

UPOV

TG/81/5(proj.)

Original: Inglés

Fecha: 2000-02-18

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

GIRASOL

(Helianthus annuus L.)

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	3
II. Material necesario	3
III. Ejecución del examen	3
IV. Métodos y observaciones	4
V. Modo de agrupar las variedades	6
VI. Caracteres y símbolos	6
VII. Tabla de caracteres	7
VIII. Explicaciones de la tabla de caracteres	19
IX. Bibliografía	28
X. Cuestionario técnico	29

ANEXO

I. Objeto de las directrices

Estas Directrices de Examen se aplican a todas las variedades de *Helianthus annuus* L., incluidos líneas endocriadas, híbridos y variedades de polinización libre.

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 aquél en el que se efectuará el examen deberán asegurarse de que se han cumplido todas las formalidades aduaneras. La cantidad mínima de semillas que debe presentar el solicitante en una o varias muestras será de:

5.000 semillas para líneas endocriadas
1 Kg para híbridos y variedades de polinización libre

En el caso de híbridos, se deberán presentar otras 5.000 semillas de cada componente (p.ej., línea endocriada incluida la línea androestéril y la línea mantenedora de la línea parental femenina, híbrido simple). En el caso de líneas androestériles, se presentarán otras 5.000 semillas de la línea mantenedora. La semilla deberá cumplir, al menos, los requisitos mínimos de capacidad germinativa, contenido de humedad y pureza para la comercialización de semillas certificadas en el país en el que se haya presentado la solicitud. La capacidad germinativa debe 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 períodos similares de vegetación.

2. Normalmente, se deberán efectuar los ensayos 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. Las parcelas deberán tener un tamaño tal que permitan 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 40 plantas que estarán repartidas en dos o más repeticiones. Solamente se podrán utilizar parcelas separadas para observación y medición si han estado sometidas a condiciones ambientales similares.

4. Se podrán ejecutar ensayos adicionales con fines particulares, por ejemplo ensayos de líneas-capítulo, en caso de que las autoridades competentes acepten resultados obtenidos por el solicitante antes de la fecha de la solicitud.

5. En caso de que se controle la fórmula de híbridos mediante electroforesis enzimática, se deberá efectuar un examen en un mínimo de 10 plántulas de cada línea endocriada. Se analizarán, como mínimo, 4 plántulas para híbridos simples, y, al menos, 10 plántulas para híbridos de tres vías. En caso de duda, analícese plántulas adicionales.

IV. Métodos y observaciones

1. Se emplearán los caracteres descritos en el Capítulo VII para ejecutar el examen de la distinción de las líneas parentales, de los híbridos y de variedades de polinización libre.

2. Sin embargo, para determinar la distinción de los híbridos, se podrá establecer un sistema de preselección sobre la base de las líneas parentales y de la fórmula, de conformidad con las siguientes recomendaciones:

a) descripción de las líneas parentales de conformidad con las Directrices de Examen;

b) comprobación de la originalidad de esas líneas parentales comparadas con la colección de referencia basada en los caracteres que figuran en el Capítulo VII, a fin de seleccionar las líneas endocriadas más parecidas;

c) comprobación de la originalidad de la fórmula de los híbridos comparada con la de los híbridos más conocidos, teniendo en cuenta las líneas endocriadas más parecidas;

d) evaluación de la distinción a nivel de híbrido de variedades con fórmulas parecidas.

3. Todas las observaciones para evaluar la distinción y la homogeneidad, incluidos los caracteres electroforéticos, de haberlos, se deberán efectuar en 40 plantas o partes de 40 plantas en cada lugar de examen y en cada período de vegetación.

4. Todas las observaciones se deberán efectuar en el tallo principal.

5. Todas las observaciones de la hoja se deberán efectuar en hojas completamente desarrolladas a 2/3 de altura de la planta, desde el estado de botón floral, pero antes del estado de floración. El botón floral deberá alcanzar un tamaño de 4 a 5 cm.

6. Para evaluar la homogeneidad de las líneas endocriadas, se deberá aplicar una población estándar del 2% con una probabilidad de aceptación de al menos 95%. Además, se deberán aplicar la misma población estándar y la misma probabilidad de aceptación a casos típicos de plantas de cruzamiento exógeno y de plantas isógenas fértiles, en total, dentro de una línea androestéril. Para evaluar la homogeneidad de híbridos simples, se deberá aplicar una población estándar del 5% con una probabilidad de aceptación de al menos 95%. Para aquellos países en los que la adaptación de su sistema a las nuevas normas adoptadas suponga un cambio demasiado grande con las consiguientes dificultades, se podrá prever un período provisional de 2 años desde la adopción de las Directrices de Examen antes de que cambien a las nuevas normas. Por lo que atañe a los híbridos de tres vías y a las variedades de polinización libre, la variabilidad dentro de la variedad no debería superar la variabilidad de variedades comparables ya conocidas.

Número de plantas atípicas permitidas para diferentes casos y tamaños de muestras

	Plantas atípicas	Número de plantas observadas	Número de plantas atípicas permitidas
<u>Línea endocriada¹ androestéril</u> (población estándar: 2%, Posibilidad de aceptación: <u>95%</u>)	Plantas cruzadas y plantas isógenas fértiles	19 - 41	2
		42 - 69	3
		70 - 99	4
		100 - 131	5
	Otras plantas atípicas	19 - 41	2
		42 - 69	3
		70 - 99	4
		100 - 131	5
<u>Línea endocriada androestéril</u> (población estándar: 2%, posibilidad de aceptación: <u>95%</u>)	Todo tipo de plantas atípicas	19 - 41	2
		42 - 69	3
		70 - 99	4
		100 - 131	5
<u>Híbridos simples</u> (población estándar: 5%, posibilidad de aceptación: <u>95%</u>)	Todo tipo de plantas atípicas	17 - 28	3
		29 - 40	4
		41 - 53	5
		54 - 67	6
		68 - 81	7
		82 - 95	8
		96 - 110	9
		111- 125	10

7. Si se emplea la electroforesis enzimática para determinar la distinción, se deberán aplicar la misma población estándar y la misma probabilidad de aceptación que para los demás caracteres. Todas las plantas de una línea endocriada con dos o más loci heterocigotes para los cuales un alelo en cada locus provenga de la línea endocriada en cuestión (p. ej. , AX) se considerarán como cruzamientos exógenos. Todo otro caso de heterocigosis así como los

¹ Por ejemplo, se aceptará una línea endocriada androestéril con 2 plantas de cruzamiento exógeno y 2 plantas atípicas con respecto a los caracteres de las hojas, en 40 plantas observadas. Por otra parte, se rechazará una línea endocriada androestéril con tres plantas atípicas para los caracteres de las hojas, en 40 plantas observadas.

demás casos en los que dos alelos exóticos estén presentes en un locus, se considerarán plantas atípicas.

