

DISCLAIMER

The present version of the national guideline has been accepted by the President of the CPVO for its use in technical examinations carried out on behalf of the CPVO or for the take-over of reports serving as a basis for a CPVO decision.

Protocole technique d'examen DHS

Distinction, Homogénéité, Stabilité

Trèfles Annuels

(Trifolium alexandrinum L, Trifolium incarnatum L, Trifolium michelianum Savi, Trifolium resupinatum L, Trifolium squarrosum L, Trifolium vesiculosum L.)

TRFOL_ALE, TRFOL_INC, TRFOL_MIC, TRFOL_RES, TRFOL_SQU,
TRFOL_VES

Version établie en juin 2019

DOCDHS/AGR/EFG/TA/PROTO/001/IND1

10 pages, 1 annexes

Création protocole

Sommaire

1. Conditions d'examen.....	1
2. Déroulement de l'examen	1
2.1. Collection de référence	1
2.2. Le matériel étudié	1
2.3. Dispositif expérimental et conduite culturale	1
2.3.1. Le dispositif	2
2.3.2. Mise en place et conduite culturale de l'essai.....	2
2.4. Les caractères observés.....	4
2.4.1. Les caractères observés en pépinière et/ou en lignes.....	4
2.5. Les caractères additionnels	8
2.6. Regroupement des variétés.....	8
2.7. Essais particuliers	8
2.8. Traitement des données	8
2.8.1. Appréciation de la Distinction.....	9
2.8.2. Appréciation de l'homogénéité.....	9
2.8.3. Appréciation de la stabilité	10
3. Visite des essais	10
4. Transmission des résultats d'examen	10

Annexe 1 : liste des caractères observés

1. Conditions d'examen

La recevabilité d'une demande d'examen est conditionnée par :

- le respect des dates des dépôts des dossiers
 - o 1^{er} juin (CTPS)
 - o 15 décembre (DEE),
- le respect des dates de fourniture des semences
 - o 1^{er} juillet (CTPS)
 - o 10 janvier (DEE),
- la fourniture des semences en qualité et quantité aux exigences requises
 - o 1kg quel que soit l'origine,
- la fourniture, par le service demandeur, des questionnaires techniques et administratifs au GEVES.

2. Déroulement de l'examen

2.1. Collection de référence

Confer paragraphe 2.1 du protocole général d'examen DHS « Groupe d'espèces agricoles ».

Renseignements complémentaires :

Les échantillons fournis doivent répondre au minimum aux normes appliquées aux semences certifiées. Ces normes sont décrites dans le Règlement technique de production et de contrôle publié par le GNIS-SOC.

Le nouveau lot est systématiquement comparé au lot initial de référence sur l'ensemble des caractères en végétation avant remplacement, au minimum sur un cycle et en dispositif lignes. En cas d'anomalie, une nouvelle fourniture est exigée par le service demandeur, à la demande du GEVES.

2.2. Le matériel étudié

Les variétés en étude sont essentiellement des variétés synthétiques ou des variétés populations. Le matériel étudié relève de deux statuts : les variétés candidates (en étude) et les variétés de la collection de référence. La collection de référence n'est pas systématiquement implantée dans son intégralité (Cf. 2.1. Collection de référence).

La quantité de semence à recevoir est de 1kg, non traitée.

2.3. Dispositif expérimental et conduite culturale

Le GEVES conduit les études de DHS sur deux cycles de huit mois et dans deux lieux :

L'Anjouère (Maine et Loire), lieu principal avec le dispositif de parcelles en lignes.

La Valette (Hérault), lieu secondaire avec un dispositif complémentaire de parcelles en lignes.

Pour chaque cycle, une implantation est réalisée sur chaque lieu. Ces implantations sont spécifiques des lieux et sont donc traitées différemment pour le suivi expérimental et la compilation des résultats.

