

UPOV

TG/170/2(proj.)

ORIGINAL: Inglés

FECHA: 2001-01-09

INTERNATIONAL UNION
FOR THE PROTECTION
OF NEW VARIETIES OF
PLANTS

UNION INTERNATIONALE
POUR LA PROTECTION
DES OBTENTIONS
VEGETALES

INTERNATIONALER
VERBAND ZUM SCHUTZ
VON PFLANZEN-
ZÜCHTUNGEN

UNIÓN INTERNACIONAL
PARA LA PROTECCIÓN
DE LAS OBTENCIONES
VEGETALES

PROYECTO

DIRECTRICES

PARA LA EJECUCIÓN DEL EXAMEN

DE LA DISTINCIÓN, LA HOMOGENEIDAD Y LA ESTABILIDAD

TRÉBOL SUBTERRÁNEO

(Trifolium subterraneum)

Se deberán interpretar las Directrices conjuntamente con el documento TG/1/2, el cual contiene notas explicativas sobre los principios generales utilizados para el establecimiento de estas Directrices.

<u>ÍNDICE</u>	<u>Página</u>
I. Objeto de las Directrices de Examen	3
II. Material necesario	3
III. Ejecución del examen	3
IV. Métodos y Observaciones.....	4
V. Modo de agrupar las variedades	4
VI. Carácteres y símbolos.....	5
VII. Tabla de caracteres	6
VIII. Explicaciones de la Tabla de caracteres	20
IX. Bibliografía	23
X. Cuestionario técnico	24

I. Objeto de las Directrices de Examen

Estas Directrices de Examen se aplican a todas las variedades de *Trifolium subterraneum* (ssp. *subterraneum*, spp. *yanninicum* y ssp. *brachycalycinum*).

II. Material necesario

1. Las autoridades competentes deciden cuándo, dónde y en qué cantidad y calidad se deberá entregar el material vegetal necesario para la ejecución de exámenes de la variedad. Los solicitantes que presentan 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. La cantidad mínima de semilla que debe presentar el solicitante en una o varias muestras será de:

100 g.

La semilla deberá cumplir, por lo menos, los requisitos mínimos de germinación, contenido de humedad y pureza para la comercialización de la semilla certificada en el país en el que se haya presentado la solicitud. La capacidad de germinación deberá ser lo más elevada posible.

2. El material vegetal deberá estar exento de todo tratamiento, salvo autorización en contrario o solicitud expresa de las autoridades competentes. Si ha sido tratado, se deberá indicar en detalle el tratamiento aplicado.

III. Ejecución del examen

1. La duración mínima del examen será, normalmente, de dos ciclos de crecimiento independientes.

2. Normalmente los ensayos deberán efectuarse en un solo lugar. Si ese lugar no permite la expresión de ciertos caracteres importantes de la variedad, se podrá estudiar esa variedad también en otro lugar.

3. Se deberán efectuar los ensayos en condiciones que aseguren un desarrollo normal. La semilla deberá ser inoculada con la raza apropiada de rizobio. Las parcelas deberán ser de un tamaño que permita la extracción de plantas o partes de plantas para efectuar medidas y conteos sin perjudicar las observaciones ulteriores, que se efectuarán hasta el final del período de vegetación. Cada ensayo deberá abarcar un total de 30 plantas aisladas y podrá incluir asimismo 4 metros de hileras. Solamente se podrán utilizar parcelas separadas para observación y medición si han estado sometidas a condiciones ambientales similares.

4. Parcelas con plantas aisladas: Cada ensayo deberá consistir en 30 plantas aisladas por variedad dispuestas en 2, 3 ó 5 repeticiones, es decir, parcelas de 15, 10 ó 6 plantas. Por lo general, un mayor número de repeticiones resulta más eficaz cuando se incluyen menos variedades en el ensayo.

