



TG/170/2(proj.)

ORIGINAL: englisch

DATUM: 2001-01-09

G

INTERNATIONAL UNION
FOR THE PROTECTION
OF NEW VARIETIES OF
PLANTS

UNION INTERNATIONALE
POUR LA PROTECTION
DES OBTENTIONS
VÉGÉTALES

INTERNATIONALER
VERBAND ZUM SCHUTZ
VON PFLANZEN-
ZÜCHTUNGEN

UNIÓN INTERNACIONAL
PARA LA PROTECCIÓN
DE LAS OBTENCIONES
VEGETALES

ENTWURF

RICHTLINIEN

FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DER PRÜFUNG

AUF UNTERSCHIEDBARKEIT, HOMOGENITÄT UND BESTÄNDIGKEIT

**BODENFRÜCHTIGER
KLEE**

(Trifolium subterraneum)

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

<u>INHALT</u>	<u>SEITE</u>
I. Anwendung dieser Richtlinien	3
II. Anforderungen an das Vermehrungsmaterial	3
III. Durchführung der Prüfung	3
IV. Methoden und Erfassungen	4
V. Gruppierung der Sorten	4
VI. Merkmale und Symbole	5
VII. Merkmalstabelle	6
VIII. Erklärungen zu der Merkmalstabelle	20
IX. Literatur	23
X. Technischer Fragebogen	24

I. Anwendung der Richtlinien

Diese Richtlinien gelten für alle Sorten von *Trifolium subterraneum* (ssp. *subterraneum*, spp. *yanninicum* und ssp. *brachycalycinum*).

II. Anforderungen an das Vermehrungsmaterial

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

100g.

Die Mindestanforderungen an die Keimfähigkeit, den Feuchtigkeitsgehalt und die Reinheit sollten nicht niedriger sein als die in dem betreffenden Land bestehende Vermarktungsnorm für zertifiziertes Saatgut. Die Keimfähigkeit sollte so hoch wie möglich sein.

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

III. Durchführung der Prüfung

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

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

3. Die Feldprüfungen sollten unter Bedingungen durchgeführt werden, die eine normale Pflanzenentwicklung sicherstellen. Das Saatgut sollte mit dem geeigneten Knöllchenbakterienstamm inokuliert werden. Die Parzellengröße ist so zu bemessen, daß den Beständen die für Messungen und Zählungen benötigten Pflanzen oder Pflanzenteile entnommen werden können, ohne daß dadurch die Beobachtungen, die bis zum Abschluß der Vegetationsperiode durchzuführen sind, beeinträchtigt werden. Jede Prüfung sollte 30 Einzelpflanzen und kann außerdem 4 Meter Reihen umfassen. Getrennte Parzellen für Erfassungen einerseits und Messungen andererseits können nur bei Vorliegen ähnlicher Umweltbedingungen verwendet werden.

4. Parzellen mit Einzelpflanzen: Jede Prüfung sollte je Sorte 30 auf 2, 3 oder 5 Wiederholungen verteilte Einzelpflanzen, d.h. Parzellen mit 15, 10 oder 6 Pflanzen, umfassen. Die größere Anzahl Wiederholungen ist bei einer geringen Anzahl von Sorten in der Prüfung normalerweise besser.

5. Parzellen in Reihen: Jede Prüfung mit Parzellen in Reihen sollte mindestens eine Reihengänge von 4 m, verteilt auf zwei Wiederholungen von je 2 m, umfassen. Die Parzellengröße ist so zu bemessen, daß den Beständen die für Beobachtungen benötigten Pflanzen oder Pflanzenteile entnommen werden können, ohne daß dadurch die visuellen Erfassungen, die bis zum Abschluß der Vegetationsperiode durchzuführen sind, beeinträchtigt werden. Die Aussaatstärke sollte so bemessen sein, daß etwa 150 Pflanzen je Meter erwartet werden können.
6. Zusätzliche Prüfungen für besondere Erfordernisse können durchgeführt werden.