V. Modo de agrupar las variedades

1. La colección de las variedades que vayan a cultivarse se deberá dividir en grupos para facilitar la evaluación de la distinción. Los caracteres que deberán utilizarse para definir los grupos serán 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, se separarán las variedades en líneas endocriadas y otras variedades. Luego, se recomienda a las autoridades competentes la utilización de los siguientes caracteres para agrupar las variedades:

- a) Hoja: color verde (carácter 6)
- b) Hoja: abullonado (carácter 7)
- c) Época de la floración (carácter 14)
- d) Planta: altura natural (carácter 27)
- e) Planta: ramificación (excluyendo la causada por el medio ambiente) (carácter 29)
- f) Semilla: estrías en el borde (carácter 39)
- g) Semilla: estrías entre los bordes (carácter 40)

VI. Caracteres 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 efectos del tratamiento electrónico de datos, se han introducido notas (números) frente a los niveles de expresión de 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) El estado de desarrollo óptimo para evaluar cada carácter está indicado con un número en la segunda columna. Los estados de desarrollo designados por cada número se describen al final del Capítulo VIII.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

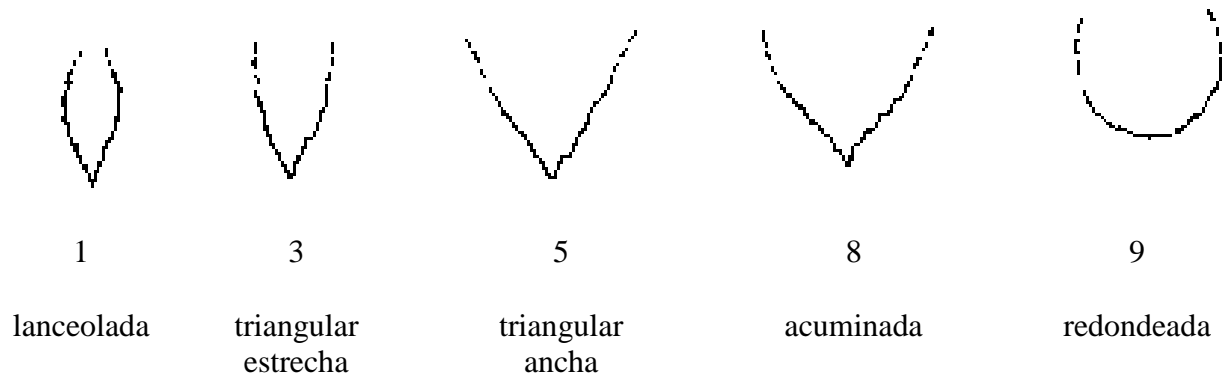
	Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
34.	M3	Head: shape of grain side	Capitule: forme de la partie du grain	Korb: Form der Kornseite	Capítulo: forma de la parte del grano		
(*)		strongly concave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

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

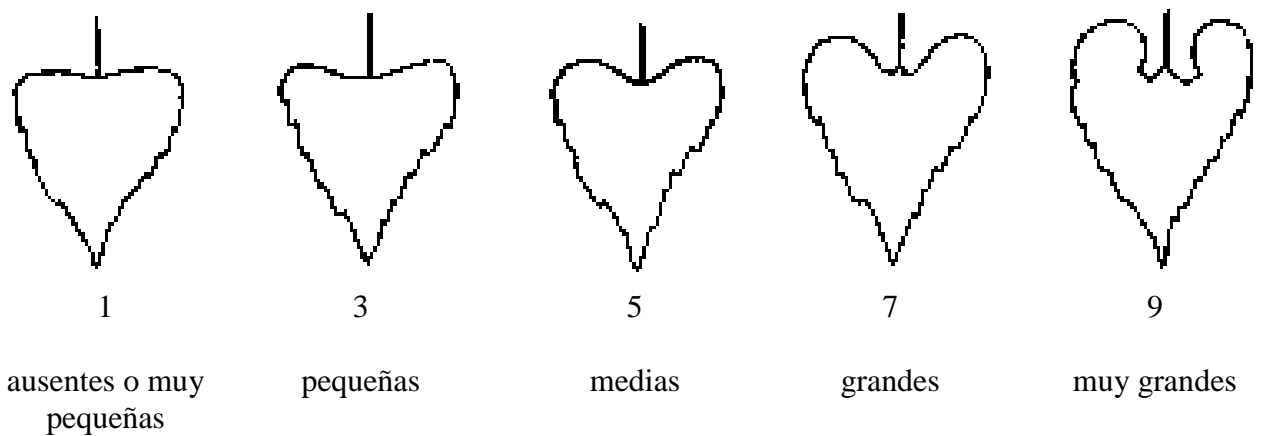
Stage ¹⁾ Stade ¹⁾ Stadium ¹⁾ Estadio ¹⁾	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielsorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
41. M4	Seed: color of stripes	Grain: couleur des stries	Korn: Farbe der Streifen	Semilla: color de las estrías		
	white	blanches	weiß	blanco	RHA 295	1
	grey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