5. Parcelas en hilera: Cada ensayo que incluya parcelas en hileras deberá consistir en al menos 4 metros de hileras dispuestas en dos divisiones, de 2 metros cada una. Las parcelas

deberán ser de un tamaño que permita la extracción de plantas o partes de plantas para efectuar medidas sin perjudicar las observaciones visuales que se realizarán hasta el final del período de vegetación. La densidad de la siembra deberá permitir obtener unas 150 plantas por metro.

6. Se podrán ejecutar ensayos adicionales con fines particulares.

IV. Métodos y observaciones

1. Todas las observaciones para la evaluación de la distinción y la estabilidad se deberán efectuar sobre 30 plantas o partes de cada una de las 30 plantas.

2. Para evaluar la homogeneidad, se deberá aplicar una población estándar del 1% y un índice de probabilidad de aceptación de al menos 95%. En el caso de una muestra de 30 plantas, el número de plantas atípicas no deberá exceder de 1.

3. Salvo indicación contraria, todas las observaciones de la hoja se deberán efectuar en hojas nuevas plenamente expandidas al 50% de la floración (50% de las plantas con al menos una flor). La observación de la flor deberá realizarse 2 semanas después del 50% de la floración. Las observaciones del fruto y la semilla deberán realizarse en plantas maduras, que hayan llegado a la senectud.

V. Modo de agrupar las variedades

1. La colección de las variedades que vayan a cultivarse deberá dividirse en grupos para facilitar la evaluación de la distinción. Los caracteres idóneos para definir los grupos son los que la experiencia ha demostrado que no varían, o que varían poco, dentro de una variedad. Sus diferentes niveles de expresión deberán repartirse con suficiente uniformidad en la colección.

2. En primer lugar, la colección se dividirá de conformidad con las subespecies:

- *subterraneum*
- *yanninicum* o
- *brachycalycinum*.

3. Se recomienda a las autoridades competentes la utilización de los siguientes caracteres para agrupar las variedades dentro de cada subespecie:

- a) Foliolo: patrón de la marca (carácter 6)
- b) Estípulas: grado de pigmentación antociánica (en la parte sombreada del canopeo) (carácter 29)
- c) Época de comienzo de la floración (carácter 30)
- d) Tubo del cáliz: distribución de la pigmentación (carácter 34)
- e) Tallo (estolón): grado de la pilosidad (en el entrenudo entre el 3^{er} y 4^o nudo de la ramificación más larga) (carácter 36)
- f) Semilla: ruptura de semillas duras durante cuatro meses (carácter 43).

VI. Carácteres y Símbolos

1. Para evaluar la distinción, la homogeneidad y la estabilidad, se deberán utilizar los caracteres indicados en la tabla de caracteres, con sus diferentes niveles de expresión.

2. A los efectos del tratamiento electrónico de los datos, se han introducido notas (números) a la derecha de los niveles de expresión para cada carácter.

3. Signos convencionales

(*) Se trata de caracteres que deberán emplearse para todas las variedades en cada período de vegetación en el que se ejecuten exámenes y que deberán figurar siempre en la descripción de la variedad, a menos que el nivel de expresión de un carácter precedente o las condiciones ambientales regionales lo impidan.

(+) Véanse las explicaciones de la tabla de caracteres en el Capítulo VIII.

1) Se observarán en: A = plantas aisladas
B = parcelas en hilera
C = ensayo especial

M = medida propiamente dicha

VG = evaluación visual por medio de una única observación de un grupo de plantas o partes de plantas

VS = evaluación visual por medio de la observación de varias plantas individuales o partes de plantas

VIII. Explicación de la Tabla de caracteres

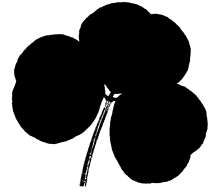
Ad. 4: Foliolo: forma general



1
triangular



2
triangular a redondeada



3
redondeada

Ad. 7, 10, 17: Foliolo patrón de la marca

Sólo para variedades con brazos: Foliolo: anchura de los brazos (carácter 7)



