F

UPOV

TG/170/2(proj.)
ORIGINAL : anglais
DATE : 2001-01-09

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

PROJET

PRINCIPES DIRECTEURS

POUR LA CONDUITE DE L'EXAMEN DES CARACTÈRES DISTINCTIFS,

DE L'HOMOGÉNÉITÉ ET DE LA STABILITÉ

TRÈFLE SOUTERRAIN

(*Trifolium subterraneum*)

Ces principes directeurs doivent être interprétés en relation avec le document TG/1/2, qui contient des explications sur les principes généraux qui sont à la base de leur rédaction

TABLE DES MATIÈRES PAGE

I. Objet de ces principes directeurs 3

II. Matériel requis …..... 3

III. Conduite de l'examen 3

IV. Méthodes et observations 4

V. Groupement des variétés 4

VI. Caractères et symboles …..... 5

VII. Tableau des caractères 6

VIII. Explications du tableau des caractères …….... 20

IX. Littérature 23

X. Questionnaire technique 24

I. Objet de ces principes directeurs

Ces principes directeurs d'examen s'appliquent à toutes les catégories de *Trifolium subterraneum* (ssp. *subterraneum*, spp. *yanninicum* et ssp. *brachycalycinum*).

II. Matériel requis

1. Les autorités compétentes décident de la quantité de matériel végétal nécessaire pour l'examen de la variété, de sa qualité, ainsi que des dates et lieux d'envoi. Il appartient au demandeur qui soumet du matériel provenant d'un pays autre que celui où l'examen doit avoir lieu de s'assurer que toutes les formalités douanières ont été dûment accomplies. La quantité minimale de semences à fournir par le demandeur en un ou plusieurs échantillons doit être de :

100 g.

Les semences doivent au moins satisfaire les conditions minimales exigées pour la faculté germinative, la teneur en eau et la pureté aux fins de la commercialisation des semences certifiées dans le pays dans lequel la demande est faite. La faculté germinative doit être aussi élevée que possible.

2. Le matériel végétal ne doit pas avoir subi de traitement, sauf autorisation ou demande expresse des autorités compétentes. S'il a été traité, le traitement appliqué doit être indiqué en détail.

III. Conduite de l'examen

1. La durée minimale d'examen est en règle générale de deux cycles de végétation indépendants.

2. Les essais doivent être conduits en un seul lieu. Si ce lieu ne permet pas de faire apparaître certains caractères importants de la variété, celle-ci peut aussi être étudiée dans un autre lieu.

3. Les essais en plein champ doivent être conduits dans des conditions normales de culture. Le grain doit être semé dans la souche appropriée de Rhizobium. La taille des parcelles doit être telle que l'on puisse prélever des plantes ou parties de plantes pour effectuer des mesures ou des dénombrements sans nuire aux observations ultérieures qui doivent se poursuivre jusqu'à la fin de la période de végétation. Chaque essai doit porter sur 30 plantes isolées et peut en outre comporter 4 mètres de lignes. On ne peut utiliser de parcelles séparées, destinées l'une aux observations et l'autre aux mesures, que si elles sont soumises à des conditions de milieu similaires.

4. Parcelles de plantes isolées : chaque essai doit comporter 30 plantes par variété, réparties en deux, trois ou cinq répétitions, c'est-à-dire en parcelles de 15, 10 ou 6 plantes. Un nombre élevé de répétitions donne généralement de meilleurs résultats lorsqu'un petit nombre de variétés figurent dans l'essai.

5. Parcelles en ligne : chaque essai qui porte sur des parcelles en ligne doit comporter au moins quatre mètres de ligne répartis en deux répétitions de deux mètres chacune. La taille des parcelles doit être telle que des plantes ou parties de plantes puissent être prélevées pour effectuer des observations sans nuire aux évaluations visuelles qui doivent se poursuivre jusqu'à la fin de la période de végétation. La densité du semis doit être telle qu'on ait environ 150 plantes par mètre.