2.3.1. *Le dispositif*

Pour chaque année d'implantation, deux dispositifs sont mis en œuvre :

Des parcelles en plantes isolées.

Pour l'évaluation des caractères mesurés, un effectif global de 60 plantes sur trois répétitions est identifié au sein du dispositif en ligne de sorte à observer ces mêmes 60 plantes à chaque caractère. L'écartement inter-plante est de l'ordre de 50 centimètres.

Dispositif de parcelles en lignes : ce dispositif est présent sur les deux sites. Il est destiné à apprécier les caractères qualitatifs par une densité de plantes plus représentative des conditions de culture de l'espèce.

Les dispositifs de parcelles en lignes sont différents suivant le lieu d'implantation :

L'Anjouère (49).

Cet essai comporte 3 répétitions de deux lignes de 4 mètres de long. La densité de semis est de l'ordre de 150 à 200 plantes au mètre linéaire. L'écartement inter parcelle est d'environ 0.30 mètre et l'écartement interligne est d'environ 0,50 mètre.

La Valette (34).

Cet essai comporte 3 répétitions de deux lignes de 2.75 mètres de long. La densité de semis est de l'ordre de 130 à 180 plantes au mètre linéaire. L'écartement inter parcelle est de l'ordre de 1 mètre et l'écartement interligne de 0.25 mètre.

Ces dispositifs incluent l'ensemble des variétés en étude et les variétés issues de la collection de référence comparables.

2.3.2. *Mise en place et conduite culturale de l'essai*

Implantation

Les dates d'implantation recherchées, **sous réserve que les conditions climatiques le permettent**, sont les suivantes :

Lieu	Semis en direct des lignes
L'Anjouère (49)	entre le 1 ^{er} et le 15 avril-
La Valette (34)	entre le 15 aout et le 15 septembre

Conduite culturale

La conduite de l'essai est classique. Le précédent cultural doit permettre une implantation de l'essai dans de bonnes conditions. La fertilisation apportée, en règle générale, est la suivante :

Essais sur le site de L'Anjouère

	Fertilisation azotée	Fertilisation phosphatée et potassique
Année d'implantation (année 1)	aucune	Environ 100 à 120 unités, fonction de la situation de la parcelle

Essais sur le site de La Valette

	Fertilisation azotée	Fertilisation phosphatée et potassique
Année d'implantation (année 1)	aucune	Environ 85 à 160 unités, fonction de la situation culturale de la parcelle

Les essais sont irrigués dans les deux lieux, après les semis de parcelles en lignes ou en cours de développement, si les conditions climatiques l'exigent.

Désherbage

On privilégie les binages mécaniques ou manuels pour permettre de maintenir les essais dans un état de propreté satisfaisant. Toutefois des désherbages chimiques peuvent être réalisés. On utilise, alors, des produits homologués et le choix des matières actives est établi sur la base des recommandations de la FNAMS ou d'ARVALIS.

Les produits pouvant avoir une influence sur le jugement DHS sont proscrits.

En fonction du type d'adventices concernés ou de l'espèce à protéger, les traitements sont réalisés sur l'ensemble de l'essai ou bien en application dirigée.

Entretien et coupes

Année 1 : Après la dernière notation de floraison, les variétés de l'essais devront être coupées pour permettre l'observation des derniers caractères du protocole.

2.4. Les caractères observés

Le protocole d'examen mis en œuvre comporte la liste des caractères à observer.

Il fait référence aux caractères nationaux (**annexe 1**), et est inspiré de descripteur d'offices homologues pour les différentes espèces étudiées en l'absence de principe directeur de l'UPOV et de protocole OCVV pour la conduite de l'examen des caractères distinctifs, de l'homogénéité et de la stabilité.

La liste des caractères observés inclut donc uniquement les caractères jugés pertinents pour décrire les variétés dans les conditions de cultures nationales.

2.4.1. Les caractères observés en pépinière et/ou en lignes

Couleur du tégument

(QL) Ce caractère est noté sur les graines.