IV. Methoden und Erfassungen

1. Alle Erfassungen für die Bestimmung der Unterscheidbarkeit und der Beständigkeit sollten an 30 Pflanzen oder Teilen von 30 Pflanzen erfolgen.
2. Für die Bestimmung der Homogenität sollte ein Populationsstandard von 1% mit einer Akzeptanzwahrscheinlichkeit von mindestens 95% angewandt werden. Bei einer Probengröße von 30 Pflanzen würde die höchste zulässige Anzahl von Abweichern 1 betragen.
3. Sofern nicht anders angegeben, sollten alle Erfassungen am Blatt an neuen, vollständig geöffneten Blättern im Blühstadium von 50% (50% der Pflanzen mit mindestens einer Blüte) erfolgen. Die Erfassungen an den Blüten sollten 2 Wochen nach dem Blühstadium von 50% erfolgen. Erfassungen an der Frucht und an den Samen sollten an vollentwickelten, gealterten Pflanzen erfolgen.

V. Gruppierung der Sorten

1. Das Prüfsortiment sollte zur leichteren Herausarbeitung der Unterscheidbarkeit in Gruppen unterteilt werden. Für die Gruppierung sind solche Merkmale geeignet, die erfahrungsgemäß innerhalb einer Sorte nicht oder nur wenig variieren. Die verschiedenen Ausprägungsstufen sollten in der Vergleichssammlung ziemlich gleichmäßig verteilt sein.
2. Zunächst sollte die Vergleichssammlung nach Unterarten unterteilt werden:
 - *subterraneum*
 - *yannicum* oder
 - *brachycalycinum*.
3. Den zuständigen Behörden wird empfohlen, die nachstehenden Merkmale für die Gruppierung der Sorten innerhalb jeder Unterart heranzuziehen:
 - a) Fiederblatt: Verteilung der Markierung (Merkmal 6)
 - b) Nebenblätter: Stärke der Anthocyanfärbung (im beschatteten Teil des Laubes) (Merkmal 29)
 - c) Zeitpunkt des Blühbeginns (Merkmal 30)
 - d) Kelchhöhle: Verteilung der Färbung (Merkmal 34)
 - e) Ausläufer: Ausprägung der Behaarung (Internodium zwischen dem 3. und 4. Knoten des längsten Hauptzweiges) (Merkmal 36)

- f) Samen: Brechen von hartem Samen während vier Monaten (Merkmal 43).

VI. Merkmale und Symbole

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

2. Hinter den Ausprägungsstufen für jedes Merkmal stehen Noten (Zahlen) für eine elektronische Datenverarbeitung.

3. Legende:

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

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

1) Zu erfassen an A = Einzelpflanzen
 B = Parzellen in Reihen
 C = besonderen Prüfungen

M: tatsächliche Messung.

VG: visuelle Erfassung durch eine einzige Beobachtung einer Gruppe von Pflanzen oder Pflanzenteilen

VS: :visuelle Erfassungen durch Beobachtung einer Anzahl einzelner Pflanzen oder Pflanzenteile.

VIII. Erklärungen zu der Merkmalstabelle

Zu. 4: Fiederblatt: allgemeine Form



1
dreieckig



2
dreieckig bis rund



3
rund

Zu 7, 10, 16: Fiederblatt: Verteilung der Markierung

Nur für Sorten mit Streifen: Fiederblatt: Breite der Streifen (Merkmal 7)



3
schmal
(A1)



5
mittel
(A2)



7
breit
(A3)

Nur für Sorten mit Bändern: Fiederblatt: Breite der Bänder (Merkmal 10)



3
schmal
(B1)

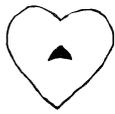


5
mittel



7
breit
(B2)

Nur für Sorten mit Halbmond: Fiederblatt: Basis des Halbmonds (Merkmal 16)



1
(C1)



2
(C2)



3
(C3)



4
(C4)

Zu 26 bis 28: Blatt: Anteil an Isoflavonen (Formononetin, Genistein, Biochanin A) vor Beginn der Blüte (Prozentsatz von Trockensubstanz)

Schätzung des Anteils an Isoflavonen. Das Verfahren ist im wesentlichen wie bei Francis und Millington (1965) dokumentiert. Zusammenfassend ist das Verfahren wie folgt:

Proben

Frische Blattproben werden gesunden, kürzlich ausgebildeten Blättern vor der Blüte entnommen. Zwölf Blattscheiben je Sorte werden als Proben für die chemische Analyse entnommen. Eine Zweitprobe von je 12 Blattscheiben wird für die Berechnungen des Trockengewichts entnommen.