VIII. Explicaciones de la Tabla de caracteres

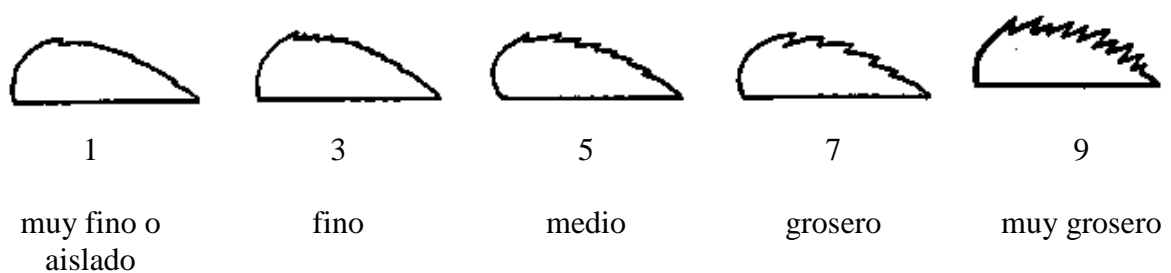
Ad. 4: Hoja: forma de la parte distal



Ad. 5: Hoja: aurículas



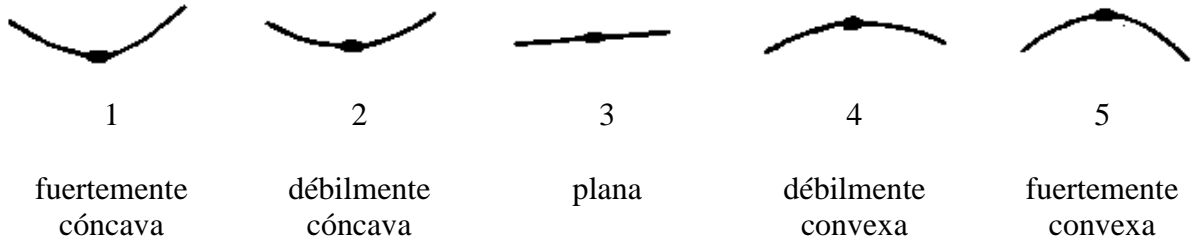
Ad. 8: Hoja: dentado



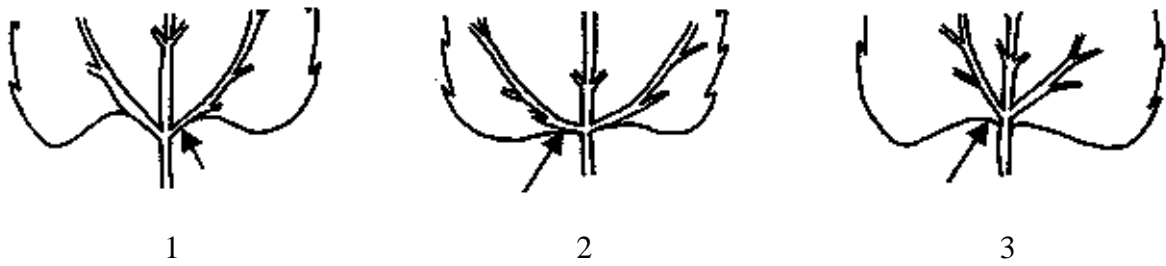
Ad. 9: Hoja: forma de la sección transversal
 (en el medio de la hoja)



sección transversal

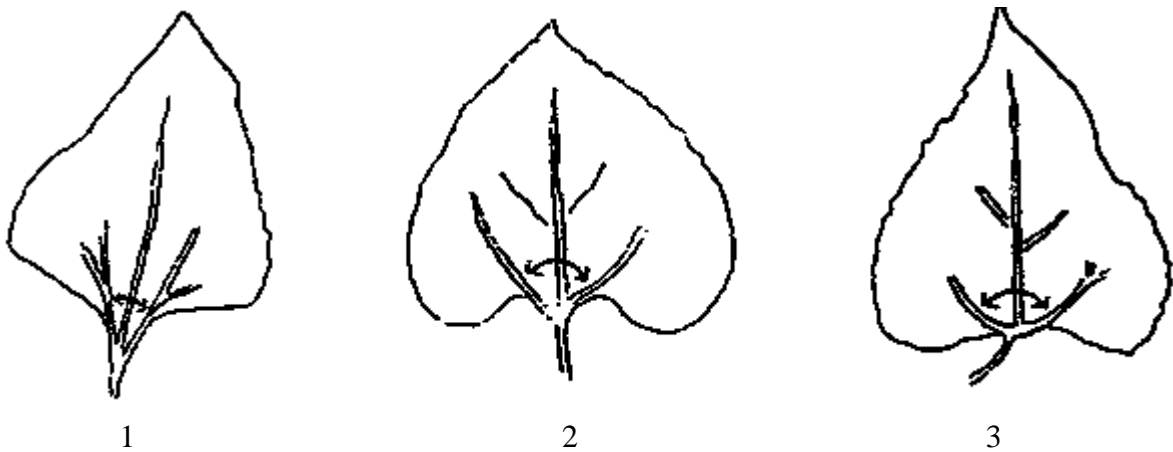


Ad. 10: Hoja: alas
 (parénquima en la base de los nervios laterales)



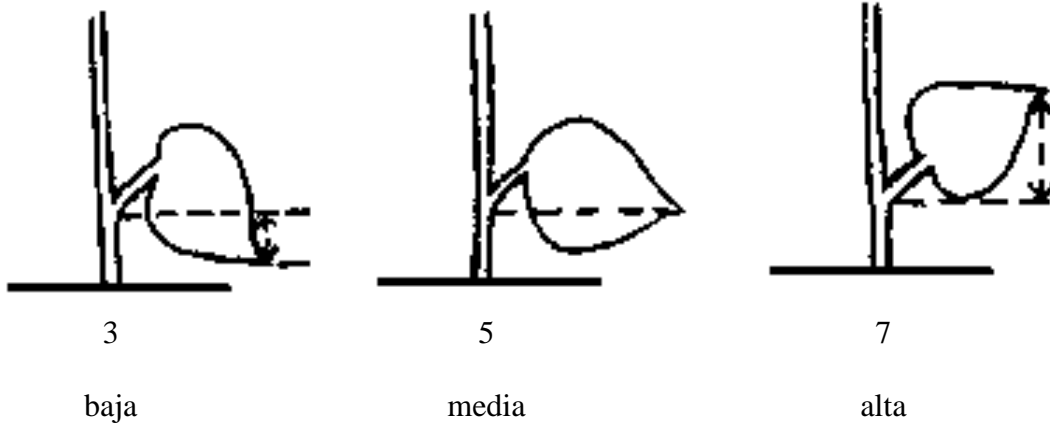
ninguna o muy débilmente débilmente definidas fuertemente definidas
 definidas