Echelle de notation :	-jaune	1
	-violet	2
	-multicolore	3

Intensité de la couleur verte (avant floraison)

(QN) Cette observation est faite sur une estimation globale de chaque ligne, dans chaque répétition au stade feuilles étalées. (avant la floraison).

Echelle de notation :	-très claire	1
	-claire	3
	-moyenne	5
	-foncée	7
	-très foncée	9

Port à l'état végétatif (avant floraison)

(QN) Cette observation est faite sur une estimation globale de chaque ligne ainsi que sur chaque plante de la pépinière de plantes isolées, dans chaque répétition au stade feuilles étalées. (avant la floraison). L'observation consiste en une estimation visuelle de l'angle des tiges externes par rapport à une ligne horizontale

Echelle de notation :	-dressé	1
	-demi-dressé	3
	-moyen	5
	-étalé	7
	-très étalé	9

Hauteur à l'état végétatif (avant floraison)

(QN) Cette observation est faite sur une estimation globale de chaque ligne et correspond à la mesure de chaque plante de la pépinière de plantes isolées, dans chaque répétition au stade feuilles étalées. (avant la floraison).

Echelle de notation :	-très basse	1
	-basse	3
	-moyenne	5
	-haute	7
	-très haute	9

Epoque de début de floraison (quantième)

(QN) L'époque de début floraison se situe au moment où 10% des tiges de la plante ont au moins une fleur épanouie dans le dispositif de parcelles en ligne. Ce stade équivaut à la présence de 3 capitules fleuris par plante en pépinière de plantes isolées. La précocité de floraison est notée à raison de 2 à 3 passages par semaine et exprimée en quantième de l'année civile (au 1^{er} janvier).

Port à la floraison

(QN) Cette observation est réalisée dans le même temps que le caractère précédent dans les deux dispositifs. L'observation consiste en une estimation visuelle de l'angle des tiges externes par rapport à une ligne horizontale.

Echelle de notation :	-dressé	1
	-demi-dressé	3
	-moyen	5
	-étalé	7
	-très étalé	9

Longueur de la foliole médiane

(QN) Cette observation est réalisée à complet développement, à minima 1 à 2 semaines après la date moyenne de floraison et au niveau du 3^{ème} entrenœuds d'une tige représentative de chaque plante de la pépinière de plantes isolées.

Echelle de notation :	-très courte	1
	-courte	3
	-moyenne	5
	-longue	7
	-très longue	9

Largeur de la foliole médiane

(QN) Cette observation est réalisée sur les mêmes éléments que le caractère précédent.

Echelle de notation :	-très étroite	1
	-étroite	3
	-moyenne	5
	-large	7
	-très large	9

Ratio longueur/largeur de la foliole médiane

(QN) Cette observation est calculée à partir des deux caractères précédents.

Echelle de notation :	-très petit	1
	-petit	3
	-moyen	5
	-grand	7
	-très grand	9

Longueur de la tige

(QN) Cette observation est réalisée à complet développement, à minima 1 à 2 semaines après la date moyenne de floraison et au niveau du 3^{ème} entrenœuds d'une tige représentative de chaque plante de la pépinière de plantes isolées. Une estimation de cette longueur est effectuée sur le dispositif de parcelles en lignes en complément.

Echelle de notation :	-très courte	1
	-courte	3
	-moyenne	5
	-longue	7
	-très longue	9

Epaisseur de la tige

(QN) Cette observation est réalisée à complet développement, à minima 1 à 2 semaines après la date moyenne de floraison et au niveau du 3^{ème} entrenœuds de la même tige que le caractère précédent pour chaque plante de la pépinière de plantes isolées.