6. Il est possible d'établir des essais supplémentaires pour certaines déterminations.

IV. Méthodes et observations

1. Toutes les mesures pour la détermination des caractères distinctifs et de la stabilité doivent porter sur 30 plantes ou sur des parties de chacune des 30 plantes.

2. Pour l'évaluation de l'homogénéité, il faut appliquer une norme de population de 1% avec une probabilité d'acceptation d'au moins 95%. Dans le cas d'un échantillon de 30 plantes, le nombre maximal de plantes aberrantes toléré sera de 1.

3. Sauf indication contraire, toutes les observations sur la feuille doivent être effectuées sur les nouvelles feuilles complètement ouvertes, à 50% de la floraison (50% des plantes ayant au moins une fleur). Les observations sur les fleurs doivent être effectuées deux semaines après le stade de 50% de floraison. Les observations sur le fruit et la semence doivent être effectuées sur des plantes totalement mûres, fanées.

V. Groupement des variétés

1. La collection des variétés à cultiver doit être divisée en groupes pour faciliter la détermination des caractères distinctifs. Les caractères à utiliser pour définir les groupes sont ceux dont on sait par expérience qu'ils ne varient pas, ou qu'ils varient peu, à l'intérieur d'une variété. Les différents niveaux d'expression doivent être assez uniformément répartis dans toute la collection.

2. En premier lieu, la collection doit être divisée suivant les sous-espèces ci-après :

- *subterraneum*
- *yanninicum* ou
- *brachycalycinum*.

3. Il est recommandé aux autorités compétentes d'utiliser les caractères ci-après pour le groupement des variétés dans chaque sous-espèce :

a) foliole : disposition du dessin (caractère 6)
b) stipules : degré de coloration anthocyanique (dans la partie ombrée du feuillage) (caractère 29)
c) époque de début de la floraison (caractère 30)
d) tube du calice : distribution de la pigmentation (caractère 34)
e) tige : degré de pilosité (entre-nœud entre le troisième et le quatrième nœud de la plus longue branche principale (caractère 36)
f) semence : rampement des semences dures pendant quatre mois (caractère 43).

VI. Caractères et symboles

1. Pour évaluer les possibilités de distinction, d'homogénéité et de la stabilité, on doit utiliser les caractères indiqués dans le tableau des caractères, avec leurs différents niveaux d'expression.

3. Légende

(*) Caractères qui doivent être utilisés pour toutes les variétés, à chaque cycle de végétation au cours duquel les essais sont réalisés, et qui doivent toujours figurer dans la description de la variété, sauf si le niveau d'expression d'un caractère précédent ou les conditions de milieu régionales rendent cela impossible.

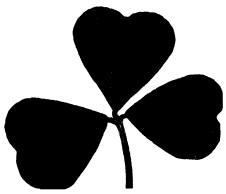
(+) Voir l'explication du tableau des caractères au chapitre VIII.

1) Observations sur : A = plantes isolées
B = parcelles en ligne
C = essais spéciaux

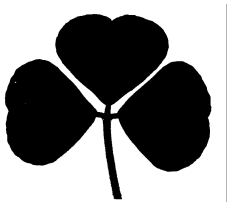
M = mensurations effectives
VG = évaluation visuelle fondée sur une seule observation faite sur un ensemble de plantes ou parties de plantes
VS = évaluation visuelle fondée sur des observations faites individuellement sur un certain nombre de plantes ou parties de plantes

VIII. Explication du tableau des caractères

Ad. 4 : Foliole : forme générale



1
triangulaire



2
triangulaire à ronde

3
ronde

Add. 7, 10, 16 : foliole : disposition du dessin

Seulement pour variétés avec bras : foliole : largeur des bras (caractère 7)

3
étroite
(A1)

5
moyenne
(A2)

7
large
(A3)

Seulement pour variétés avec bandes : foliole : largeur des bandes (caractère 10)

3
étroite
(B1)

5
moyenne

7
large
(B2)

