilidad: el presente documento no constituye un documento de política u orientación de la UPOV

Nombres alternativos:*

<i>Nombre botánico</i>	<i>Inglés</i>	<i>Francés</i>	<i>Alemán</i>	<i>Español</i>
<i>Hordeum vulgare L. sensu lato</i>	Barley	Orge	Gerste	Cebada

La finalidad de estas directrices ("directrices de examen") es elaborar los principios que figuran en la Introducción General (documento TG/1/3) y sus documentos TGP conexos, con objeto de que sirvan de orientación práctica y detallada para el examen armonizado de la distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE) y en particular, para identificar los caracteres apropiados para el examen DHE y producir descripciones armonizadas de variedades.

DOCUMENTOS CONEXOS

Estas directrices de examen deberán leerse en conjunción con la Introducción General y sus documentos TGP conexos.

* Estos nombres eran correctos en el momento de la adopción de estas directrices de examen pero podrían ser objeto de revisión o actualización. [Se aconseja a los lectores consultar el Código UPOV en el sitio Web de la UPOV (www.upov.int), donde encontrarán la información más reciente.]

<u>ÍNDICE</u>	<u>PÁGINA</u>
1. OBJETO DE ESTAS DIRECTRICES DE EXAMEN.....	<u>4</u>
2. MATERIAL NECESARIO.....	<u>4</u>
3. MÉTODO DE EXAMEN.....	<u>5</u>
3.1 Número De Ciclos De Cultivo.....	<u>5</u>
3.2 Lugar De Ejecución De Los Ensayos.....	<u>5</u>
3.3 Condiciones Para Efectuar El Examen.....	<u>5</u>
3.4 Diseño De Los Ensayos.....	<u>5</u>
3.5 Ensayos Adicionales.....	<u>5</u>
4. EVALUACIÓN DE LA DISTINCIÓN, LA HOMOGENEIDAD Y LA ESTABILIDAD.....	<u>6</u>
4.1 Distinción.....	<u>6</u>
4.2 Homogeneidad.....	<u>7</u>
4.3 Estabilidad.....	<u>8</u>
5. MODO DE AGRUPAR LAS VARIEDADES Y ORGANIZACIÓN DE LOS ENSAYOS EN CULTIVO.....	<u>9</u>
6. INTRODUCCIÓN A LA TABLA DE CARACTERES.....	<u>10</u>
6.1 Categorías De Caracteres.....	<u>10</u>
6.2 Niveles De Expresión Y Notas Correspondientes.....	<u>10</u>
6.3 Tipos De Expresión.....	<u>10</u>
6.4 Variedades Ejemplo.....	<u>11</u>
6.5 Leyenda.....	<u>12</u>
7. TABLE OF CHARACTERISTICS/TABLEAU DES CARACTÈRES/MERKMALSTABELLE/TABLA DE CARACTERES.....	<u>13</u>
8. EXPLICACIONES DE LA TABLA DE CARACTERES.....	<u>22</u>
8.1 Explicaciones Relativas A Caracteres Individuales.....	<u>22</u>
9. BIBLIOGRAFÍA.....	<u>22</u>
10. CUESTIONARIO TÉCNICO.....	<u>34</u>

1. Objeto de estas directrices de examen

Las presentes directrices de examen se aplican a todas las variedades de *Hordeum vulgare* L. *sensu lato*.

2. Material necesario

2.1 Las autoridades competentes deciden cuándo, dónde y en qué cantidad y calidad se deberá entregar el material vegetal necesario para la ejecución del examen de la variedad. Los solicitantes que presenten material procedente de un país distinto de aquel en el que se efectuará el examen, deberán asegurarse de que se han cumplido todas las formalidades aduaneras y fitosanitarias.

2.2 El material se entregará en forma de semillas y espigas (si se solicitan).

2.3 La cantidad mínima de material vegetal que ha de entregar el solicitante deberá ser de:

Semillas: 3 kg
Espigas: 120

La semilla deberá satisfacer, por lo menos, los requisitos mínimos de germinación, pureza analítica y de la especie, sanidad y contenido de humedad que especifiquen las autoridades competentes. Cuando la semilla deba almacenarse, la capacidad de germinación deberá ser lo más elevada posible y deberá ser especificada por el solicitante.

Las espigas deberán estar bien desarrolladas y contener un número de semillas viables suficiente para establecer un cultivo en hileras que permita efectuar observaciones.

2.4 El material vegetal proporcionado deberá presentar una apariencia saludable y no carecer de vigor ni estar afectado por enfermedades o plagas importantes.

2.5 El material vegetal deberá estar exento de todo tratamiento que afecte la expresión de los caracteres de la variedad, salvo autorización en contrario o solicitud expresa de las autoridades competentes. Si ha sido tratado, se deberá indicar en detalle el tratamiento aplicado.

3. Método de examen

3.1 *Número de ciclos de cultivo*

La duración mínima de los ensayos deberá ser normalmente de dos ciclos de cultivo independientes.

3.2 *Lugar de ejecución de los ensayos*

Normalmente los ensayos deberán efectuarse en un sólo lugar. En el documento TGP/9 "Examen de la distinción" se ofrece orientación respecto a los ensayos realizados en más de un lugar.

3.3 *Condiciones para efectuar el examen*

3.3.1 Se deberán efectuar los ensayos en condiciones que aseguren un desarrollo satisfactorio para la expresión de los caracteres pertinentes de la variedad y para la ejecución del examen.

3.3.2 El estado óptimo de desarrollo para evaluar cada carácter se indica mediante una referencia en la tabla de caracteres. Los estados de desarrollo indicados por cada referencia se describen en el Capítulo 8.

3.4 *Diseño de los ensayos*

- 3.4.1 Cada ensayo deberá tener por finalidad la obtención de al menos 2.000 plantas, que se dividirán en 2 repeticiones como mínimo.
- 3.4.2 La evaluación del carácter “tipo de desarrollo” deberá llevarse a cabo en al menos 300 plantas.
- 3.4.2 Si se efectúan exámenes de las espigas-surco, deberán observarse al menos 100 espigas-surco.
- 3.4.4 Los ensayos deberán concebirse de tal manera que se permita la extracción de plantas o partes de plantas para efectuar medidas y conteos, sin perjudicar las observaciones ulteriores que se deban efectuar hasta el final del ciclo de cultivo.

3.5 *Ensayos adicionales*

Se podrán efectuar ensayos adicionales para estudiar caracteres pertinentes.

4. Evaluación de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad

4.1 *Distinción*

4.1.1 Recomendaciones generales

Es de particular importancia para los usuarios de estas directrices de examen consultar la Introducción General antes de tomar decisiones relativas a la distinción. Sin embargo, a continuación se citan una serie de aspectos que han de tenerse en cuenta en las directrices de examen.

Para evaluar la distinción de los híbridos, se puede utilizar las líneas parentales y la fórmula, con arreglo a las siguientes recomendaciones:

- i) descripción de las líneas parentales con arreglo a las Directrices de examen;
- ii) comprobación de la originalidad de las líneas parentales por comparación con la colección de referencia, sobre la base de los caracteres indicados en el capítulo 7, con el fin de seleccionar las líneas endógamas más próximas;
- iii) comprobación de la originalidad de la fórmula de los híbridos por comparación con la de los híbridos notoriamente conocidos, teniendo en cuenta las líneas endógamas más próximas;
- (iv) evaluación de la distinción en el nivel del híbrido en las variedades con una fórmula similar.

En los documentos TGP/9 “Examen de la distinción” y TGP/8 “Diseño de ensayos y técnicas utilizadas en el examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad” se ofrecen más orientaciones.

4.1.2 Diferencias consistentes

Las diferencias observadas entre variedades pueden ser tan evidentes que no sea necesario más de un ciclo de cultivo. Asimismo, en algunas circunstancias, la influencia del medio ambiente no reviste la importancia suficiente como para requerir más de un único ciclo de cultivo con el fin de garantizar que las diferencias observadas entre variedades son suficientemente consistentes. Una manera de garantizar que una diferencia en un carácter, observada en un ensayo en cultivo, sea lo suficientemente consistente es examinar el carácter en al menos dos ciclos de cultivo independientes.

4.1.3 Diferencias claras

Determinar si una diferencia entre dos variedades es clara depende de muchos factores y, para ello se tendría que considerar, en particular, el tipo de expresión del carácter que se esté examinando, es decir, si éste se expresa de manera cualitativa, cuantitativa o pseudocualitativa. Por consiguiente, es importante que los usuarios de estas directrices de examen estén familiarizados con las recomendaciones contenidas en la Introducción General antes de tomar decisiones relativas a la distinción.

4.1.4 Número de plantas o partes de plantas que se ha de examinar

Salvo indicación en contrario, a los efectos de la distinción, todas las observaciones de plantas individuales deberán efectuarse en 10 plantas o partes de cada una de las 10 plantas y cualquier otra observación se efectuará en todas las plantas del ensayo, sin tener en cuenta las plantas fuera de tipo.

En el caso de observaciones de partes tomadas de plantas individuales, el número de partes que deberán tomarse de cada una de las plantas, deberá ser de 1.

4.1.5 Método de observación

El método recomendado para observar los caracteres a los fines del examen de la distinción se indica en la tabla de caracteres mediante la siguiente clave (véase el documento TGP/9 “Examen de la distinción”, sección 4 “Observación de los caracteres”):

MG: medición única de un grupo de varias plantas o partes de plantas

MS: medición de varias plantas o partes de plantas individuales

VG: evaluación visual mediante una única observación de un grupo de varias plantas o partes de plantas

VS: evaluación visual mediante la observación de varias plantas o partes de plantas individuales

Tipo de observación visual (V) o medición (M)

La observación “visual” (V) es una observación basada en la opinión del experto. A los fines del presente documento, por observación “visual” se entienden las observaciones sensoriales de los expertos y, por lo tanto, también incluye el olfato, el gusto y el tacto. La observación visual comprende además las observaciones en las que el experto utiliza referencias (por ejemplo, diagramas, variedades ejemplo, comparación por pares) o gráficos no lineales (por ejemplo, cartas de colores). La medición (M) es una observación objetiva que se realiza frente a una escala lineal calibrada, por ejemplo, utilizando una regla, una báscula, un colorímetro, fechas, recuentos, etc.

Tipo de registro(s): un grupo de plantas (G) o plantas individuales (S)

A los fines de la distinción, las observaciones pueden registrarse mediante una observación global de un grupo de plantas o partes de plantas (G) o mediante observaciones de varias plantas o partes de plantas individuales (S). En la mayoría de los casos, la observación del tipo “G” proporciona un único registro por variedad y no es posible ni necesario aplicar métodos estadísticos en un análisis planta por planta para la evaluación de la distinción.

Para los casos en que en la tabla de caracteres se indica más de un método de observación de los caracteres (p. ej. VG/MG), en la Sección 4.2 del documento TGP/9 se ofrece orientación sobre la elección de un método apropiado.