Extraktion von Isoflavonen

Die Blattproben für die chemische Analyse werden in Reagenzgläsern mazeriert. Nachdem sie 15 Minuten stehengelassen wurden, um die Hydrolyse der gebundenen Isoflavone zu ermöglichen, wird 1 ml Ethanol (handelsübliche Qualität, absolut) beigegeben. Die Proben werden 10 Minuten lang in ein Schüttelwasserbad von 60° C gelegt und das Extrakt in saubere Reagenzgläser umgefüllt. Das Extraktionsverfahren wird am Probenrest wiederholt, um weitere Isoflavone zu extrahieren. Die Lösung wird zur ersten umgefüllten Lösung hinzugefügt und das Gesamtvolumen nach Bedarf mit Ethanol auf 2 ml ergänzt. Um die Probe zu konzentrieren, wird eine Unterprobe von 0,5 ml in kleine Reagenzgläser pipettiert und in einen Wärmeschrank mit 40 C gestellt, bis das Ethanol vollständig verdunstet ist. Die Unterprobe wird sodann erneut in 0,2 ml Ethanol von handelsüblicher Qualität aufgelöst.

Chromatographie

Eine Aliquote von 5·µL von jeder Probe wird auf Dünnschichtchromatographie-Platten mit Silikagel 60 F₂₅₄ gesprenkelt. Standardlösungen, die bekannte Konzentrationen der drei Isoflavone enthalten, werden ebenfalls auf jede Platte gesprenkelt. Die Chromatographie wird sodann in einer Lösung von Chloroform/Methanol im Verhältnis 90:10 durchgeführt. Die Intensität der Isoflavonbanden wird bei Ultraviolettlicht mit 254 nm durch Vergleich mit der Intensität der Standardlösungen gemessen.

Trockengewichtproben

Die für die Trockengewichtberechnungen entnommenen Zweitproben werden während 48 Stunden bei 60° C getrocknet und sodann gewogen.

Berechnungen

Der Anteil jedes Isoflavons wird als Prozentsatz des Trockengewichts berechnet.

Zu 43: Samen: Geschwindigkeit des Brechens von hartem Samen während sechs Monaten

Samenproben

Voll ausgebildete Früchte sollten von kürzlich gealterten Pflanzen gewonnen werden. Die Samenerzeugung sollte unter angemessener, jedoch nicht übermäßig langer Bewässerung oder Regenmenge erfolgt sein. Die Samen werden vorsichtig aus den Früchten gerieben, wobei darauf zu achten ist, daß die Samenoberfläche nicht zerkratzt wird.

Laborverfahren

Vierhundert Samen von jeder Probe werden mit Wasser benetzt und während 48 Stunden in einen Schrank mit 15° C gelegt. Die gekeimten Samen werden gezählt und ausgeschieden. Die verbleibenden harten Samen werden für die Bestimmung der Brechgeschwindigkeit verwendet. Sie werden 4 Monate lang in einen Schrank gelegt, dessen Temperatur über einen Zeitraum von 24 Stunden zwischen 15° C und 60° C schwankt. Die Proben werden sodann mit Wasser benetzt und während 48 Stunden in einen Schrank mit 15° C gelegt. Die gekeimten Samen werden gezählt. Der Anteil der verbleibenden harten Samen wird als Prozentsatz der Anzahl harter Samen in der ursprünglichen Probe berechnet.

IX. Literatur

Dear, B.S. und Sandral, G.A. (1997). Subterranean clover in NSW – identification and use. Agfact P2.5.16, (2. Auflage), NSW Agriculture, S. 36.