Ad. 11: Hoja: ángulo de los nervios laterales



agudo ángulo recto o casi ángulo obtuso
 recto

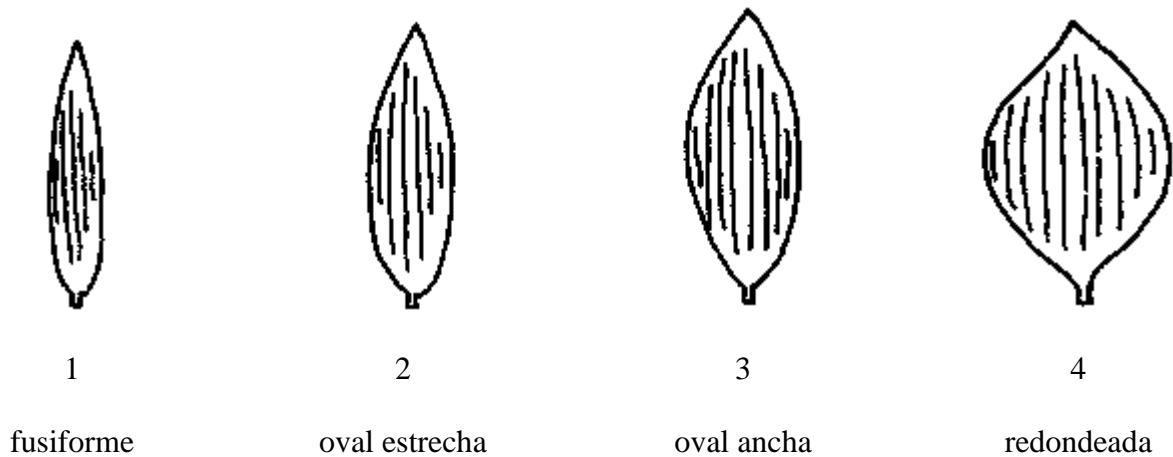
Ad. 12: Hoja: altura de la punta del limbo en relación con la inserción del pecíolo



Ad. 14: Época de la floración

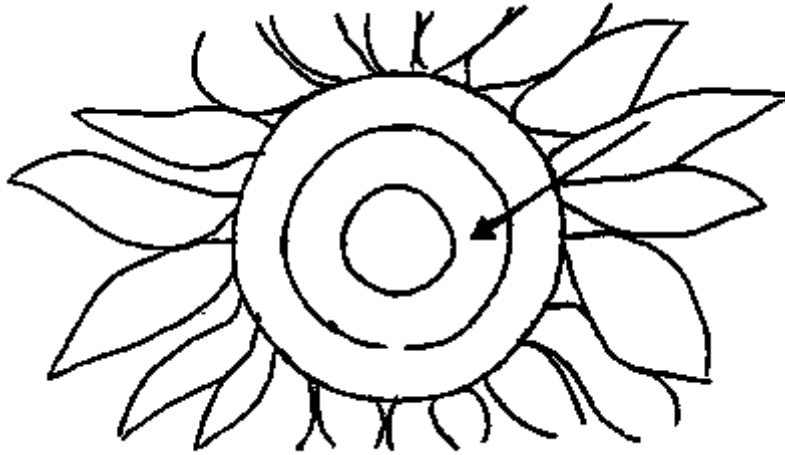
La época de floración se alcanza cuando 50% de las plantas están en flor. Se considera que una planta está en flor cuando tiene al menos una flor ligulada erguida y coloreada.

Ad. 16: Flor ligulada: forma

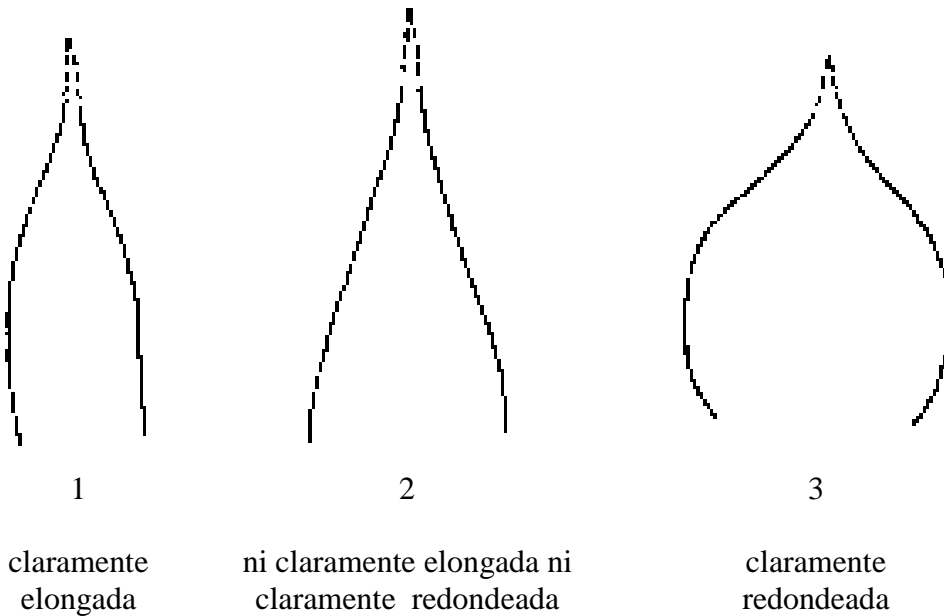


Ad. 21 y 22: Flósculo (flor del disco): pigmentación antociánica del estigma

La pigmentación antociánica se registrará en estigmas del tercio central del capítulo, inmediatamente después de que haya aparecido el polen en la parte superior de las anteras.

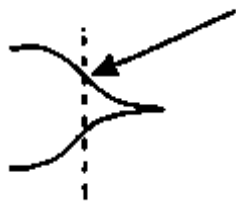


Ad. 24: Bráctea: forma



Ad. 25: Bráctea: longitud de la punta

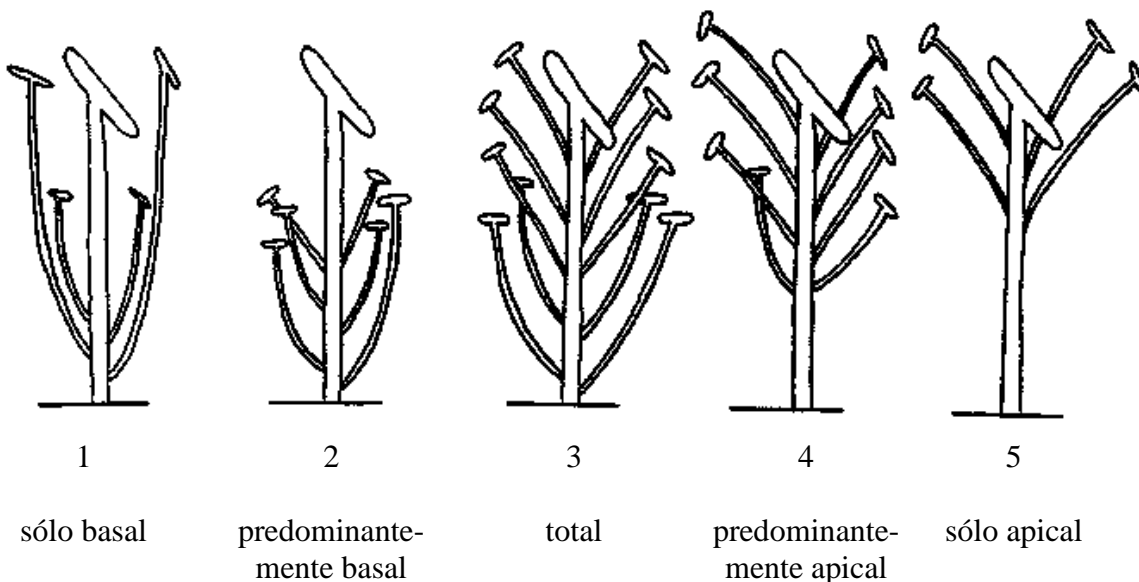
La punta comienza donde cambia
la dirección de la curvatura