4.2 Homogeneidad

- 4.2.1 Es particularmente importante que los usuarios de estas directrices de examen consulten la Introducción General antes de tomar decisiones relativas a la homogeneidad. Sin embargo, a continuación se citan una serie de aspectos que han de tenerse en cuenta en las directrices de examen.
- 4.2.2 Las presentes directrices de examen han sido desarrolladas para el examen de variedades autóгамas y variedades híbridas. En el caso de variedades con otros tipos de reproducción o multiplicación, deberán seguirse las recomendaciones que figuran en la Introducción General y en la sección 4.5 “Examen de la homogeneidad” del documento TGP/13 “Orientaciones para nuevos tipos y especies”.
- 4.2.3 La evaluación de la homogeneidad en las variedades híbridas depende del tipo de híbrido y se realizará de conformidad con las recomendaciones que figuran en la Introducción General.
- 4.2.4 Cuando en la evaluación se emplean las líneas parentales, la homogeneidad de un híbrido debe evaluarse mediante el examen de la homogeneidad de sus líneas parentales, además del examen del híbrido en sí.
- 4.2.5 El tamaño de muestra recomendado para evaluar la homogeneidad se indica en la tabla de caracteres mediante la siguiente clave:
- A: tamaño de muestra de 100 plantas, partes de plantas o espigas-surco
B: tamaño de muestra de 2.000 plantas
- 4.2.6 Para evaluar la homogeneidad en una muestra de 2.000 plantas, deberán aplicarse las siguientes normas
En las variedades autóгамas deberá aplicarse una población estándar del 0,1% y una probabilidad de aceptación del 95%, como mínimo. En el caso de un tamaño de muestra de 2.000 plantas, se permitirán 5 plantas fuera de tipo.
En las líneas parentales androestériles, deberá aplicarse una población estándar del 0,2% y una probabilidad de aceptación del 95%, como mínimo. En el caso de un tamaño de muestra de 2.000 plantas, se permitirán 8 plantas fuera de tipo.
En los híbridos simples estériles empleados como parentales en un híbrido de tres vías deberá aplicarse una población estándar del 0,5% y una probabilidad de aceptación del 95%, como mínimo. En el caso de un tamaño de muestra de 2.000 plantas, se permitirán 15 plantas fuera de tipo.
- 4.2.7 Para evaluar la homogeneidad en una muestra de 100 espigas-surco, plantas o partes de plantas, deberá aplicarse una población estándar del 1% y una probabilidad de aceptación del 95%, como mínimo. En el caso de una muestra de 100 espigas-surco, plantas o partes de plantas, se permitirán 3 plantas fuera de tipo. Una espiga-surco se considera fuera de tipo si hay más de una planta fuera de tipo en ese surco.
- 4.2.8 La evaluación de la homogeneidad de los caracteres señalados con una “A”, excepto el carácter 1, puede efectuarse en 2 etapas. En la primera etapa se observan 20 plantas. Si no se observan plantas fuera de tipo, se considera que la variedad es homogénea. Si se observan más de 3 plantas fuera de tipo, se considera que la variedad no es homogénea. Si se observan entre 1 y 3 plantas fuera de tipo, se deberá observar otra muestra de 80 plantas o partes de plantas.
- 4.2.9 Para evaluar la homogeneidad de las variedades híbridas, deberá aplicarse una población estándar del 10% y una probabilidad de aceptación del 95%, como mínimo. Para evaluar la homogeneidad de los caracteres señalados con una “B”, el tamaño de la muestra puede reducirse a 200 plantas. En el caso de una muestra de 200 plantas, se permitirán 27 plantas fuera de tipo. En el caso de una muestra de 100 espigas-surco, plantas o partes de plantas, se permitirán 15 plantas fuera de tipo.

4.3 *Estabilidad*

- 4.3.1 En la práctica no es frecuente que se conduzcan exámenes de la estabilidad que brinden resultados tan fiables como los obtenidos en el examen de la distinción y la homogeneidad. No obstante, la experiencia ha demostrado que en muchos tipos de variedades, cuando una variedad haya demostrado ser homogénea, también podrá considerarse estable.
- 4.3.2 Cuando corresponda, o en caso de duda, la estabilidad podrá evaluarse adicionalmente, examinando un nuevo lote de semillas, para asegurarse de que presenta los mismos caracteres que el material suministrado inicialmente.
- 4.3.3 Cuando corresponda, o en caso de duda, la estabilidad de una variedad híbrida podrá, además de evaluarse mediante un examen de la propia variedad híbrida, asimismo evaluarse mediante un examen de la homogeneidad y la estabilidad de sus líneas parentales.

5. Modo de agrupar las variedades y organización de los ensayos en cultivo

- 5.1 Los caracteres de agrupamiento contribuyen a seleccionar las variedades notoriamente conocidas que se han de cultivar en el ensayo con las variedades candidatas y a la manera en que estas variedades se dividen en grupos para facilitar la evaluación de la distinción.
- 5.2 Los caracteres de agrupamiento son aquellos en los que los niveles de expresión documentados, aun cuando hayan sido registrados en distintos lugares, pueden utilizarse, individualmente o en combinación con otros caracteres similares: a) para seleccionar las variedades notoriamente conocidas que puedan ser excluidas del ensayo en cultivo utilizado para el examen de la distinción; y b) para organizar el ensayo en cultivo de manera tal que variedades similares queden agrupadas conjuntamente.
- 5.3 Se ha acordado la utilidad de los siguientes caracteres de agrupamiento:
 - (a) Hojas inferiores: vellosoidad de la vaina de las hojas (carácter 4)
 - (b) Espiga: número de hileras (carácter 14)
 - (c) Espiga: desarrollo de las espiguillas estériles (carácter 15)
 - (d) Grano: tipo de pelo de la raquilla (carácter 24)
 - (e) Grano: tipo (carácter 26)
 - (f) Grano: vellosoidad del surco ventral (carácter 27)
 - (g) Tipo de desarrollo (carácter 28)
- 5.4 En la Introducción General y en el documento TGP/9 "Examen de la distinción" se dan orientaciones sobre el uso de los caracteres de agrupamiento en el proceso de examen de la distinción.

6. Introducción a la tabla de caracteres

6.1 *Categorías de caracteres*

6.1.1 Caracteres estándar de las directrices de examen

Los caracteres estándar de las directrices de examen son aquellos que han sido aprobados por la UPOV para el examen DHE y de los cuales los Miembros de la Unión pueden elegir los que convengan para determinadas circunstancias.

6.1.2 Caracteres con asterisco

Los caracteres con asterisco (señalados con *) son los caracteres incluidos en las directrices de examen que son importantes para la armonización internacional de las descripciones de variedades y que deberán utilizarse siempre en el examen DHE e incluirse en la descripción de la variedad por todos los Miembros de la Unión, excepto cuando el nivel de expresión de un carácter precedente o las condiciones medioambientales de la región lo imposibiliten.

6.2 *Niveles de expresión y notas correspondientes*

6.2.1 Se atribuyen a cada carácter niveles de expresión con el fin de definir el carácter y armonizar las descripciones. A cada nivel de expresión corresponde una nota numérica para facilitar el registro de los datos y la elaboración y el intercambio de la descripción.

6.2.2 En el caso de los caracteres cualitativos y pseudocualitativos (véase el Capítulo 6.3), todos los niveles pertinentes de expresión se presentan en el carácter. Sin embargo, en el caso de caracteres cuantitativos con cinco o más niveles puede utilizarse una escala abreviada para reducir al mínimo el tamaño de la tabla de caracteres. Por ejemplo, respecto de un carácter cuantitativo de nueve niveles de expresión, la presentación de los niveles de expresión en las directrices de examen puede abreviarse como sigue:

<i>Nivel</i>	<i>Nota</i>
pequeño	3
mediano	5
grande	7

Ahora bien, cabe observar que los nueve niveles de expresión siguientes existen para describir las variedades y deberán utilizarse según proceda:

<i>Nivel</i>	<i>Nota</i>
muy pequeño	1
muy pequeño a pequeño	2
pequeño	3
pequeño a mediano	4
mediano	5
mediano a grande	6
grande	7
grande a muy grande	8
muy grande	9

6.2.3 Explicaciones más exhaustivas relativas a la presentación de los niveles de expresión y de las notas figuran en el documento TGP/7 "Elaboración de las directrices de examen."

6.3 *Tipos de expresión*

En la Introducción General figura una explicación de los tipos de expresión de los caracteres (cualitativo, cuantitativo y pseudocualitativo).

6.4 Variedades ejemplo

En caso necesario, se proporcionan variedades ejemplo con el fin de aclarar los niveles de expresión de un carácter.

Las variedades se señalan como:

(S): cebada de primavera

(W): cebada de invierno.

6.5 Leyenda

		English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
1	2	3	4	5	6	7	
		Name of characteristics in English	Nom du caractère en français	Name des Merkmals auf Deutsch	Nombre del carácter en español		
		states of expression	types d'expression	Ausprägungsstufen	tipos de expresión		

1 Número de carácter

2 (*) Carácter con asterisco – véase el Capítulo 6.1.2

3 Tipo de expresión
 QL Carácter cualitativo – véase el Capítulo 6.3
 QN Carácter cuantitativo – véase el Capítulo 6.3
 PQ Carácter pseudocualitativo – véase el Capítulo 6.3

4 Método de observación (y tipo de parcela, si aplicable)
 MG, MS, VG, VS – véase el Capítulo 4.1.5

5 (+) Véanse las explicaciones de la tabla de caracteres en el Capítulo 8.1

6 No aplicable

7 Clave del estado de desarrollo Véanse las explicaciones de la tabla de caracteres en el Capítulo 8

A: tamaño de muestra de 100 plantas, partes de plantas o espigas-surco

B: tamaño de muestra de 2.000 plantas

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

	English		français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
1.	PQ	VG A		00			
	Kernel: color of aleurone layer		Grain nu : couleur de la couche d'aleurone	Nacktes Korn: Farbe der Aleuronschicht	Núcleo carnosos: color de la capa de aleurona		
	whitish		blanchâtre	weißlich	blanquecina	(S) Grace, (W) California	1
	light grey blue		bleu gris clair	helles Graublau	azul grisáceo claro	(S) Henley, (W) SY Leoo	2
	dark grey blue		bleu gris foncé	dunkles Graublau	azul grisáceo oscuro	(S) ---, (W) Saffron	3
	purple		violet	purpurn	púrpura		4
	black		noir	schwarz	negro		5
2. (*)	QN	VG B	(+)	25-29			
	Plant: growth habit		Plante : port	Pflanze: Wuchsform	Planta: hábito de crecimiento		
	erect		dressé	aufrecht	erguido	(S) ---, (W) ---	1
	semi-erect		demi-dressé	halbaufrecht	semi erguido	(S) Pirona, (W) ---	3
	intermediate		intermédiaire	mittel	medio	(S) Grace, (W) California	5
	semi-prostate		demi-étalé	halbliiegend	semipostrado	(S) Quench, (W) KWS Joy	7
	prostate		étalé	liegend	postrado	(S) ---, (W) ---	9
3.	QN	VG B		25-29			
	Plant: intensity of green color		Plante : intensité de la couleur verte	Pflanze: Intensität der Grünfärbung	Planta: intensidad del color verde		
	weak		faible	gering	débil	(S) ---, (W) Lomerit	1
	medium		moyenne	mittel	medio	(S) Conchita, (W) Henriette	2
	strong		forte	stark	oscuro	(S) Quench, (W) KWS Meridian	3