Echelle de notation :	-très fine	1
	-fine	3
	-moyenne	5
	-épaisse	7
	-très épaisse	9

Nombre d'entrenœuds de la tige

(QN) Cette observation est réalisée à complet développement, à minima 1 à 2 semaines après la date moyenne de floraison et au niveau du 3^{ème} entrenœuds de la même tige que le caractère précédent pour chaque plante de la pépinière de plantes isolées.

Echelle de notation :	-très courte	1
	-courte	3
	-moyenne	5
	-longue	7
	-très longue	9

Densité de la pilosité de la tige

(QN) Cette observation est réalisée à complet développement, à minima 1 à 2 semaines après la date moyenne de floraison et au niveau du 3^{ème} entrenœuds de la même tige que le caractère précédent pour chaque plante de la pépinière de plantes isolées.

Echelle de notation :	-très faible	1
	-faible	3
	-moyenne	5
	-élevée	7
	-très élevée	9

Forme de la foliole médiane

(PQ) Cette observation est réalisée à complet développement, à minima 1 à 2 semaines après la date moyenne de floraison et au niveau du 3^{ème} entrenœuds de la même tige que le caractère précédent pour chaque plante de la pépinière de plantes isolées ainsi que sur le dispositif de parcelles isolées de La Valette.

Echelle de notation :	-allongée	1
	-ovale	2
	-arrondie	3

Surface des marques foliaires blanches

(QN) Cette observation est réalisée à minima 1 à 2 semaines après la date moyenne de floraison et au niveau du 3^{ème} entrenœuds de la même foliole que le caractère précédent pour chaque plante de la pépinière de plantes isolées ainsi que sur le dispositif de parcelles isolées de La Valette.

Echelle de notation :	-nulle à très faible	1
	-faible	3
	-moyenne	5
	-forte	7
	-très forte	9

Intensité des marques foliaires blanches

(QN) Cette observation est réalisée à minima 1 à 2 semaines après la date moyenne de floraison et au niveau du 3^{ème} entrenœuds de la même foliole que le caractère précédent pour chaque plante de la pépinière de plantes isolées ainsi que sur le dispositif de parcelles isolées de La Valette.

Echelle de notation :	-nulle à très faible	1
	-faible	3
	-moyenne	5
	-forte	7
	-très forte	9

Hauteur naturelle de la repousse après coupe

(QN) Cette observation est réalisée 3 à 4 semaines après la coupe de postfloraison sur chaque dispositif.

Echelle de notation :	-très basse	1
	-basse	3
	-moyenne	5
	-haute	7
	-très haute	9

Intensité de la couleur verte après coupe

(QN) Cette observation est faite sur une estimation globale de chaque ligne, dans chaque répétition au stade feuilles étalées, au même stade que le caractère précédent.

Echelle de notation :	-très claire	1
	-claire	3
	-moyenne	5
	-foncée	7
	-très foncée	9

Port de la plante après coupe

(QN) Cette observation est faite sur une estimation globale de chaque ligne ainsi que sur chaque plante de la pépinière de plantes isolées, dans chaque répétition au même stade que le caractère précédent. L'observation consiste en une estimation visuelle de l'angle des tiges externes par rapport à une ligne horizontale

Echelle de notation :	-dressé	1
	-demi-dressé	3
	-moyen	5
	-étalé	7
	-très étalé	9

2.5. Les caractères additionnels

Tout caractère additionnel doit faire l'objet d'une étude de faisabilité technique et économique de la part du GEVES. Cette étude est soumise à l'approbation du service demandeur avant sa mise en œuvre. La réalisation des tests ou des analyses additionnels donne lieu à une facturation complémentaire.

2.6. Regroupement des variétés

Pour faciliter la détermination des caractères distinctifs, la collection variétale est structurée selon la précocité d'épiaison.

Les variétés en étude qui s'avèrent proches d'autres variétés seront dans la mesure du possible disposées à proximité des variétés à comparer dans au moins 2 répétitions sur les 3.