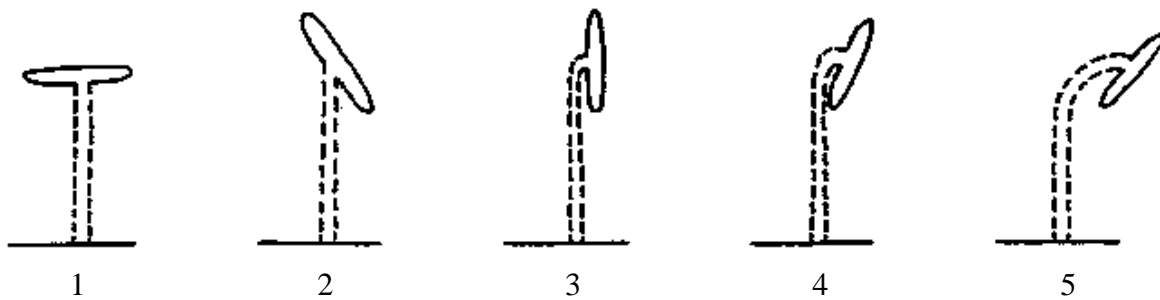
Ad. 27: Planta: altura natural

Diferentes condiciones del medio ambiente pueden requerir escalas separadas para líneas, híbridos y variedades de polinización abierta.

Ad. 30: Planta: tipo de ramificación
(excluyendo la causada por el medio ambiente)



Ad. 32: Capítulo: porte



horizontal

inclinado

vertical

semiinvertido
con el tallo recto

semiinvertido
con el tallo
arqueado



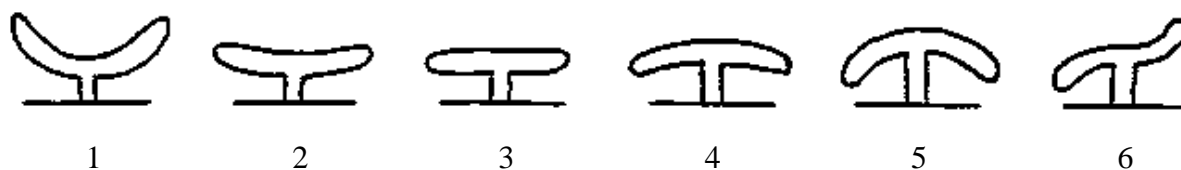
invertido con el
tallo recto

invertido con el tallo
ligeramente arqueado

invertido con el tallo
fuertemente arqueado

retorcido

Ad. 34: Capítulo: forma de la parte del grano



fuertemente
cóncavo

débilmente
cóncavo

plano

débilmente
convexo

fuertemente
convexo

deformado

Ad. 36: Semilla: forma



1

elongada



2

ovoide estrecha



3

ovoide ancha



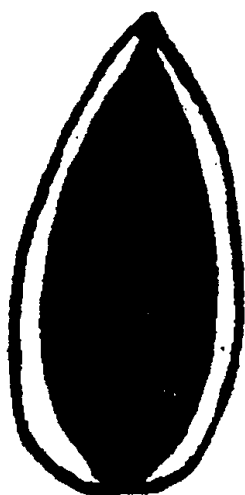
4

redondeada

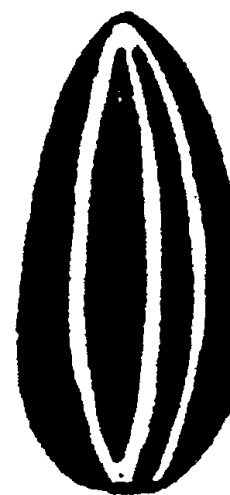
Ad. 38: Semilla: color principal

El color principal de la semilla es aquel que ocupa la mayor superficie. En caso de duda en cuanto a cuál es la mayor superficie, el color más oscuro es el color principal.

Ad. 39 y 40: Semilla: estrías



en el borde



entre los bordes

ESTADOS DE DESARROLLO DEL GIRASOL¹

(Se llega a un estado cuando el 50% de las plantas se hallan en ese estado)

Germinación - Emergencia (A)



A 1

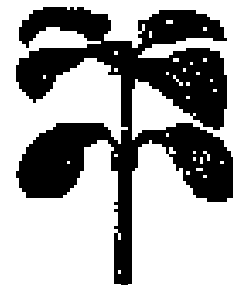
Aparición del hipocotilo en cayado.



A 2

Emergencia de los cotiledones y primeras hojas visibles

Fase vegetativa (B)



B 3 - B 4

Aparición del segundo par de hojas opuestas que tiene 4 cm aproximadamente de longitud; los pecíolos son visibles desde arriba

Fase de botón floral (E)



E 1

Aparición del botón floral estrechamente insertado en medio de las hojas jóvenes: estado de botón estrella.



E 2

El botón se separa de la corona foliar, las brácteas se distinguen claramente de las hojas. El diámetro oscila entre 0,5-2 cm.



E 4

El botón está claramente separado de las hojas; su diámetro oscila entre 5-8 cm. Permanece horizontal. Una parte de las brácteas está desplegada.

¹ Reproducido con la amable autorización de CETIOM (Francia)

Floración (F)

Maduración (M)



F 1

Inclinación del botón floral; las flores liguladas son perpendiculares al disco.



F 3.2

Los tres círculos de flósculos discoidales más exteriores tienen sus anteras visibles y separadas y sus estigmas desplegados



M 0

Caída de las flores liguladas. La parte posterior del capítulo sigue siendo verde.