	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
4.	(*) QL VG A		25-29			
	Lowest leaves: hairiness of leaf sheath	Feuilles de la base : pilosité de la gaine	Basalblätter: Behaarung der Blattscheide	Hojas inferiores: vellosidad de la vaina de las hojas		
	absent	absente	fehlend	ausente	(S) Grace, (W) California	1
	present	présente	vorhanden	presente	(S) ---, (W) Henriette	9
5.	(*) QN VG B		45-49			
	Flag leaf: anthocyanin coloration of auricles	Dernière feuille : pigmentation anthocyanique des oreillettes	Fahnenblatt: Anthocyanfärbung der Auricula	Hoja bandera: pigmentación antociánica de las aurículas		
	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil	(S) ---, (W) California	1
	weak	faible	gering	débil	(S) Pirona, (W) ---	3
	medium	moyenne	mittel	media	(S) Conchita, (W) SY Leoo	5
	strong	forte	stark	fuerte	(S) Grace, (W) Semper	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte	(S) ---, (W) Meseta	9
6.	QN VG B	(+)	49-51			
	Flag leaf: attitude	Dernière feuille : port	Fahnenblatt: Haltung	Hoja bandera: porte		
	erect	dressé	aufrecht	erecto	(S) ---, (W) Hobbit	1
	semi-erect	demi-dressé	halbaufrecht	semierecto	(S) Natasia, (W) California	3
	horizontal	horizontal	waagrecht	horizontal	(S) Quench, (W) Saffron	5
	semi-drooping	demi-retombant	halbüberhängend	semicolgante	(S) Arcadia, (W) Matros	7
	drooping	retombant	überhängend	colgante	(S) ---, (W) Augusta	9

	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
7. (*)	QN	MG B	(+)			
	Time of ear emergence	Époque d'épiaison	Zeitpunkt des Ährenschiebens	Época de espigado		
	very early	très précoce	sehr früh	muy precoz	(S) ---, (W) ---	1
	early	précoce	früh	precoz	(S) Lilly, (W) Meseta	3
	medium	moyenne	mittel	media	(S) Natasia, (W) California	5
	late	tardive	spät	tardía	(S) ---, (W) Saffron	7
	very late	très tardive	sehr spät	muy tardía	(S) ---, (W) ---	9
8.	QN	VG B		50-60		
	Flag leaf: glaucosity of sheath	Dernière feuille : glaucescence de la gaine	Fahnenblatt: Bereifung der Blattscheide	Hoja bandera: glaucescencia de la vaina		
	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil	(S) ---, (W) ---	1
	weak	faible	gering	débil	(S) ---, (W) Barbara	3
	medium	moyenne	mittel	media	(S) Pirona, (W) Saffron	5
	strong	forte	stark	fuerte	(S) Grace, (W) California	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte	(S) ---, (W) Henriette	9
9. (*)	QN	VG B		60-65		
	Awns: anthocyanin coloration of tips	Barbes : pigmentation anthocyanique des pointes	Grannen: Anthocyanfärbung der Spitzen	Aristas: pigmentación antociánica de las puntas		
	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil	(S) ---, (W) California	1
	weak	faible	gering	débil	(S) Pirona, (W) Lomerit	3
	medium	moyenne	mittel	media	(S) Ebson, (W) Marielle	5
	strong	forte	stark	fuerte	(S) Grace, (W) Semper	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte	(S) Wilma, (W) ---	9

	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
10. (*)	QN	VG B			65-75	
	Ear: glaucosity	Épi : glaucescence	Ähre: Bereifung	Espiga: glaucescencia		
	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil	(S) Sunshine, (W) Henriette	1
	weak	faible	gering	débil	(S) Michelle, (W) Matros	3
	medium	moyenne	mittel	media	(S) Arcadia, (W) Semper	5
	strong	forte	stark	fuerte	(S) Natasia, (W) KWS Meridian	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte	(S) ---, (W) ---	9
11.	QN	VG B	(+)		70-80	
	Ear: attitude	Épi : port	Ähre: Haltung	Espiga: porte		
	erect	dressé	aufrecht	erecta	(S) ---, (W) ---	1
	semi-erect	demi-dressé	halbaufrecht	semierecta	(S) Quench, (W) KWS Meridian	3
	horizontal	horizontal	waagerecht	horizontal	(S) Grace, (W) Saffron	5
	semi-drooping	demi-retombant	halbüberhängend	semicolgante	(S) Ingmar, (W) Augusta	7
	drooping	retombant	überhängend	colgante	(S) ---, (W) ---	9
12.	QN	VG B			80-85	
	Grain: anthocyanin coloration of nerves of lemma	Grain : pigmentation anthocyanique des nervures de la glumelle inférieure	Korn: Anthocyanfärbung der Nerven der Deckspelze	Grano: pigmentación antociánica de la nervadura de la lema		
	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil	(S) ---, (W) California	1
	weak	faible	gering	débil	(S) Chamonix, (W) Hobbit	3
	medium	moyenne	mittel	media	(S) Quench, (W) Marielle	5
	strong	forte	stark	fuerte	(S) Grace, (W) Atenon	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte	(S) ---, (W) Matros	9

	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
13. (*)	QN MG B	(+)	80-92			
	Plant: length	Plante : longueur	Pflanze: Länge	Planta: longitud		
	very short	très courte	sehr kurz	muy corta	(S) ---, (W) ---	1
	short	courte	kurz	corta	(S) Frontier, (W) Findora	3
	medium	moyenne	mittel	media	(S) Quench, (W) Henriette	5
	long	longue	lang	larga	(S) Pirona, (W) Semper	7
	very long	très longue	sehr lang	muy larga	(S) ---, (W) ---	9
14. (*)	QL VG B		80-92			
	Ear: number of rows	Épi : nombre de lignes	Ähre: Anzahl der Reihen	Espiga: número de hileras		
	two	deux	zwei	dos	(S) Grace, (W) California	1
	six	six	sechs	seis	(S) Olsok, (W) Henriette	2
15. (*)	QL VG B	(+)	80-92			
	Ear: development of sterile spikelets	Épi : développement d'épillets stériles	Ähre: Ausbildung steriler Ährchen	Espiga: desarrollo de las espiguillas estériles		
	none or rudimentary	aucun ou rudimentaires	keine oder rudimentär	ninguno o rudimentario	(S) Grace, (W) California	1
	full	nombreux	vollständig	pleno	(S) Quench, (W) Casanova	2
16. (*)	QN VG B	(+)	80-92			
	Sterile spikelet: attitude	Épillets stériles : port	Steriles Ährchen: Haltung	Espiguilla estéril: porte		
	parallel	parallèle	parallel	paralelas	(S) Pirona, (W) California	1
	parallel to divergent	parallèle à divergent	parallel bis abstehend	paralelas a divergentes	(S) Henley, (W) KWS Joy	2
	divergent	divergent	abstehend	divergentes	(S) Quench, (W) Casanova	3

	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
17. (*)	PQ	VG B	(+)	80-92		
	Ear: shape	Épi : forme	Ähre: Form	Espiga: forma		
	strongly tapering	fortement fuselé	stark pyramidenförmig	muy piramidal	(S) KWS Irina, (W) California	1
	slightly tapering	légèrement fuselé	leicht pyramidenförmig	ligeramente piramidal	(S) Arcadia, (W) Hobbit	2
	parallel	parallèle	parallel	paralela	(S) Natasia, (W) Semper	3
	fusiform	fusiforme	spindelförmig	fusiforme	(S) ---, (W) ---	4
18. (*)	QN	MS B VG B		80-92		
	Ear: density	Épi : densité	Ähre: Dichte	Espiga: densidad		
	very sparse	très lâche	sehr locker	muy laxa	(S) ---, (W) ---	1
	sparse	lâche	locker	laxa	(S) Ingmar, (W) Casanova	3
	medium	moyen	mittel	media	(S) Quench, (W) KWS Meridian	5
	dense	dense	dicht	densa	(S) Belgravia, (W) Findora	7
	very dense	très dense	sehr dicht	muy densa	(S) Mercada, (W) ---	9
19.	QN	MS B VG B	(+)	80-92		
	Ear: length	Épi : longueur	Granne: Länge	Espiga: longitud		
	very short	très court	sehr kurz	muy corta	(S) ---, (W) ---	1
	short	court	kurz	corta	(S) Mercada, (W) Champagne	3
	medium	moyen	mittel	media	(S) Quench, (W) Findora	5
	long	long	lang	larga	(S) Ingmar, (W) California	7
	very long	très long	sehr lang	muy larga	(S) ---, (W) ---	9

	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielsorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
20.	(*)	QN	MS B VG B	(+)	80-92	
	Awn: length	Barbe : longueur	Granne: Länge	Arista: longitud		
	very short	très courte	sehr kurz	muy corta	(S) Pirona, (W) ---	1
	short	courte	kurz	corta	(S) Marthe, (W) KWS Meridian	3
	medium	moyenne	mittel	media	(S) Natasia, (W) Augusta	5
	long	longue	lang	larga	(S) Quench, (W) Lomerit	7
	very long	très longue	sehr lang	muy larga	(S) ---, (W) ---	9
21.	QN	MG A MS A VG A			92	
	Rachis: length of first segment	Rachis : longueur du premier article	Spindel: Länge des untersten Gliedes	Raquis: longitud del primer segmento		
	very short	très court	sehr kurz	muy corto	(S) ---, (W) ---	1
	short	court	kurz	corto	(S) Quench, (W) SY Leo	3
	medium	moyen	mittel	medio	(S) Natasia, (W) KWS Meridian	5
	long	long	lang	largo	(S) Belgravia, (W) California	7
	very long	très long	sehr lang	muy largo	(S) ---, (W) ---	9
22.	QN	VG A	(+)		92	
	Rachis: curvature of first segment	Rachis : incurvation du premier article	Spindel: Krümmung des untersten Gliedes	Raquis: curvatura del primer segmento		
	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil	(S) ---, (W) ---	1
	weak	faible	gering	débil	(S) KWS Aliciana, (W) Henriette	3
	medium	moyenne	mittel	media	(S) Henley, (W) California	5
	strong	forte	stark	fuerte	(S) Ingmar, (W) KWS Joy	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte	(S) ---, (W) ---	9

	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielsorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
23. (*)	QN	VG A	(+)		92	
	Median spikelet: length of glume and its awn relative to grain	Épillet médian : longueur de la glume et de sa barbe par rapport au grain	Mittleres Ährchen: Länge der Hüllspelze und ihrer Granne im Verhältnis zum Korn	Espiguilla media: longitud de la gluma y su arista en relación con el grano		
	shorter	plus courte	kürzer	más corta	(S) ---, (W) ---	1
	equal	égale	gleich lang	igual	(S) Quench, (W) California	2
	slightly longer	légèrement plus longue	etwas länger	ligeramente mas larga	(S) ---, (W) Cierzo	3
	much longer	beaucoup plus longue	viel länger	mucho más larga	(S) ---, (W) Champagne	4
24. (*)	QL	VG A	(+)		80-92	
	Grain: rachilla hair type	Grain : type de pilosité de la baguette	Korn: Behaarung der Basalborste	Grano: tipo de pelo de la raquilla		
	short	courte	kurz	corto	(S) Quench, (W) KWS Joy	1
	long	longue	lang	largo	(S) Grace, (W) California	2
25.	QN	VG A	(+)		80-92	
	Grain: spiculation of inner lateral nerves of dorsal side of lemma	Grain : denticulation des nervures latérales internes de la face dorsale de la glumelle inférieure	Korn: Bezahnung der inneren seitlichen Rückennerven der Deckspelze	Grano: dentado de la nervadura lateral interna de la cara dorsal de la lema		
	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil	(S) Grace, (W) California	1
	weak	faible	gering	débil	(S) Chamonix, (W) KWS Joy	3
	medium	moyenne	mittel	medio	(S) Henley, (W) Champagne	5
	strong	forte	stark	fuerte	(S) ---, (W) Semper	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte	(S) ---, (W) ---	9
26. (*)	QL	VG A			92	
	Grain: type	Grain : type	Korn: Typ	Grano: tipo		
	non-husked	sans glume	nicht bespelzt	sin cáscara	(S) Pirona, (W) ---	1
	husked	avec glume	bespelzt	con cáscara	(S) Grace, (W) Henriette	9