3
estrecha
(A1)



5
media
(A2)



7
ancha
(A3)

Sólo para variedades con bandas: Foliolo: grosor de las bandas (carácter 10)



3
estrecha
(B1)



5
media



7
ancha
(B2)

Sólo para variedades con medialuna: Foliolo: base de la medialuna (carácter 16)



1
(C1)



2
(C2)



3
(C3)



4
(C4)

Ad. 26 a 28: Hoja: nivel de isoflavones (formononetín, genisteína, biocanina A) antes del comienzo de la floración (porcentaje de materia seca)

Niveles estimados de isoflavones. El método es esencialmente tal como se describe en *Francis and Millington* (1965). En resumen, el procedimiento es el siguiente:

Muestras

Las muestras de hojas frescas se toman de hojas sanas, recientemente desarrolladas con anterioridad a la floración. Se muestrean 12 discos foliares por variedad para los análisis químicos. Se toma una muestra duplicado de 12 discos foliares para calcular el peso en seco.

Extracción de isoflavones

Las muestras de hojas para el análisis químico se maceran en tubos de ensayo. Tras esperar 15 minutos para permitir la hidrólisis de isoflavones adheridos, se añade 1 mL de etanol (comercial puro). Se colocan las muestras en un baño de agua agitada a 60° C durante 10 minutos y se coloca el extracto decantado en tubos de ensayo limpios. El procedimiento de extracción se repite en el residuo de muestra para extraer los isoflavones restantes. Esta solución se añade a la solución inicial decantada y el volumen total debe alcanzar los 2 mL. En caso necesario se añadirá etanol para completar. Para concentrar la muestra, por medio de una pipeta, se toma una submuestra de 0,5 mL y se coloca en pequeños tubos de ensayo que se colocarán en un horno a 40°C hasta que se evapore todo el etanol. A continuación, se vuelve a disolver la submuestra en 0,2 mL de etanol comercial.

Cromatografía

Se coloca un alícuota de 5·µL de cada muestra en placas cromatográficas de capa delgada de Silica gel 60 F₂₅₄. Se colocan asimismo en cada placa soluciones estándar que contienen concentraciones conocidas de los tres isoflavones. A continuación, se efectúa la cromatografía en una solución de cloroformo: metanol 90:10. Se mide la intensidad de las bandas de isoflavones bajo rayos ultravioletas a 254 nm en comparación con la intensidad de las soluciones estándar.

Muestras de peso en seco

Las muestras duplicado tomadas para los cálculos del peso en seco se secan durante 48 horas a 60° C y se pesan a continuación.

Cálculos

El nivel de cada isoflavón se calcula como porcentaje del peso en seco.

Ad. 43: Semilla: ruptura de semillas duras durante cuatro meses

Muestras de semillas

Los frutos plenamente formados se obtendrán de plantas que hayan llegado recientemente a la senectud. La producción de semillas se habrá obtenido mediante una cantidad de irrigación o de lluvia adecuada pero no excesivamente prolongada. Las semillas se separan suavemente de los frutos teniendo cuidado de no arañar la superficie de la semilla.

Procedimiento en laboratorio

Se humedecen con agua 400 semillas de cada muestra y se colocan en una cuba a 15° C durante 48 horas. Las semillas germinadas se cuentan y se descartan. Las semillas duras restantes se utilizan para determinar el índice de ruptura. Se colocan en una cuba con una temperatura que fluctúe entre 15° C y 60° C en un período de 24 horas durante 4 meses. A continuación, se humedecen las semillas con agua y se colocan en una cuba a 15° C durante 48 horas. Se cuentan las semillas germinadas. La proporción de semillas duras restantes se calcula como un porcentaje del número de semillas duras en la muestra inicial.

IX. Bibliografía

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

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

Nichols, P.G.H., Collins, W.J. and Barbetti, M.J. (1996). Registered cultivars of subterranean clover - their characteristics, origin and identification. Agriculture Western Australia Bulletin No. 4327, pág. 61.