Seulement pour variétés avec croissant : foliole : base du croissant (caractère 16)

1	2	3	4
(C1)	(C2)	(C3)	(C4)

Add. 26 à 28 : feuille : niveau d'isoflavones (formononétine, génistéine, biochanine A) avant le commencement de la floraison (pourcentage de matières sèches)

Estimation des niveaux d'isoflavones. La méthode est pour l'essentiel celle qui est illustrée dans Francis et Millington (1965). En résumé, la procédure est la suivante :

Échantillons

Des échantillons de feuilles fraîches sont prélevés sur des feuilles saines et récemment développées, avant la floraison. Douze disques de feuilles par variété sont pris à titre d'échantillon aux fins d'une analyse chimique. Un double de l'échantillon de 12 disques de feuilles est utilisé pour calculer le poids sec.

Extraction d'isoflavones

Les échantillons de feuilles utilisés pour l'analyse chimique sont mis à macérer dans des tubes à essai. Après les avoir laissés 15 minutes pour permettre l'hydrolyse des isoflavones liées, il faut ajouter 1 ml d'éthanol (qualité commerciale, pur). Les échantillons sont placés dans un bain-marie à agitation à 60 degrés pendant 10 minutes et l'extrait est transvasé dans des tubes à essai propres. La procédure d'extraction est renouvelée sur les résidus d'échantillons pour extraire éventuellement d'autres isoflavones. Cette solution est ajoutée à la première solution décantée et le volume total doit atteindre 2 ml, en ajoutant si nécessaire de l'éthanol. Pour concentrer l'échantillon, un sous-échantillon de 0,5 ml est prélevé avec une pipette et introduit dans de petits tubes à essai et placé dans un four à 40 ^{o}C jusqu'à évaporation totale de l'éthanol. Le sous-échantillon est ensuite dissous une nouvelle fois dans 0,2 ml d'éthanol de qualité commerciale.

Chromatographie

Une partie aliquote de 5 µl de chaque échantillon est versée goutte à goutte sur des plaques de chromatographie à émulsion mince de gel de silice 60 $F_{254.}$ Des gouttes de solutions standard contenant des concentrations connues des trois isoflavones sont aussi placées sur chaque plaque. La chromatographie est ensuite réalisée dans une solution 90:10 de chloroforme : méthanol. L'intensité des bandes d'isoflavone est mesurée sous une lampe à ultraviolets à 254 nanomètres par comparaison avec l'intensité des solutions standard.

Échantillons en poids sec

Les doubles des échantillons utilisés pour les calculs du poids sec sont séchés pendant 48 heures à 60 °C puis pesés.

Calculs

Le niveau de chaque isoflavone est calculé en pourcentage du poids sec.

Add. 43 : semence : taux de rampement des semences dures pendant six mois

Échantillons de semence

Des fruits totalement formés doivent être obtenus à partir de plantes récemment fanées. La production de semence doit avoir lieu dans des conditions d'irrigation ou de pluie adéquates mais ne se prolongeant pas excessivement. On détache doucement les semences des fruits par frottement, en prenant soin de ne pas érafler la surface des semences.

Procédure de laboratoire

400 semences de chaque échantillon sont humidifiées avec de l'eau et placées dans une armoire à 15 °C pendant 48 heures. Les semences germées sont comptées et mises de côté. Les semences dures restantes sont utilisées pour déterminer le taux de rampement. Elles sont placées pendant quatre mois dans une armoire dont la température varie de 15 à 60 °C en 24 heures. Les échantillons sont ensuite humidifiés avec de l'eau et placés dans une armoire à 15 °C pendant 48 heures. Les semences germées sont comptées. La proportion de semences dures restantes est calculée en pourcentage du nombre de semences dures de l'échantillon initial.

IX. Littérature

Dear, B.S. and Sandral, G.A. (1997). Subterranean clover in NSW – identification and use. Agfact P2.5.16, (2nd edition), NSW Agriculture, pp. 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, pp. 61.