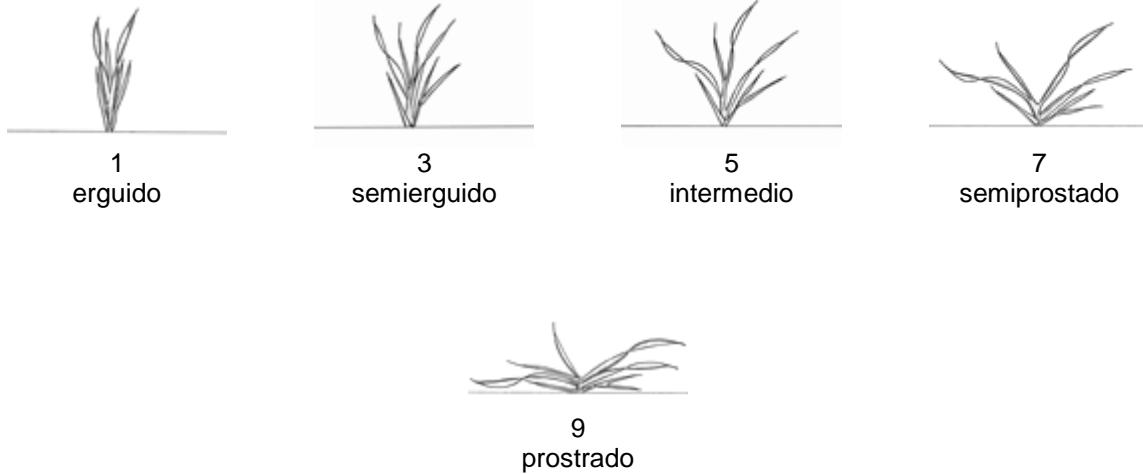
	English		français		deutsch		español		Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
27. (*)	QL	VG A	(+)		92					
	Grain: hairiness of ventral furrow		Grain : pilosité du sillon		Korn: Behaarung der Bauchfurche		Grano: vellosidad del surco ventral			
	absent		absente		fehlend		ausente		(S) Grace, (W) Henriette	1
	present		présente		vorhanden		presente		(S) ---, (W) Saffron	9
28. (*)	PQ	VG	(+)		92					
	Seasonal type		Type de développement		Wechselverhalten		Tipo de desarrollo			
	winter type		type hiver		Winterform		tipo de invierno		(S) ---, (W) Henriette	1
	alternative type		type alternatif		Wechselform		tipo alternativo		(S) ---, (W) Farandole	2
	spring type		type printemps		Sommerform		tipo de primavera		(S) Grace, (W) Cierzo, (W) Genie	3
29.	QL	VG A	(+)		92					
	Lemma: shape of base		Glumelle inférieure : forme de la base		Deckspelze: Form der Basis		Lema: forma de la base			
	non-bevelled		non biseautée		nicht abgeschrägt		no oblicua		(S) Steffi, (W) Montana	1
	bevelled		biseautée		abgeschrägt		oblicua		(S) Grace, (W) Henriette	2

8. Explicaciones de la tabla de caracteres

8.1 *Explicaciones relativas a caracteres individuales*

Ad. 2: Planta: hábito de crecimiento

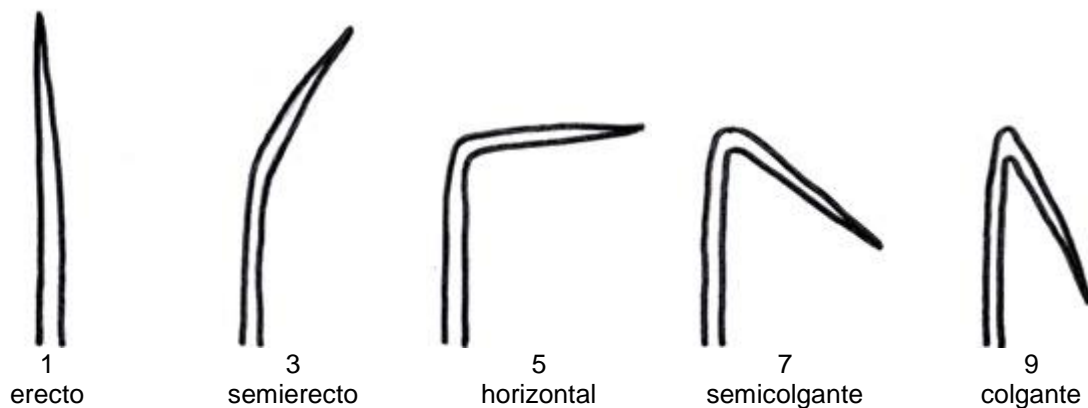
El hábito de crecimiento se determinará visualmente a partir del porte de las hojas y los macollos (hijuelos o vástagos). Deberá observarse el ángulo que forman las hojas más externas y los macollos con un eje vertical imaginario.



Ad. 6: Hoja bandera: porte

El porte de la hoja bandera depende del estado de desarrollo de la planta. Por lo tanto, es especialmente importante observarlo en determinados estados de desarrollo (estados 49 a 51 del código decimal de Zadoks).

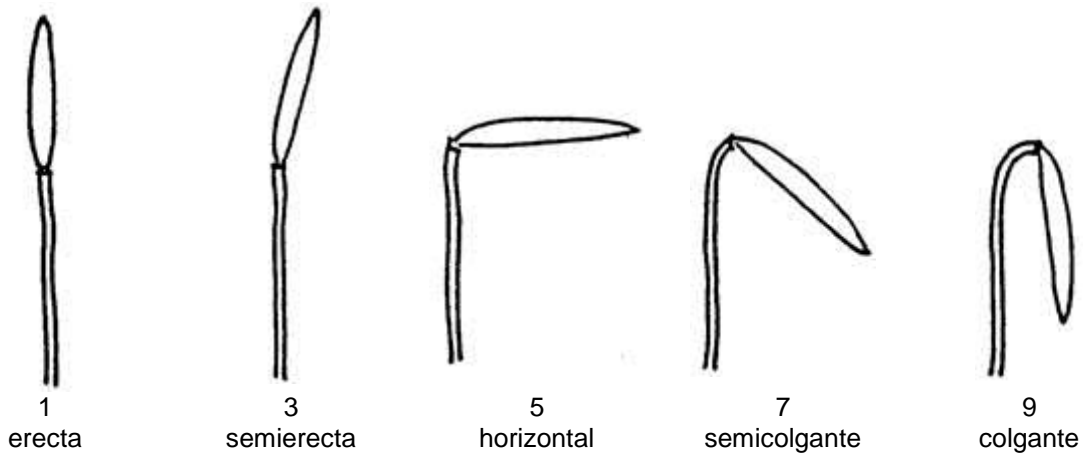
El porte de la hoja bandera se refiere al ángulo que forma su limbo con el eje principal (tallo). Ha de registrarse la expresión observada en la mayoría de las plantas, sin tener en cuenta plantas individuales en que la expresión del porte pueda ser diferente.



Ad. 7: Época de espigado

La época de espigado se alcanza cuando la primera espiguilla sea visible en el 50% de las espigas.

Ad. 11: Espiga: porte



Ad. 13: Planta: longitud

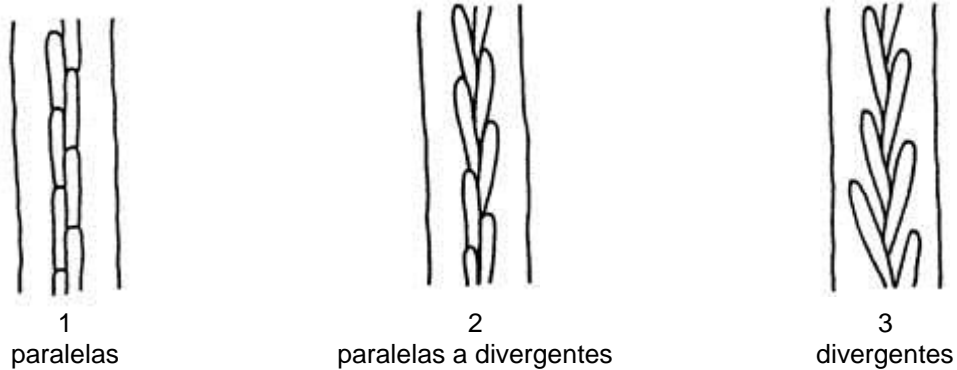
La longitud de la planta incluye el tallo, la espiga y las aristas.

Ad. 15: Espiga: desarrollo de las espiguillas estériles

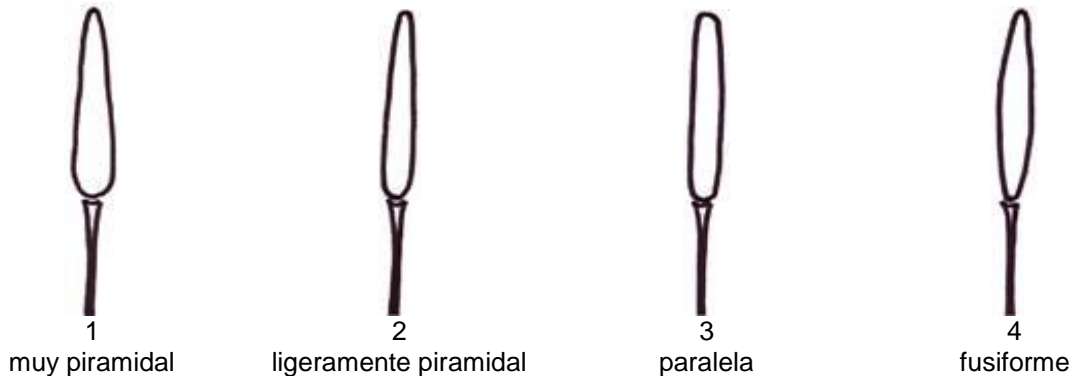
La observación de la espiguilla estéril se aplica únicamente a las variedades de dos hileras.

Ad. 16: Espiguilla estéril: porte

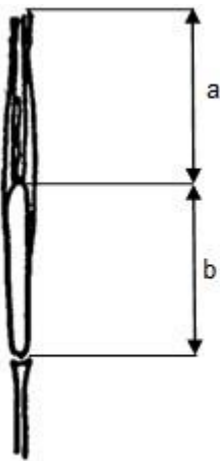
El porte de las espiguillas estériles se ha de observar únicamente en las variedades con espiguillas plenamente desarrolladas. Las observaciones deberán efectuarse en el tercio medio de la espiga.