X. Cuestionario técnico

		Número de referencia (reservado a la Administración)	
CUESTIONARIO TÉCNICO rellénese en relación con la solicitud de un título de obtención vegetal			
1.1	Especie	<i>Trifolium subterraneum</i> TRÉBOL SUBTERRÁNEO	
1.2	Subespecies	<i>subterraneum</i> <i>yanninicum</i> <i>brachycalycinum</i> otras (especificar)	[] [] [] []
2.	Solicitante (Nombre y dirección)		
3.	Denominación propuesta o referencia del obtentor		

4. Información sobre el origen, la conservación y la reproducción o la multiplicación de la variedad

5. Caracteres de la variedad que deben indicarse (el número entre paréntesis hace referencia al carácter correspondiente en las directrices de examen; márquese el nivel de expresión apropiado).

Caracteres	Variedades ejemplo	Nota
5.1 Foliolo: patrón de la marca (6)		
sólo un par de brazos	Yarloop	1[]
sólo una banda transversal	Nungarin	2[]
una sola marca central en forma de luna creciente	Mt Barker	3[]
un par de brazos y una luna creciente	Seaton Park	4[]
5.2 Estípulas: grado de pigmentación antociánica (en la parte (29) sombreada del canopeo)		
ausente o muy débil	Junne	1[]
débil	Dalkeith, Goulburn	3[]
medio	Denmark, York	5[]
fuerte	Daliak, Woogenellup	7[]
muy fuerte	Yarloop	9[]
5.3 Época de comienzo de la floración (30)		
muy temprana	Nungarin	1[]
temprana	Dalkeith	3[]
media	Riverina, York	5[]
tardía	Goulburn, Mt Barker	7[]
muy tardía	Tallarook	9[]

Caracteres	Variedades ejemplo	Nota
5.4 Tubo del cáliz: distribución de la pigmentación (34)		
en el cuarto superior del cáliz		1
en la mitad superior del cáliz	Goulburn	2
en los tres cuartos superiores del cáliz	Mt Barker, Nungarin, York	3
en todo el cáliz	Daliak	4
5.5 Tallo (estolón): grado de la pilosidad (en el entrenudo entre el 3^{er} y 4° nudo de la ramificación más larga) (36)		
ausente o muy débil	Denmark, Gosse, Goulburn, Riverina	1[]
débil	Nuba	3[]
media	Daliak, Leura, York	5[]
fuerte	Dalkeith, Nungarin, Seaton Park	7[]
muy fuerte		9[]
5.6 Semilla: ruptura de semillas duras durante cuatro meses (43)		
muy lenta	Geraldton, Northam	1[]
lenta	Dalkeith, Nungarin, York	3[]
media	June, Seaton Park	5[]
rápida	Gosse, Riverina	7[]
muy rápida	Mt Barker, Woogenellup	9[]

6. Variedades con características similares y diferencias respecto de esas variedades

Denominación de la variedad similar	Carácter en el que la variedad similar es diferente ^{o)}	Nivel de expresión de la variedad similar	Nivel de expresión de la variedad candidata
-------------------------------------	---	---	---

^{o)} Cuando los niveles de expresión de las dos variedades sean idénticos, se ruega indicar la amplitud de la diferencia.

7. Información complementaria que pueda ayudar a distinguir la variedad

7.1 Resistencia a plagas y enfermedades

7.2 Condiciones particulares para el examen de la variedad

7.3 Otros datos

8. Autorización para la diseminación

a) ¿Requiere la variedad autorización previa para su diseminación según la legislación sobre protección del medio ambiente, la salud humana y animal?

Sí ☐

No ☐

b) ¿Se ha obtenido dicha autorización?

Sí ☐

No ☐

Si la respuesta a esta pregunta es sí, por favor incluya una copia de dicha autorización.

[Fin del documento]