Maduración (M)



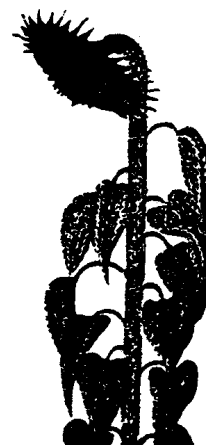
M 2

La parte posterior del capítulo es amarilla. Tres cuartas partes de las brácteas son de color marrón. La humedad de la semilla oscila entre el 20% y el 25%.



M 3

La parte posterior del capítulo es de color marrón marmóreo. El tallo comienza a secarse. La humedad de la semilla es del 15% aproximadamente.



M 4

Todos los órganos de la planta son de color marrón oscuro. La humedad de la semilla es del 10% aproximadamente.

IX. Bibliografía

J.F. Miller: "Update on Inheritance of Sunflower Characteristics," USDA - ARS, Northern Crop Science Laboratory, Fargo, North Dakoto 58105 (EE.UU.)

X. Cuestionario técnico

	Número de referencia (a rellenar por la Administración)
<p>CUESTIONARIO TÉCNICO a rellenar en relación con la solicitud de título de obtención vegetal</p>	
1. Especie	<p><i>Helianthus annuus</i> L. GIRASOL</p>
2. Solicitante (nombre y dirección)	
3. Denominación propuesta o referencia del obtentor	

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 ejemplos	Nota
5.1 Hoja: color verde (6)		
claro	H 52.9.1.1	3[]
medio	HA 821	5[]
oscuro	HA 303	7[]
5.2 Hoja: abullonado (7)		
ausente o muy débil		1[]
débil	HA 342, RHA 273	3[]
medio	HA 291	5[]
fuerte	HA 303, RHA 361	7[]
muy fuerte		9[]
5.3 Época de floración (14)		
muy temprana	HA 302, RHA 381	1[]
temprana	RHA 273	3[]
media	RHA 274	5[]
tardía	RHA 271	7[]
muy tardía	RHA 361	9[]

Caracteres	Variedades ejemplos	Nota
5.4 Flor ligulada: color (19)		
marfil		1[]
amarillo pálido		2[]
amarillo medio	HA 89	3[]
amarillo naranja	RHA 361	4[]
naranja	CM 587, RHA 295	5[]
púrpura		6[]
marrón rojizo		7[]
multicolor		8[]
5.5 Planta: altura natural (27)		
muy baja	HA 379	1[]
baja	HA 291	3[]
media	RHA 801	5[]
alta	H 52.9.1.1	7[]
muy alta		9[]
5.6 Planta: ramificación (excluyendo la causada por el medio ambiente) (29)		
ausente	HA89	1[]
presente	RHA 271	9[]
5.7 Semilla: estrías en el borde (39)		
ninguna o muy débilmente definidas	RHA 273	1[]
débilmente definidas	H 52.9.1.1	2[]
fuertemente definidas	HA 89	3[]

Caracteres		Variedades ejemplos	Nota
5.8	Semilla: estrías entre los bordes		
(40)			
	ninguna o muy débilmente definidas	RHA 273	1[]
	débilmente definidas	RHA 293	2[]
	fuertemente definidas	HA 89	3[]
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 las variedades

7.1 Resistencia a plagas y enfermedades

- a) Mildiú veloso []
(precísense las razas)

.....

.....

- b) Roya []

- c) Otras pestes o enfermedades []
(especifíquese)

.....

7.2 Utilización

- a) aceite y torta []

- b) pájaros y consumo directo para el hombre []

- c) ornamental []

- d) otras utilizaciones []

.....

7.3 Condiciones particulares para el examen de la variedad

7.4 Otros datos

8. Autorización para la disseminación

- a) ¿Requiere la variedad autorización previa para su disseminación 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.

[Sigue el Anexo]

ANEXO

Explicaciones útiles adicionales

	<u>ÍNDICE</u>	<u>PÁGINA</u>
Parte I.	Introducción	2
Parte II.	Caracteres obtenidos mediante electroforesis	3
Parte III.	Descripción del método a emplear	4

Parte I

Introducción

El Anexo siguiente contiene una lista de caracteres obtenidos mediante electroforesis y una descripción del método que debe emplearse. La UPOV ha decidido publicar esos caracteres en un anexo de las Directrices de Examen, creando con ello una categoría especial de caracteres, habida cuenta de que la mayoría de los Estados miembros de la UPOV opinan que es imposible establecer la distinción solamente sobre la base de la diferencia encontrada en un carácter mediante electroforesis. Por consiguiente, se deberán emplear esos caracteres solamente como complemento de otras diferencias comprobadas para caracteres morfológicos o fisiológicos. La UPOV confirma que se consideran esos caracteres útiles pero que, aisladamente, no pueden ser suficientes para establecer la distinción. No se los debe emplear como caracteres de rutina, sino a petición, o con el acuerdo del solicitante de la variedad objeto de la solicitud.

Parte II

Caracteres obtenidos mediante electroforesis

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

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

Parte III

Descripción del método a emplear

Descripción del método para el análisis de isoenzimas en geles de almidón de *Helianthus annuus L.*

1.- Número de semillas por ensayo:

- Para revisar la fórmula:

10 plántulas para cada una de las líneas puras
4 plántulas para los híbridos simples
10 plántulas para los híbridos 3 vías.
- Para los test de distinguibilidad, uniformidad y estabilidad:
Al menos 40 semillas para líneas puras, híbridos y variedades de polinización libre.

2.- Aparatos y equipo

Se puede utilizar cualquier sistema de electroforesis que mantenga los geles a 4° C. Se recomienda un grosor del gel de 10 mm. La fuente de alimentación utilizada deberá ser capaz de proporcionar un voltaje constante.

3.- Productos químicos

Todos los productos químicos deben ser de calidad “reactivo analítico” o mejores.