Ad. 17: Espiga: forma



Ad. 19: Espiga: longitud

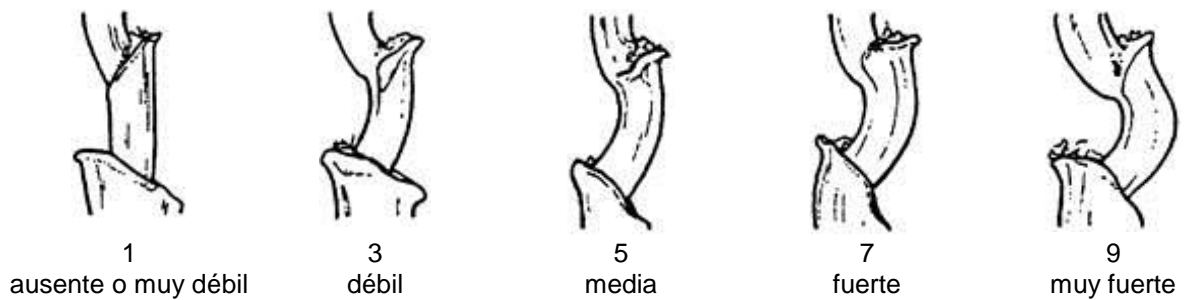


a = longitud de la arista
b = longitud de la espiga

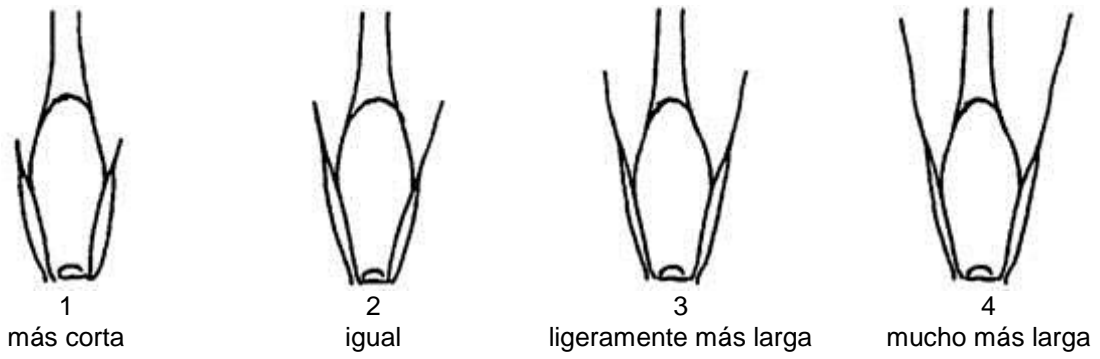
Ad. 20: Arista: longitud

Véase el Ad. 19

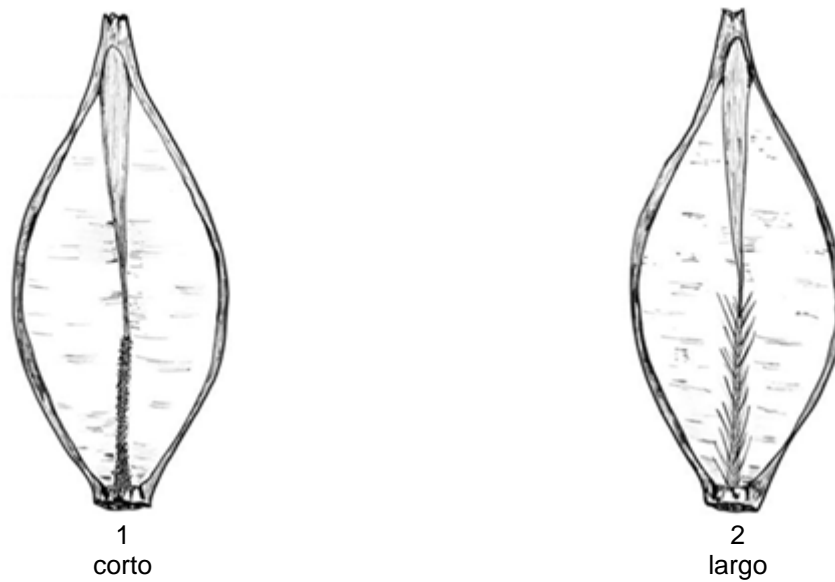
Ad. 22: Raquis: curvatura del primer segmento



Ad. 23: Espiguilla media: longitud de la gluma y su arista en relación con el grano



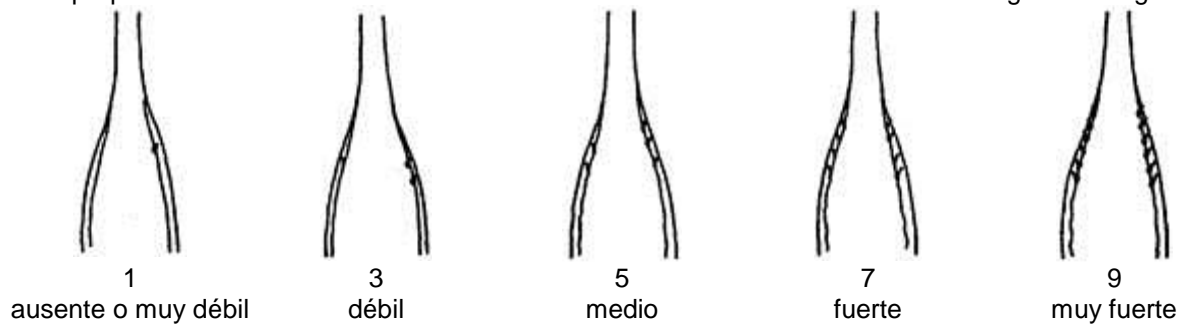
Ad. 24: Grano: tipo de pelo de la raquilla



Ad. 25: Grano: dentado de la nervadura lateral interna de la cara dorsal de la lema

ninguno u
ocasionalmente 1
o 2 dientes
pequeños

10 o más dientes
grandes regulares



Ad. 27: Grano: vellosidad del surco ventral

El surco ventral ha de observarse después de eliminar la raquilla. Tiene especial importancia que la fuente de luz se haya instalado en el lugar correcto. Un número muy pequeño de pelos se valorará como “presente”.



Ad. 28: Tipo de desarrollo

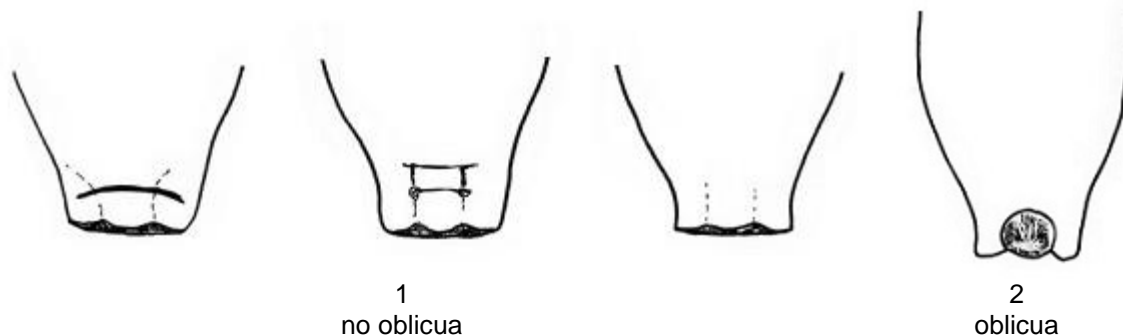
El tipo de desarrollo (necesidad de vernalización) deberá determinarse en parcelas sembradas en primavera. En el ensayo siempre deberán incluirse variedades ejemplo. Las variedades estudiadas podrán describirse, siempre que su comportamiento se ajuste a sus descripciones. El estado de desarrollo alcanzado por cada variedad se determinará cuando la más tardía de primavera haya alcanzado la plena madurez (estado 91 o 92 del código decimal de Zadoks). La definición de los niveles de expresión es la siguiente:

- 1 - Tipo de invierno (gran necesidad de vernalización): las plantas han alcanzado como máximo el estado 45 del código decimal de Zadoks (vaina hinchada).
- 2 - Tipo alternativo (necesidad parcial de vernalización): las plantas han superado el estado 45 del código decimal de Zadoks (por regla general, superan el estado 75) y han alcanzado como máximo el estado 90.
- 3 - Tipo de primavera (escasa o nula necesidad de vernalización): las plantas han superado el estado 90 del código decimal de Zadoks.

El tipo de desarrollo no se refiere a la resistencia al frío. Las variedades del tipo “de primavera” no tienen requerimientos de vernalización pero pueden ser resistentes al frío.

Ad. 29: Lema: forma de la base

Las observaciones deberán efectuarse en el tercio medio de la espiga. En el caso de las variedades de seis hileras de espiguillas, las observaciones se efectuarán en la hilera central.



8.2 Descripción de los estados de desarrollo del código decimal de Zadoks para los cereales (ZADOKS et al., 1974)

Código decimal de Zadoks	Descripción	Código decimal de Zadoks	Descripción
	<u>Germinación</u>		<u>Hinchamiento</u>
00	Semilla seca	41	Extensión de la vaina de la hoja bandera
01	Comienzo de la imbibición	43	Hinchamiento de la vaina apenas visible
03	Imbibición completa	45	Vainas hinchadas
05	La radícula ha emergido de la semilla	47	Apertura de la vaina de la hoja bandera
07	El coleóptilo emerge de la semilla	49	Primeras aristas visibles
09	Aparición de la hoja en el ápice del coleóptilo		
	<u>Desarrollo de la plántula</u>		<u>Inflorescencia visible</u>
		50	Primera espiguilla de la inflorescencia visible
10	La primera hoja atraviesa el coleóptilo	53	1/4 de la inflorescencia visible
11	Primera hoja desplegada	55	1/2 de la inflorescencia visible
12	2 hojas desplegadas	57	3/4 de la inflorescencia visible
13	3 hojas desplegadas	59	Inflorescencia completamente visible
14	4 hojas desplegadas		
15	5 hojas desplegadas		<u>Antesis</u>
16	6 hojas desplegadas	60	Comienzo de la antesis
17	7 hojas desplegadas	65	Mitad de la antesis
18	8 hojas desplegadas	69	Final de la antesis
19	9 o más hojas desplegadas		
	<u>Macollaje</u>		<u>Estado lechoso</u>
20	Tallo principal únicamente	71	Cariópsides en madurez acuosa
21	Tallo principal con 1 macollo	73	Comienzo del estado lechoso
22	Tallo principal y 2 macollos	75	Mitad del estado lechoso
23	Tallo principal y 3 macollos	77	Fin del estado lechoso
24	Tallo principal y 4 macollos		
25	Tallo principal y 5 macollos	83	<u>Estado pastoso</u>
26	Tallo principal y 6 macollos	85	Comienzo del estado pastoso
27	Tallo principal y 7 macollos	87	Estado pastoso blando
28	Tallo principal y 8 macollos		Estado pastoso duro
29	Tallo principal y 9 macollos o más		
	<u>Elongación del tallo</u>		<u>Maduración</u>
		91	Las cariópsides están duras (resulta difícil cortarlas con la uña)
30	Erección del pseudotallo	92	Las cariópsides están duras (ya no se puede hacer una marca con la uña)
31	Primer nudo detectable	93	Las cariópsides se separan durante el día
32	Segundo nudo detectable	94	Demasiado maduras: la paja está muerta y se desprende
33	Tercer nudo detectable	95	Semillas en estado de latencia
34	Cuarto nudo detectable	96	Semillas viables: germinación del 50%
35	Quinto nudo detectable	97	Las semillas han acabado el estado de latencia
36	Sexto nudo detectable	98	Latencia secundaria inducida
37	Hoja bandera visible	99	Latencia secundaria superada
39	Lígula o collarín de la hoja bandera visible		

9. Bibliografía

Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F., 1974: A Decimal code for the Growth Stages of Cereals. Weed Research. NL, 14: 415-421

10. CUESTINARIO TÉCNICO

CUESTINARIO TÉCNICO		Página {x} de {y}	Número de referencia:
		Fecha de la solicitud: (no debe ser rellenado por el solicitante)	
CUESTIONARIO TÉCNICO rellénese junto con la solicitud de derechos de obtentor			
En el caso de variedades híbridas que sean objeto de una solicitud de derechos de obtentor, y cuando las líneas parentales deban presentarse como parte del examen de dicha variedad, este Cuestionario Técnico deberá rellenarse para cada una de las líneas parentales, además de rellenarse para la variedad híbrida.			
1.	Objeto del Cuestionario Técnico		
1.1	Nombre botánico	<i>Hordeum vulgare</i> L. <i>sensu lato</i>	
1.2	Nombre común	Cebada	
2.	Solicitante		
	Nombre	<input type="text"/>	
	Dirección	<input type="text"/>	
	Número de teléfono	<input type="text"/>	
	Número de fax	<input type="text"/>	
	Dirección de correo-e	<input type="text"/>	
	Obtentor (si no es el solicitante)	<input type="text"/>	
3.	Denominación propuesta y referencia del obtentor		
	Denominación propuesta (si procede)	<input type="text"/>	
	Referencia del obtentor	<input type="text"/>	

CUESTINARIO TÉCNICO	Página {x} de {y}	Número de referencia:
---------------------	-------------------	-----------------------

#4. Información sobre el método de obtención y la reproducción de la variedad

4.1 Método de obtención

Variedad resultante de:

4.1.1 Cruzamiento

(a) cruzamiento controlado
(sírvese mencionar las variedades parentales)

(.....) x (.....)

línea parental femenina línea parental masculina

(b) cruzamiento parcialmente desconocido
(sírvese mencionar la variedad o variedades parentales conocidas)

(.....) x (.....)

línea parental femenina línea parental masculina

(c) cruzamiento desconocido

4.1.2 Descubrimiento y desarrollo
(sírvese mencionar dónde y cuándo ha sido descubierta y cómo ha sido desarrollada la variedad)

4.1.3 Mutación
(sírvese mencionar la variedad parental)

4.1.5 Otros
(sírvese dar detalles)

Las autoridades podrán disponer que parte de esta información se suministre en una sección confidencial del Cuestionario Técnico.