2.7. Essais particuliers

Pour une caractéristique particulière mentionnée par l'obteneur et non réalisée dans le cadre des observations du protocole DHS, des essais particuliers apportant une aide à la distinction peuvent être entrepris après accord du service demandeur.

Ces caractéristiques portent en général sur le comportement vis-à-vis de pathogènes en conditions contrôlées. Un test complémentaire aux essais pratiqués par le laboratoire de pathologie de la SNES peut être réalisé sous la forme d'essais codés chez le déposant de la variété candidate.

Un protocole d'étude est rédigé par le GEVES et mentionne notamment les témoins de référence. Le GEVES expédie sous forme codée les échantillons variétaux concernés ainsi que les différents témoins nécessaires à cette expérimentation. Le GEVES collecte les données et en assure l'analyse statistique (cf. 2.8.)

Le coût de ce test complémentaire incombe au demandeur.

2.8. Traitement des données

Les données individuelles font l'objet d'un traitement statistique. Le test mis en œuvre et les seuils de signification sont différents selon qu'il s'agit de caractères qualitatifs ou quantitatifs et également du type de dispositif (en pépinières ou en lignes).

L'analyse de ces tests permet au GEVES d'élaborer les rapports techniques établissant des propositions sur la Distinction, l'Homogénéité et la Stabilité.

2.8.1. *Appréciation de la Distinction*

Pour le dispositif en parcelles de plantes isolées

- Tests sur les caractères quantitatifs : une variété est déclarée distincte si à l'issue de l'étude, une différence significative au seuil $\alpha = 1\%$ est observée sur la base du test d'analyse statistique pluriannuelle (COY D) si le nombre de variétés dans l'essai est suffisant pour l'un des critères retenus.

Si le nombre de variétés n'est pas suffisant à l'application du test COYD, un test T est réalisé pour chaque cycle au seuil $\alpha = 1\%$. Une variété est déclarée distincte si à l'issue de l'étude la différence au seuil α est obtenue pour, à minima, 2 cycles d'études dans le même sens ($2 \times 1\%$).

- Tests sur les caractères QL : un test T est réalisé à l'issue. Une variété est déclarée distincte si une différence significative au seuil $\alpha = 1\%$ est observée pour un caractère et/ou si l'écart des moyennes est suffisant et de même sens cycle par cycle.
- Tests sur les caractères qualitatifs PQ : Une variété est déclarée distincte si une différence de note est présente.

La description de ces tests figure dans le document UPOV TG/ 1/3.

Pour le dispositif de parcelles en lignes

Une variété est déclarée distincte :

- si une différence supérieure à deux points (dans le même sens) est observée pour le ou les critères étudiés pendant au moins 2 cycles de végétation.
- si une différence égale à un points (minimum) est observée pour le ou les critères étudiés pendant 2 cycles de végétation lorsque les variétés sont observées « côte à côte » (en comparaison directe).

Autres tests ou essais particuliers

Une différence significative sera portée à la connaissance de la commission d'experts en complément des résultats de DHS de la variété en étude.

Si aucune de ces conditions n'est remplie, un complément d'étude est proposé au service demandeur.

* : la différence significative sera donnée en fonction du traitement des données le plus pertinent possible en rapport avec le test ou l'essai particulier.

2.8.2. *Appréciation de l'homogénéité*

Les variétés synthétiques, par leur mode de reproduction de type allogame, possèdent une variabilité génétique intra variétale qui, ajoutée aux effets du milieu et aux interactions « génotype x milieu », induit une assez grande hétérogénéité. L'homogénéité d'une variété candidate doit être vérifiée par rapport à celle des variétés de référence. Le test retenu et recommandé par l'UPOV, COY U, est basé sur l'estimation de la variabilité inter annuelle pour un caractère donné par comparaison entre la variété candidate et la moyenne des variétés de référence qui lui sont proches. La variété candidate ne doit pas être significativement plus hétérogène que les variétés de référence de son groupe. Le seuil de rejet à l'issue de l'expérimentation est fixé à 0,1 %. Le seuil d'acceptation après 2 années est de 1 %.