3.1. Productos químicos para la extracción de las enzimas

Tris (hidroximetil) aminometano (Tris)
Acido clorhídrico
β-Mercaptoetanol

3.2. Productos químicos para la electroforesis

Azul de bromofenol
Acido cítrico monohidrato
L-Histidina
Almidón hidrolizado, para electroforesis (Sigma S-45010 ó similar)

3.3. Reactivos para las tinciones de las enzimas

Etanol del 95%
Acido etilendiaminotetraacético, sal disódica-2-hidrato (EDTA Na₂)
D-Fructosa 6-fosfato, sal disódica
α-D-Glucosa 1-fosfato, sal disódica monohidrato
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Sigma G-5885)
Acido clorhídrico
Cloruro de magnesio seis hidrato (Mg Cl₂.6H₂O)

Acido DL-málico, sal monosódica
Dimetiltiazol difenil tetrazolio (MTT)
 β -Nicotinamida-adenina-dinucleótico fosfato (NADP)
Cloruro de azul Nitrotetrazolio (NBT)
Acido 6-fosfogluónico, sal trisódica hidratada
Fenazina metilsulfato
Acido sikimico
Hidróxido sódico (NaOH)
Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris)

4.- Soluciones

4.1. Solución de extracción

Tris HCl 0,1 M (pH 7.2) + 2-mercaptoetanol al 0,2% (v/v)

4.2. Tampones de electroforesis

4.2.1. Tampones para electroforesis en geles de almidón pH 6.5

4.2.1.1. Solución stock: L-histidina-citrato 0,364 M

50,44 g de L-histidina
8,34 g. de ácido cítrico monohidrato
enrasar a 1 l con agua desionizada

4.2.1.2. Tampón de migración: L-histidina-citrato 0,072 M, pH 6,5 (Dilución de la solución stock 1 en 5)

400 ml de solución stock (4.2.1.1)
enrasar a 2 l con agua desionizada

4.2.1.3. Tampón del gel: L-histidina-citrato 0,024 M, (Dilución de la solución stock 1 en 15)

80 ml de solución stock (4.2.1.1.)
enrasar a 1.200 ml con agua desionizada

4.2.2. Tampones para electroforesis en geles de almidón pH 5.7

4.2.2.1. Tampón de migración: L-histidina-citrato 0,067 M. pH 5.7

20,18 g de L-histidina
8,34 g.de ácido cítrico monohidrato
enrasar a 2 l con agua desionizada

4.2.2.2. Tampón gel: L-histidina-citrato 0,011 M (tampón de migración diluido 1 en 6)

100 ml de tampón de migración (4.2.2.1.)
enrasado a 1.200 ml con agua desionizada

4.2.2.3. Solución de azul de bromofenol

50 mg de azul de bromofenol disuelto en 100 ml. de agua desionizada.

4.3. Soluciones de tinción

4.3.1. Soluciones stock

4.3.1.1. Tris-HCl 1 M pH 7,5

121,1 g de Tris, enrasar a 1 l. con agua desionizada y ajustar a pH 7.5 con HCl al 50%.

4.3.1.2. Tris-HCl 1 M pH 8.5

121,1 g de Tris, enrasar a 1 l. con agua destilada y ajustar a pH 8.5 con HCl al 50%.

4.3.1.3. Solución de MTT

1 g de MTT, enrasar a 100 ml. con agua desionizada.

4.3.1.4. Solución de NBT

1 g de NBT, enrasar a 100 ml. con agua desionizada

4.3.1.5. Solución de PMS

200 mg de PMS, enrasar a 100 ml. con agua desionizada

4.3.1.6. Solución de MgCl₂

10 g de Cloruro de magnesio hexahidratado, enrasar a 100 ml. con agua desionizada.

4.3.1.7. Solución de malato sódico

2,5 g de ácido DL-málico, enrasar a 50 ml. con agua desionizada y ajustar a pH 8.0 con NaOH 1 M.

4.3.2. Soluciones de teñido

4.3.2.1. Solución de teñido de ME

100 ml de Tris-HCl 0,1 M, pH 7.5 (4.3.1.1. diluido 1 en 10)
4 ml de solución de malato sódico (4.3.1.7.)
1 ml de solución de NBT (4.3.1.4.)
1 ml de solución de PMS (4.3.1.5.)

1.8 ml de solución de $MgCl_2$ (4.3.1.6.)
17,5 mg de NADP

4.3.2.2. Solución de teñido de PGI + PGD

100 ml de Tris-HCl 0,1 M, pH 7.5 (4.3.1.1. diluido 1 en 10)
100 mg de D-fructosa 6-fosfato, sal disódica
60 mg de ácido 6-fosfogluconico, sal trisódica
10 mg de NADP
1 ml. de (la) solución de MTT (4.3.1.3.)
1,5 ml de (la) solución de PMS (4.3.1.5.)
1 ml de (la) solución de $MgCl_2$ (4.3.1.6.)
40 unidades de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sigma G-5885)
Para teñir PGI solamente, no añadir el ácido 6-fosfogluconico.
Para teñir PGD solamente, no incluir ni fructosa 6-fosfato, ni glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

4.3.2.3. Solución de tinción de PGM

100 ml de Tris-HCl 0,1 M, pH 8.5 (4.3.1.2. diluido 1 en 10)
150 mg de α -D- glucosa 1-fosfato, sal disódica monohidrato
150 mg de EDTA, Na_2
10 mg de NADP
1,5 ml de solución de MTT (4.3.1.3.)
1 ml de solución de PMS (4.3.1.5.)
4 ml de solución de $MgCl_2$ (4.3.1.6.)
40 unidades de Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

4.3.2.4. Solución de teñido de ShDh

100 ml de Tris-HCl 0,2 M, pH 8.5 (4.3.1.2. diluido 1 en 5)
50 mg de ácido sikímico
1 ml de solución de MTT (4.3.1.3.)
1,25 ml de solución de PMS (4.3.1.5.)
12 mg de NADP

5. Procedimiento

5.1. Extracción de las enzimas

Se ponen a germinar las semillas en papel humedecido, durante 2 a 3 días, a 25°C en la oscuridad. Se separan las cubiertas de las semillas y se trituran los cotiledones, a 4°C en microtubos de 1,5 ml con 300 µl de tampón de extracción (4.1.)
Los extractos se pueden mantener congelados a -30°C ó a -80°C.

5.2. Preparación del gel

Los geles se preparán el día anterior a aquel en que se va a realizar la emigración. Para fabricar 2 geles de almidón al 12,5 % (con unas dimensiones de 18x18x1 cm.) : se mezclarán 128 g de almidón con 1.020 ml. de tampón gel (4.2.1.3. ó 4.2.2.2.) en un kitasato y calentar hasta alcanzar los 78°C. La mezcla se desgasifica con una bomba de vacío durante 30 segundos. Se vierte el gel en el molde tal y como describa el manual del equipo utilizado. Se debe evitar que queden burbujas en el gel. Los geles se mantienen durante 45 minutos a temperatura ambiente, para que se enfríen y después 1 hora en un refrigerador. Pasado ese tiempo se cubren con una lámina de polietileno y se dejan toda la noche a temperatura ambiente, volviendo a enfriarlos a 4°C 1 hora antes de la migración.