CUESTINARIO TÉCNICO	Página {x} de {y}	Número de referencia:
---------------------	-------------------	-----------------------

4.2	Método de reproducción de la variedad	
4.2.1	Variedades propagadas mediante semillas	
(a)	Autopolinización	[]
(b)	Híbrido	[]
(c)	Otras (sírvese dar detalles)	[]
	<input type="text"/>	
4.2.2	Otras (sírvese dar detalles)	[]
	<input type="text"/>	

En el caso de las variedades híbridas, el método de producción se presentará en una hoja aparte, en la que se proporcionará información detallada de todas las líneas parentales necesarias para reproducir el híbrido, por ejemplo

Híbrido simple

(.....) x (.....)

parental femenino parental masculino

Híbrido de tres vías

(.....) x (.....)

parental femenino parental masculino

(.....) x (.....)

híbrido simple utilizado como parental femenino parental masculino

y en particular debería identificarse:

a) cualquier línea parental androestéril

b) el sistema de mantenimiento de las líneas parentales androestériles.

CUESTINARIO TÉCNICO	Página {x} de {y}	Reference Number:
---------------------	-------------------	-------------------

5. Caracteres de la variedad que se deben indicar (el número entre paréntesis indica el carácter correspondiente en las directrices de examen; especifíquese la nota apropiada)

Caracteres	Ejemplos	Note
5.1 Hojas inferiores: vellosidad de la vaina de la hoja (4)		
ausente	(S) Grace, (W) California	1 []
presente	(S) ---, (W) Henriette	9 []
5.2 Época de espigado (7)		
muy precoz	(S) ---, (W) ---	1 []
muy precoz a precoz		2 []
precoz	(S) Lilly, (W) Meseta	3 []
precoz a media		4 []
media	(S) Natasia, (W) California	5 []
media a tardía		6 []
tardía	(S) ---, (W) Saffron	7 []
tardía a muy tardía		8 []
muy tardía	(S) ---, (W) ---	9 []
5.3 Aristas: pigmentación antociánica de las puntas (9)		
ausente o muy débil	(S) ---, (W) California	1 []
muy débil a débil		2 []
débil	(S) Pirona, (W) Lomerit	3 []
débil a media		4 []
media	(S) Ebson, (W) Marielle	5 []
media a fuerte		6 []
fuerte	(S) Grace, (W) Semper	7 []
fuerte a muy fuerte		8 []
muy fuerte	(S) Wilma, (W) ---	9 []

Caracteres	Ejemplos	Note
5.4 Planta: longitud (13)		
muy corta	(S) ---, (W) ---	1 []
muy corta a corta		2 []
corta	(S) Frontier, (W) Findora	3 []
corta a media		4 []
media	(S) Quench, (W) Henriette	5 []
media a larga		6 []
larga	(S) Pirona, (W) Semper	7 []
larga a muy larga		8 []
muy larga	(S) ---, (W) ---	9 []
5.5 Espiga: número de hileras (14)		
dos	(S) Grace, (W) California	1 []
seis	(S) Olsok, (W) Henriette	2 []
5.6 Espiga: desarrollo de las espiguillas estériles (15)		
ninguno o rudimentario	(S) Grace, (W) California	1 []
pleno	(S) Quench, (W) Casanova	2 []
5.7 Grano: tipo de pelo de la raquilla (24)		
corto	(S) Quench, (W) KWS Joy	1 []
largo	(S) Grace, (W) California	2 []
5.8 Grano: tipo (26)		
sin cáscara	(S) Pirona, (W) ---	1 []
con cáscara	(S) Grace, (W) Henriette	9 []
5.9 Grano: velloso del surco ventral (27)		
ausente	(S) Grace, (W) Henriette	1 []
presente	(S) ---, (W) Saffron	9 []
5.10 Tipo de desarrollo (28)		
tipo de invierno	(S) ---, (W) Henriette	1 []
tipo alternativo	(S) ---, (W) Farandole	2 []
tipo de primavera	(S) Grace, (W) Cierzo, (W) Genie	3 []

CUESTINARIO TÉCNICO	Página {x} de {y}	Número de referencia:
---------------------	-------------------	-----------------------

6. Variedades similares y diferencias con respecto a esas variedades

Sírvase utilizar la tabla y el recuadro de comentarios siguientes para suministrar información acerca de la diferencia entre su variedad candidata y la variedad o variedades que, a su leal saber y entender, es o son más similares. Esta información puede ser útil para que las autoridades encargadas del examen realicen el examen de la distinción.

Denominación de la variedad o variedades similares a su variedad candidata	Caracteres respecto de los que su variedad candidata difiere de las variedades similares	Describa la expresión de los caracteres de las variedades similares	Describa la expresión de los caracteres de su variedad candidata
<i>Ejemplo</i>	<i>Espiga: glauescencia</i>	<i>débil</i>	<i>media a fuerte</i>
Comentarios:			

CUESTINARIO TÉCNICO	Página {x} de {y}	Número de referencia:
---------------------	-------------------	-----------------------

#7.	Información complementaria que pueda facilitar el examen de la variedad		
7.1	Además de la información suministrada en los Capítulos 5 y 6, ¿existen caracteres adicionales que puedan contribuir a distinguir la variedad?		
Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>
(En caso afirmativo, sírvase especificar)			
7.2	¿Existen condiciones especiales de cultivo de la variedad o de realización del examen?		
Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>
(En caso afirmativo, sírvase especificar)			
7.3	Otra información		

Las autoridades podrán disponer que parte de esta información se suministre en una sección confidencial del Cuestionario Técnico.

CUESTINARIO TÉCNICO	Página {x} de {y}	Número de referencia:
---------------------	-------------------	-----------------------

8. Autorización para la disseminación

(a) ¿Se exige una autorización previa para poder disseminar la variedad en virtud de la legislación relativa a la protección del medio ambiente y la salud humana y animal?

Si No

(b) ¿Se ha obtenido dicha autorización?

Si No

Si la segunda respuesta es afirmativa, sírvase presentar una copia de la autorización.

9. Información sobre el material vegetal que deberá ser examinado o presentado para ser examinado.

9.1 La expresión de un carácter o de varios caracteres de una variedad puede verse afectada por factores tales como las plagas y enfermedades, los tratamientos químicos (por ejemplo, retardadores del crecimiento, pesticidas), efectos del cultivo de tejidos, distintos portainjertos y patrones tomados en distintos estados de desarrollo de un árbol, etcétera.

9.2 El material vegetal deberá estar exento de todo tratamiento que afecte la expresión de los caracteres de la variedad, salvo autorización en contra o solicitud expresa de las autoridades competentes. Si el material vegetal ha sido tratado, se deberá indicar en detalle el tratamiento aplicado. Por consiguiente, sírvase indicar a continuación si, a su leal saber y entender, el material vegetal que será examinado ha estado expuesto a:

(a)	Microorganismos (por ejemplo, virus, bacterias, fitoplasma)	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
(b)	Tratamiento químico (por ejemplo, retardadores del crecimiento, pesticidas)	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
(c)	Cultivo de tejido	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
(d)	Otros factores	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>

Si ha contestado afirmativamente a alguna de las preguntas sírvase suministrar detalles.

.....

10. Por la presente declaro que, a mi leal saber y entender, la información proporcionada en este formulario es correcta:

Nombre del solicitante

Firma Fecha

[Sigue el Anexo]

ANEXO

Explicaciones útiles complementarias

ÍNDICE

- Parte I. Introducción
- Parte II. Caracteres derivados del polimorfismo proteico
- Parte III. Descripción del método que debe emplearse

Parte I

Introducción

En el Anexo siguiente figura una lista de los caracteres basados en marcadores de isozimas obtenidos por electroforesis y una descripción del método que debe emplearse. La UPOV ha decidido publicarlos en un anexo de las directrices de examen, creando así una categoría especial de caracteres, habida cuenta de que la mayoría de los miembros de la UPOV opina que no es posible determinar la distinción únicamente a partir de la diferencia encontrada en un carácter basado en marcadores de isozimas obtenidos por electroforesis. Por consiguiente, estos caracteres solo deben utilizarse como complemento de otras diferencias en caracteres morfológicos o fisiológicos. La UPOV confirma que estos caracteres se consideran útiles pero que no siempre son suficientes por sí mismos para establecer la distinción. No se los debe emplear como caracteres de manera sistemática, sino a petición o con el acuerdo del solicitante de la variedad candidata.

Para analizar las hordeínas, se recomienda realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS PAGE). Las hordeínas están codificadas por tres locus complejos denominados Hor-1, Hor-2 y Hor-3, que se encuentran en el cromosoma 5 (Hor-1 y Hor-2 en el brazo corto y Hor-3 en el brazo largo). Es posible identificar varios alelos en cada locus, y el análisis de las hordeínas se basa en el reconocimiento de estos alelos por las proteínas que aparecen en el gel como una serie de bandas o grupos de bandas bien definidos. Los locus codifican diferentes grupos de proteínas susceptibles de separación por electroforesis, conocidas como hordeínas B, C y D por orden decreciente de movilidad. Los alelos de cada locus pueden designarse mediante letras o números o una combinación de ambos. También es posible determinar la movilidad electroforética relativa de cada una de las bandas.

En el caso de que solo sean de interés las hordeínas C (Hor-1) y B (Hor-2), se puede emplear el método patrón de referencia PAGE ácido de la Asociación Internacional para el Ensayo de Semillas (ISTA).

Parte II

Caracteres derivados del polimorfismo proteico

En el siguiente cuadro se indican los valores de movilidad electroforética relativa de las principales bandas presentes en los alelos de las hordeínas B, C y D analizados mediante el método SDS PAGE y el método PAGE ácido. Cabe señalar que las variedades ejemplo y las notas obtenidas en cada nivel de expresión son idénticas con ambos métodos.