Francis, C.M. und Millington, A.J. (1965). Varietal variation in the isoflavone content of subterranean clover: its estimation by a microtechnique. *Aust. J. Agric. Res.* **16**: S. 557-564.

Nichols, P.G.H., Collins, W.J. und Barbetti, M.J. (1996). Registered cultivars of subterranean clover - their characteristics, origin and identification. *Agriculture Western Australia Bulletin* Nr. 4327, S. 61.

X. Technischer Fragebogen

		Referenznummer (nicht vom Anmelder auszufüllen)	
TECHNISCHER FRAGEBOGEN in Verbindung mit der Anmeldung zum Sortenschutz auszufüllen			
1.1	Art	<i>Trifolium subterraneum</i>	
		BODENFRÜCHTIGER KLEE	
1.2	Unterarten	<i>subterraneum</i>	[]
		<i>yanninicum</i>	[]
		<i>brachycalycinum</i>	[]
		sonstige (bitte angeben)	[]
		
2.	Anmelder (Name und Anschrift)		
3.	Vorgeschlagene Sortenbezeichnung oder Anmeldebezeichnung		

4. Informationen über Ursprung, Erhaltung und Vermehrung der Sorte

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

Merkmale	Beispielsorten	Note
5.1 Fiederblatt: Verteilung der Markierung (6)		
nur ein Paar Streifen	Yarloop	1[]
nur ein einzelnes transversales Band	Nungarin	2[]
nur eine einzelne halbmondförmige Markierung	Mt Barker	3[]
ein Paar Streifen und ein Halbmond	Seaton Park	4[]
5.2 Nebenblätter: Stärke der Anthocyanfärbung (im beschatteten Teil des Laubes) (29)		
fehlend oder sehr gering	Junne	1[]
schwach	Dalkeith, Goulburn	3[]
mittel	Denmark, York	5[]
stark	Daliak, Woogenellup	7[]
sehr stark	Yarloop	9[]
5.3 Zeitpunkt des Blühbeginns (30)		
sehr früh	Nungarin	1[]
früh	Dalkeith	3[]
mittel	Riverina, York	5[]
spät	Goulburn, Mt Barker	7[]
sehr spät	Tallarook	9[]

Merkmale	Beispielsorten	Note
5.4 Kelchhöhle: Verteilung der Färbung (34)		
im oberen Viertel des Kelches		1
an der oberen Hälfte des Kelches	Goulburn	2
am oberen Dreiviertel des Kelches	Mt Barker, Nungarin, York	3
am ganzen Kelch	Daliak	4
5.5 Ausläufer: Ausprägung der Behaarung (Internodium zwischen dem 3. und 4. Knoten des längsten Hauptzweiges) (36)		
fehlend oder sehr gering	Denmark, Gosse, Goulburn, Riverina	1[]
schwach	Nuba	3[]
mittel	Daliak, Leura, York	5[]
stark	Dalkeith, Nungarin, Seaton Park	7[]
sehr stark		9[]
5.6 Samen: Brechen von hartem Samen während vier Monaten (43)		
sehr langsam	Geraldton, Northam	1[]
langsam	Dalkeith, Nungarin, York	3[]
mittel	June, Seaton Park	5[]
schnell	Gosse, Goulburn	7[]
sehr schnell	Mt Barker, Woogenellup	9[]

6. Ähnliche Sorten und Unterschiede zwischen diesen Sorten

Bezeichnung der ähnlichen Sorte	Merkmal, in dem die ähnliche Sorte unterschiedlich ist ^{o)}	Ausprägungsstufe der ähnlichen Sorte	Ausprägungsstufe der Kandidatensorte
---------------------------------	--	--------------------------------------	--------------------------------------

^{o)} Sofern die Ausprägungsstufen der beiden Sorten identisch sind, bitte die Größe des Unterschieds angeben.

7. Zusätzliche Informationen zur Erleichterung der Unterscheidung der Sorte

7.1 Resistenz gegen Schadorganismen

7.2 Besondere Bedingungen für die Prüfung der Sorte

7.3 Sonstige Informationen