5.3. Electroforesis

5.3.1. Se llena cada cubeta de electrodo con el volumen necesario de tampón de migración (4.2.1.2. ó 4.2.2.1.) enfriado previamente a 4°C. Se retira la lámina de polietileno y se hacen dos cortes transversales en el gel, a 3 y 4 cm del borde del molde (zona del cátodo).

Se quita esta lámina de gel y se colocan los extractos como sigue:

- Se descongelan los extractos (5.1.) y se absorben en mechas de papel de filtro (Whatman nº 3, de 1,5 mm. X 20 mm.)
- Se insertan estas mechas así embebidas en el gel, apretándolas bien contra el primer corte.
- Se coloca una mecha embebida en solución de azul de bromofenol (4.2.2.3.) en cada uno de los extremos del gel (como marcador de la migración).
- Se vuelve a colocar en su sitio la lámina de gel y se cubre éste con una lámina de polietileno.

Los dos geles, con los extractos en la zona catódica, se colocan en dos cubetas de tampón electrodo, en un lugar refrigerado a 4°C.

La electroforesis tiene lugar a 4°C, hacia el ánodo. A los 15' de migración al primer voltaje, se quitan las mechas de papel y se aumenta el voltaje. Durante cada fase se debe mantener el voltaje constante.

Las condiciones electroforéticas serán las siguientes:

Sistemas de tampón	Voltaje constante	Distancia recorrida por el azul de bromofenol	Duración de la migración
Histidina-citrato pH 5.7	260 V durante 15 minutos. Después 290 V	13 cm	5 h
Histidina-citrato pH 6.5	240 V durante 15 minutos. Después 280 V	11 cm	5 h

Las isoenzimas ME,PGD y PGI, se estudian en los geles realizados a pH 5.7, y las enzimas PGM y ShDh en los geles de pH 6.5.

5.4. Teñido enzimático

Después de apagar la corriente eléctrica, el gel se corta horizontalmente en capas de 1 mm. de grosor con un alambre de acero o un hilo de pescar. La capa superior no se utiliza. Cada una de las capas restantes se tiñen con la siguiente solución de tinción, dejándolas incubando en oscuridad a 37°C:

- Para ME : Solución 4.3.2.1. Tiempo de incubación 15 h.
- Para PGI y PGD: Solución 4.3.2.2. Tiempo de incubación 1 h.
- Para PGM: Solución 4.3.2.3. Tiempo de incubación ½ h.
- Para ShDH: Solución 4.3.2.4. Tiempo de incubación 1 h.

Después del teñido las capas se lavan con agua desionizada y se fijan en una solución de etanol al 40%.

Si se quieren conservar las capas durante largo tiempo, se puede emplear uno de los procedimientos siguientes: colocar la loncha en una solución al 5% de glicerol y secarla después de un rato entre dos láminas de celofan mojadas en la misma solución de glicerol, o conservar la capa en bolsas de polietileno cerradas.

6. Reconocimiento de alelos que codifican isoenzimas

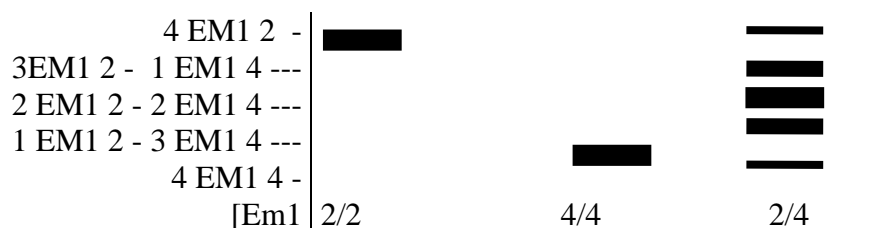
6.1. Reconocimiento de alelos que codifican ME

6.1.1. Interpretación genética de los zimogramas

Enzima	Estructura cuaternaria	Locus	Alelos
Enzima málico (ME)	Tetramérica	Me1	2 4

6.1.2. Esquematización de los zimogramas

Bandas



6.2. Reconocimiento de alelos que codifican PGD

6.2.1. Interpretación genética de los zimogramas

Enzima	Estructura cuaternaria	Locus	Alelos
6-Fosfogluconato deshidrogenasa (PGD)	Dimérica	Pgd1	2 4

6.2.2. Esquematización de los zimogramas

Bandas



Se pueden observar dos zonas de migración; sólo las bandas de más lenta migración son polimórficas.

6.3. Reconocimiento de alelos que codifican PGI

6.3.1. Interpretación genética de los zimogramas

Enzima	Estructura cuaternaria	Locus	Alelos
Fosfoglucoisomerasa (PGI)	Dimérica	Pgi2	2 4

6.3.2. Esquematización de los zimogramas

Bandas

PGI2 2 - PGI2 2 -	█		█
PGI2 2 - PGI2 4 ----			█
PGI2 4 - PGI2 4 ----		█	█
[Pgi2]	2/2	4/4	2/4

Se pueden observar dos zonas de migración, sólo se consideran las bandas de migración más lenta.

6.4. Reconocimiento de alelos que codifican ShDH

6.4.1. Interpretación genética de los zimogramas

Enzima	Estructura cuaternaria	Locus	Alelos
Sikimato deshidrogenasa	Monomérica	Shdh1	2 4

6.4.2. Esquematización de los zimogramas

Bandas

ShDH1 2	█		█
ShDH1 4			█
[Shdh1]	2/2	4/4	2/4

6.5. Reconocimiento de los alelos que codifican PGM

6.5.1. Interpretación genética de los zimogramas

Enzima	Estructura cuaternaria	Locus	Alelos
Fosfoglucomutasa	Monomérica	Pgm4	2 4

6.5.2. Esquematización de los zimogramas

Bandas



Pueden observarse varias zonas de migración, sólo la zona más rápida es polimórfica.

Codificando un enzima que coemigra con PGM4 4, existe otro gen que hemos designado como Pgm3, y que aún no ha sido estudiado.

Por eso los genotipos Pgm4 2/2 y Pgm4 2/4, presentan un zimograma de dos bandas. Estos dos genotipos difieren únicamente en la intensidad relativa de sus bandas.

[Fin del documento]