Caracteres		Example Varieties	Note/
Posición de la banda con el <u>método</u> <u>SDS PAGE</u>	Posición de la banda con el <u>método</u> <u>PAGE ácido</u>	Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Nota
30. QL VG			
Composición de las hordeínas D: expresión de los alelos en el locus Hor-3			
banda 34		(W) California	1
banda 33		(W) Medina	2
banda 35		(W) Saturn	3
banda 32,5		(W) Iris	4
banda 32		(W) Princesse	5
31. QL VG			
Composición de las hordeínas C: expresión de los alelos en el locus Hor-1			
bandas 62+65+68	bandas 27+30+32+37+39	(W) California	1
bandas 62+65+66+68	bandas 27+30+32+34+37+39	(W) Lomerit	2
bandas 65+68	bandas 27+30+32+37	(W) Medina	3
bandas 66.5+71	bandas 32+37+41	(W) Sandra	4
bandas 61.5+66.5+71	bandas 27+30+32+37+39+41	(S) Meltan	5
banda 65	bandas 32+37+38	(S) Armada	6
bandas 60 +67.5+68.5	bandas 35+38	(W) Roseval	7
bandas 61+65+68+73	bandas 32+37+39+41	(W) Semper	8
bandas 60+69+72	bandas 38+41+42	(S) Sydney	9
bandas 64+66,5	bandas 30+32+37	(W) Saturn	10
bandas 67+71	bandas 34+37	(S) Pastello	11
bandas 65+68+69+70	bandas 34+39+41+42	(W) Albacete	12
bandas 61.5+68+71	bandas 31+34+37+38+41	(W) Borwina	13
bandas 65+67.5	bandas 32+37+41+43	(W) Kendo	14
bandas 65.5+70.5		(W) Delita	15
bandas 66+70.5		(W) Maybrit	16

Caracteres		Example Varieties	Note/
Posición de la banda con el <u>método</u> <u>SDS PAGE</u>	Posición de la banda con el <u>método</u> <u>PAGE ácido</u>	Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Nota
32. QL VG			
Composición de las hordeínas B: expresión de los alelos en el locus Hor-2			
bandas 79+86+88+100	bandas 71+79+83+86+94+100	(S) Quench	1
bandas 79+88+91+95+97+101	bandas 71+82+89+100	(S) Overture	2
bandas 79+91+92+95+97+101	bandas 76+82+83+86+100	(S) Hellana	3
bandas 75+82+87+91+97	bandas 66+71+76+86+93+100	(W) Caribic	4
bandas 79+86+88+97+101	bandas 71+78+79+90+94	(W) Piroline	5
bandas 78+84+95+101	bandas 76+81+94	(W) Ingmar	6
bandas 79+90+91+94+100	bandas 71+72+75+82+85+86+100	(S) Sebastian	7
bandas 78+86+91+95+100	bandas 72+76+79+90+94	(W) Sandra	8
bandas 79+82+88+91+92+100	bandas 71+76+79+86	(S) Ebson	9
bandas 76+79+86+88+100	bandas 71+78+83+86+94+100	(S) Trebon	10
bandas 79+86+89+92+95+101	bandas 71+79+83+86+90	(W) Sigma	11
bandas 79+95+101	bandas 71+76+79	(W) Midas	12
bandas 78+89+92+101	bandas 71+89	(W) Lomerit	13
bandas 75+78+79+81+89+101	bandas 79+83+86+90	(W) Findora	14
bandas 75+78+79+81+83+86+88+94+95+100	bandas 67+69+71+72+78+79+85+89+94	(W) Caresse	15
bandas 81+84+88+90+101	bandas 71+79+83+88+94	(W) Reseda	16
bandas 75+78+79+81+83+86	bandas 69+76+79+83+93	(W) Baronesse	17
bandas 82+88+100	bandas 71+72+79+85+86+91+100	(W) Albacete	18
bandas 81+100	bandas 72+76+100	(S) Basic	19
bandas 75+79+83+89+91	bandas 61+71+76+79+83	(W) Camargue	20
bandas 79+84+92	bandas 76+81+94+100	---	21
bandas 79+91+92		(W) Libelle	22
bandas 75+79+91+92+95+97+101		(W) Anja	23
bandas 75+79+90+94+99		(W) Hiberna	24
bandas 79+(83-85)+(89-91)+(94-96)+102		(W) Jerka	25

Parte III

Descripción del método que se debe emplear

1. Método SDG PAGE para el análisis de las hordeínas de *Hordeum vulgare*

1.1 Material y equipo

Se puede utilizar cualquier sistema idóneo de electroforesis vertical a condición de que se pueda mantener el gel a una temperatura constante. Se recomienda emplear un gel de 1,5 mm de espesor como máximo. La fuente de energía que se emplee debe la capacidad de proporcionar una corriente y una tensión de alimentación constantes.

1.2. Productos químicos

Todos los productos químicos deben ser de calidad “reactivo para análisis” o superior.

Acrilamida (especialmente purificada para electroforesis)
Bisacrilamida (especialmente purificada para electroforesis)
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)
Dodecilsulfato de sodio (SDS)
Persulfato de amonio (APS)
2-mercaptoetanol
NNN'N'-tetrametiletildiamina (TEMED)
Ácido tricloroacético (TCA)
Ácido clorhídrico
Ácido acético glacial
Glicina
n-butanol
Pironina
Glicerol (d = 1,256)
Metanol
Azul brillante de Coomassie R-250 (o equivalente)
Azul brillante de Coomassie G-250 (o equivalente)

1.3 Soluciones

1.3.1 Solución de extracción

Solución de base:

6,25 ml de tampón (*buffer*) TRIS HCl 1M, pH 6,8 (véase el apartado 1.3.3.2)
12,05 ml de agua destilada
2 g de SDS
10 mg de pironina
10 ml de glicerol

Esta solución se puede conservar durante dos meses a 4°C.

La solución de extracción se prepara inmediatamente antes de utilizarla, de la manera siguiente:

28,33 ml de solución de base y 7,91 ml de 2-mercaptoetanol, diluidos en agua destilada hasta obtener 100 ml. Esta solución se debe preparar inmediatamente antes de utilizarla y no puede conservarse.

1.3.2 Tampón (buffer) de migración

Solución de base:

141,1 g de glicina

30,0 g de TRIS

10,0 g de SDS

diluidos en agua destilada hasta obtener 1 litro.

La solución de base se diluye con agua destilada (1:10) inmediatamente antes de su empleo.

La solución tampón de base puede conservarse durante dos meses a temperatura ambiente. La solución tampón diluida no debe conservarse más de una semana. El pH del tampón debe situarse en torno a 8,3.

1.3.3 Soluciones para preparar el gel

1.3.3.1 Tampón de base del gel separador (TRIS HCl 1M, pH 8,8)

121,14 g de TRIS y, aproximadamente, 20 ml de HCl (d = 1,19), diluidos en agua destilada hasta obtener 1 litro. Este tampón se puede conservar durante dos meses a 4°C.

1.3.3.2 Tampón de base del gel de concentración (TRIS HCl 1M, pH 6,8)

121,14 g de TRIS y, aproximadamente, 78 ml de HCl (d = 1,19), diluidos en agua destilada hasta obtener 1 litro. Este tampón se puede conservar durante dos meses a 4°C.

1.3.3.3 Solución de SDS al 10% (p/v)

10 g de SDS diluidos en agua destilada hasta obtener 100 ml de solución. Esta solución se puede conservar durante dos meses a 4°C. Antes de emplearla, agitar y calentar ligeramente la mezcla para volver a diluir el SDS si fuese necesario.

1.3.3.4 Solución de persulfato de amonio al 1% (p/v)

1 g de persulfato de amonio disuelto en agua destilada hasta obtener 10 ml. Esta solución se debe preparar inmediatamente antes de emplearla.

1.3.3.5 Solución de base de acrilamida

51,98 g de acrilamida diluida en agua destilada hasta obtener 100 ml.

1.3.3.6 Solución de base de bisacrilamida

0,3185 g de bisacrilamida diluida en agua destilada hasta obtener 130 ml.

1.3.4 Soluciones de coloración

1.3.4.1 0,25 g de azul brillante de Coomassie G-250 y 0,75 g de azul brillante de Coomassie R-250, diluidos en agua hasta obtener 100 ml.

1.3.4.2 55 g de ácido tricloroacético, 65 ml de ácido acético glacial, 180 ml de metanol y 25 ml de la solución obtenida anteriormente (1.3.4.1), diluidos en agua destilada hasta obtener 1 litro.

1.4 Procedimiento

1.4.1 Extracción de las proteínas

Se muelen los granos con un martillo (u otro instrumento). Se mezcla la harina obtenida con el tampón de extracción diluido (1.3.1) en un tubo de hemólisis de polipropileno de 3 ml o en un tubo análogo con tapón a rosca. La proporción de la mezcla ha de ser de 50 mg de harina por cada 0,75 ml de tampón de extracción. Se extraen las muestras durante dos horas a temperatura ambiente, se mezclan varias veces con una agitadora vorticial, se calientan durante 10 minutos al baño María y luego se dejan enfriar. Se centrifugan los tubos a 18.000 g durante 5 minutos.

El volumen de extracto cargado podrá variar según el espesor del gel y la dimensión de los pocillos. Por regla general basta con 10 a 25 μ l.

1.4.2 Preparación del gel

Las cajas (*cassettes*) de gel deberán estar limpias y secas y se ensamblarán según la configuración del equipo utilizado. Si se utiliza cinta adhesiva para cerrarlas, es conveniente armarlas al menos con un día de anticipación para permitir que la cinta "envejezca" y se adhiera mejor.

1.4.2.1 Gel de separación (principal) (10% de acrilamida, pH 8,8)

Para elaborar dos placas de gel de 180 x 160 x 1,5 mm, se necesita lo siguiente:

20 ml de solución de base de acrilamida (1.3.3.5),
26 ml de solución de base de bisacrilamida (1.3.3.6),
30 ml de tampón de base del gel (1.3.3.1).

La mezcla, que debe estar a 4°C, se desgasifica durante 10 minutos en un kitasato de 100 ml. Añadir a la solución:

2 ml de persulfato de amonio (1.3.3.4),
0,8 ml de dodecilsulfato de sodio (1.3.3.3),
40 μ l de TEMED (extraída directamente de la botella).

Luego se vierte el gel con precaución para evitar que se formen burbujas de aire y se deja polimerizar a temperatura ambiente.

Las cajas de gel no deben llenarse por completo, a fin de que quede lugar para una capa de gel de concentración de 3 a 4 cm de espesor. Se cubre con mucho cuidado la superficie del gel con n-butanol (o agua destilada) con una jeringa. Una vez terminada la polimerización (al cabo de unos 30 minutos), se debe enjuagar con cuidado la superficie del gel con agua destilada y secar con papel filtro.

1.4.2.3 Gel de concentración (3,5% de acrilamida, pH 6,8)

En un kitasato de 50 ml se mezclan:

1,35 ml de solución de base de acrilamida (1.3.3.5),
3,17 ml de solución de base de bisacrilamida (1.3.3.6),
2,50 ml de tampón de base del gel (1.3.3.2) y
12,30 ml de agua destilada.

Después de desgasificar, añádanse:

0,875 ml de persulfato de amonio (1.3.3.4),
0,233 ml de dodecilsulfato de sodio (1.3.3.3),
17,5 μ l de TEMED (extraída directamente de la botella).

Mézclase con cuidado y viértase de inmediato la solución de gel de concentración hasta llenar las cajas de gel. Insertar el "peine" para formar los pocillos, evitando que se formen burbujas de aire. Dejar polimerizar durante dos horas aproximadamente. Luego, retírense con cuidado los "peines" de las cajas de gel y enjuáguese los pocillos con el tampón de migración diluido (1.3.2).