Toutefois, si le nombre de variétés dans l'essai est insuffisant l'utilisation de la COYU ne peut être fait, c'est la méthode de la variance relative qui est à utiliser. La valeur de la variance relative d'une candidate au seuil limite de $p=0.01$ est de 1.6 pour un effectif de 60 plantes.

Les documents de référence dans lesquels sont décrits les principes directeurs d'examen DHS sont le TG/1/3, le TGP/10 et le TGP/8.

2.8.3. Appréciation de la stabilité

La stabilité ne peut être vérifiée qu'après inscription, dans le cadre de la certification et/ou des renouvellement des lots initiaux ; la stabilité est cependant liée au degré d'homogénéité de la variété et à sa constitution génétique (nombre et nature des constituants, nombre de générations entre le matériel de départ et la génération commerciale.)

3. Visite des essais

Confer chapitre 3 du protocole général d'examen DHS « Groupe d'espèces agricoles ».

4. Transmission des résultats d'examen

Le rapport intermédiaire est établi entre décembre et début mars de la dernière année d'expérimentation pour les variétés dont l'étude est terminée.

Le rapport définitif est élaboré entre fin décembre et début avril de l'année (+1) d'expérimentation. Il est adressé au service demandeur.

Annexe 1 : liste des caractères observés

Espèce/Libellé du caractère	Type évaluation	N° National
Trèfle Alexandrie, Trèfle Incarnat, Trèfle Micheli, Trèfle de Perse		
Trèfle squarrosus, Trèfle vesiculosus		
Semence : couleur du tégument	QL-VG	1
Feuille : intensité de la couleur verte, avant floraison	QN-VG/VS	2
Plante : port à l'état végétatif, avant floraison	QN-VG/VS	3
Plante : hauteur à l'état végétatif, avant floraison	QN-MS	4
Plante : époque de floraison (G)	QN-MS/MG	5
Plante : port à la floraison	QN-VS/VG	6
Feuille : longueur de la foliole médiane	QN-MS	7
Feuille : largeur de la foliole médiane	QN-MS	8
Feuille : ratio longueur/largeur de la foliole médiane	QN-MS	9
Tige : longueur	QN-MS	10
Tige : épaisseur	QN-MS	11
Tige : nombre d'entrenœuds	QN-MS	12
Tige : densité de la pilosité	QN-VS	13
Feuille : forme de la foliole médiane	PQ-VS	14
Feuille : surface des marques foliaires blanches	QN-VS	15
Feuille : intensité des marques foliaires blanches	QN-VS	16
Plante : hauteur naturelle de la repousse après coupe	QN-MS	17
Feuille : intensité de la couleur verte après coupe	QN-VS	18
Plante : port après coupe	QN-VS/VG	19

Les caractères identifiés sont des caractères nationaux observés systématiquement, à chaque cycle de végétation, pendant la durée des essais. Il n'existe pas de protocole OCVV ni de recommandations UPOV.

Les caractères marqués de la lettre G, sont les caractères utilisés pour grouper et/ou exclure des variétés dans les essais en culture (**paragraphe 2.6**).

QL: Caractère qualitatif**

QN : Caractère quantitatif**

PQ : Caractère pseudo-qualitatif**

MG: mensuration unique d'un ensemble de plantes ou de parties de plantes

MS : mensuration d'un certain nombre de plantes isolées ou de parties de plantes

VG : évaluation visuelle fondée sur une seule observation faite sur un ensemble de plantes ou de parties de plantes

VS : évaluation visuelle fondée sur l'observation d'un certain nombre de plantes isolées ou de parties de plantes

** : Une explication des types d'expression des caractères (caractères qualitatifs, quantitatifs et pseudo-qualitatifs) est donnée dans l'introduction générale UPOV-TG/1/3