X. Questionnaire technique

	Référence (réservée aux administrations)

QUESTIONNAIRE TECHNIQUE
à remplir en relation avec une demande de certificat d'obtention végétale

1.1	Espèce	*Trifolium subterraneum* TRÈFLE SOUTERRAIN	
1.2	Sous-espèces	*subterraneum* *yanninicum* *brachycalycinum* autre (préciser)	[ ] [ ] [ ] [ ]

2. Demandeur (nom et adresse)

3. Dénomination proposée ou référence de l'obtenteur

4. Renseignements sur l’origine, le maintien et la reproduction ou la multiplication de la variété

5. Caractères de la variété à indiquer (le chiffre entre parenthèses renvoie au caractère correspondant dans les principes directeurs d'examen; prière de marquer d'une croix le niveau d'expression approprié).

	Caractères	Exemples	Note
5.1 (6)	**Foliole : disposition du dessin**		
	seulement une paire de bras	Yarloop	1[ ]
	seulement une seule bande transversale	Nungarin	2[ ]
	un seul dessin central en forme de croissant	Mt Barker	3[ ]
	une paire de bras et un croissant	Seaton Park	4[ ]
5.2 (29)	**Stipules : degré de coloration anthocyanique (dans la partie ombrée du feuillage)**		
	nul ou très faible	Junne	1[ ]
	faible	Dalkeith, Goulburn	3[ ]
	moyen	Denmark, York	5[ ]
	fort	Daliak, Woogenellup	7[ ]
	très fort	Yarloop	9[ ]
5.3 (30)	**Époque de début de la floraison**		
	très précoce	Nungarin	1[ ]
	précoce	Dalkeith	3[ ]
	moyenne	Riverina, York	5[ ]
	tardive	Goulburn, Mt Barker	7[ ]
	très tardive	Tallarook	9[ ]

	Caractéristiques	Exemple	Note
5.4 (34)	**Tube du calice : distribution de la pigmentation**		
	sur le quart supérieur du calice		1
	sur la moitié du calice	Goulburn	2
	sur les trois quarts supérieurs du calice	Mt Barker, Nungarin, York	3
	sur tout le calice	Daliak	4
5.5 (36)	**Tige : degré de pilosité (entre-nœud entre le troisième et le quatrième nœud de la plus longue branche principale)**		
	nul ou très faible	Denmark, Gosse, Goulburn, Riverina	1[ ]
	faible	Nuba	3[ ]
	moyen	Daliak, Leura, York	5[ ]
	fort	Dalkeith, Nungarin, Seaton Park	7[ ]
	très fort		9[ ]
5.6 (43)	**Semence : rampement des semences dures pendant quatre mois**		
	très lent	Geraldton, Northam	1[ ]
	lent	Dalkeith, Nungarin, York	3[ ]
	moyen	Junee, Seaton Park	5[ ]
	rapide	Gosse, Goulburn	7[ ]
	très rapide	Mt Barker, Woogenellup	9[ ]

6. Variétés voisines et différences par rapport à ces variétés

Dénomination de la variété voisine	Caractère par lequel la variété voisine diffère [o)]	Niveau d'expression pour la variété voisine	Niveau d'expression pour la variété candidate

[o)] Au cas où les niveaux d'expression des deux variétés seraient identiques, prière d'indiquer l'amplitude de la différence.

7. Renseignements complémentaires pouvant faciliter la détermination des caractères distinctifs de la variété

7.1 Résistance aux parasites et aux maladies

7.2 Conditions particulières pour l'examen de la variété

7.3 Autres renseignements

8. Autorisation de dissémination

a) La législation en matière de protection de l'environnement et de la santé de l'homme et de l'animal soumet-elle la variété à une autorisation préalable pour la dissémination?

Oui [ ] Non [ ]

b) Dans l'affirmative, une telle autorisation a-t-elle été obtenue?

Oui [ ] Non [ ]

Si oui, veuillez joindre une copie de l'autorisation.

[Fin du document]