1.4.3 Electroforesis

Se llena la cuba con el volumen necesario de tampón de migración (1.3.2), enfriado a 15°C. Tras introducir la muestra, se aplica una corriente constante de 8 mA/cm² de gel (superficie de la sección transversal), hasta que la pironina G atraviese el gel de concentración, y luego una corriente constante de 16 mA/cm² de gel (tensión máxima de 300 V) hasta que el marcador llegue al fondo del gel. Se debe mantener la temperatura a 15°C.

1.4.4 Fijación y coloración

Se retiran las cajas de gel de la cuba, se abren y se fija el gel como mínimo durante 30 minutos en 250 ml de ácido tricloroacético al 15% (p/v). Se enjuaga el gel con agua destilada y se coloca en 250 ml de solución de coloración (1.3.4.2) durante toda la noche, a temperatura ambiente. Por lo general no es necesario decolorar el gel, pero es preciso lavarlo con agua destilada antes de guardarlo en bolsas de polietileno selladas.

También pueden aplicarse satisfactoriamente otros métodos de coloración (por ejemplo, azul brillante de Coomassie G, o una sustancia equivalente, en ácido tricloroacético solamente). Para controlar la calidad final del gel, tanto desde el punto de vista de su preparación como de su coloración, se debe proceder a analizar las variedades ejemplo propuestas en cada serie de gel. La separación de las bandas reveladas y la movilidad electroforética relativa (pesos moleculares) deben ser claras para que el procedimiento se considere satisfactorio.

1.5 **Reconocimiento de los alelos de las hordeínas (SDS PAGE)**

El patrón de bandas de las hordeínas B, C y D presentado en los cuadros es sistemático y en la presentación se han ignorado las diferencias en la intensidad de las bandas.

Hordeínas B, C y D: nomenclatura de cada banda y reconocimiento de los correspondientes alelos (SDS PAGE)

Carácter 30: composición de las hordeínas D: expresión de los alelos en el locus Hor-3

Banda	Ejemplo California	Nota				
		1	2	3	4	5
32						--
32.5					--	
33			--			
34	--	--				
35				--		

Carácter 31: composición de las hordeínas C: expresión de los alelos en el locus Hor-1

Banda	Ejemplo California	Nota																Banda
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
60								--										60
61									--									61
61.5																		61.5
62	--	--	--			--							--					62
64											--							64
65	--	--	--	--			--		--				--		--			65
65.5																--		65.5
66			--														--	66
66.5					--	--					--							66.5
67												--						67
67.5								--							--			67.5
68	--	--	--	--					--				--	--				68
68.5									--									68.5
69										--			--					69
70													--					70
70.5															--	--		70.5
71				--	--							--		--				71
72										--								72
73											--							73

Carácter 32: composición de las hordeínas B: expresión de los alelos en el locus Hor-2

Banda	Ejemplo Quench	Nota																									Banda	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
75				--											--	--		--			--			--	--		75	
76											--																	76
78						--	--					--	--	--				--										78
79	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	79
81														--	--	--	--		--									81
82				--															--									82
83															--	--	--	--			--				--			83
84						--										--					--			--				84
85																										--		85
86	--	--			--		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	86
87				--																								87
88	--	--	--		--				--	--					--	--			--									88
89										--		--	--								--					--		89
90							--					--	--			--					--				--	--		90
91			--	--	--		--	--	--											--		--	--	--	--	--		91
92			--					--	--		--	--	--								--	--	--	--	--	--		92
94							--								--										--	--		94
95			--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	95
96																										--		96
97			--	--	--	--																		--				97
99																										--		99
100	--	--					--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	100
101			--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	101
102																										--		102

2. Método PAGE ácido para el análisis de las hordeínas B y C de *Hordeum vulgare*

En el caso de que solo sean de interés las hordeínas B y C, se puede emplear el método PAGE ácido. A continuación se describe el método patrón de referencia recomendado por la Asociación Internacional para el Ensayo de Semillas.

2.1. Material y equipo

Se han empleado satisfactoriamente diversos modelos de equipo de electroforesis vertical, entre ellos los comercializados por Biometra, Bio-Rad, Desaga y Pharmacia-LKB. La fuente de energía que se emplee debe tener la capacidad de operar a una tensión y corriente constantes.

2.2. Productos químicos

Todos los productos químicos deben ser de calidad "reactivo para análisis" o superior.

Acrilamida (especialmente purificada para electroforesis)
Bisacrilamida (especialmente purificada para electroforesis)
Urea
Ácido acético glacial
Glicina
Sulfato ferroso
Ácido ascórbico
Peróxido de hidrógeno
Monotioglicerol
Pironina G
Ácido tricloroacético (TCA)
Metanol
2-cloroetanol
Azul brillante de Coomassie G-250 (o equivalente)
Azul brillante de Coomassie R-250 (o equivalente)

2.3. Soluciones

2.3.1 Solución de extracción

Pironina G (0,05%) (p/v) en 2-cloroetanol (20%) (v/v) con urea (18% p/v) y monotioglicerol (1% v/v) (mantener refrigerado o prepararlo inmediatamente antes de usarlo).

2.3.2 Solución tampón para cuba

Ácido acético glacial (4 ml) y glicina (0,4g) diluidos en agua destilada hasta obtener 1 litro; mantener refrigerado.

2.3.3 Solución tampón del gel

Ácido acético glacial (20 ml) y glicina (1,0 g) diluidos en agua destilada hasta obtener 1 litro; mantener refrigerado.

2.3.4 Soluciones de coloración

0,25 g de azul brillante de Coomassie G-250 y 0,75 g de azul brillante de Coomassie R-250 en 100 ml de agua.

55 g de ácido tricloroacético, 65 ml de ácido acético glacial, 180 ml de metanol y 25 ml de la solución obtenida anteriormente (2.3.4.1), diluidos en agua destilada hasta obtener 1 litro.

2.4. Procedimiento

2.4.1 Extracción de las proteínas

Se aplastan los granos con pinzas o por medios similares y se transfieren a tubos de centrifuga de polipropileno de 1,5 ml o a placas de microtitulación. Se añade la solución de extracción (2.3.1) (0,3 ml) y se dejan los tubos o las placas durante toda la noche a temperatura ambiente. Si fuera necesario se centrifugan los tubos a 18.000 g y se utiliza el sobrenadante para la electroforesis.

2.4.2 Preparación del gel

Las cajas de gel (*cassettes*) deberán estar limpias y secas, y se ensamblarán según la configuración del equipo. Antes de ensamblar las placas de vidrio, se las puede tratar con silicio para que luego sea más fácil extraer el gel. Se puede incorporar a las cajas de gel una película plástica de soporte (por ejemplo, "Gel Bond PAG" de FMC Corporation). Esta película soportará el gel durante las operaciones posteriores. Para preparar 100 ml de medio de cultivo gelificante, se toma tampón de gel (2.3.3) a 4°C (aproximadamente 60 ml) y se añade lo siguiente: acrilamida (10 g), bisacrilamida (0,4 g), urea (6 g), ácido ascórbico (0,1 g) y sulfato ferroso (0,005 g). Se agita la solución y se añade solución tampón de base del gel (2.3.3) (4°C) hasta obtener 100 ml. Se añade solución de peróxido de hidrógeno al 0,6% (v/v) recién preparada (0,35 ml por cada 100 ml de medio de cultivo gelificante, se mezcla rápidamente y se vierte el gel. Se coloca un "peine" acrílico en la parte superior de la caja para formar pocillos en el gel. La polimerización se lleva a cabo a temperatura ambiente y debe finalizar en cinco a 15 minutos. De lo contrario puede que sea necesario ajustar el volumen de peróxido de hidrógeno añadido. La caja debe llenarse con la mezcla de gel en exceso o cubrirse por una capa de agua, para asegurar que la polimerización sea satisfactoria en la superficie.

2.4.3 Electroforesis

Se extrae el peine acrílico del gel y se lavan los pocillos de muestra con tampón para cuba (2.3.2). Se llena la cuba con el volumen necesario de tampón (2.3.2) (según el equipo empleado). Se cargan las muestras (10-20 μ l) en los pocillos y se coloca el gel en la cuba, procurando que los pocillos de muestra queden totalmente llenos. La temperatura de la cámara de tampón inferior debe mantenerse en 15°C. La electroforesis se lleva a cabo con una tensión constante que no supere los 60 V/cm² de gel (área transversal) (corresponde a una tensión de 500 V para dos geles de 16 cm de anchura y 0,15 cm de espesor) durante el doble del tiempo que lleve al marcador de pironina G dejar el gel. Se debe tener presente que en este sistema el ánodo (electrodo positivo) se encuentra en el origen (parte superior del gel).

2.4.4 Fijación y coloración

Se extrae la caja de gel de la cuba, se abre y se coloca el gel en una caja de plástico que contiene 200 ml de solución de coloración (2.3.4.2). La coloración se lleva a cabo durante toda la noche, a temperatura ambiente. Si fuera necesario decolorar, se colocan los geles en agua durante aproximadamente dos a tres horas a temperatura ambiente. Luego se los puede secar o conservar en bolsas de polietileno selladas, a 4°C.

Cabe señalar que otros procedimientos producen una coloración satisfactoria de los geles, entre ellos el aumento de temperatura o el uso de mezclas de TCA y azul brillante de Coomassie G. Para controlar la calidad final del gel, desde el punto de vista tanto de su preparación como de su coloración, se debe proceder al análisis de las variedades ejemplo propuestas respecto de cada serie de gel. La separación de las bandas reveladas y la movilidad electroforética relativa deben ser claras y correctas para que el procedimiento sea satisfactorio.

2.5 Reconocimiento de los alelos de las hordeínas (PAGE ácido)

Hordeínas B y C: nomenclatura de cada banda y reconocimiento de los correspondientes alelos: PAGE ácido

Carácter 31: composición de las hordeínas C: expresión de los alelos en el locus Hor-1

Banda	Ejemplo California	Nota														Banda
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
25																25
27	--	--	--	--		--										27
30	--	--	--	--		--					--					30
31														--		31
32	--	--	--	--	--	--	--		--		--				--	32
34			--									--	--	--		34
35								--								35
37	--	--	--	--	--	--	--		--		--	--		--	--	37
38							--	--		--				--		38
39	--	--	--			--			--				--			39
41					--	--			--	--			--	--	--	41
42										--			--			42
43															--	43
		Alelos según la nomenclatura del PAGE ácido														
		10	10A	1	11	17	6	19	2	4	5	18	14	8	3	

Carácter 31: composición de las hordeínas B: expresión de los alelos en el locus Hor-2

Banda	Ejemplo Quench	Nota																				Banda	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
61																					--		61
66					--																		66
67																--							67
69																--		--					69
71	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	71
72							--	--							--	--			--	--			72
75								--															75
76			--	--		--		--	--		--							--		--	--	--	76
78					--					--					--					--	--	--	78
79	--	--			--			--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	79
81						--																--	81
82		--	--					--															82
83	--	--								--	--			--		--	--				--		83
85								--							--				--				85
86	--	--	--	--			--	--	--	--	--			--					--				86
88																	--						88
89		--										--		--									89
90					--			--			--			--									90
91																			--				91
93				--															--				93
94	--	--			--	--		--		--				--	--							--	94
97								--											--	--			97
100	--	--	--	--				--		--									--	--		--	100
		3	4	13	14	-	9	1	7	6	-	-	11	16	-	18	-	19	8	15	12	10	

[Fin del Anexo y del documento]